



Universitat de Lleida

Nuevas perspectivas en la diabetes mellitus tipo 2: buscando marcadores de lesión pulmonar, hipoxia nocturna, hiperactivación simpática durante el sueño y cronodisrupción

Carolina López Cano

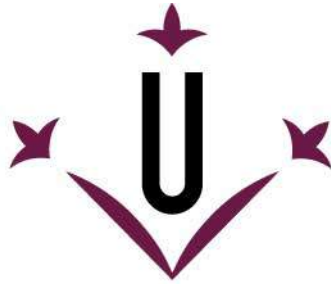
<http://hdl.handle.net/10803/670029>



Nuevas perspectivas en la diabetes mellitus tipo 2: buscando marcadores de lesión pulmonar, hipoxia nocturna, hiperactivación simpática durante el sueño y cronodisrupción està subjecte a una llicència de [Reconeixement-NoComercial-CompartirIgual 4.0 No adaptada de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Les publicacions incloses en la tesi no estan subjectes a aquesta llicència i es mantenen sota les condicions originals.

(c) 2020, Carolina López Cano



Universitat de Lleida

TESI DOCTORAL

**Nuevas perspectivas en la diabetes mellitus tipo 2:
buscando marcadores de lesión pulmonar, hipoxia
nocturna, hiperactivación simpática durante el sueño y
cronodisrupción.**

CAROLINA LÓPEZ CANO

Memòria presentada per optar al grau de Doctor per la Universitat de
Lleida
Programa de Doctorat en Salut

Director/a
Dr. ALBERT LECUBE TORELLÓ
Dr. FERRAN BARBÉ ILLA

Tutor/a
Dr. REINALD PAMPLONA GRA

ABREVIATURAS

AGE: productos finales de glicación avanzada
ARNm: ácido ribonucleico mensajero
CPAP: presión positiva continua en la vía aérea
CPT: capacidad pulmonar total
CT90: tiempo de sueño con saturación de oxígeno por debajo del 90%
CVF: capacidad vital forzada
DM: diabetes mellitus
DLCO: capacidad de difusión pulmonar
FEF25-75: flujo espiratorio máximo entre el 25-75% de la capacidad vital forzada
Gen BMAL1: de sus siglas en inglés, brain and muscle Arnt-like protein-1
Gen CLOCK: de sus siglas en inglés, circadian locomotor output cycles kaput
Gen CRY: de sus siglas en inglés, criptocromo
Gen PER: de sus siglas en inglés, period
Gen REV-ERB: de sus siglas en inglés, reverse erythroblastosis virus
Gen ROR: de sus siglas en inglés, retinoid-related orphan receptor
GLP 1: péptido 1 similar al glucagón
GH: hormona de crecimiento
HbA1c: hemoglobina glicosilada
HDL: lipoproteína de alta densidad
HIF: factor inducible por hipoxia
HOMA: homeostasis model assessment
IAH: índice de apneas e hipoapneas
IC: intervalo confianza
ICAM: molécula de adhesión intercelular
IGF-1: factor de crecimiento insulínico tipo 1
IMC: índice de masa corporal
IL: interleucina
LDL: lipoproteína de baja densidad
LFA/RFA: simpático- área de baja frecuencia /parasimpático- área de frecuencia respiratoria
OR: odds ratio
PEF: flujo espiratorio máximo
RAGE: receptores para los productos finales de glicación avanzada
REM: movimientos oculares rápidos
ROS: especies reactivas de oxígeno
SAHOS: síndrome de apneas e hipoapneas obstructivas del sueño
SGLT2: cotransportador sodio- glucosa tipo 2
SP-D: proteína D del surfactante
SP-A: proteína A del surfactante
TNF- α : factor de necrosis tumoral α
VCAM: molécula de adhesión vascular
VEF1: volumen espiratorio forzado en el primer segundo
VR: volumen residual
VV: vasa vasorum

*Do not let the day end without having grown a little,
without having been happy, without having increased your dreams.
Do not give up the desire to make your life something extraordinary.
Enjoy the panic that causes you the life you have ahead.
Do not let life happen to you without you living it.*
Walt Whitman

AGRADECIMIENTOS

Agradecer tendría que ser siempre sencillo, pero las experiencias se enmarcan en una etapa de vida con todo lo que traducen... y las palabras seguro serán insuficientes. Comenzaré disculpándome con aquellos que olvide mencionar en estas líneas: si han estado allí y hoy no los recuerdo, espero perdonen mi mala memoria y a pesar de todo, acompañen mis pasos.

Es obligado empezar por mi familia. A mis padres: si bien suena tópico, es sin duda real, que han determinado mi personalidad y mi trayectoria. Su lucha constante en este vendaval que han tenido por vida será siempre inspiradora. A mi hermana, por estar a mi lado invariablemente, en nuestros momentos eternos, a pesar del tiempo y a pesar de mí. A mis suegros, que aún en la lejanía, me hacen sentir su presencia y cariño. A Esteban, por obligarme a esta aventura en terrenos lejanos, que un día cualquiera se tornaron inveterados y entrañables. Gracias por su amor y apoyo en el día a día.

A mi director de tesis el Doctor Barbé, y a mi tutor el Doctor Reinald Pamplona, por su confianza en mí y por sacar un espacio en sus ajetreadas labores.

Al Doctor Lecube, al margen de su labor como director de tesis, no exagero cuando afirmo que sin él hubiese sido imposible. Muchísimas gracias por apostar diariamente por mí, por el trabajo incansable incluso en situaciones desprovistas de salud, por conducirme a nuevos retos que han ayudado a superarme.

Con especial afecto, a mis compañeros del Servei d'Endocrinología por todas sus enseñanzas en el ámbito de la especialidad... y de la vida. Gracias por la amistad, por soportarme en los avatares de estos últimos años. Gracias Lola Santos, Xavi Suárez, Marta Bueno, Pilar Ibars por vuestra compañía. A Ferran Rius y Marta Hernández, no olvido las jornadas de trabajo y las investigaciones clínicas que han marcado mi devenir.

Al primer jefe de servicio Didac Mauricio por impulsar mi formación, por las oportunidades brindadas.

A todo el grupo de investigación ODIM, en especial, Raquel Martí, Liliana Gutiérrez y Enric Sánchez que hicieron la tarea cotidiana más fácil y cuando menos amena e interesante.

Al servicio de Neumología y a la Unidad del sueño, por su colaboración constante y su labor más que fundamental en esta tesis.

Al personal de la UDETMA, a la Doctora Angels Betriu y a la Doctora Elvira Fernández por compartir amablemente sus conocimientos en aterosclerosis.

Al grupo de investigación DIAMET del Institut de Investigació Sanitaria Pere Virgili siempre prestos a iluminarnos con su sabiduría.

A nuestros grandes colaboradores del Institut de Recerca de Vall d'Hebron.

A mis amigos, y al Sr Roberto que ha musicalizado los momentos de escritura de estas páginas.

Y sobre todo a aquellos que son el fin, gracias a los pacientes que han hecho de mi una mejor profesional.

1.- ÍNDICE

1.- ÍNDICE	7
2.- RESUM	9
3.- RESUMEN	12
4.- SUMMARY	15
5.- INTRODUCCIÓN	18
5.- Diabetes Mellitus tipo 2	19
5.1.- Epidemiología	19
5.2.- Mecanismos etiopatogénicos	20
5.3.- Diabetes y riesgo cardiovascular	23
5.4.- Diabetes y enfermedad ateromatosa	24
5.5.- La vasa vasorum en el inicio de la enfermedad ateromatosa	25
6.- Impacto de la diabetes sobre la función pulmonar	26
6.1.- Cambios histológicos en el pulmón	26
6.2.- Resultados obtenidos en estudios poblacionales	28
6.3.- Duración de la diabetes y función pulmonar	30
6.4.- Función pulmonar y complicaciones “clásicas” de la diabetes	31
6.5.- Mecanismos fisiopatológicos implicados en el daño pulmonar	32
7.- Diabetes y síndrome de apneas e hipoapneas obstructivas del sueño	35
7.1.- Prevalencia del SAHOS en población con DM tipo 2	35
7.2.- Mecanismos fisiopatológicos implicados	37
7.3.- Efectos de la DM tipo 2 sobre la respiración nocturna	38
7.4.- Registro polisomnográfico en la DM tipo 2	39
7.5.- El impacto de la DM sobre la arquitectura del sueño	39
7.6.- Impacto clínico: somnolencia diurna y calidad del sueño	39
8.- Diabetes e hiperactivación simpática	41
8.1.- Hiperactivación simpática en la Dm tipo2	41
8.2.- Trastornos del sueño e hiperactivación simpática	43
9.- Diabetes y ritmos circadianos	44
10.- JUSTIFICACIÓN DE LOS ESTUDIOS DESARROLLADOS	48
11.- HIPÓTESIS	50
12.- OBJETIVOS	52
12.1.- Objetivo general	52
12.2.- Objetivos específicos	52
13.- RESULTADOS	55
13.1.- Estudio 1	56
13.2.- Estudio 2	70
13.3.- Estudio 3	79
13.4.- Estudio 4	98
13.5.- Estudio 5	116
14.- DISCUSIÓN GENERAL	121
15.- CONCLUSIONES	131
16.- PERSPECTIVAS DE FUTURO.....	133
17.- BIBLIOGRAFÍA	136

2.- RESUM

L'impacte negatiu de la diabetis mellitus (DM) tipus 2 sobre la funció pulmonar i la respiració durant el son ha adquirit un progressiu interès durant l'última dècada. La cerca de biomarcadors que permetin identificar els subjectes més vulnerables de patir aquesta complicació [Factor induïble per hipòxia (HIF-1 α) i les proteïnes sèriques A i D de l' surfactant pulmonar (SP-A i SP-D)], aprofundir en alguns dels mecanismes que poden explicar aquesta relació (hiperactivació simpàtica i cronodisrupció) i avaluar l'impacte sobre l'ateromatosis subclínica (densitat dels vasa vasorum carotidis) ens a permès desenvolupar els següents 4 estudis:

1.- Avaluar la influència de la DM tipus 2 i la hipòxia nocturna sobre l'activació simpàtica. Es va estudiar mitjançant marcadors en orina (metanefrines), marcadors sèrics [cortisol, insulina, glucagó, factor de creixement similar a la insulina-1 (IGF-1) i hormona de creixement (GH)] i variabilitat cardíaca. Per a això, es van avaluar 47 subjectes (36 pacients amb DM tipus 2 i 11 subjectes control). En els pacients amb Dm tipus 2 es va observar major concentració urinària de metanefrines durant la nit, a diferència del dia [247,0 (120,0-1375,0) vs. 210,0 (92,0-670,0), p=0,039]. Aquest augment de metanefrines es va associar amb una disminució de el to simpàtic en repòs i es va relacionar també amb la hipoxèmia nocturna (CT90).

2.- Aprofundir en la modulació que exerceix la presència de DM tipus 2 sobre l'expressió relativa de HIF-1 α i la cronodisrupció. En 129 subjectes (48% amb DM tipus 2) la diabetis es va associar amb una disminució de l'expressió de HIF-1 α i de l'expressió de diversos gens "rellotge" o relacionats amb la hipòxia [EPAS1 (HIF2A), CLOCK, ARNTL (BMAL1), RORA, PER1, PER2, PER3, CRY1, CRY2 i SUCNR]. La disminució en l'expressió d'aquests gens es va relacionar també amb el temps d' hipoxèmia nocturna (CT90) i un pitjor control metabòlic. Així, en aquells subjectes amb DM tipus 2 i major grau d' hipoxèmia nocturna, es presenta una resposta cel·lular aberrant que comporta una disminució en l'expressió relativa de HIF-1 α i una disminució en l'expressió dels gens rellotge, amb la consegüent desregulació en el ritme circadià cel·lular.

3.- Avaluar la concentració sèrica de les proteïnes A i D del surfactant pulmonar (SP-A i SP-D) com a marcadors de lesió pulmonar. Es va dur a terme un estudi transversal de casos i controls amb 127 pacients sense patologia pulmonar, 49 d'ells amb diabetis. Els pacients amb DM tipus 2 tenien una pitjor funció pulmonar, amb menor volum espiratori forçat en el primer segon (VEF1), capacitat vital forçada (CVF) i flux espiratori forçat 25-75 (FEF 25-75) que els subjectes sense

diabetis. La concentració sèrica de la SP-D va ser significativament major en els pacients amb DM tipus 2 [133,0 (35,4-815,8) *vs.* 97,6 (23,5-336,2) ng/ml; $p=0,006$] i es va associar amb els paràmetres de funció pulmonar [VEF1 i volum residual (VR)]. Per tant, la determinació de la SP-D circulant podria ser útil com a biomarcador per identificar pacients amb DM tipus 2 més vulnerables de presentar afectació pulmonar.

4.- Estudiar la influència de la hipòxia nocturna sobre la malaltia ateromatosa en fases inicials. Per a això es va determinar la densitat de vasa vasorum a l'adventícia carotídia de 55 pacients candidats a cirurgia bariàtrica (30,9% amb DM tipus 2). Els pacients amb síndrome d'apnees i hipoapnees obstructives de la son (SAHOS) van mostrar major densitat de vasa vasorum a l'adventícia carotídia ($0,801 \pm 0,125$ *vs.* $0,697 \pm 0,082$, $p=0,005$) i nivells sèrics més elevats de la molècula d'adhesió vascular (VCAM) tipus 1 ($745,2 \pm 137,8$ *vs.* $643,3 \pm 122,7$ ng/ml, $p=0,035$) que aquells sense SAHOS. A més, mostrem una relació positiva entre la hipòxia nocturna, intermitent [índex d'apnees i hipoapnees (IAH)] i crònica (CT90), la hiperglucèmia en dejú i la densitat de vasa vasorum.

Finalment, i persistint en la cerca de respostes als interrogants que planteja la relació entre DM tipus 2, funció pulmonar i respiració durant el son, també he tingut l'oportunitat de col·laborar en un treball de revisió recopilant la informació més rellevant per a la nostra recerca. Més enllà dels mecanismes fisiopatològics ben reconeguts (resistència a la insulina, inflamació crònica de baix grau, resistència a la leptina...) s'emfatitza en el dany microvascular i la neuropatia autònoma. També es va analitzar l'impacte de la DM de tipus 2 en la respiració del so.

3.- RESUMEN

El impacto negativo de la diabetes mellitus (DM) tipo 2 sobre la función pulmonar y la respiración durante el sueño ha adquirido un progresivo interés durante la última década. La búsqueda de biomarcadores que permitan identificar a los sujetos más vulnerables de sufrir esta complicación tardía [factor inducible por hipoxia (HIF-1 α) y las proteínas séricas A y D del surfactante pulmonar (SP-A y SP-D)], profundizar en los mecanismos que pueden explicar esta relación (hiperactivación simpática y cronodisrupción) y evaluar el impacto sobre la ateromatosis subclínica (densidad vasa vasorum) nos han permitido desarrollar los siguientes cuatro estudios:

1.- Evaluar la influencia de la DM tipo 2 y la hipoxia nocturna sobre la activación simpática. Ésta se estudió mediante marcadores en orina (metanefrinas), marcadores séricos [cortisol, insulina, glucagón, factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1) y hormona del crecimiento (GH)] y variabilidad del latido cardíaco. Para ello se evaluaron 47 sujetos (36 pacientes con DM tipo 2 y 11 sujetos control). En los pacientes con DM tipo 2 se observó mayor concentración urinaria de metanefrinas durante la noche, a diferencia del día [247,0 (120,0–1375,0) vs. 210,0 (92,0–670,0), $p=0,039$]. Este aumento de metanefrinas se asoció con una disminución del tono simpático en reposo y se relacionó también con la hipoxemia nocturna (CT90).

2.- Profundizar en la modulación que ejerce la presencia de DM tipo 2 sobre la expresión relativa de HIF-1 α y la cronodisrupción. En 129 sujetos (48% con DM tipo 2) la diabetes se asoció con una disminución de la expresión de HIF-1 α y de la expresión de diversos genes “reloj” o relacionados con la hipoxia [EPAS1 (HIF2A), CLOCK, ARNTL (BMAL1), RORA, PER1, PER2, PER3, CRY1, CRY2 and SUCNR]. La disminución en la expresión de estos genes se relacionó también con el tiempo de hipoxemia nocturna (CT90) y un peor control metabólico [control glucémico estimado mediante hemoglobina glicosilada (Hba1c)]. Así, en aquellos sujetos con DM tipo 2 y mayor grado de hipoxemia nocturna, se presenta una respuesta celular aberrante que conlleva una disminución en la expresión relativa de HIF-1 α y una disminución en la expresión de los genes reloj, con la consiguiente desregulación del ritmo circadiano celular.

3.- Evaluar la concentración sérica de las proteínas A y D del surfactante pulmonar (SP-A y SP-D) como marcadores de lesión pulmonar. Se llevó a cabo un estudio transversal de casos y controles con 127 pacientes sin patología pulmonar, 49 de ellos con diabetes. Los pacientes con DM tipo 2 tenían una peor función pulmonar, con menor volumen espiratorio forzado en el primer segundo (VEF1),

capacidad vital forzada (CVF) y flujo espiratorio forzado 25-75 (FEF 25-75) que los sujetos sin diabetes. La concentración sérica de la SP-D fue significativamente mayor en los pacientes con DM tipo 2 [133,0 (35,4-815,8) *vs.* 97,6 (23,5-336,2) ng/mL, $p=0,006$] y se asoció con los parámetros de función pulmonar [VEF1 y volumen residual (VR)]. Así, la determinación de la SP-D circulante podría ser útil como biomarcador que identifique a los pacientes con DM tipo 2 más vulnerables de presentar patología pulmonar.

4.- Estudiar la influencia de la hipoxia nocturna sobre la enfermedad ateromatosa en fases iniciales. Para ello se determinó la densidad de vasa vasorum en la adventicia carotídea de 55 pacientes candidatos a cirugía bariátrica (30,9% con DM tipo 2). Los pacientes con síndrome de apneas e hipoapneas obstructivas del sueño (SAHOS) mostraron mayor densidad de vasa vasorum en la adventicia carotídea ($0,801 \pm 0,125$ *vs.* $0,697 \pm 0,082$, $p=0,005$) y niveles séricos más elevados de la molécula de adhesión vascular (VCAM) tipo 1 ($745,2 \pm 137,8$ *vs.* $643,3 \pm 122,7$ ng/ml, $p=0,035$) que aquellos sin SAHOS. Además, mostramos una relación positiva entre la hipoxia nocturna, intermitente [índice de apneas e hipoapneas (IAH)] y crónica (CT90), la hiperglucemia en ayunas y la densidad de vasa vasorum.

Finalmente, y persistiendo en la búsqueda de respuestas para los interrogantes que plantea la relación entre DM tipo 2, función pulmonar y respiración durante el sueño, he tenido la oportunidad de colaborar en un trabajo de revisión recopilando la información más relevante para nuestra investigación. Más allá de los mecanismos fisiopatológicos bien reconocidos (resistencia a la insulina y a la leptina, inflamación crónica de bajo grado...) se enfatiza en el daño microvascular y la neuropatía autonómica. También, se ha analizado el impacto de la DM tipo 2 en la respiración durante el sueño.

4. - SUMMARY

The negative impact of type 2 diabetes mellitus (T2DM) on lung function and breathing during sleep has reached a progressive interest during the last decade. We have searched for biomarkers that allow identifying the most vulnerable subjects to develop this late complication [hypoxia-inducible factor (HIF-1 α) and serum surfactant proteins A and D (SP-A and SP-D)]. We have deepened in some of the mechanisms that can explain the lung and T2DM relationship (sympathetic hyperactivation and chronodisruption). Furthermore, evaluate the impact on subclinical atheromatosis (vasa vasorum density) have allowed us to develop the following studies:

1.- To evaluate the influence of T2DM and nocturnal hypoxemia on sympathetic activation. This association was studied using urine markers (metanephrines), serum markers [cortisol, insulin, glucagon, insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and growth hormone (GH)] and heartbeat variability. 47 subjects were evaluated (36 patients with T2DM and 11 control individuals). In the T2DM patients a higher urinary concentration of methanephrines was observed at night in comparison to day concentration [247.0 (120.0–1375.0) vs. 210.0 (92.0–670.0), $p=0.039$]. This increase in methanephrines was associated with a decrease in resting sympathetic tone and was also related to nocturnal hypoxemia (CT90).

2.- Deepen the modulation exerted by the T2DM presence in the relative expression of HIF-1 α and chronodisruption. In 129 subjects (48% with T2DM) diabetes was associated with a decrease in the expression of HIF-1 α and the expression of various “clock” genes or genes related to hypoxia [EPAS1 (HIF2A), CLOCK, ARNTL (BMAL1), RORA, PER1, PER2, PER3, CRY1, CRY2 and SUCNR]. The decrease in the expression of these genes was also related with the time of nocturnal hypoxemia (CT90) and a worse metabolic control [glycemic control estimated by glycosylated hemoglobin (Hba1c)]. Thus, in those subjects with T2DM and a higher degree of nocturnal hypoxemia, an aberrant cellular response is presented that implies a decrease in the relative expression of HIF-1 α and a decrease in the expression of the clock genes, with the consequent deregulation of the cell circadian rhythm.

3.- To assess the serum concentration of proteins A and D of the pulmonary surfactant (SP-A and SP-D) as markers of lung injury. A cross-sectional case-control study was carried out with 127 patients without pulmonary pathology, 49 of them with diabetes. Patients with T2DM had a worse lung function, with lower forced expiratory volume in the first second (FEV1), forced vital capacity (FVC) and forced expiratory flow 25-75 (FEF 25-75) than subjects without diabetes. The

serum concentration of SP-D was significantly higher in patients with T2DM [133.0 (35.4-815.8) *vs.* 97.6 (23.5-336.2) ng/mL, $p=0.006$] and was associated with lung function parameters [FEV1 and residual volume (VR)]. Thereby, the determination of circulating SP-D could be useful as a biomarker that identifies patients with T2DM most vulnerable to develop lung disease.

4.- To study the influence of nocturnal hypoxia on early stages of atheromatous disease. For this purpose, the density of vasa vasorum in the carotid adventitia of 55 patients' candidates for bariatric surgery (30.9% with T2DM) was determined. It was proved that patients with obstructive sleep apnea and hypopnea syndrome (SAHS) showed a higher density of vasa vasorum in the carotid adventitia (0.801 ± 0.125 *vs.* 0.697 ± 0.082 , $p=0.005$) and higher serum levels of the molecule vascular adhesion (VCAM) type 1 (745.2 ± 137.8 *vs.* 643.3 ± 122.7 ng/ml, $p=0.035$) than those without SAHS. In addition, we objetify a positive relationship between nocturnal, intermittent [apnea and hypoapnea index (AHI)] and chronic (CT90) hypoxia, fasting hyperglycemia and vasa vasorum density.

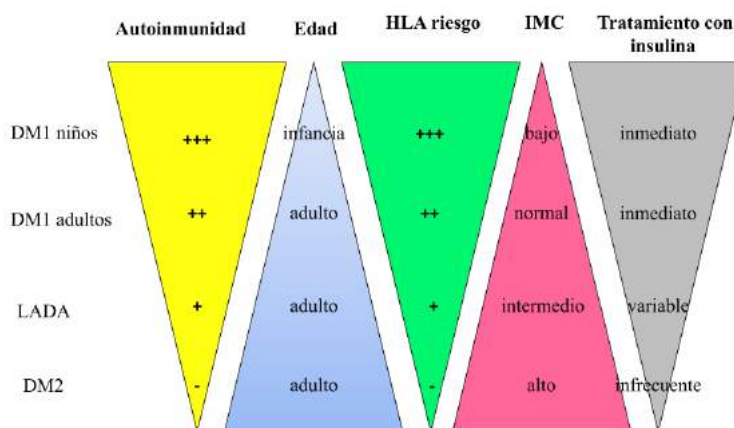
Finally, and persisting in the study of the characterization of the relationship between T2DM, lung function and breathing during sleep, I had the opportunity to collaborate in a review work gathering the most relevant information for our research. Beyond the well-recognized pathophysiological mechanisms (insulin and leptin resistance, chronic low-grade inflammation...), microvascular damage and autonomic neuropathy are emphasized. Also, the impact of T2DM on breathing during sleep has been analyzed.

5.- INTRODUCCIÓN

5.- DIABETES MELLITUS TIPO 2

La diabetes es un término que comprende varias enfermedades con presentación clínica heterogénea, caracterizadas por la presencia de hiperglucemia. Ésta se desencadena por diferentes mecanismos que resultan en un defecto de la secreción de insulina y/o una alteración en la acción de ésta (**Figura 1**). Se clasifica en base a su etiología, siendo la DM tipo 2 la forma más frecuente, con hasta un 90% de los casos. Suele diagnosticarse en la cuarta década de la vida y se relaciona con otros factores de riesgo cardiovascular, en especial la obesidad abdominal [1].

Figura 1. Espectro de las características clínicas de los diferentes tipos de diabetes (adaptado de Leslie et al. DMRR 2008). [2]

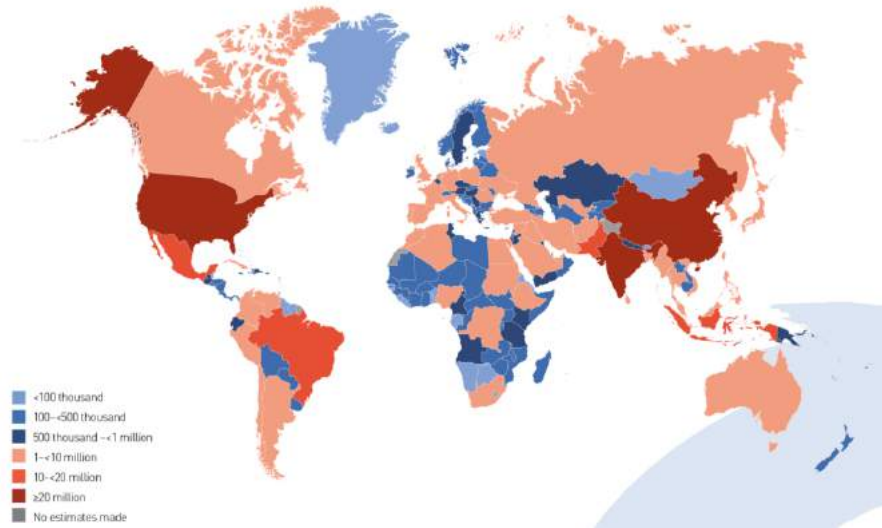


5.1.- Epidemiología

La DM tipo 2 se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial, siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad. Datos de la International Diabetes Federation estiman una prevalencia mundial de 8,8% entre los adultos de 20 a 79 años (**Figura 2**). Aunque estas cifras hacen referencia a todo tipo de diabetes, se calcula que el 85-95% de los casos son de DM tipo 2. Alrededor del 75% de los sujetos con diabetes viven en países con renta media o baja y la mayoría se encuentran entre la cuarta y quinta década de la vida. Si estas cifras ya son de por sí remarcables, la prevalencia global incrementa de forma progresiva en relación con el envejecimiento de la población, el mayor consumo de alimentos con alta densidad energética, el

sedentarismo, y el incremento del sobrepeso y la obesidad. Así, se estima que habrá 629 millones de personas de 20 a 79 años con diabetes en el año 2045. [3]

Figura 2. Número de personas entre 20 y 79 años con diabetes en 2019. [4]



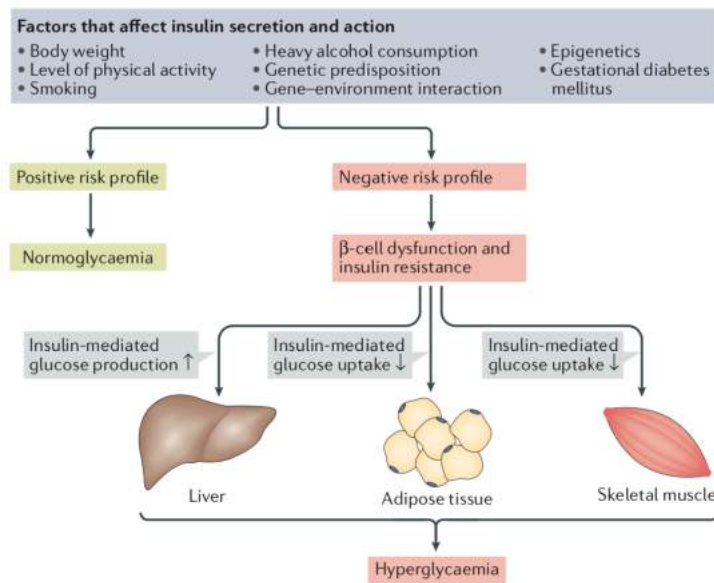
Uno de los aspectos más importantes de la epidemiología en la DM tipo 2 es el porcentaje de diabetes desconocida, que se estima en 212 millones de personas. Se ha descrito también una distribución geográfica relacionada probablemente con los recursos económicos de la región y la priorización de la detección de la diabetes en los programas de salud; así, en África, la prevalencia de diabetes no diagnosticada es del 69,2% y en países de renta alta se alcanza una prevalencia de 37,3%. En consonancia con el panorama global, la prevalencia de DM tipo 2 en España se sitúa en el 13,8%, que incluye un 6,01% de DM no conocida. Se describe una mayor prevalencia en el sur de España que se correlaciona, a su vez, con datos de mayor prevalencia de obesidad e hipertensión arterial. [5]

5.2.- Mecanismos etiopatogénicos

La etiopatogenia de la DM tipo 2 aún no está completamente dilucidada (**Figura 3**). Existe evidencia de su componente genético en relación con la obesidad y la resistencia a la insulina, generando diferente predisposición a la enfermedad en ciertos grupos étnicos. Así, en los indios Pima, se ha descrito una marcada agregación familiar, con tasas de incidencia de diabetes de hasta 40%

en familiares de primer grado, en comparación con una incidencia de 6% en la población general. [6] Estudios de asociación del genoma completo (GWAS: genome-wide association study) han identificado más de 70 loci de susceptibilidad para la diabetes: KCNJ11 (canal de potasio, subfamilia J), TCF7L2 (factor de transcripción 7), IGF2BP2 (proteína de unión al factor de crecimiento) y PPARG2 (receptor gamma activado por el proliferador de peroxisoma) entre otros. [7, 8]

Figura 3. Fisiopatología de la DM tipo 2. [9]

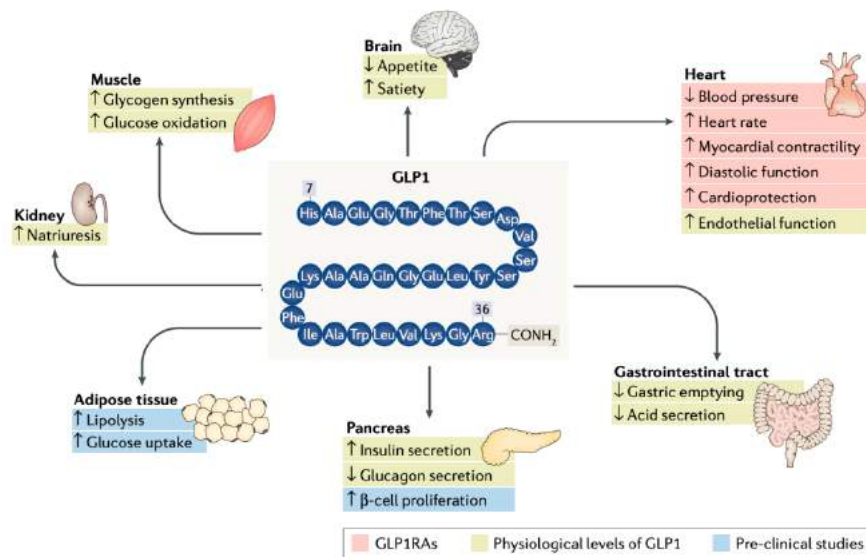


La fisiopatología de la DM tipo 2 se caracteriza por presentar algún grado de resistencia a la insulina en los tejidos periféricos (muscular, hepático y adiposo) con disminución del metabolismo y la captación de glucosa, además de una disfunción en la secreción de insulina. Los factores que intervienen en la alteración de la secreción de insulina son múltiples. Entre ellos destaca un proceso inflamatorio sistémico de bajo grado que conlleva a insulinitis y la existencia de estrés oxidativo y estrés del retículo endoplásmico, que desembocan en apoptosis de la célula beta. [10] Entre los trastornos de la secreción encontramos también descoordinación de las fases de secreción de insulina en respuesta a los niveles de glucosa y alteración en el procesamiento de la proinsulina. La resistencia a la insulina implica alteraciones en el

metabolismo de la glucosa y de los lípidos que se relacionan con la obesidad, el envejecimiento y la hipoxia. [11,12] También se asocia con sustancias liberadas por los adipocitos como la leptina y el factor de necrosis tumoral (TNF) α . [13] En el sistema nervioso central, la insulinoresistencia disminuye la producción de péptidos anorexígenos, estimulando la ingesta y favoreciendo la obesidad. Además, hay un aumento de gluconeogénesis hepática en relación con la inhibición de la cascada de señalización de la insulina y con el aumento de la secreción de glucagón en el período postprandial. [14]

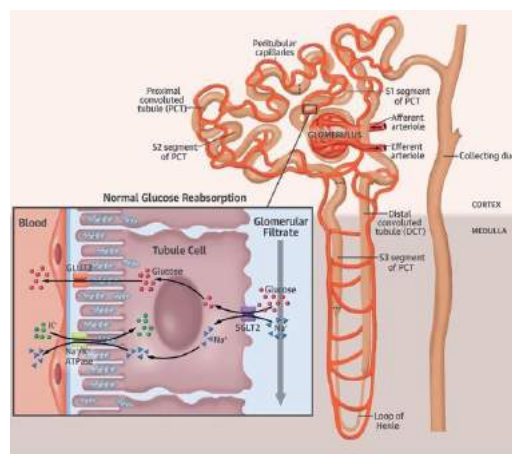
En las últimas décadas han emergido dos nuevos protagonistas en el desarrollo de la diabetes: el riñón y el eje entero pancreático. Las incretinas [péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) y péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP)] son hormonas gastrointestinales que estimulan la secreción de insulina y disminuyen la secreción de glucagón en respuesta a la ingesta de alimentos. Son, por lo tanto, esenciales en la regulación de la glucemia postprandial. En individuos con DM tipo 2, el efecto incretina está disminuido debido a alteraciones en la secreción (concentración) y función de las mismas. [15] Debe considerarse que el GLP 1 ejerce también efectos extra-pancreáticos, con expresión de receptores para el mismo en el riñón, sistema nervioso central, corazón, músculo liso, tejido adiposo y pulmón (**Figura 4**).

Figura 4. Efectos de GLP-1 en diversos tejidos. [16]



Por su parte, el riñón contribuye a la hiperglucemia mediante un aumento de la gluconeogénesis y reabsorción de glucosa en el túbulo contorneado proximal a través de los cotransportadores de sodio y glucosa, un receptor transmembrana, principalmente el tipo 2 (SGLT2) (**Figura 5**). En los individuos con hiperglucemia crónica existe una sobreexpresión de receptores SGLT2, con el consecuente incremento en la reabsorción de glucosa, que contribuye al deterioro de la función renal. [17,18]

Figura 5. Reabsorción de glucosa a nivel renal. [19]



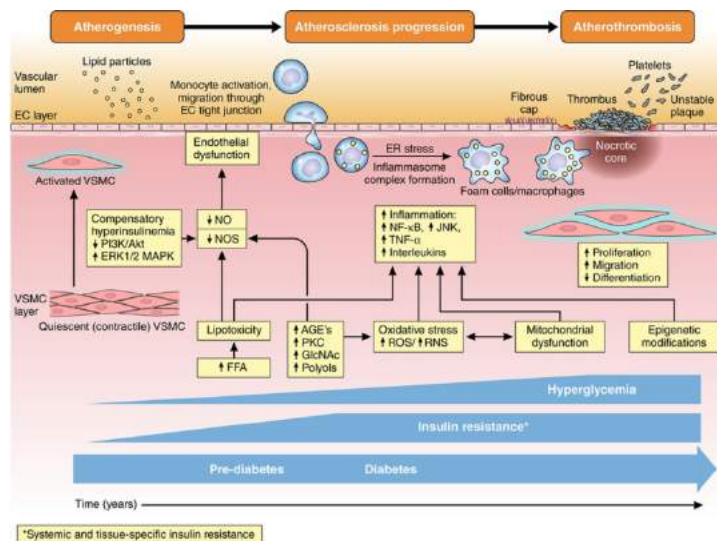
5.3.- Diabetes y riesgo cardiovascular

Es bien sabido el impacto negativo de la diabetes en la salud. Las complicaciones crónicas de esta enfermedad se asocian a la lesión microvascular en órganos diana que conlleva el desarrollo de retinopatía, nefropatía y neuropatía. Se favorece también la aparición de enfermedad macrovascular, con un riesgo aumentado de cardiopatía isquémica, ictus y enfermedad arterial periférica. Múltiples estudios prospectivos y registros de morbilidad poblacionales han mostrado que los pacientes con DM tipo 2 presentan un exceso de riesgo para enfermedad coronaria que persiste incluso tras la corrección de factores de riesgo clásicos como la obesidad, hipertensión arterial, dislipidemia (niveles de colesterol LDL) y hábito tabáquico. Por tanto, hoy en día, se considera que la DM tipo 2 es un equivalente de enfermedad cardiovascular. [20]

5.4.- Diabetes y enfermedad ateromatosa

El origen de los trastornos cardiovasculares en la diabetes parece ser el desarrollo de una aterosclerosis prematura. El estudio *Atherosclerosis Risk in Communities* (ARIC), un estudio longitudinal de cohortes diseñado para investigar las causas de la aterosclerosis y las enfermedades cardiovasculares, evidenció una relación directa entre la glucemia basal y el grosor íntima-media de la carótida. [21,22] El complejo proceso de aterosclerosis involucra una pérdida del equilibrio endotelial entre los factores vasoactivos que aseguran la permeabilidad y la integridad vascular, como el óxido nítrico y la angiotensina (Figura 6).

Figura 6. Representación de los mecanismos implicados en la progresión de la aterosclerosis. [23]



Esto lleva a la unión de células inmunitarias a la pared del vaso, formación de células espumosas y finalmente, proliferación de células musculares lisas y depósitos de matriz que forman la placa aterosclerótica. La pérdida de la homeostasis vascular en la DM tipo 2 no depende sólo de la hiperglucemia, también se debe al estrés oxidativo generado por la producción de productos finales de glicación avanzada (AGE), trastornos en la síntesis o liberación de óxido nítrico por el endotelio y alteraciones en el proceso de coagulación (disfunción plaquetaria e hipofibrinólisis). No hay mucha evidencia sobre la

resistencia a la insulina como causa de la disfunción endotelial; sin embargo, es un factor de riesgo que se asocia también a dislipidemia aterogénica e hipertensión arterial. [24,25] En sujetos con DM tipo 2 y un patrón de insulinoresistencia se ha observado un incremento en la inflamación a nivel endotelial, con mayor expresión de interleucina-6 (IL-6), de molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1) y de la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP 1); al igual que una marcada disminución en la biodisponibilidad de óxido nítrico. [26]

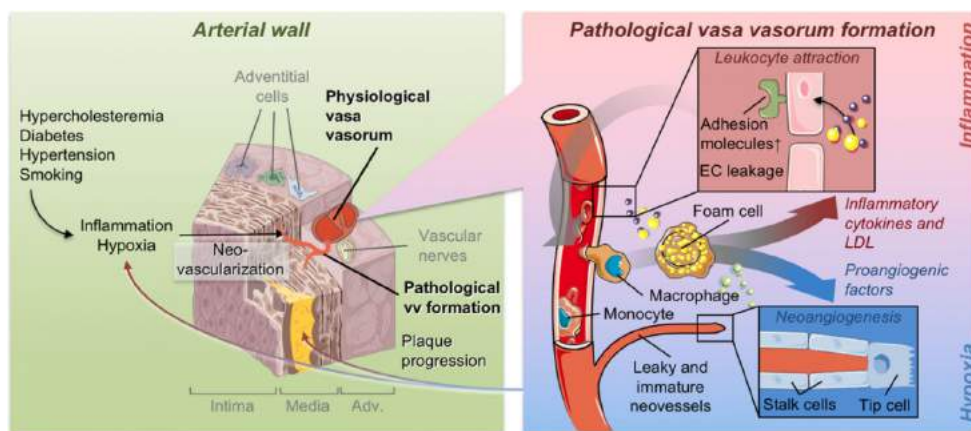
5.5.- La vasa vasorum en el inicio de la enfermedad ateromatosa

La aterosclerosis comprende una fase silente de duración variable, cuyo diagnóstico es fundamental para la correcta estratificación del riesgo de los individuos, y poder así implementar estrategias de prevención adecuadas. Existen diferentes métodos no invasivos para la detección de la aterosclerosis subclínica que difieren en costo y accesibilidad. El método más sencillo es el índice tobillo-brazo (ITB), que se obtiene midiendo la presión arterial sistólica mediante un ultrasonido doppler a nivel del tobillo. El método menos reproducible y estandarizado es la evaluación de la vasodilatación mediada por flujo que se determina midiendo el porcentaje de respuesta vasodilatadora post-isquemia en la arteria humeral mediante ecografía bidimensional. Por medio de técnicas de imagen como la tomografía axial computarizada (TAC) puede evaluarse la calcificación de las arterias coronarias, con la resonancia de alta definición podemos visualizar la anatomía y composición de la placa aterosclerótica, y con el estudio ecográfico medimos el grosor de la íntima media carotídeo (GIM), la presencia de placas, su volumen e incluso su composición. Así, por ejemplo, se ha demostrado que el incremento del GIM se asocia con mayor incidencia de enfermedades coronarias y cerebrovasculares. [27-29]

Sin embargo, hay cada vez mayor evidencia de que el incremento en el grosor de la íntima media no es la lesión aterosclerótica más precoz, sino que viene precedida por la proliferación de la vasa vasorum en la adventicia carotídea (**Figura 7**). La vasa vasorum son pequeños vasos sanguíneos que irrigan los vasos de mayor calibre. La presencia de noxas que actúan sobre la luz de la

pared arterial, como la hipoxia, estimula la proliferación de la vasa vasorum y su crecimiento perpendicular a la luz del vaso. La vasa vasorum se pueden estudiar mediante la ecografía con contraste de microburbujas de hexafluoruro de azufre, y estudios previos de nuestro grupo han demostrado un aumento de la vascularización de la adventicia carotídea en sujetos con DM tipo 2 en comparación con individuos sin diabetes. [30-32]

Figura 7. La vasa vasorum y su contribución a la formación de la placa de ateroma [33].



6.- IMPACTO DE LA DIABETES SOBRE LA FUNCIÓN PULMONAR

En los últimos años se ha descrito el desarrollo de complicaciones de la diabetes en órganos no clásicos, como por ejemplo la hipoacusia, el deterioro cognitivo y la disfunción pulmonar. El pulmón recibe todo el débito cardíaco a través de las arterias pulmonares, por lo que posee una importante red de vascularización. Además, la riqueza del parénquima pulmonar en fibras de colágeno y elastina lo convierte en potencial objeto de lesión en situación de hiperglucemia crónica. Investigaciones básicas y estudios poblacionales apuntan también a un efecto nocivo de la DM tipo 2 en el patrón de la respiración en el sueño con incremento de la hipoxemia nocturna.

6.1.- Cambios histológicos en el pulmón

El pulmón no se considera un órgano diana clásica en las complicaciones de la diabetes. Sin embargo, existe creciente evidencia de que ocurren trastornos

histológicos y fisiológicos similares a los presentes en otros órganos que finalmente alteran la función pulmonar en sujetos con DM tipo 2. [34-36] Estudios en modelos animales han descrito numerosos cambios histopatológicos, entre los que vale la pena destacar los siguientes:

i) Engrosamiento del epitelio alveolar y de la lámina basal del capilar pulmonar: En modelos de ratones con diabetes, tras la inyección de estreptozotocina, existe un aumento de las proteínas de la matriz, principalmente colágeno (tipo I y III) y fibras de elastina, y una disminución en la concentración de proteoglicanos de sulfato en el vaso pulmonar.

ii) La glicación no enzimática del colágeno que aumenta la rigidez de la matriz y la expresión tisular de citoquinas pro-fibrosis, resultando en una reducción de volumen pulmonar y de su compliance. [37,38]

iii) La reducción del espacio alveolar y presencia de enfisema centrolobulillar: En un modelo de rata obesa de Zucker se describe una morfología alterada de las células alveolares tipo II cuboidales (AT-II), que lleva a un trastorno en la producción de surfactante. Esto, sumado al aumento de la matriz extracelular, induciría un colapso parcial de los alvéolos. [39]

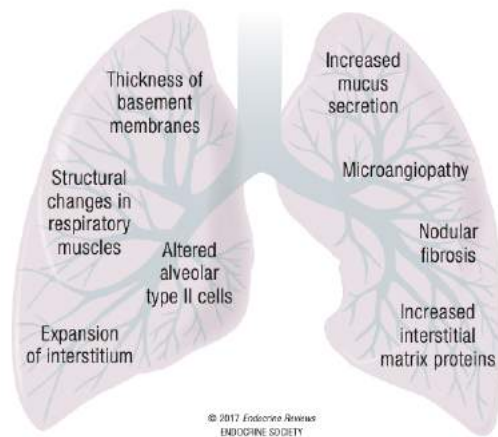
iv) Un mayor grado de fibrosis y modificaciones en la secreción del moco.

v) Alteraciones en los músculos respiratorios con atrofia muscular, aumento del depósito de lípidos, disminución de las mitocondrias y transformación de las fibras musculares.

La evidencia en humanos es más escasa y mucha proviene de la observación de autopsias (**Figura 8**). Así, la autopsia de 28 pacientes con DM tipo 2 confirmó la presencia de microangiopatía en el pulmón, incluyendo los vasos en septos

alveolares y pleura, así como engrosamiento de la membrana basal, hialinosis, plasmorragia e insudación. También, en estudios que comparan la histopatología de los pulmones de pacientes con DM tipo 2 con controles sin diabetes, se describe un incremento en el grosor de la pared del alveolo capilar y de la pared arteriolar, un aumento significativo de la concentración de colágeno en las paredes del alveolo y de los grandes vasos, junto con señales de hemorragia pulmonar. [40]

Figura 8. Alteraciones histopatológicas descritas en el pulmón de los sujetos con DM tipo 2. [41]



6.2.- Resultados obtenidos en estudios poblacionales

La asociación entre la DM tipo 2 y la función pulmonar se ha descrito en grandes estudios epidemiológicos, entre ellos: el *Fremantle Diabetes Study* [42], el *Framingham Heart Study* [43], el *British Women's Heart and Health Study* [44], el *Normative Aging Study* [45], el *Copenhagen City Heart Study* [46], el *Atherosclerosis Risk in Communities Study* (ARIC) [47] y el *Strong Heart Study* [48] (**Tabla 1**).

Tabla 1. Estudios transversales que evalúan la relación entre la DM tipo 2 y la alteración en la función pulmonar.

Autor	Año	Muestra	N	DM2 vs	DM2 vs
				no-DM2	no-DM2
				VEF	CVF
Barrett-Connor et al. 33	1996	Rancho Bernardo Study	1,239	↓	↓
Davis et al. 24	2000	Fremantle Diabetes Study	495	↓	↓
Lange et al. 30	2002	Copenhagen City Heart Study	12,062	↓	↓
Walter et al. 27	2003	Framingham Heart Study	3,254	↓	↓
Lawlor et al. 28	2004	British Women's Heart and Health Study	3,911	↓	↓
Litonjua et al. 29	2005	Normative Aging Study	704	↓	↓
Chance et al. 34	2008	Pacientes DM2 y no-fumadores	114	↔	↓
Yeh HC et al. 31	2008	Atherosclerosis Risk in Communities Study	11,262	↓	↓
Oda et al. 35	2009	Mujeres y hombres japoneses	2,608	-	↓
Yeh F et al. 32	2011	Strong Heart Study	2,396	↓	↓
Klein et al. 36	2012	Estudio clínico	4,164	↓	↓
Klein et al. 37	2016	Hispanic Community Health Study/Study of Latinos	14,455	↓	↓

Rancho Bernardo study [49], Chance et al [50], Oda et al [51], Klein et al [52], Hispanic Community Health Study [53].

Así, los estudios transversales han demostrado que los individuos con DM tipo 2 tienen menor capacidad vital forzada y valores de VEF1 más bajos, en un porcentaje que se sitúa entre el 8 y 10%, que los adultos sin DM tipo 2. En general, los estudios han evaluado cohortes relativamente grandes y han informado los resultados corregidos por factores de confusión como la edad, el sexo, el índice de masa corporal (IMC), el tabaquismo y la duración de la diabetes.

De forma prospectiva, el estudio ARIC, tras tres años de seguimiento, observó una disminución significativa de la CVF en 1100 pacientes con diabetes en comparación con el grupo control de 10.162 sujetos sanos de mediana edad. Además, el control metabólico de la diabetes se relacionó de manera rápida y gradual con la disminución absoluta de la CVF. [47] En el *Fremantle Diabetes Study*, en un grupo de 125 pacientes australianos no fumadores con DM tipo 2, después de siete años de observación, se reveló una disminución anual de VEF1 de 71 ml en comparación con una disminución de 25-30 ml en los controles sanos no fumadores. El estudio reveló también una correlación positiva y significativa entre la disminución de la CVF y una hemoglobina glicosilada

(HbA1c) basal más alta: por cada aumento del 1% en el nivel de HbA1c se observó una disminución de la CVF del 4% del valor predicho.[42]

Debe recordarse que un descenso de solo el 8% en el VEF1 se ha descrito como factor independiente de mortalidad en población general tras 29 años de seguimiento. [54] En la cohorte prospectiva poblacional del *Rancho Bernardo Study*, también se encontró que un descenso de aproximadamente 12% en el VEF1 se asociaba con hasta casi 2 veces más riesgo de muerte por enfermedad cardiovascular y muerte por enfermedad coronaria. [55] De forma similar, el descenso del 10% del mismo parámetro en sujetos con diabetes en el *Fremantle Diabetes Study* se asoció con mayor mortalidad tras solo 4 años de seguimiento. [42]

6.3.- Duración de la diabetes y función pulmonar

Las alteraciones en la función respiratoria asociadas con la DM tipo 2 preceden al diagnóstico de diabetes, lo cual sugiere que estas dos entidades comparten algunos de los mecanismos etiopatogénicos como la resistencia a la insulina y la inflamación crónica de bajo grado. Así, en el *Fremantle Diabetes Study*, la disminución en la función pulmonar se describió casi 3 años antes al diagnóstico de diabetes, y en el *Strong Heart Study* en nativos americanos también se detectó una función pulmonar deteriorada antes del desarrollo de síndrome metabólico o de la DM tipo 2. [42, 48] En el seguimiento a 4 años de esta última cohorte, se informó un aumento del 2% en el riesgo de incidencia de DM tipo 2 para cada disminución del 1% en los valores de CVF. Del mismo modo, en otra cohorte sueca se describió que una disminución en los valores de CVF y VEF1 predecían la incidencia de diabetes. [56] Esta asociación entre el deterioro de la función pulmonar y un nuevo diagnóstico de diabetes también se informó en el *Copenhagen City Heart Study* y en datos provenientes del *National Health and Nutrition Examination*. [46, 57]

La duración de la diabetes parece ser también un factor clave en el desarrollo de la disfunción pulmonar. Los resultados de disminución del VEF1 en el estudio ARIC se presentaron sólo en los sujetos con duración de la diabetes mayor a 10 años. Se observó también una asociación gradual inversa entre la CVF y el VEF1

y la gravedad de la diabetes (cuantificada según la duración de la diabetes y los medicamentos antidiabéticos prescritos). También, los datos del *Fremantle Diabetes Study* mostraron que era la duración de la DM tipo 2, y no el control glucémico, el factor que más se asociaba con la reducción de la función pulmonar, principalmente el VEF1 y el flujo espiratorio máximo (PEF).

6.4.- Función pulmonar y complicaciones “clásicas” de la diabetes

La inmensa red alveolo-capilar a nivel pulmonar es potencialmente susceptible al desarrollo de daño microangiopático. Pero las grandes reservas de su lecho microvascular, que se activan en caso de mayor demanda de oxígeno, favorecen la aparición de una microangiopatía subclínica y más tardía, a diferencia de otras complicaciones propias de la diabetes como la retinopatía y la nefropatía. [58]

Numerosos estudios han reportado pérdida de la reserva microvascular pulmonar y disminución en la ventilación alveolar, demostrado por una reducción en la capacidad de difusión pulmonar (DLCO), en pacientes con DM tipo 2. [59, 60] Chance et al describieron una disminución en el reclutamiento de capilares alveolares en 69 pacientes con DM tipo 2 en comparación con 45 individuos sanos; así, presentaban entre 10 y 25% menos flujo sanguíneo pulmonar y DLCO en el ejercicio. Estos hallazgos pulmonares se relacionaron con la HbA1C y la microangiopatía extrapulmonar, incluida la retinopatía y la microalbuminuria. [61] También, Klein y colaboradores, en un estudio transversal con 14455 individuos han descrito una disminución mayor de los parámetros espirométricos en los pacientes con nefropatía diabética (medida por excreción de albúmina en orina) en comparación con el grupo de pacientes sin microangiopatía renal. [53]

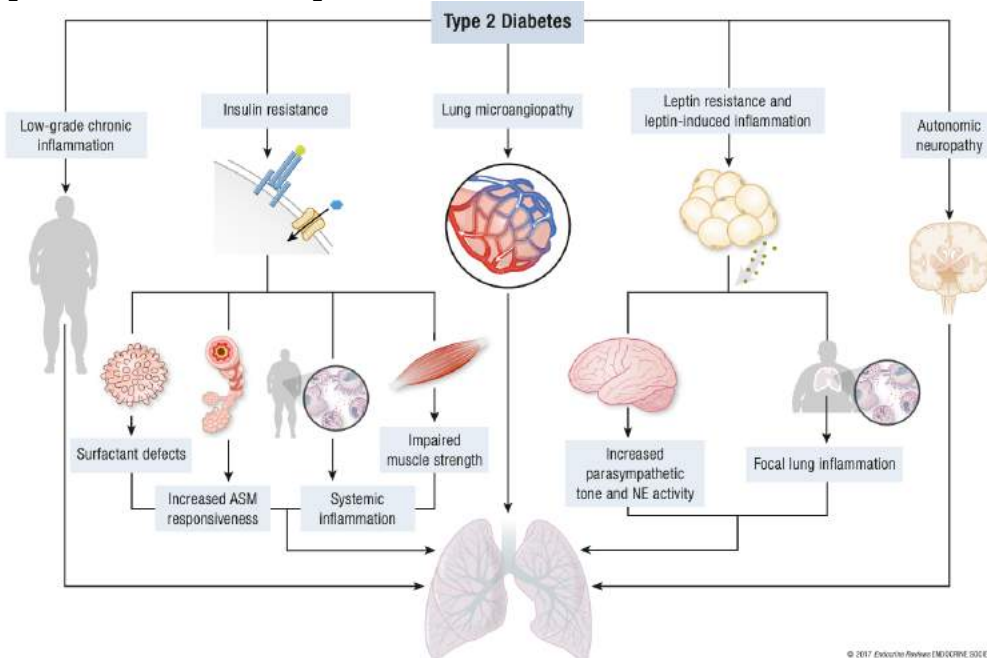
Otros estudios clínicos han mostrado una disminución de la DLCO en pacientes diabéticos, en especial en aquellos pacientes con retinopatía diabética o microalbuminuria. Esto sugiere que los procesos relacionados con la microangiopatía “clásica” en la DM tipo 2 también están involucrados en el daño pulmonar. [62-64]

6.5.- Mecanismos fisiopatológicos implicados en el daño pulmonar

Entre los mecanismos fisiopatológicos implicados en el deterioro de la función pulmonar en los pacientes con DM tipo 2 deben considerarse los siguientes (Figura 9):

i) La resistencia a la insulina: Es importante destacar que existen receptores de insulina en las células epiteliales alveolares tipo II. También se ha demostrado como la hiperinsulinemia aumenta la hiperreactividad de las células del músculo liso de las vías respiratorias, además de incrementar su proliferación y su contractilidad. De igual manera, existe evidencia en la resistencia a la insulina de una reducción de la función mitocondrial en el músculo esquelético con la consecuente disminución de la fuerza muscular. [65,66] Estudios transversales han mostrado una asociación negativa entre el índice de resistencia a la insulina en ayunas y una disminución significativa de la CVF y el VEF1, incluso tras la corrección por factores de confusión como peso, edad, tabaquismo y actividad física. [67,68]

Figura 9. Mecanismos patogénicos responsables de disfunción pulmonar en la DM tipo 2.



ASM, músculo liso de las vías respiratorias; NE, neutrófilos elastasa. [41]

ii) La inflamación crónica de bajo grado: En el estudio transversal de Dennis et al, se evaluaron 495 sujetos con DM tipo 2 evidenciándose una asociación inversa entre la CVF y el VEF1 con la glucemia y ciertos marcadores de inflamación como la PCR (proteína C reactiva), la interleucina 6 (IL-6) y el recuento de glóbulos blancos. Esta fuerte asociación inversa permaneció después del ajuste por edad, sexo, componentes del síndrome metabólico y nivel de condición física. [69] Además, Lecube et al encontraron una relación entre los niveles circulantes del receptor soluble 1 del factor de necrosis tumoral (TNF) α y la reducción de los volúmenes pulmonares en 31 mujeres con obesidad mórbida sin enfermedad respiratoria clínicamente reconocida. Esto sugiere que el TNF- α es un factor patogénico temprano en la disfunción pulmonar. [70]

iii) Resistencia a la leptina. La leptina, hormona proteica secretada principalmente en el tejido adiposo, tiene una estructura similar a las citoquinas y una actividad proinflamatoria. Es probable que esta función inflamatoria sea el nexo de unión entre la concentración elevada de leptina y su acción negativa en el calibre de las vías respiratorias mediante la inducción de lesión epitelial focal, desaparición de las vías respiratorias pequeñas y consecuente enfisema centrolobulillar. Un aumento de la concentración de leptina se ha descrito en hombres y mujeres caucásicos no obesos con disfunción pulmonar. Y en individuos con VEF1 normal de un estudio anidado de casos y controles del personal del Departamento de Bomberos de Nueva York, la elevación en las concentraciones de leptina fue un factor de riesgo de mayor susceptibilidad al deterioro de la función pulmonar. Así, la resistencia a la leptina se ha relacionado con un desbalance entre la antitripsina alfa-1 y la actividad de la elastasa neutrofílica, produciendo una hiperactividad de la elastasa que puede degradar las proteínas del tejido pulmonar y provocar trastornos pulmonares; entre ellos un aumento del tono parasimpático causante de broncoconstricción. [71-74]

iv) La glucosilación no enzimática de las proteínas del tejido conectivo pulmonar. Como se ha comentado más arriba, el pulmón es un

órgano rico en fibras de colágeno, elastina y fibronectina. [75, 76]. Quizás la proteína con un papel más primordial sea el colágeno, que al glicosilarse, presenta una tasa baja de recambio fisiológico secundario a un incremento en la resistencia a su digestión por la colagenasa y la pepsina. [77] Este cambio en su estructura resulta nocivo para el parénquima pulmonar, aumentando su rigidez, así como el de los cartílagos de la pared torácica. [78] Esta alteración en la mecánica ventilatoria también se ha descrito en estudios clínicos donde pacientes con DM insulino dependiente y movilidad articular limitada mostraron una disminución significativa en la capacidad pulmonar total, la CVF y el VEF1 en comparación con pacientes sin trastornos articulares. Todo ello sugiere una afección generalizada en el metabolismo del colágeno en los pacientes con diabetes. [79] Además, la glucosilación de proteínas perpetua el estado inflamatorio a nivel local. Las células epiteliales alveolares tipo II expresan específicamente el ARNm de los receptores para AGE (RAGE). Así, la ligación AGE-RAGE activa las cascadas fisiopatológicas que condicionan efectos pro-inflamatorios que finalmente conducen a la disfunción de las células endoteliales pulmonares y la apoptosis celular. [80,81]

v) Las alteraciones en la capa de surfactante pulmonar. La capa de surfactante bronquiolar reduce la tensión superficial en la interfase aire-líquido y es esencial para mantener la superficie de intercambio gaseoso y el diámetro de las vías respiratorias. Se han identificado cuatro proteínas asociadas al surfactante que determinan su compleja estructura y su actividad. Cuando se daña la barrera alveolo-capilar, las 2 proteínas del surfactante con mayor capacidad tensoactiva, las proteínas D y A del surfactante (SP-D y SP-A), escapan del espacio alveolar hacia el compartimento vascular permitiendo su medición sérica. Así, la concentración sérica de SP-D se ha evaluado en enfermedades pulmonares y enfermedades sistémicas con afectación pulmonar, evidenciando un incremento en la concentración de SP-D en exacerbaciones de asma, bronquitis crónica, episodios de neumonía bacteriana y en distrés respiratorio, con una disminución de la misma al mejorarse la dinámica pulmonar. [82-84]

Por otro lado, se ha hallado una relación entre biomarcadores de lesión intersticial pulmonar y la alteración del metabolismo glucídico. Así, en un

estudio poblacional en la cohorte japonesa Tanno-Sobetsu se encontró que los niveles elevados de KL-6 (Krebs von den Lungen-6) está asociada con el riesgo de desarrollar resistencia a la insulina y diabetes mellitus de nueva aparición. [85] Mientras, Fernández-Real et al. en un estudio con 164 individuos de sexo masculino, describieron un aumento de los niveles circulantes de la proteína A del surfactante que se asoció con intolerancia a la glucosa e insulinoresistencia, independiente de la edad, el IMC y el tabaquismo. Así, niveles circulantes elevados de SP-A reflejan cambios en la permeabilidad pulmonar y pueden conducir a un aumento en la resistencia de la vía aérea. [86]

vi) El péptido 1 similar al glucagón (GLP-1), hormona peptídica de la familia de las incretinas, que se encuentra alterada en su concentración y metabolismo en la DM tipo 2, presenta un número abundante de receptores en el pulmón. Estudios experimentales han encontrado una asociación entre el GLP-1 y la regulación de la fracción lipídica del surfactante y la estimulación de la producción del mismo por los neumocitos. [87,88] Por lo tanto, el déficit subyacente en las concentraciones de GLP-1 que existe en la DM tipo 2 también podría incrementar la resistencia de la vía aérea observada en estos pacientes. En modelos animales de ratones con hipoplasia pulmonar se ha mejorado la función pulmonar tras de la administración de GLP-1. De hecho, en un modelo de rata con hipoplasia pulmonar, la producción de surfactante se mejoró mediante la administración de liraglutide, un fármaco agonista del receptor GLP-1. [89] También, en un modelo de rata con diabetes inducida por estreptozotocina, se logró el restablecimiento de los niveles pulmonares de surfactante A y B tras de la administración de liraglutide. [90]

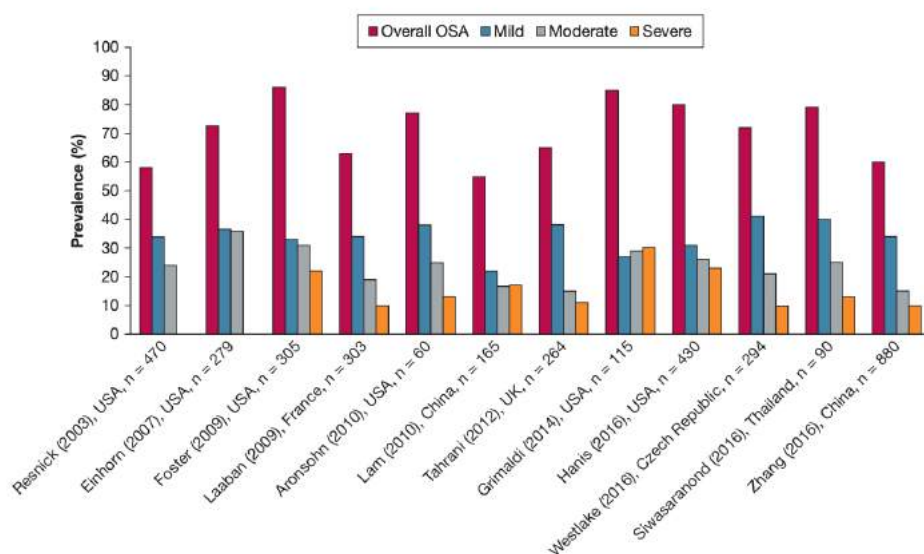
7.- DIABETES Y SÍNDROME DE APNEAS E HIPOAPNEAS OBSTRUCTIVAS DEL SUEÑO

7.1- Prevalencia del SAHOS en población con DM tipo 2

Cada vez existe mayor evidencia del efecto negativo de la diabetes sobre la respiración durante el sueño, con estudios que muestran el doble de prevalencia

de SAHOS en pacientes con DM tipo 2 en comparación con la población general. El SAHOS se caracteriza por episodios de 10 segundos de duración de reducción del flujo aéreo en relación con el colapso de la vía aérea superior (apneas) y/o una reducción del flujo aéreo de al menos 50% con disminución de la saturación de oxígeno mayor del 3% (hipoapneas). El principal síntoma es la hipersomnolencia diurna con alteración en la calidad de vida y lo que es más importante, un incremento en la morbilidad y en la mortalidad de causa cardiovascular. [91,92] La prevalencia exacta del SAHOS en población general es difícil de saber con exactitud, pues no siempre se utilizan los mismos métodos para su estudio ni los mismos puntos de corte para definir su presencia y gravedad. En cualquier caso, sabemos que la prevalencia es alta en la población general, mayor en las edades más avanzadas, en los hombres y en aquellos con un IMC más elevado. [93] Así, la prevalencia de este trastorno en población de edad media oscila entre 2 y 7% en mujeres y entre 9 y 14% en varones, incrementándose en sujetos con obesidad hasta por encima del 58%. En individuos con DM tipo 2 se ha reportado una prevalencia de SAHOS de 23%, que puede llegar a superar el 80% en aquellos sujetos que también presentan obesidad mórbida (**Figura 10**). [94]

Figura 10. Prevalencia de SAHOS en pacientes con DM tipo 2, tanto de forma global como por su gravedad (leve, moderado, grave). [95]



7.2 Mecanismos fisiopatológicos implicados

Los mecanismos fisiopatológicos que se encuentran tras los trastornos respiratorios del sueño en la DM tipo 2 son diversos. Investigaciones previas han demostrado un patrón alterado de respuesta ventilatoria a la hipercapnia, con 3 veces menor respuesta a la hipoxia en pacientes con DM tipo 2 en comparación con sujetos sanos. La respuesta ventilatoria a la hipoxia depende de múltiples factores que se han descrito afectados en la diabetes: el feed-back de los quimiorreceptores, la actividad de los centros respiratorios en la médula espinal, la conducción neuronal aferente y eferente, y la función de los músculos respiratorios. [96, 97] También existen otros mecanismos de control ventilatorio:

i) La leptina, cuya concentración sérica es mayor en sujetos obesos con SAHOS y en la DM tipo 2, participa en el control de la ventilación central y en el tono muscular de la vía aérea. Así, la resistencia en la leptina observada en estos pacientes se ha asociado con desregulación de la ventilación central. [98,99]

ii) La inflamación de bajo grado presente en la DM tipo 2, presenta una conexión con el control central de los impulsos respiratorios y el tono de la vía aérea. El aumento de los niveles de citoquinas causado por la insulinoresistencia condiciona un efecto perjudicial en el control respiratorio central, especialmente relacionado con la elevación de los niveles del TNF- α y la IL-6. Así, el tratamiento con etanercept, un inhibidor de TNF- α , disminuyó la somnolencia y el número de apneas en sujetos obesos con SAHOS que participaron en un estudio piloto doble-ciego comparado con placebo. Esto refuerza la hipótesis que las citoquinas proinflamatorias contribuyen a la patogénesis del SAHOS. [100]

iii) La neuropatía autonómica. Mediante mediciones directas del nervio simpático muscular se ha evidenciado una mayor actividad simpática en pacientes con SAHOS. Esta hiperactivación persiste durante el día en los pacientes con SAHS y se ha observado la reducción de ésta

tras la instauración de tratamiento con CPAP. Así, estas alteraciones en las fibras nerviosas autonómicas pueden determinar también un deterioro en los reflejos de la vía aérea superior. [101-103]

iv) La resistencia a la insulina. Varios estudios en poblaciones con obesidad han evidenciado una asociación entre la resistencia a la insulina y la apnea del sueño. Así, como Ramadan *et al.* demostraron que la hiperinsulinemia desarrollada en ratas no obesas, tras ser alimentadas con una dieta alta en grasas, aumentaba la incidencia de apneas. De igual manera, el tratamiento de estos animales con metformina, un fármaco capaz de reducir la resistencia a la insulina, era capaz no solo de prevenir sino también de corregir los eventos de apneas. [104]

7.3.- Efectos de la DM tipo 2 sobre la respiración nocturna

La DM tipo 2 ha mostrado ser un factor de riesgo independiente para la aparición de hipoxemia nocturna grave. [105] Un análisis de datos transversales del *Sleep Heart Health Study*, encontró que los sujetos con DM tipo 2 tenían una disfunción del control central de la ventilación y un nivel más grave de hipoxemia durante el sueño. [106] De hecho, la duración del tiempo de sueño con saturación de oxígeno por debajo del 90% (CT90) fue de 3 a 4 veces mayor en pacientes con DM tipo 2 en comparación con sujetos no diabéticos emparejados de acuerdo con su IMC. También, se observaron diferencias estadísticamente no significativas en el índice de alteraciones respiratorias (apneas e hipoapneas) entre las personas diabéticas y no diabéticas.

Datos pendientes de publicación del estudio *Sweet Dreams* llevado a cabo por nuestro grupo evidencian un efecto positivo de la mejoría del control glucémico sobre la función respiratoria del sueño. Así, en una treintena de pacientes con DM tipo 2 y SAHOS tras un seguimiento aproximado de 5 meses, se evidenció un descenso significativo del IAH y del CT90 en aquellos sujetos que mejoraron su HbA1c en más de un 0,5 %. En un estudio previo de casos y controles, en 30 sujetos con DM tipo 2 se demostró una reducción significativa en el número de

desaturaciones nocturnas días tras la mejoría del control glucémico durante solo 5 días. [107]

7.4.- Registro polisomnográfico en la DM tipo 2

En 2015, el estudio *Sweet Sleep* describió que pacientes con DM tipo 2 presentaban un patrón de respiración durante el sueño diferente al de los sujetos sin diabetes. La diferencia más importante era que ante el mismo índice de apneas-hipoapneas (IAH), los pacientes con DM tipo 2 presentaban un mayor número de apneas y menor de hipoapneas, junto a un patrón de hipoxemia de mayor gravedad que los sujetos control sin diabetes. [108]

7.5.- El impacto de la DM sobre la arquitectura del sueño y los microdespertares

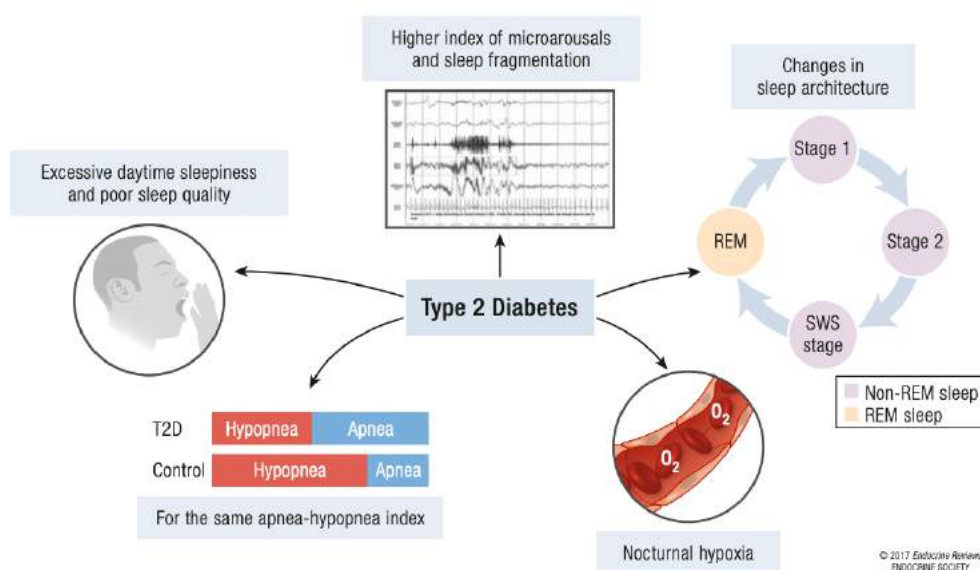
Al analizar las distintas fases del sueño en los sujetos con DM tipo 2 se observa cómo la hipoxia intermitente se ve intensificada durante el sueño REM (movimientos oculares rápidos), provocando un aumento del estrés oxidativo y de la disfunción endotelial. Por el contrario, la mayor aparición de microdespertares ocurre principalmente durante la fase no REM del sueño [109,110] Y en los últimos años se ha desvelado también una respuesta defectuosa a la hipoxia celular en los tejidos de sujetos con DM tipo 2 atribuible a la supresión de la estabilidad y la función del factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF-1 α). Todos estos factores constituyen nuevas vías etiopatogénicas que contribuyen al elevado riesgo de eventos cardiovasculares observado en estos sujetos.[111]

7.6.- Impacto clínico: somnolencia diurna y calidad del sueño

La DM tipo 2 también se asocia con la presencia de somnolencia diurna excesiva independientemente de la gravedad del SAHOS. En un estudio de casos y controles con 826 individuos, la somnolencia diurna excesiva fue casi el doble entre los pacientes con DM tipo2 en comparación con la población control (23,9% vs. 16,9%) y el riesgo de la misma era mayor en los sujetos con una HbA1c > 6,4% y/o una glucemia basal en ayunas > 236 mg/dL con un OR= 3,9 (IC 95%: 1,8-7,9; p=0,0003). [112]

También se ha descrito en la DM tipo 2 una reducción de la calidad del sueño, evaluada mediante el Índice de Calidad del Sueño de Pittsburgh (PSQI). Luyster et al evaluaron la calidad del sueño en 300 individuos con DM tipo 2, encontrando que el 55% de los pacientes eran “poor sleepers” según el PSQI y que esta mala calidad del sueño era predictora de una menor calidad de vida relacionada con la salud. [113] Tenemos también datos de una población en Cataluña, donde 135 pacientes con DM tipo 2, en comparación con sujetos con metabolismo glucídico normal, presentaron un sueño más “deficiente” (puntuación global del PSQI > 5) que se relacionó con la glucemia basal en ayunas, pero no con los parámetros de sueño. [114] También Cavalcanti-Ferreira y colaboradores evidenciaron alteraciones en la calidad del sueño y disfunción en el ritmo de actividad de reposo en 21 pacientes con DM tipo 2 en comparación con sujetos sanos apareados por sexo y edad. Estas diferencias se asociaron con alteraciones en la función circadiana, que podrían estar relacionadas con la variación glucémica. [115] En la siguiente figura se resumen las principales consecuencias que la DM tipo 2 ejerce sobre la respiración durante el sueño (**Figura 11**).

Figura 11. Efecto deletéreo de la DM tipo 2 sobre la arquitectura y los trastornos de la respiración en el sueño [41]



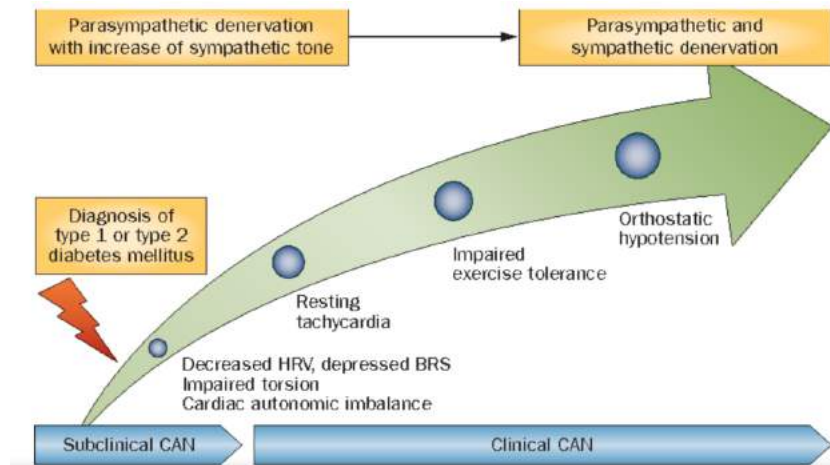
8.- DIABETES E HIPERACTIVACIÓN SIMPÁTICA

La relación entre la DM tipo 2 y el sistema nervioso simpático existe a diferentes niveles y en diferentes estadios de la enfermedad, jugando un papel en la fisiopatología de la hiperglucemia y aumentando el riesgo cardiovascular por diferentes vías (**Figura 12**). Por ejemplo, estudios transversales han identificado polimorfismos genéticos en el sistema nervioso simpático que llevan a disrupciones del mismo, que se correlacionan con la alta prevalencia de obesidad y DM tipo 2 en determinadas poblaciones. [116-118]

8.1.- Hiperactivación simpática en la DM tipo 2

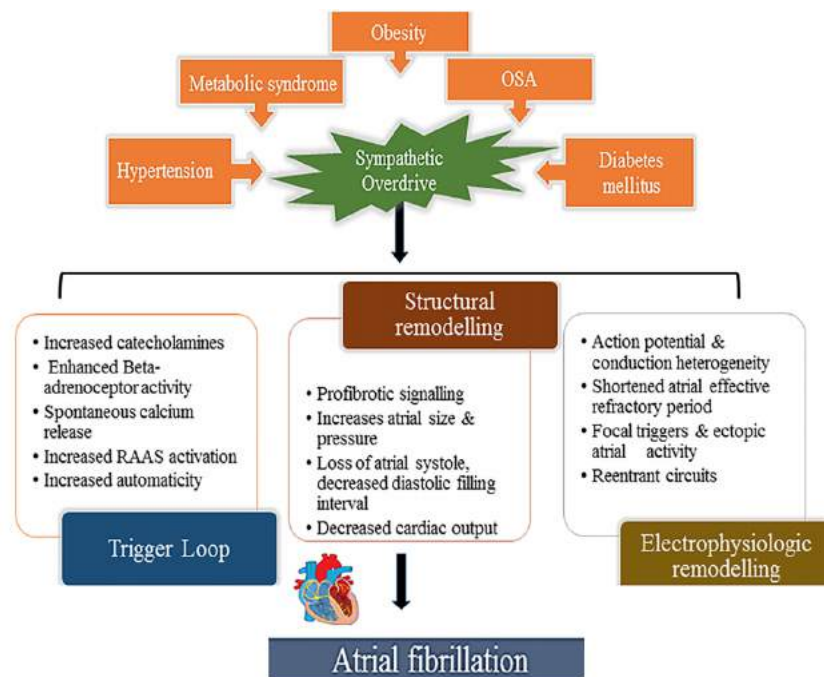
En una primera instancia, la hiperactivación simpática amplifica la insulinoresistencia y aumenta la producción de glucosa hepática; y a nivel muscular, disminuye el aporte y la captación de glucosa. [119] Los efectos sobre el tejido adiposo parecen estar relacionados con la producción de adipoquinas. Así, los estudios en ratones con una alteración genética del receptor de serotonina indican un desequilibrio en la saciedad, alteraciones de la leptina y de la señalización del receptor beta3-adrenérgico, que pueden causar obesidad e intolerancia a la glucosa. [120, 121] A nivel cardíaco, se ha descrito un aumento en la frecuencia cardíaca en reposo, alteraciones en la inervación simpática/parasimpática del corazón con focos miocárdicos de denervación o hiperinervación simpática, y alteraciones en la variabilidad cardíaca durante la respiración profunda (**Figura 13**). [122, 123]

Figura 12. Progresión de la neuropatía autonómica cardíaca. Los primeros signos subclínicos detectables de disfunción autonómica pueden estar ya presentes en el momento del diagnóstico de la diabetes. [124]



A nivel endotelial, existe evidencia de microangiopatía preclínica con aumento en la rigidez aórtica desde etapas precoces de la DM tipo 2, en probable relación con una disfunción endotelial originada por un desequilibrio en la producción de moléculas de adhesión: ICAM tipo 1 y VCAM tipo 1. [125-127]

Figura 13. Activación simpática aberrante en trastornos tales como obesidad, hipertensión, apnea obstructiva del sueño, diabetes mellitus y síndrome metabólico [128]



8.2 Trastornos del sueño e hiperactivación simpática

El sueño es una cadena de ciclos de duración y características diferentes interindividuales que se suceden durante el descanso nocturno. Entre las alteraciones del sueño en los pacientes con diabetes se describe una mayor fragmentación del sueño, con un aumento de microdespertares (microarousals) en especial en la fase no-REM. A su vez, los microdespertares, que se caracterizan por períodos de hiperactividad simpática, se han asociado de forma independiente con la glucosa plasmática en ayunas. [129,130]

Los episodios de hipoxia nocturna en relación con el SAHOS también activan el sistema nervioso simpático, llevando a hipertensión, alteraciones en la variabilidad cardíaca y probablemente a daño endotelial. [131-132] Estudios en pacientes con SAHOS ponen de manifiesto cómo la exposición a largo plazo a la hipoxia intermitente y a la fragmentación del sueño aumenta la actividad nerviosa simpática, resultando en una mayor prevalencia de hiperglucemia en ayunas, resistencia a la insulina y DM tipo 2. [133,134]

En el Estudio CARDIA (*the Coronary Artery Risk Development in Young Adults Sleep Study*), entre los 40 sujetos con DM tipo 2 se observó un incremento del 10% en la fragmentación del sueño asociado a una elevación de 9% en la glucemia en ayunas, así como un aumento del 30% en el nivel de insulina en ayunas y del 43% en la resistencia a la insulina evaluada mediante el homeostasis model assessment (HOMA). [135] Estos micro despertares también se han relacionado con una hiperactivación simpática que lleva a disfunción endotelial y disminución del óxido nítrico, y a un aumento de los niveles de cortisol, de lípidos y de la presión arterial, que estarían implicados de forma conjunta en la progresión de la disfunción endotelial y la enfermedad cardiovascular. [136, 137] Así, en modelo animal, se ha demostrado cómo la fragmentación del sueño induce cambios en la expresión de marcadores de inflamación, con aumento de IL-6 en tejido adiposo retroperitoneal y disminución de TNF- α en tejido adiposo mesentérico; además de aumento en la expresión de los genes de IL-1 β en tejido adiposo y corazón y de TGF- β 1 (factor de crecimiento transformante beta) en el hipotálamo. [138-140]

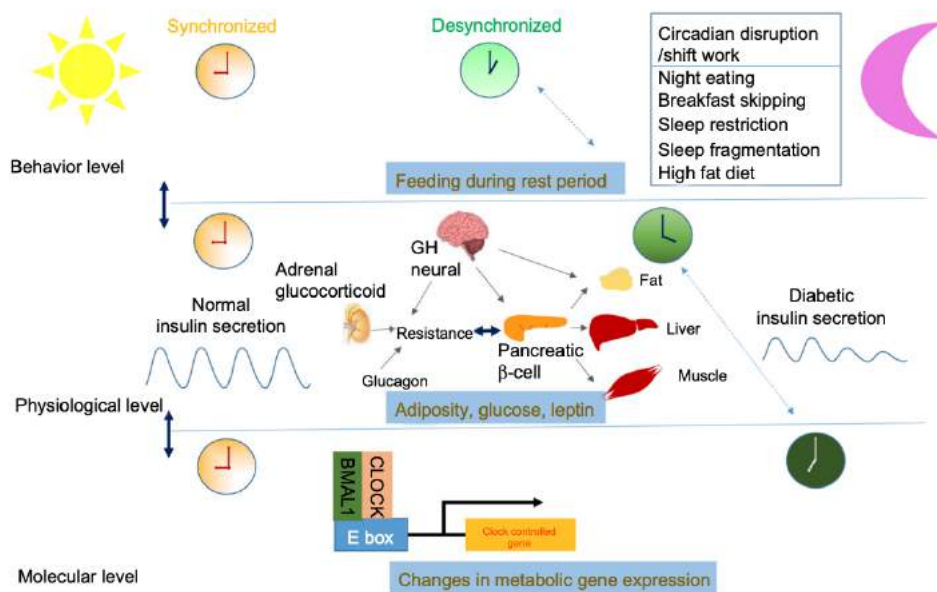
En los años cincuenta, cuando se estudiaba las acciones de la reserpina y de las anfetaminas, se descubrió el papel de las catecolaminas en el ciclo sueño-vigilia. Las alteraciones del sueño, tales como la fragmentación del sueño y los despertares nocturnos, causan un aumento en la epinefrina. A su vez, la norepinefrina incrementa en función de los cambios de posición, con respuesta aumentada en el ortostatismo y tras el despertar matutino. [141]

9.- DIABETES Y RITMOS CIRCADIANOS

En las últimas décadas, se ha descrito la asociación entre las alteraciones en el ritmo circadiano derivadas de nuestro estilo de vida, tales como trabajos y comidas de horario nocturno, la DM tipo 2 y la obesidad (**Figura 14**). [142,143] También se ha descrito que los comportamientos que llevan a la restricción involuntaria del sueño, modificando los biofenómenos circadianos (condiciones ambientales, trastornos médicos o psiquiátricos y medicamentos entre otros) son un factor de riesgo significativo para el desarrollo de diabetes. [144]

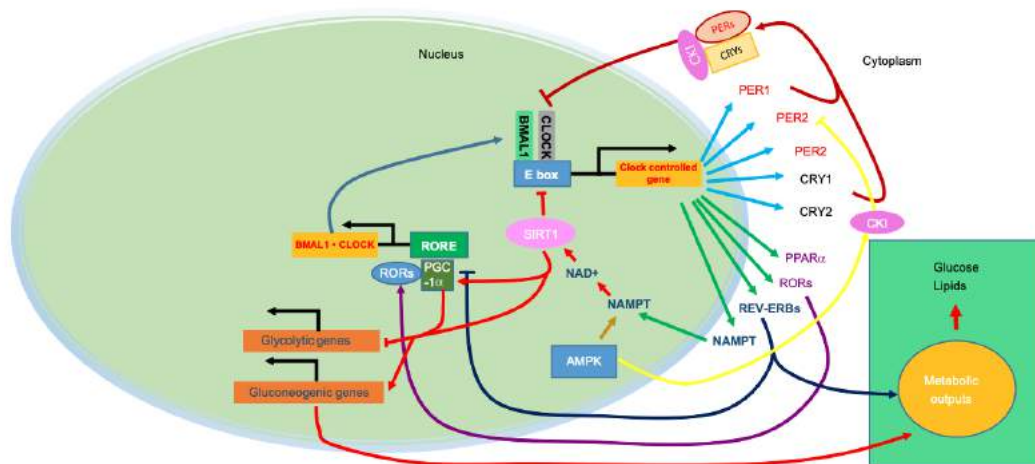
El metabolismo tiene un ritmo circadiano donde la ingesta, el gasto energético, el perfil glucémico, la utilización de la glucosa, la secreción a la insulina y la sensibilidad a la misma están sujetos a cambios en relación con el día y la noche o el ciclo de sueño-vigilia. [145] Así, si bien los factores de riesgo más clásicos de la diabetes se relacionan con el exceso de peso, la predisposición genética y la falta de actividad física, en los últimos años también se han incorporado los trastornos en el ritmo circadiano secundarios a costumbres y hábitos de la vida diaria. [146,147]

Figura 14. Los factores de comportamiento llevan a asincronía circadiana y pueden intervenir en el desarrollo de diabetes tipo 2. [148]



El reloj circadiano, situado en el núcleo supraquiasmático hipotalámico, se encarga de organizar estos ritmos en ciclos de aproximadamente 24 horas, tanto a nivel central como en tejidos periféricos (**Figura 15**). Se trata de un circuito de retroalimentación que regula la expresión génica a nivel transcripcional y traduccional, donde el primer ciclo depende de la activación transcripcional de CLOCK (circadian locomotor output cycles kaput) y BMAL1 (brain and muscle Arnt-like protein-1). Ambos genes se unen a secuencias reguladoras conocidas como cajas E, localizadas en los promotores de los genes PER (period) y CRY (criptocromo). El segundo ciclo de retroalimentación involucra activadores de la transcripción como ROR (receptor huérfano relacionado con el ácido retinoico) α , β y γ , y represores de la misma como el REV-ERB (receptor huérfano codificado en la cadena no codificante de las proteínas del gen α de la tiroides) α y β . Estos genes reloj se encargan de regular su propia transcripción y la de otros genes que contienen cajas E en sus promotores y están implicados en los biofenómenos circadianos y en la transmisión de la información generada en el sistema nervioso central al resto de tejidos y a los genes “reloj” en ellos localizados. [149] Así, se ha demostrado que estos genes son responsables de más del 10% de las transcripciones expresadas en cualquier tejido que participan en procesos celulares importantes, como la proliferación celular o la apoptosis. [150,151]

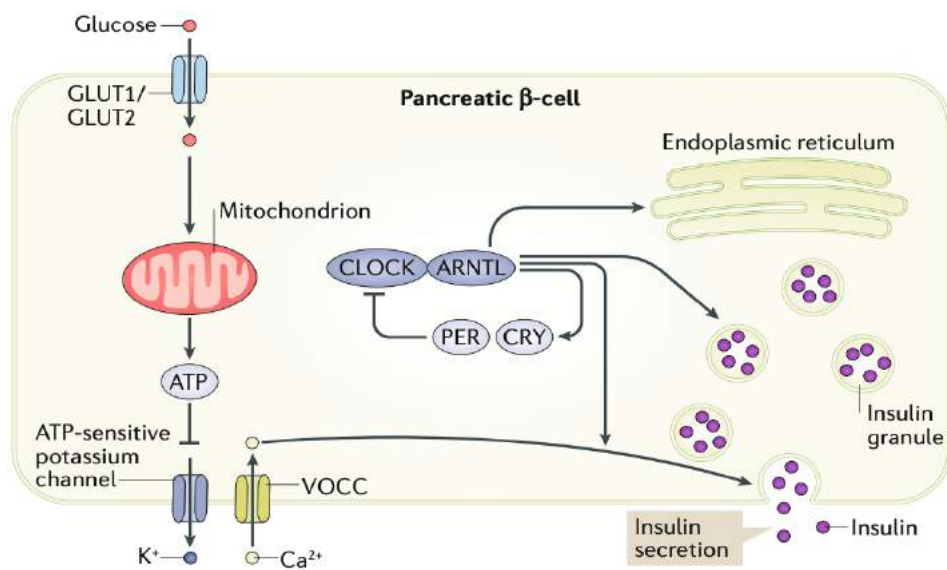
Figura 15. Los componentes centrales del sistema de reloj de los mamíferos. [148]



Existen relojes circadianos similares a los del sistema nervioso central, en una gran variedad de tejidos periféricos implicados en el metabolismo, como hígado, corazón, pulmón, riñón y fibroblastos entre otros. Estos genes son los responsables de los ritmos circadianos en las células de los tejidos periféricos y el reloj circadiano del núcleo supraquiasmático coordina las relaciones de fase entre los tejidos. [152] Así, en los islotes pancreáticos los genes reloj controlan la secreción y la señalización de la insulina, la captación y el metabolismo de la glucosa, el ciclo celular, la proliferación y el crecimiento de las células β . [153,154] En modelos animales se ha demostrado que la función alterada de los genes reloj puede resultar en alteraciones del metabolismo hidrocarbonado (**Figura 16**). Así, los ratones homocigotos para la mutación en el gen CLOCK descritos por Turek y colaboradores, mostraban un ritmo de alimentación diurno atenuado con cambios en la regulación del peso corporal y el gasto energético que conducían a obesidad, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hiperleptinemia, hiperglucemia e hipoinsulinemia. [155] También, se describen alteraciones en la adipogénesis y en el metabolismo hepático de carbohidratos en ratones carentes de BMAL1, CRY1 o CRY2. [156,157] La evidencia en seres humanos existe, aunque más escasa: variantes y polimorfismos en CLOCK, CRY2 y PER2 se asocian a mayor susceptibilidad a la obesidad, al síndrome metabólico y a la diabetes. [158-160]. Las variantes genéticas en BMAL1, por su

parte, se relacionan con diabetes tipo 2, hipertensión arterial y diabetes gestacional. [161,162]

Figura 16. Participación de los genes reloj en el funcionamiento de la célula beta. [163]



GLUT, transportador de glucosa; VOCC, canal de calcio dependiente de voltaje.

10.- JUSTIFICACIÓN DE LOS ESTUDIOS DESARROLLADOS.

* Estudios poblacionales han mostrado el impacto negativo de la DM tipo 2 sobre la función pulmonar.

* Se han descrito mecanismos fisiopatológicos relacionados como la resistencia a la insulina, la inflamación crónica de bajo grado, el daño microvascular y la neuropatía autonómica.

* De igual manera, existe cada vez mayor evidencia del efecto deletéreo de la DM tipo 2 sobre la respiración nocturna, produciendo descenso de la saturación arterial de oxígeno y desregulando los ritmos circadianos.

* Estas complicaciones “no clásicas” de la diabetes incrementan el riesgo cardiovascular de los pacientes de manera independiente al control glucémico.

* No está aún establecido cómo abordar el estudio de la función pulmonar y la respiración nocturna en los pacientes con diabetes, ni mucho menos cómo identificar a los individuos más susceptibles de desarrollar estas complicaciones.

* Los estudios de esta tesis buscan profundizar en la búsqueda de biomarcadores que permitan identificar a los sujetos más vulnerables de sufrir esta complicación tardía (HIF y las proteínas séricas A y D del surfactante pulmonar), ahondar en los mecanismos que pueden explicar esta relación (hiperactivación simpática y cronodisrupción) y evaluar el impacto sobre la ateromatosis subclínica (densidad vasa vasorum).

11.- HIPÓTESIS

Hipótesis 1:

La mayor activación simpática descrita en la DM tipo 2 estará condicionada por los episodios de hipoxia nocturna y el grado de control metabólico.

Hipótesis 2:

La mayor activación simpática en los pacientes con DM tipo 2 impactará en la expresión de genes reloj relacionados con el ritmo circadiano y la cronodisrupción.

Hipótesis 3:

El estudio de la expresión de HIF-1 α puede ser útil para identificar a los pacientes con DM tipo 2 con mayor hipoxia nocturna.

Hipótesis 4:

El incremento en la concentración sérica de las proteínas del surfactante pulmonar, como reflejo del daño pulmonar, ayudará a identificar a los sujetos con DM tipo 2 y mayor afectación de la función pulmonar.

Hipótesis 5:

La mayor hipoxia nocturna (mantenida e intermitente) descrita en la DM tipo 2 se relacionará con el desarrollo de enfermedad ateromatosa y una mayor densidad de la vasa vasorum a nivel de la adventicia carotídea.

12.- OBJETIVOS

12.1.- OBJETIVO GENERAL

Profundizar en los mecanismos fisiopatológicos que favorecen el efecto negativo de la DM tipo 2 sobre la función respiratoria y la respiración durante el sueño, y encontrar marcadores tempranos de esta lesión.

12.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la activación simpática en un grupo de pacientes con DM tipo 2 y la relación de esta activación con los parámetros polisomnográficos.

- 1.1 Evaluar la variabilidad del ritmo cardiaco en el grupo de estudio y el grupo control.
- 1.2 Determinar la concentración de hormonas contrarreguladoras: cortisol, insulina, glucagón y GH (hormona crecimiento) en el grupo de estudio y el grupo control.
- 1.3 Comparar las concentraciones en orina de metanefrinas entre el día y la noche en ambos grupos.
- 1.4 Evaluar la relación entre la variabilidad del ritmo cardíaco, la concentración de metanefrinas en orina, las hormonas contrarreguladoras y los parámetros polisomnográficos.

2. Evaluar la expresión de HIF-1 α y de los principales genes reloj en los pacientes con DM tipo 2 en comparación con sujetos sin diabetes.

- 2.1 Comparar la expresión génica de HIF-1 α en los dos grupos.
- 2.2 Comparar en ambos grupos la expresión génica de los siguientes genes reloj: PER1, PER2, PER3, ROR α , ARNTL, CLOCK, EPAS1, CRY1, CRY2 y SUCNR1.

2.3 Evaluar la relación entre el grado de control metabólico y la expresión génica de HIF-1 α y de los genes reloj.

2.4 Evaluar la relación entre la hipoxemia nocturna y la expresión génica de HIF-1 α y de los genes reloj.

3. Evaluar los niveles séricos de las proteínas D y A del surfactante pulmonar (SP-D y SP-A) en pacientes con DM tipo 2 en relación con lesión pulmonar no conocida.

3.1 Comparar las concentraciones de las proteínas surfactante sérico D (SP-D) y A (SP-A) entre el grupo de estudio y un grupo control sin DM tipo 2.

3.2 Comparar la función pulmonar mediante espirometría entre el grupo de estudio y el grupo control.

3.3 Evaluar la relación entre las concentraciones de SP-D y de SP-A y la función pulmonar en pacientes con DM tipo 2.

4. Evaluar el impacto del SAHOS y la hipoxia intermitente nocturna en la pared carotídea mediante la evaluación de la densidad de la vasa vasorum de la adventicia.

4.1 Comparar la densidad de la vasa vasorum en la adventicia carotídea entre la población de pacientes con SAHOS y el grupo control.

4.2 Comparar la concentración sérica de marcadores de daño endotelial (ICAM-1, VCAM-1, P-Selectina y Lipocalina-2) entre la población de pacientes con SAHOS y el grupo control.

4.3 Establecer la relación entre la densidad de la vasa vasorum en la adventicia carotídea y los parámetros relacionados con el SAHOS en el grupo de estudio.

13.- RESULTADOS

ESTUDIO 1

Hiperactividad simpática y trastornos del sueño en personas con diabetes tipo 2

Article Source: **Sympathetic Hyperactivity and Sleep Disorders in Individuals with Type 2 Diabetes** López-Cano C, Gutiérrez-Carrasquilla L, Sánchez E, González J, Yeramian A, et al. (2019) *Frontiers in Endocrinology* 10:752. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00752>

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY).

RESUMEN

Ya que el origen de la hiperactivación simpática en la DM tipo 2 no se conoce con exactitud, proponemos que tanto la hipoxia intermitente como el mayor número de microdespertares que caracterizan el sueño en los pacientes con diabetes podrían explicar el incremento en la actividad del sistema nervioso simpático.

Con el objetivo de evaluar la actividad simpática en pacientes con DM tipo 2 e investigar la relación entre esta activación y los parámetros polisomnográficos, diseñamos un estudio transversal con un grupo de pacientes provenientes de las Consultas Externas de Endocrinología (Unidades de Obesidad y de Diabetes) del Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida.

La población de estudio reclutada, 36 sujetos con DM tipo 2, sin enfermedad clínica macrovascular ni enfermedad pulmonar conocida, tenía una edad entre 40-70 años y un IMC menor de 40 kg/m². Se excluyeron del estudio los pacientes que llevaban tratamiento con fármacos con actividad sobre el sistema nervioso central: hipnóticos, antidepresivos, sedantes y psicodélicos. También aquellos sujetos con tabaquismo activo, historia de abuso de alcohol, enfermedad renal crónica, neoplasia activa, enfermedades neuromusculares y aquellos un SAHOS en tratamiento con un dispositivo de presión positiva continua en la vía aérea (CPAP). Se reclutó también un grupo control de 11 sujetos sanos, sin DM tipo 2 ni enfermedad pulmonar, apareados por edad, IMC, circunferencias de cuello y de cintura, y presión arterial (**Tabla 2**).

Todos los sujetos del estudio se sometieron a la realización de una poligrafía cardiorrespiratoria no asistida en su domicilio con un dispositivo portátil Alice PDx, midiendo así el IAH y el CT90.

Se estudió la variabilidad del ritmo cardíaco, definida como la medida de la variación en milisegundos entre latido y latido, en sus intervalos R-R, mediante un dispositivo QHRV con el hardware DT-HW6c. Los resultados se analizaron tras la medición en diferentes estados: descansando (tras un reposo de 15 minutos), respirando profundamente, en Valsalva y en posición de bipedestación.

Tabla 2. Características clínicas, metabólicas y respiratorias del sueño básicas de los participantes en el estudio.

	DM tipo 2	Grupo control	p
n	36	11	-
Edad (años)	56,3 ± 8,7	51,2 ± 8,8	0,101
Mujeres, n (%)	10 (27,7)	11 (100)	<0,001
IMC (Kg/m²)	31,9 ± 4,8	32,5 ± 5,8	0,745
Circunferencia cuello (cm)	41,9 ± 4,2	39,6 ± 2,8	0,095
Circunferencia abdominal (cm)	113,0 ± 11,0	116,0 ± 10,8	0,431
HbA1c (%)	8,0 ± 1,3	5,5 ± 0,5	<0,001
Colesterol LDL (mmol/l)	2,8 ± 1,0	3,2 ± 1,1	0,337
Triglicéridos (mmol/l)	1,7 (0,8-3,7)	1,1 (0,8-2,0)	0,089
Presión sistólica (mm Hg)	131,6 ± 12,6	131,9 ± 10,5	0,902
Presión diastólica (mm Hg)	77,6 ± 8,2	80,7 ± 5,3	0,260
AHI (eventos/hora)	23,5 (3,0-78,0)	14,0 (0,0-67,0)	0,227
CT90 (%)	7,5 (0,0-64,0)	6,5 (0,0-44,0)	0,355

Los datos son media ± DE, mediana (rango) ó n (porcentaje). IMC: índice de masa corporal; HbA1c: hemoglobina glicosilada; LDL: lipoproteína de baja densidad; IAH: índice de apnea-hipopnea; CT90: tiempo de sueño con saturación de oxígeno por debajo del 90%.

Con el fin de comparar la concentración en orina de metanefrinas, se llevó a cabo la recolección de orina en dos espacios de tiempo de 12 horas, diferenciándose así entre la orina diurna y nocturna. Se determinó también la concentración de ciertas hormonas contrarreguladoras: cortisol, insulina, glucagón, IGF-1 y GH mediante enzimoquimioluminiscencia. Vale la pena destacar que, para la realización de todas las determinaciones y pruebas antes descritas, los pacientes no debían consumir alimentos, café o nicotina tres horas antes de la prueba. Tampoco podían recibir tratamiento con los siguientes fármacos: anticolinérgicos, fludrocortisona, antihistamínicos, antagonistas alfa o beta y/o ansiolíticos durante las 48 horas previas.

El grupo de pacientes con DM tipo 2 (27,7% mujeres), contaba con una media de edad de 56,3 ± 8,7 años, todos con sobrepeso u obesidad, con un IMC de 31,9 ± 4,8 kg/m² y un perímetro abdominal de 113,0 ± 11,0 cm. En cuanto a las variables analíticas, nuestros pacientes presentaban: HbA1c 8,0 ± 1,3%, colesterol LDL 2,8 ± 1,0 mmol/L y triglicéridos 1,7 (0,8-3,7) mmol/L. En relación a los parámetros de la poligrafía respiratoria, los sujetos con DM tipo 2 se encontraban en el rango de SAHOS moderado, con un IAH de 23,5 eventos/hora (3-78) y un CT90% de 7,5% (0-64) (**Tabla 2**). Finalmente, los

valores de hormonas contrarreguladoras y los parámetros de variabilidad del ritmo cardíaco estaban dentro del rango normal y eran similares a los del grupo control (**Tabla 3**).

La concentración nocturna de metanefrinas totales en orina fue superior a la concentración diurna en los pacientes con DM tipo 2 [247,0 (120,0-1375,0) vs. 210,0 (92,0-670,0), $p=0,039$]. Sin embargo, no se observaron diferencias entre el día y la noche en el grupo control. Estos niveles de metanefrinas nocturnos se asociaron de manera positiva y significativa con el CT90 ($r=0,617$, $p<0,001$), desapareciendo esta relación al considerar las metanefrinas diurnas ($r=0,093$, $p=0,644$) (**Figura 17**). Así, a mayor tiempo de hipoxia nocturna encontramos mayor secreción de metanefrinas en la noche, y normalización de las mismas durante el día. Adicionalmente, la concentración de metanefrinas diurnas y nocturnas se asoció negativamente con la concentración de glucagón (**Tabla 4**).

Tabla 3. Valores de hormonas y parámetros de variabilidad cardíaca de los participantes en el estudio.

	DM tipo 2	Grupo control	p
Cortisol (nmol/L)	330,0 (41,0-616,2)	452,0 (211,3-798,3)	0,094
Insulina (mIU/L)	100,3 (24,0-523,8)	128,5 (40,1-188,0)	0,899
IGF-1 (ng/mL)	135,1 (55,3-273,2)	149,9 (85,0-215,9)	0,461
Glucagón (pg/mL)	136,0 (61,0-304,0)	112,0 (63,0-183,0)	0,348
GH (ng/mL)	0,1 (0,0-2,1)	0,1 (0,0-1,2)	0,800
LFa/RFa reposo	0,9 (0,3-2,0)	0,7 (0,2-1,8)	0,299
LFa/RFa respiratoria	0,6 (0,2-1,7)	0,4 (0,3-0,7)	0,099
LFa/RFa Valsalva	1,7 (0,8-3,0)	1,7 (0,6-3,5)	0,591
LFa/RFa bipedestación	1,1 (0,3-2,8)	0,7 (0,5-2,2)	0,022
SDNN	21,5 (7,1-85,3)	39,5 (17,4-76,7)	0,013

Los datos son media (rango). IGF-1: factor de crecimiento similar a la insulina-1; GH: hormona crecimiento; LFa: simpático- área de baja frecuencia; RFa: parasimpático- área de frecuencia respiratoria; SDNN: desviación estándar de latido a latido o intervalos NN.

Figura 17. Correlación lineal entre la concentración de metanefrinas en orina y el porcentaje de tiempo con saturaciones de oxígeno por debajo del 90%.

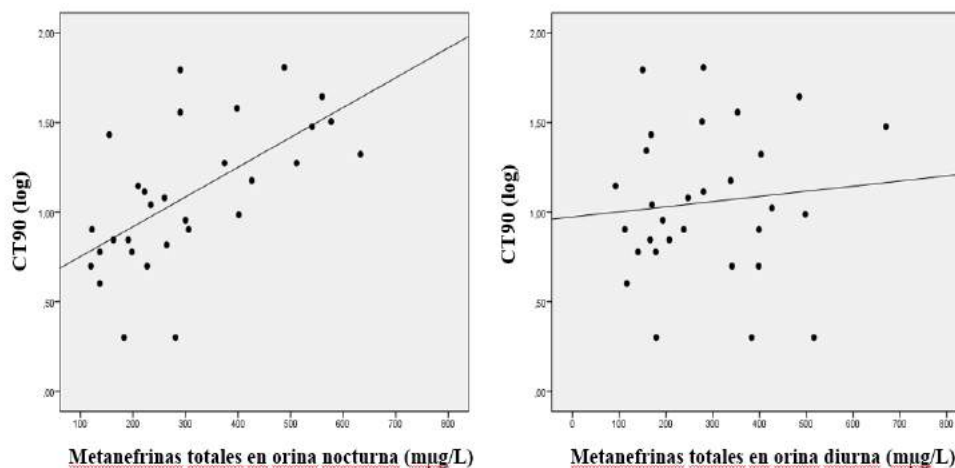


Tabla 4. Correlaciones lineales entre las metanefrinas diurnas y nocturnas, las hormonas séricas y los parámetros de variabilidad de la frecuencia cardíaca.

	Metanefrinas nocturnas		Metanefrinas diurnas	
	r	p	r	p
CT90 (log)	0,617	<0,001	0,093	0,644
IAH (log)	0,146	0,356	0,426	0,146
Cortisol (mmol/L)	0,069	0,677	-0,102	0,522
Insulina (mIU/L)	0,235	0,145	0,050	0,752
IGF-1 (ng/mL)	0,045	0,784	0,039	0,802
Glucagón (pg/mL)	-0,427	0,008	-0,452	0,003
GH (ng/mL)	0,231	0,151	0,101	0,519
LFa/RFa respiratoria	-0,163	0,335	-0,176	0,271
LFa/RFa Valsalva	0,085	0,612	0,236	0,132
LFa/RFa bipedestación	0,127	0,448	0,035	0,828
LFa/RFa reposo	-0,161	0,334	-0,137	0,386

IGF-1: factor de crecimiento similar a la insulina-1; GH: hormona crecimiento; LFa: simpático- área de baja frecuencia; RFa: parasimpático- área de frecuencia respiratoria

En el análisis multivariado, para evaluar los factores con influencia sobre la concentración nocturna de metanefrinas, se incluyeron las siguientes variables independientes: hormonas contrarreguladoras (cortisol, insulina, glucagón, IGF-1 y GH) y parámetros de variabilidad cardíaca (respiratoria, Valsalva, bipedestación y reposo). Al analizar al conjunto de la población incluida en el estudio se encontró una interacción significativa entre la concentración urinaria

nocturna de metanefrinas, el CT90 ($p=0,001$), la concentración sérica de glucagón ($p=0,001$), el tono parasimpático en reposo ($p=0,009$) y la tensión arterial diastólica ($p=0,047$), $R^2 = 0,741$] (**Tabla 5**). Cuando el análisis se limitó al grupo de pacientes con DM tipo 2, la concentración de glucagón ($p=0,011$) y el CT 90 ($p=0,016$) continuaban prediciendo de manera independiente la concentración urinaria nocturna de metanefrinas ($R^2 = 0.549$).

Tabla 5. Análisis de regresión múltiple (método por pasos) en toda la población: variables relacionadas independientemente con las metanefrinas nocturnas en orina.

	β	Beta (95% IC)	p
CT90 (log)	0,520	191,2 (93,9 a 288,6)	0,001
Glucagón (pg/mL)	-0,505	-1,3 (-2,0 a -0,6)	0,001
LFa/RFa reposo	-0,379	-148,9 (-255,4 a -42,5)	0,009
Presión diastólica (mm Hg)	0,277	6,0 (0,0 a 12,0)	0,047
IAH (eventos/hora)	-0,212	-	0,095
Tabaquismo	-0,240	-	0,114
GH (ng/mL)	-0,260	-	0,172
LFa/RFa bipedestación	-0,218	-	0,196
Edad (años)	-0,148	-	0,289
IGF-1 (ng/mL)	0,138	-	0,356
Insulina (mIU/L)	0,132	-	0,370
Presión sistólica (mmHg)	-0,246	-	0,371
Cortisol (mmol/L)	-0,115	-	0,434
LFa/RFa respiratoria	-0,100	-	0,436
HbA1c (%)	0,120	-	0,443
IMC (kg/m ²)	0,074	-	0,596
Género (mujer/hombre)	-0,047	-	0,742
LFa/RFa reposo	-0,041	-	0,763
LFa/RFa Valsalva	0,026	-	0,866
Circunferencia de cuello (cm)	-0,016	-	0,914
Constante	-	-58,1 (-540,7 a 424,3)	0,802
$R^2=0.741$			

En conclusión, basados en esta nuestros resultados, sugerimos que el aumento de la actividad simpática previamente descrito en pacientes con DM tipo 2 podría estar mediado por el efecto deletéreo de la diabetes en la respiración nocturna.

CONTRIBUCIÓN CIENTÍFICA COMO PÓSTER:

López-Cano C, Gutiérrez- Carrasquilla LP, Sánchez E, Gaeta AM, Martí R, Hernández M, Cao G, Ribelles M, Gómez X, Sánchez M, Mizab C, Barbé F, Lecube A. *Sympathetic hyperactivity and sleep disorders: ¿is Type 2 diabetes the link between these two situations?* 20th European Congress of Endocrinology. Barcelona, 2018.

CONTRIBUCIÓN CIENTÍFICA COMO PONENCIA:

López-Cano C. *Actividad simpática, hipoxia nocturna y diabetes. Un mundo por redescubrir*. En la reunión anual TARRACO-MALACCA V JOINT WORKSHOP An update on new players in obesity and type 2 diabetes. Tarragona, 2018.



Sympathetic Hyperactivity and Sleep Disorders in Individuals With Type 2 Diabetes

Carolina López-Cano¹, Liliانا Gutierrez-Carrasquilla¹, Enric Sánchez¹, Jessica González^{2,3}, Andree Yeramian¹, Raquel Martí¹, Marta Hernández¹, Gonzalo Cao⁴, Mercè Ribelles⁵, Xavier Gómez⁶, Silvia Barril^{2,3}, Ferran Barbé^{2,3}, Cristina Hernández^{7,8}, Rafael Simó^{7,8} and Albert Lecube^{1,8*}

¹ Endocrinology and Nutrition Department, Institut de Recerca Biomèdica de Lleida (IRBLleida), Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Obesity, Diabetes and Metabolism Research Group (ODM), Universitat de Lleida (UdL), Lleida, Spain, ² Respiratory Department, Institut de Recerca Biomèdica de Lleida (IRBLleida), Hospital Universitari Arnau de Vilanova-Santa Maria, Translational Research in Respiratory Medicine, Universitat de Lleida (UdL), Lleida, Spain, ³ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain, ⁴ Section of Hormones, Clinic Laboratory, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Universitat de Lleida (UdL), Lleida, Spain, ⁵ Clinic Laboratory, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Universitat de Lleida (UdL), Lleida, Spain, ⁶ Clinic Laboratory, Department of Laboratory Medicine, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Universitat de Lleida (UdL), Lleida, Spain, ⁷ Diabetes and Metabolism Research Unit, Endocrinology and Nutrition Department, Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, ⁸ Centro de Investigación en Red en Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Gaetano Santulli,
Columbia University, United States

Reviewed by:

Jan Brož,
Second Faculty of Medicine, Charles
University, Czechia
Nirav Dhanesha,
The University of Iowa, United States

*Correspondence:

Albert Lecube
alecube@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Clinical Diabetes,
a section of the journal
Frontiers in Endocrinology

Received: 05 August 2019

Accepted: 17 October 2019

Published: xx October 2019

Citation:

López-Cano C,
Gutierrez-Carrasquilla L, Sánchez E,
González J, Yeramian A, Martí R,
Hernández M, Cao G, Ribelles M,
Gómez X, Barril S, Barbé F,
Hernández C, Simó R and Lecube A
(2019) Sympathetic Hyperactivity and
Sleep Disorders in Individuals With
Type 2 Diabetes.
Front. Endocrinol. 10:752.
doi: 10.3389/fendo.2019.00752

Introduction: Many studies on the impact of type 2 diabetes mellitus (T2DM) on sleep breathing have shown a higher prevalence and severity of sleep apnea-hypopnea syndrome (SAHS) in those with T2DM. Moreover, an increased activity of the sympathetic nervous system has been described in both pathologies. This cross-sectional study aimed to assess sympathetic activity in patients with T2DM, and to investigate the relationship between sympathetic activity and polysomnographic parameters.

Materials and Methods: Thirty-six patients with T2DM without known clinical macrovascular nor pulmonary disease and 11 controls underwent respiratory polygraphy, and their cardiac variability and 24-h urine total metanephrines were measured.

Results: SAHS was highly prevalent with a mean apnea-hypopnea index (AHI) in the range of moderate SAHS. In patients with T2DM, the nocturnal concentration of total metanephrines in urine were higher than diurnal levels [247.0 (120.0–1375.0) vs. 210.0 (92.0–670.0), $p = 0.039$]. The nocturnal total metanephrine concentration was positively and significantly associated with the percentage of sleeping time spent with oxygen saturation <90% (CT90). In the entire population and in subjects with T2DM, the multivariate regression analysis showed a direct interaction between the nocturnal concentration of urine metanephrines and the CT90.

Conclusion: These findings suggest that the increase in sympathetic activity previously described in patients with T2DM could be mediated through nocturnal breathing disturbances. The diagnosis and treatment of SAHS may influence sympathetic activity disorders and may contribute to an improvement in T2DM and cardiovascular risk.

Keywords: type 2 diabetes, sympathetic hyperactivity, sleep apnea-hypopnea syndrome, sleep breathing, cardiovascular risk

INTRODUCTION

A wealth of clinical and cross-sectional studies showed a higher prevalence of sleep apnoea-hypopnea syndrome (SAHS) in patients with type 2 diabetes (T2DM). The data vary according to the population studied, but reach a prevalence of up to 85%, with 70% for the range of moderate SAHS (1–5). Despite the lack of prospective studies to demonstrate the SAHS impact in patients with T2D, it is well known that intermittent nocturnal hypoxia is associated with poorer glycaemic control and an increase in cardiovascular risk (6–13). Alternatively, patients with T2D, in comparison with the general population have a negative impact on breathing during sleep, creating greater sleep fragmentation, an increase in micro-awakenings and a higher prevalence of nocturnal hypoxia episodes (14–18). However, there is little evidence and some controversy on whether these alterations are responsible for hyperactivation of the sympathetic nervous system described in patients with T2DM.

Usually, the autonomic nervous system shows episodic oscillations of broad-spectrum activity during sleep with dynamic fluctuation of vital factors such as heart rate, blood pressure and ventilation (19, 20). Moreover, changes in sleep architecture are associated with increased sympathetic activity, leading to endothelial dysfunction and decreased nitric oxide concentration (21–23). In this way, episodes of nocturnal hypoxia also activate the sympathetic system, promoting alterations in cardiac variability and probably endothelial damage, which contributes to increased cardiovascular risk (24–27). Sympathetic overactivity has also been associated with metabolic dysfunction such as insulin resistance, obesity, hypertension and dyslipidaemia (28–30). Even genetic polymorphisms have been identified the sympathetic nervous system of humans and animals and seem to contribute to the development of obesity and T2DM in certain populations (31–33).

Since the origin of sympathetic hyperactivation in patients with T2DM is not precisely known, we propose to analyse the relation between the presence of breathing disorders that characterize their sleep with data related with sympathetic activity. We aimed to deepen this hypothesis by studying the polysomnographic record of 36 subjects with T2DM and its relationship with measurement of urine metanephrine concentration, heart rate variability (HRV) and other serum markers of sympathetic activity.

MATERIALS AND METHODS

Ethic Statement

The study was approved by the human ethics committee from the Arnau de Vilanova University Hospital and was conducted according to the ethical guidelines of the Helsinki Declaration. Informed written consent was obtained from all participants included in the study.

Description of the Study Population

In this cross-sectional study, a total of 36 patients of Caucasian origin with T2DM were prospectively recruited between September 2017 and July 2018 at the outpatient clinic in the

Endocrinology Department of the Arnau de Vilanova University Hospital. Willing participants were given detailed information about the objectives and procedures of the study.

Participants fulfilled the following inclusion criteria: T2DM with more than 5 years of known evolution, men and women aged 40 and 70 years without any history of vascular disease or lung disease and a BMI of less than 40 kg/m². The exclusion criteria were presence of type 1 diabetes, chronic kidney disease, active neoplasia, neuromuscular diseases, active smoking or former smokers, history of alcohol abuse and treatment with continuous positive airway pressure (CPAP). Patients who were treated with drugs with activity on the central nervous system (e.g., hypnotics, antidepressants, sedatives, psycholeptics) were also excluded from the study. No pregnant women were included. A control group of 11 healthy subjects without T2DM or lung disease and well matched by age, body mass index (BMI), neck and waist circumferences and blood pressure was also recruited during the same period among the relatives of patients with diabetes, as well as the employees of our institution.

Measurement of Sleep-Disordered Breathing

The 36 recruited patients and the 11 controls underwent a non-attended respiratory polygraphic record with a portable Sleep Diagnostic Alice PDx (Philips Respironics, Spain) which records nasal airflow (nasal cannula), respiratory effort (chest and abdominal bands), snoring, body position and finger pulse oximetry. The same technician manually checked all sleep studies to reduce variability. Records with less than 5 h of correct signal were repeated. An apnea was defined as cessation of airflow for more than 10 s. Hypopnea was defined as a reduction in respiratory signals for at least 10 s associated with oxygen desaturation of 4% or more. The apnea-hypopnea index (AHI) was calculated as the total number of respiratory events (apneas plus hypopneas) divided by the recording time in bed (per hour of sleep). On this basis, SAHS was defined as an AHI >10 events/hour (e/h). The cumulative percentage of time spent with oxygen saturations below 90% (CT90) was also assessed (34–36).

Laboratory Assessment

After patients fasted overnight for 12 h, venous blood was collected from the antecubital vein. Samples were separated by centrifugation (2,000 g at 4°C for 20 min) and analyzed in the clinical laboratory of our hospital using standard methods to obtain biochemical parameters. The measurement of urine metanephrines was realized by high performance liquid chromatography. In order to compare the concentrations of urine metanephrines between day and night, urine collection was carried out in two 12-h time periods [from 8:00 to 20:00 (day) and from 20:00 to 8:00 (night)]. The serum concentration of hormones related with glucose metabolism [cortisol, insulin, glucagon, insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and growth hormone (GH)] were also determined through chemiluminescence enzyme immunoassay. All samples were collected in the absence of clinical evidence of active infection or inflammatory diseases.

Cardiac Variability Study: Heart Rate Variability Parameters

Heart rate variability (HRV), defined as the measurement of the variation in milliseconds between heart beats, was studied in its R-R intervals, through a QHRV device with DT-HW6c hardware (QHRV, Santa Bárbara, CA, United States). The results were analyzed after measuring in four different stages: after a 15-min rest, breathing deeply, in Valsalva and in a standing position. In the time domain, we analyzed RR intervals, standard deviations of RR intervals (SDNN), the square root of the mean squared difference of successive RR intervals (RMSSD), and the percentage of adjacent NN intervals differing by more than 50 ms (pNN50). This last measurement was referred to as "short-term" HRV and reflects the parasympathetic influence on the heart rate. In the frequency domain, we analyzed the low-frequency band (LF, an index of both sympathetic and parasympathetic activity), high-frequency band (HF) and very low-frequency (VLF, that reflects thermoregulatory mechanisms, fluctuation in activity of the renin-angiotensin system, and the function of peripheral chemoreceptors) (37). Patients were advised not to consume food, coffee or nicotine 3 h before the test and to not receive treatment with anticholinergics, fludrocortisone, antihistamines, alpha or beta antagonists, or anxiolytics during 48 h before the test.

Statistical Analysis

Normal distribution of the variables was assessed using the Kolmogorov-Smirnov test. Data were expressed as the mean \pm standard deviation or percentage. Given their skewed distribution, AHI, CT90 and serum triglycerides are shown as median (range) and were logarithmically transformed to achieve a normal distribution. The relationship between the continuous variables was examined by the Pearson linear correlation test. Univariate and multivariate logistic regression models were computed. A stepwise multivariate regression analysis was performed to explore the variables independently related to nocturnal urine metanephrines. Variables significantly associated with changes in urine metanephrines in the bivariate analysis (i.e., CT90 and serum glucagon concentration), together with heart rate variability parameters and clinically relevant variables (i.e., gender, BMI, age, smoking habit, blood pressure, AHI, neck circumference and HbA1c) were included in the analysis. All *p*-values were based on a two-sided test of statistical significance. Significance was accepted at the level of *p* < 0.05. Statistical analyses were performed using the SPSS statistical package (IBM SPSS, Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY, USA).

RESULTS

The main clinical features and metabolic data of the study population are presented in Table 1. Briefly, patients with T2DM were 56.3 \pm 8.7 years old, mainly female (72.2%) and obese (BMI 31.9 \pm 4.8 kg/m²) and showed a poor metabolic control (HbA1c 8.0 \pm 1.3%). Regarding measurements from the non-attended polygraphy, they exhibited a median AHI of 23.5 (3.0–78.0) e/h,

TABLE 1 | Baseline main clinical, metabolic and sleep-breathing characteristics of participants in the study.

	Type 2 diabetes	Control group	<i>p</i>
N	36	11	–
Age (years)	56.3 \pm 8.7	51.2 \pm 8.8	0.101
Women, n (%)	10 (27.7)	11 (100%)	<0.001
BMI (Kg/m ²)	31.9 \pm 4.8	32.5 \pm 5.8	0.745
Neck circumference (cm)	41.9 \pm 4.2	39.6 \pm 2.8	0.095
Waist circumference (cm)	113.0 \pm 11.0	116.0 \pm 10.8	0.431
HbA1c (%)	8.0 \pm 1.3	5.5 \pm 0.5	<0.001
LDL Cholesterol (mmol/l)	2.8 \pm 1.0	3.2 \pm 1.1	0.337
Triglycerides (mmol/l)	1.7 (0.8–3.7)	1.1 (0.8–2.0)	0.089
Systolic blood pressure (mm Hg)	131.6 \pm 12.6	131.9 \pm 10.5	0.902
Diastolic blood pressure (mm Hg)	77.6 \pm 8.2	80.7 \pm 5.3	0.260
AHI (events/hour)	23.5 (3.0–78.0)	14.0 (0.0–67.0)	0.227
CT90 (%)	7.5 (0.0–64.0)	6.5 (0.0–44.0)	0.355

Data are mean \pm SD, median (range) or n (percentage). BMI, body mass index; HbA1c, glycated haemoglobin; LDL, low density lipoprotein; AHI, apnea-hypopnea index; CT90, percentage of time spent with oxygen saturations below 90%.

TABLE 2 | Hormones values and heart variability parameters of participants in the study.

	Type 2 diabetes	Control group	<i>p</i>
Cortisol (nmol/L)	330.0 (41.0–616.2)	452 (211.3–798.3)	0.094
Insulin (mIU/L)	100.3 (24.0–523.8)	128.5 (40.1–188.0)	0.899
IGF-1 (ng/mL)	135.1 (55.3–273.2)	149.9 (85.0–215.9)	0.461
Glucagon (pg/mL)	136.0 (61.0–304.0)	112.0 (63.0–183.0)	0.348
GH (ng/mL)	0.1 (0.0–2.1)	0.1 (0.0–1.2)	0.800
LFa/RFa resting	0.9 (0.3–2.0)	0.7 (0.2–1.8)	0.299
LFa/RFa respiratory	0.6 (0.2–1.7)	0.4 (0.3–0.7)	0.099
LFa/RFa valsalva	1.7 (0.8–3.0)	1.7 (0.6–3.5)	0.591
LFa/RFa standing	1.1 (0.3–2.8)	0.7 (0.5–2.2)	0.022
SDNN	21.5 (7.1–85.3)	39.5 (17.4–76.7)	0.013

Data are median (range). IGF-1, insulin-like growth factor-1; GH, growth hormone; LFa, low frequency component; RFa, high frequency component; SDNN, standard deviation of beat to beat or NN intervals.

with a median CT90 of 7.5 (0–64)%. Finally, hormone values and HRV parameters were within the normal range (Table 2).

Urine concentrations of total metanephrines were statistically higher during the night compared with the concentrations during the day period in the group of subjects with T2DM [247.0 (120.0–1375.0) vs. 210.0 (92.0–670.0), *p* = 0.039]. However, no differences between day and night were observed in the control group [243.0 (104.0–560.0) vs. 250.5 (94.0–485.0), *p* = 0.674].

Linear correlations between day and night metanephrines and serum hormones and heart rate variability parameters are shown in Table 3. Whereas the nocturnal concentration of urine metanephrines were positively associated with values of CT90 ($r = 0.617, p < 0.001$), this association disappeared with the metanephrines collected during the day ($r = 0.093, p = 0.644$) (Figure 1). In addition, nocturnal and daily urine metanephrines were negatively associated with serum glucagon concentrations ($r = -0.427, p = 0.008$). In the multivariate regression analysis including the entire population we found a significant direct interaction between the concentration of urine metanephrines at

night and the percentage of time spent with oxygen saturation $< 90\%$ ($p = 0.001$) [together with serum glucagon concentration ($p = 0.001$), LFa/RFa resting ($p = 0.009$) and diastolic blood pressure ($p = 0.047$), $R^2 = 0.741$]. This indicated that the increase in the secretion of metanephrines at night could be related with the severity of nocturnal hypoxia (Table 4). When subjects with T2DM were assessed alone, serum glucagon concentrations ($p = 0.011$) and CT90 ($p = 0.016$) still independently predicted nocturnal urine metanephrines ($R^2 = 0.549$). However, in the control group, only diastolic blood pressure and serum glucagon concentrations but not CT90 were significantly related with nocturnal total metanephrines.

TABLE 3 | Linear correlations between day and night metanephrines and serum hormones and heart rate variability parameters:

	Night metanephrines		Day metanephrines	
	r	p	r	p
CT90 (log)	0.617	<0.001	0.093	0.644
AHI (log)	0.146	0.356	0.426	0.146
Cortisol (mmol/L)	0.069	0.677	-0.102	0.522
Insulin (mIU/L)	0.235	0.145	0.050	0.752
IGF-1 (ng/mL)	0.045	0.784	0.039	0.802
Glucagon (pg/mL)	-0.427	0.008	-0.452	0.003
GH (ng/mL)	0.231	0.151	0.101	0.519
LFa/RFa respiratory	-0.163	0.335	-0.176	0.271
LFa/RFa valsalva	0.085	0.612	0.236	0.132
LFa/RFa standing	0.127	0.448	0.035	0.828
LFa/RFa resting	-0.161	0.334	-0.137	0.386

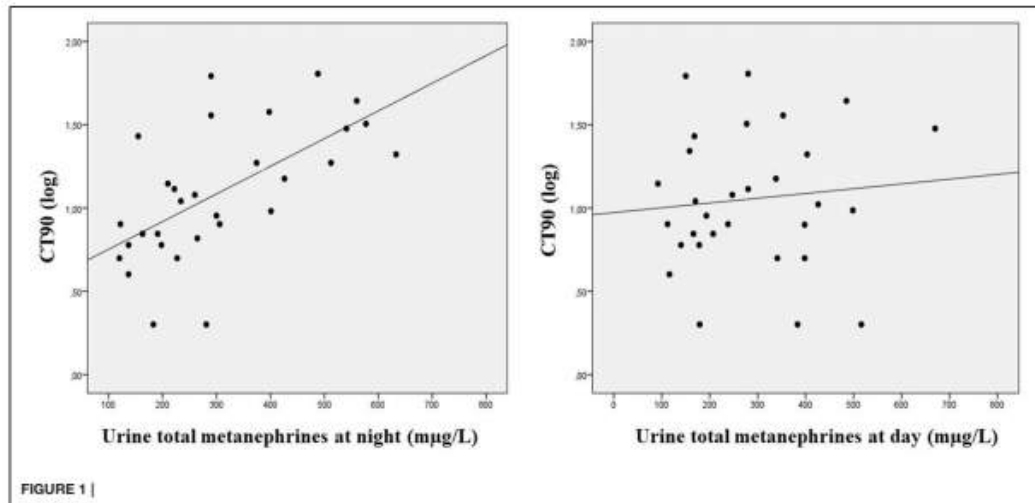
IGF-1, insulin-like growth factor-1; GH, growth hormone; LFa, low frequency component; RFa, high frequency component.

DISCUSSION

The main findings in this study were that a subgroup of patients with T2DM exhibited an increase in urine metanephrines at night associated with nocturnal hypoxia and with a decrease in serum glucagon concentrations, specifically for the parasympathetic tone. This autonomic disturbance can be explained by the deleterious effects of diabetes during night-time sleep, leading to an important nocturnal hypoxia.

It is well known that T2DM patients exhibit a hyperactivation of the sympathetic nervous system (SNS) that amplifies the effect of hyperglycaemia, increasing both cardiovascular risk and microangiopathic diabetic complications (38). The origin of this sympathetic hyperactivation has not been precisely described. We propose that, both intermittent hypoxia and the greater number of micro-awakenings that characterize the sleep of T2DM patients could explain the increase in SNS activity.

While the evidence is controversial, previous studies have demonstrated that apnea and hypopnea events are accompanied by concomitant cyclic variations in heart rate and changes in both



Q4
Q5
Q13

TABLE 4 | Variables independently related to nocturnal urine total metanephrines in the multiple regression analysis (stepwise method) in the entire population.

	β	Beta (95% IC)	p
CT90 (log)	0.520	191.2 (93.9 to 288.6)	0.001
Glucagon (pg/mL)	-0.505	-1.3 (-2.0 to -0.6)	0.001
LFa/RFa resting	-0.379	-148.9 (-255.4 to -42.5)	0.009
Systolic blood pressure (mm Hg)	0.277	6.0 (0.0 to 12.0)	0.047
AHI (events/hour)	-0.212	-	0.095
Smoking status *	-0.240	-	0.114
GH (ng/mL)	-0.260	-	0.172
LFa/RFa standing	-0.218	-	0.196
Age (years)	-0.148	-	0.289
IGF-1 (ng/mL)	0.138	-	0.356
Insulin (mIU/L)	0.132	-	0.370
Systolic blood pressure (mmHg)	-0.246	-	0.371
Cortisol (nmol/L)	-0.115	-	0.434
LFa/RFa respiratory	-0.100	-	0.436
HbA1c (%)	0.120	-	0.443
BMI (kg/m ²)	0.074	-	0.596
Gender (men/women)	-0.047	-	0.742
LFa/RFa respiratory	-0.041	-	0.763
LFa/RFa Valsalva	0.026	-	0.866
Neck circumference (cms)	-0.016	-	0.914
Constant	-	-58.1 (-540.7 to 424.3)	0.802
$R^2 = 0.741$			

sympathetic and parasympathetic activity without differences in subjects with diabetes (39, 40). As far as we know, hyperactivation of the autonomic system has been described in patients with T2DM but with involvement of both patterns (sympathetic and parasympathetic) and it was related to male sex and the presence of neuropathy (41–43). None of our patients had clinical neuropathy, and the test group was predominantly female.

Although we cannot elucidate whether the effects of hypoxia and diabetes overlap with the effects of obesity, some recent studies have shown an increased SAHS prevalence in non-overweight patients with Type 1 diabetes, suggesting that nocturnal hypoxia might be more related to autonomic disturbances rather than obesity (44, 45).

Our study combined data from men and women in the analyses, but differences regarding sex and menopausal status have been previously described. In this way, some findings suggest that men have a higher sympathetic nerve activity than women after the development of essential hypertension, and that this could have implications for gender-specific management of hypertension (46, 47). Similarly, muscle sympathetic nerve activity has been described to be greater in postmenopausal women in comparison with premenopausal women (48). In our study, the LFa/RFa respiratory parameter was the only parameter related with heart rate variability that was significantly

decreased in women when compared to men [0.7 (0.2–1.7) vs. 0.4 (0.2–0.8), $p = 0.002$], and it was also the only parameter that was positively associated with age in the bivariate analysis ($r = 0.318$, $p = 0.038$). The other heart rate variability parameters and serum hormone concentrations showed no differences between genders nor correlations with age. In addition, gender and age were not independently associated with total nocturnal urine metanephrines in the multivariate analysis.

The present study does not have sufficient power to exhibit endothelial damage or cardiovascular risk caused by this hyperactivity, but some previous studies have described the relationship between variability in autonomic function and an increase in insulin resistance, oxidative stress and inflammatory response that cause endothelial cell damage, development of atherosclerosis and increased cardiovascular risk (49–51). Along the same lines, it has been described that cardiovascular autonomic neuropathy contributes to a poorer prognosis in ischemic heart disease and heart failure (52). Also, the decrease in HRV can predict the progression of atherosclerosis in T2DM patients (53).

Our study has some limitations. First, this is a cross sectional whereby causality cannot be determined. The size of the study might have been inadequate, and a prospective study with a higher number of patients could yield better results. In addition, it should be noted that the control group in our study was composed only of women. As previously mentioned, women have a lower sympathetic nerve activity than men, so this data could influence our results. However, in the multivariate regression analysis, gender was not related to the concentration of urine metanephrines at night. Second, the HRV study might have been influenced by differences in baseline physical condition or cardiac status. We did not perform any cardiac evaluation although all participants were asked for cardiovascular diseases and arrhythmias and neither of them were athletic. Third, the effects of the antidiabetics (insulin, SGLT2, incretins) could not be excluded.

CONCLUSION

We suggest that the increased sympathetic activity previously described in patients with T2DM is mediated through the deleterious effect of diabetes in nocturnal breathing. In addition, sympathetic activity is associated with disorders of autonomic tone at resting, suggesting a new pathological pathway between T2DM and cardiovascular risk. More studies are needed to clarify whether treatment of SAHS will improve sympathetic hyperactivity, T2DM and cardiovascular outcomes in these patients.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated for this study are available on request to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

The study was approved by the human ethics committee from the Arnau de Vilanova University Hospital. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CL-C, LG-C, and ES recruited patients, collected and analyzed data, wrote the first draft of the manuscript, and had final approval of the version for publication. FB supervised the research, interpreted data, and critically reviewed the draft of the article. JG, SB, ES, and MR collected and analyzed data, and critically reviewed the draft of the article. LG-C, MH, and XG recruited patients, collected data, and contributed to the discussion. GC, MR, and AY collected and analyzed

data, and contributed to the discussion. CH and RS designed the study, supervised the statistical analysis, interpreted data, critically revised draft of the article, and had final approval of the version for publication. CL-C and AL designed the study, supervised the research, analyzed and interpreted data, and wrote the manuscript.

FUNDING

This study was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (Fondo de Investigación Sanitaria, P112/00803 and P115/00260), European Union (European Regional Development Fund, Fondo Europeo de Desarrollo Regional, Una manera de hacer Europa), and the Fundación Sociedad Española Endocrinología y Nutrición. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

REFERENCES

- Foster GD, Sanders MH, Millman R, Zammit G, Borradaile KE, Newman AB, et al. Obstructive sleep apnea among obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. (2009) 32:1017–19. doi: 10.2337/dc08-1776
- West SD, Nicoll DJ, Stradling JR. Prevalence of obstructive sleep apnoea in men with type 2 diabetes. *Thorax*. (2006) 61:945–50. doi: 10.1136/thx.2005.057745
- Heffner JE, Rozenfeld Y, Kai M, Stephens EA, Brown LK. Prevalence of diagnosed sleep apnea among patients with type 2 diabetes in primary care. *Chest*. (2012) 141:1414–21. doi: 10.1378/chest.11-1945
- Lecomte P, Crinière L, Fagot-Campagna A, Druet C, Fuhman C. Underdiagnosis of obstructive sleep apnoea syndrome in patients with type 2 diabetes in France: ENTRED 2007. *Diabetes Metab*. (2013) 39:139–47. doi: 10.1016/j.diabet.2012.10.004
- Hermans MP, Ahn SA, Rousseau MF. Cardiometabolic phenotype and UKPDS risk in male type 2 diabetic patients with obstructive sleep apnoea. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev*. (2009) 3:50–4. doi: 10.1016/j.dsx.2008.10.011
- Aronsohn RS, Whitmore H, Van Cauter E, Tasali E. Impact of untreated obstructive sleep apnea on glucose control in type 2 diabetes. *Am J Respir Crit Care Med*. (2010) 181:507–13. doi: 10.1164/rccm.200909-1423OC
- Pamidi S, Tasali E. Obstructive sleep apnea and type 2 diabetes: is there a link? *Front Neurol*. (2012) 3:126. doi: 10.3389/fneur.2012.00126
- Drager LF, Lopes HF, Maki-Nunes C, Trombetta IC, Toschi-Dias E, Alves MJ, et al. The impact of obstructive sleep apnea on metabolic and inflammatory markers in consecutive patients with metabolic syndrome. *PLoS ONE*. (2010) 5:e12065. doi: 10.1371/journal.pone.0012065
- Brady EM, Davies MJ, Hall AP, Talbot DC, Dick JL, Khunti K. An investigation into the relationship between sleep-disordered breathing, the metabolic syndrome, cardiovascular risk profiles, and inflammation between South Asians and Caucasians residing in the United Kingdom. *Metab Syndr Relat Disord*. (2012) 10:152–8. doi: 10.1089/met.2011.0073
- Tancredi M, Rosengren A, Svensson A-M, Kosiborod M, Pivodic A, Gudbjörnsdóttir S, et al. excess mortality among persons with type 2 diabetes. *N Engl J Med*. (2015) 373:1720–32. doi: 10.1056/NEJMoa1504347
- Newman AB, Nieto FJ, Guidry U, Lind BK, Redline S, Pickering TG, et al. Relation of sleep-disordered breathing to cardiovascular disease risk factors: the sleep heart health study. *Am J Epidemiol*. (2001) 154:50–9. doi: 10.1093/aje/154.1.50
- Tobaldini E, Costantino G, Solbiati M, Cogliati C, Kara T, Nobili L, et al. Sleep, sleep deprivation, autonomic nervous system and cardiovascular diseases. *Neurosci Biobehav Rev*. (2017) 74(Pt B):321–9. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.07.004
- Parish JM, Somers VK. Obstructive sleep apnea and cardiovascular disease. *Mayo Clin Proc*. (2004) 79:1036–46. doi: 10.4065/79.8.1036
- Engeda J, Mezuk B, Ratliff S, Ning Y. Association between duration and quality of sleep and the risk of pre-diabetes: evidence from NHANES. *Diabet Med*. (2013) 30:676–80. doi: 10.1111/dme.12165
- Grandner MA, Seixas A, Shetty S, Shenoy S. Sleep duration and diabetes risk: population trends and potential mechanisms. *Curr Diab Rep*. (2016) 16:106. doi: 10.1007/s11892-016-0805-8
- Lee SWH, Ng KY, Chin WK. The impact of sleep amount and sleep quality on glycemic control in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Sleep Med Rev*. (2017) 31:91–101. doi: 10.1016/j.smrv.2016.02.001
- Resnick HE, Redline S, Shahar E, Gilpin A, Newman A, Walter R, et al. Diabetes and sleep disturbances: findings from the Sleep Heart Health Study. *Diabetes Care*. (2003) 26:702–9. doi: 10.2337/diacare.26.3.702
- Lecube A, Sampol G, Lloberes P, Romero O, Mesa J, Hernández C, et al. Diabetes is an independent risk factor for severe nocturnal hypoxemia in obese patients. A case control study. *PLoS ONE*. (2009) 4:e4692. doi: 10.1371/journal.pone.0004692
- Chokroverty S. Neurophysiological and neurochemical mechanisms of wakefulness and sleep. In: *Clinical Companion to Sleep Disorders. Medicine*, 2nd ed. Butterworth Heinemann (2000).
- Verrier RL, Harper RM, Hobson JA. Cardiovascular physiology: central and autonomic regulation. In: Kryger MH, Roth T, Dement WC, Editors. *Principles and Practice of Sleep Medicine*. Saunders (2000).
- Meerlo P, Sgoifo A, Suchecki D. Restricted and disrupted sleep: effects on autonomic function, neuroendocrine stress systems and stress reactivity. *Sleep Med Rev*. (2008) 12:197–210. doi: 10.1016/j.smrv.2007.07.007
- Tasali E, Leproult R, Ehrmann DA, Van Cauter E. Slow-wave sleep and the risk of type 2 diabetes in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2008) 105:1044–9. doi: 10.1073/pnas.0706446105
- Stamatakis KA, Punjabi NM. Effects of sleep fragmentation on glucose metabolism in normal subjects. *Chest*. (2010) 137:95–101. doi: 10.1378/chest.09-0791
- Smith ML, Niedermaier ON, Hardy SM, Decker MJ, Strohl KP. Role of hypoxemia in sleep apnea-induced sympathoexcitation. *J Auton Nerv Syst*. (1996) 56:184–90. doi: 10.1016/0165-1838(95)00062-3
- Narkiewicz K, Somers VK. Sympathetic nerve activity in obstructive sleep apnoea. *Acta Physiol Scand*. (2003) 177:385–90. doi: 10.1046/j.1365-201X.2003.01091.x
- Imadojemu VA, Mawji Z, Kumselman A, Gray KS, Hogeman CS, Leuenberger UA. Sympathetic chemoreflex responses in obstructive sleep apnea and effects

- of continuous positive airway pressure therapy. *Chest*. (2007) 131:1406–13. doi: 10.1378/chest.06.2580
27. Xie A, Skatrud JB, Puleo DS, Morgan BJ. Exposure to hypoxia produces long-lasting sympathetic activation in humans. *J Appl Physiol*. (2001) 91:1555–62. doi: 10.1152/jappl.2001.91.4.1555
28. Conde S, Sacramento JF, Guarino MP, Gonzalez C, Obeso A, Diogo LN. Carotid body, insulin, and metabolic diseases: unraveling the links. *Front Physiol*. (2014) 5:418. doi: 10.3389/fphys.2014.00418
29. Fletcher EC. Sympathetic over activity in the etiology of hypertension of obstructive sleep apnea. *Sleep*. (2003) 26:15–9. doi: 10.1093/sleep/26.1.15
30. Tsioufis C, Kordalis A, Flessas D, Anastasopoulos I, Tsiachris D, Papademetriou V, et al. Pathophysiology of resistant hypertension: the role of sympathetic nervous system. *Int J Hypertens*. (2011) 2011:642416. doi: 10.4061/2011/642416
31. Wang H, Wu M, Zhu W, Shen J, Shi X, Yang J, et al. Evaluation of the association between the AC3 genetic polymorphisms and obesity in a Chinese Han population. *PLoS ONE*. (2010) 5:e1385. doi: 10.1371/journal.pone.0013851
32. Jenkinson CP, Cray K, Walder K, Herzog H, Hanson, Ravussin E. Novel polymorphisms in the neuropeptide-Y Y5 receptor associated with obesity in Pima Indians. *Int J Obes Relat Metab Disord*. (2000) 24:580–4. doi: 10.1038/sj.jco.0801200
33. Nonogaki, K. New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia*. (2000) 43:533e549. doi: 10.1007/s001250051341
34. Esnaola S, Duran J, Infante-Rivard C, Rubio R, Fernández A. Diagnostic accuracy of a portable device (Mesam IV) in suspected sleep apnoea. *Eur Respir J*. (1996) 9:2597–605. doi: 10.1183/09031936.96.09122597
35. Lloberes P, Sampol G, Levy G, Aristizabal D, Sagales T, et al. Influence of setting on unattended respiratory monitoring in the sleep apnoea-hypopnoea syndrome. *Eur Respir J*. (2001) 16:530–4. doi: 10.1183/09031936.01.00072401
36. Mbata G, Chukwuka J. Obstructive sleep apnea hypopnea syndrome. *Ann Med Health Sci Res*. (2012) 2:74–7. doi: 10.4103/2141-9248.96943
37. Otzenberger H, Gronfier C, Simon C, Charoloux A, Ehrhart J, Piquard F, et al. Dynamic heart rate variability: a tool for exploring sympathovagal balance continuously during sleep in men. *Am J Physiol*. (1998) 275:H946–950. doi: 10.1152/ajpheart.1998.275.3.H946
38. Benichou T, Pereira B, Mermillod M, Tauveron I, Pfabigan D, Maqdasly S, et al. Heart rate variability in type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*. (2018) 13:e0195166. doi: 10.1371/journal.pone.0195166
39. Guilleminault C, Connolly S, Winkle R, Melvin K, Tilkian A. Cyclical variation of heart rate in sleep apnea syndrome. *Lancet*. (1984) 1:126e31. doi: 10.1016/S0140-6736(84)90062-X
40. Jo JA, Blasi A, Valladares E, Juarez R, Baydur A, Khoo MC. Determinants of heart rate variability in obstructive sleep apnea syndrome during wakefulness and sleep. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. (2005) 288:H1103e12. doi: 10.1152/ajpheart.01065.2005
41. Laitinen T, Lindström J, Eriksson J, Ilanne-Parikka P, Aunola, Keinänen-Kiukkaanniemi S, et al. Cardiovascular autonomic dysfunction is associated with central obesity in persons with impaired glucose tolerance. *Diabet Med*. (2011) 28:699–704. doi: 10.1111/j.1464-5491.2011.03278.x
42. Subbalakshmi NK, Adhikari PM, Rajeev A, Asha K, Jegannathan PS. Independent predictors of cardiac parasympathetic dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Singapore Med J*. (2008) 49:121–8.
43. Jyotsna VP, Ambekar S, Singla R, Joshi A, Dhawan A, Kumar N, et al. Cardiac autonomic function in patients with diabetes improves with practice of comprehensive yogic breathing program. *Indian J Endocrinol Metab*. (2013) 17:480–5. doi: 10.4103/2230-8210.111645
44. Banghøj AM, Nerild HH, Kristensen PL, Pedersen-Bjergaard U, Fleischer J, Jensen AEK, et al. Obstructive sleep apnoea is frequent in patients with type 1 diabetes. *J Diab Complicat*. (2017) 31:156–61. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2016.10.006
45. Janovsky CCPS, Rolim LCdSP, Sá JRd, Poyares D, Tuñk S, Silva AB, et al. Cardiovascular autonomic neuropathy contributes to sleep apnea in young and lean type 1 diabetes mellitus patients. *Front Endocrinol*. (2014) 5:119. doi: 10.3389/fendo.2014.00119
46. Matsukawa T, Sugiyama Y, Watanabe T, Kobayashi F, Mano T. Gender difference in age-related changes in nocturnal sympathetic nerve activity in healthy subjects. *Am J Physiol*. (1998) 275:R1600–4. doi: 10.1152/ajpregu.1998.275.5.R1600
47. Hogarth AJ, Burns J, Mackintosh AF, Mary DA. Sympathetic nerve hyperactivity of essential hypertension is lower in postmenopausal women than men. *J Hum Hypertens*. (2008) 22:544–9. doi: 10.1038/jhh.2008.31
48. Hogarth AJ, Graham LN, Corrigan JH, Deuchars J, Mary DA, Greenwood JP. Sympathetic nerve hyperactivity and its effect in postmenopausal women. *J Hypertens*. (2011) 29: 2167–75. doi: 10.1097/HJH.0b013e32834b8014
49. Thiagarajan R, Subramanian SK, Sampath N, Madanmohan Trakroo, Pal P, Bobby Z, et al. Association between cardiac autonomic function, oxidative stress and inflammatory response in impaired fasting glucose subjects: cross-sectional study. *PLoS ONE*. (2012) 7:e41889. doi: 10.1371/journal.pone.0041889
50. Kratnov AE, Lysenkova NO. Parameters of heart rhythm variability and QT-interval in patients with ischemic heart disease and type 2 diabetes. *Kardiologija*. (2010) 50:27–31. Q12
51. Piwonska A, Piotrowski W, Broda G, Drygas W, Gluszek J, Zdrojewski T, et al. The relationship between resting heart rate and atherosclerosis risk factors. *Kardiol Pol*. (2008) 66:1069–75. discussion: 1076–8. Q12
52. Vinik AI, Casellini C, Parson HK, Colberg SR, Nevoret ML. Cardiac autonomic neuropathy in diabetes: a predictor of cardiometabolic events. *Front Neurosci*. (2018) 12:591. doi: 10.3389/fnins.2018.00591
53. Gottsäter A, Ahlgren AR, Taimour S, Sundkvist G. Decreased heart rate variability may predict the progression of carotid atherosclerosis in type 2 diabetes. *Clin Auton Res*. (2006) 16:228–34. doi: 10.1007/s10286-006-0345-4

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 López-Cano, Gutierrez-Carrasquilla, Sánchez, González, Yeramian, Martí, Hernández, Cao, Ribelles, Gómez, Barril, Barbé, Hernández, Simó and Lecube. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

ESTUDIO 2

**Efecto de la diabetes tipo 2 en la expresión de HIF-1.
¿Existe relación con los genes reloj?**

RESUMEN

Los tejidos responden a la hipoxia crónica disminuyendo la producción de radicales libres de oxígeno debido a una estabilización y activación del factor de transcripción HIF-1 α . En los tejidos de personas y animales con diabetes, se ha descrito una respuesta celular alterada a la hipoxia, donde la pérdida de función o el incremento en la inducción de HIF-1 α afectan la secreción de insulina. Del mismo modo, existe cada vez mayor evidencia del impacto negativo de la DM tipo 2 sobre la respiración nocturna, produciendo descenso de la saturación arterial de oxígeno y disminución del sueño nocturno reparador. Esto, a su vez, afecta la regularidad de los diversos ritmos circadianos que son una parte esencial en el mantenimiento del equilibrio metabólico. Así, en las últimas décadas, se ha puesto de manifiesto como los cambios en el ritmo circadiano derivados de nuestro estilo de vida, como el trabajo nocturno y las comidas, se han asociado con la diabetes tipo 2 y la obesidad. Sin embargo, aún no disponemos de marcadores biológicos que sean de utilidad para identificar la hipoxia nocturna, y desconocemos el impacto de ésta sobre los ritmos circadianos.

Así, para evaluar el impacto de la DM tipo 2 sobre la expresión génica de HIF-1 α y de los principales genes reloj, y valorar la relación que entre ellos se establece, hemos llevado a cabo un estudio transversal de casos-control. Se incluyeron 129 sujetos seleccionados de manera consecutiva en las consultas externas de Endocrinología del Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida. Como criterios de inclusión se incluyeron los siguientes: **(i)** raza caucásica, **(ii)** edad entre 30 y 70 años, **(iii)** un IMC menor de 40 kg/m² y **(iv)** un patrón de sueño nocturno de al menos 6 horas. Ningún paciente tenía historia de abuso de alcohol, cafeína, ni recibía tratamiento con fármacos activos sobre el sistema nervioso central: hipnóticos, antidepresivos, sedantes, psicolépticos y/o ansiolíticos.

De todos los pacientes recogimos datos clínicos y se realizó una extracción de sangre en ayunas (última ingesta no más tarde de las 22 horas del día anterior) para la cuantificación de la expresión relativa mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de HIF-1 α y de los siguientes genes reloj: PER1, PER2, PER3, ROR α , ARNTL, CLOCK, CRY1 y CRY2. También se cuantificó la expresión relativa del ARNm del gen EPAS1, relacionado con el factor de transcripción implicado en la inducción de genes regulados por la hipoxia, y el gen SUCNR1, que codifica una proteína del receptor acoplado a la proteína G del succinato. La actividad de la glicolisis aeróbica se estimó indirectamente midiendo en plasma los niveles de lactato y piruvato mediante ensayo fluorimétrico.

Finalmente, a un subgrupo de 40 pacientes, se les realizó también una poligrafía cardiorespiratoria no asistida en su domicilio. De éstos, 24 pacientes eran del grupo con DM tipo 2 (38,7%).

El grupo de pacientes con DM tipo 2 presentaba una edad similar al grupo control, pero tenía mayor prevalencia del género femenino (51,6% vs. 25,3%) y mayor IMC (33,6 vs. 28,6 kg/m²) (**Tabla 6**)

Tabla 6. Características de la población estudiada.

	DM tipo 2	Grupo control	p
n	62	67	-
Edad (años)	57,3 \pm 10,0	58,8 \pm 9,4	0,381
Mujeres, n (%)	32 (51,6)	17 (25,3)	0,003
IMC (Kg/m²)	33,6 \pm 6,2	28,6 \pm 6,6	<0,001
Peso (kg)	91,1 \pm 18,9	76,5 \pm 21,5	<0,001
HbA1c (%)	8,4 \pm 1,8	5,3 \pm 0,3	<0,001

Los datos son media \pm DE, mediana (rango) ó n (porcentaje). IMC: índice de masa corporal; HbA1c: hemoglobina glicosilada.

Los sujetos con DM tipo 2 mostraron una menor expresión génica de HIF-1 α en comparación con el grupo control (1,34 \pm 0,84 vs. 2,2 \pm 1,65; p \leq 0,010) (**Figura 18**), así como una disminución estadísticamente significativa de la expresión de

los siguientes genes reloj: PER1, PER2, PER3, ROR α , ARNTL, CLOCK, EPAS1, CRY1 y CRY2 (**Figura 19**).

En el análisis bivariado, hay una correlación inversa entre la expresión relativa de HIF-1 α y el control metabólico determinado por valores de HbA1c (**Figura 20**).

Figura 18. Expresión relativa de HIF-1 α en función de la presencia o no de DM tipo 2.

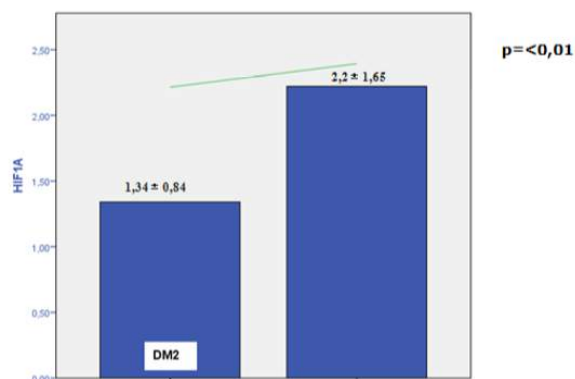


Figura 19. Expresión génica de genes reloj en función a la presencia DM tipo 2.

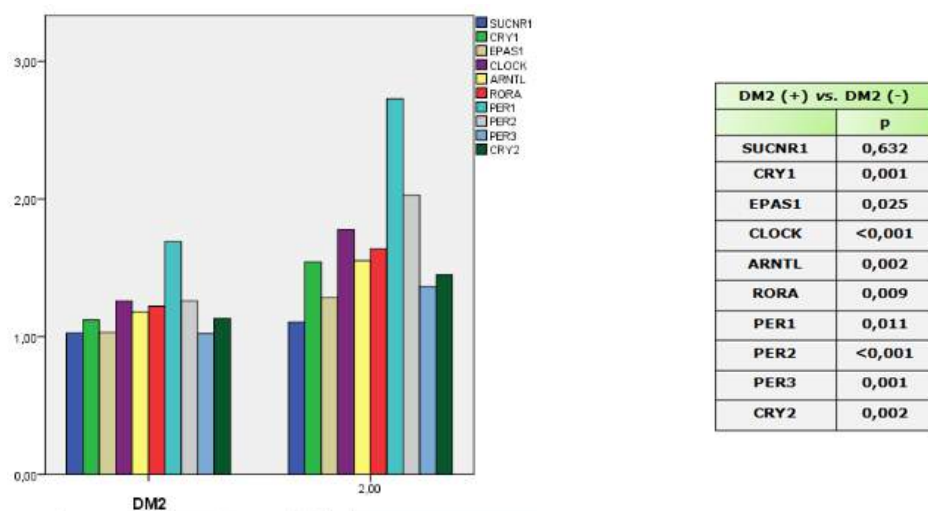
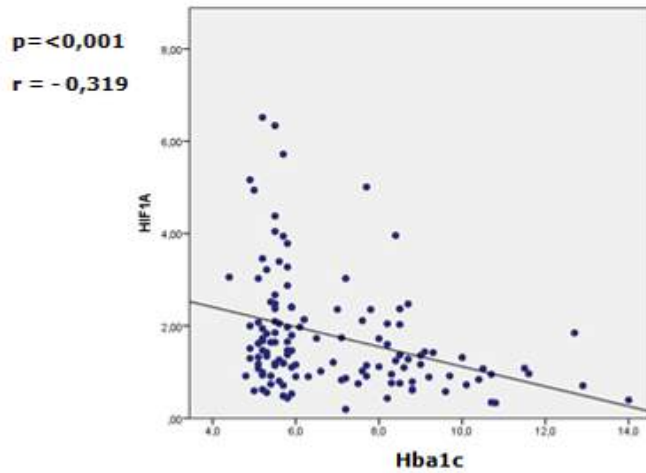


Figura 20. Correlación lineal entre HbA1c y expresión relativa de HIF-1 α



De igual manera, todos los genes reloj estudiados se correlacionaron positiva y significativamente con HIF-1 α e inversamente con la HbA1c (**Figuras 21 y 22**).

Figura 21. Correlación lineal entre la expresión relativa de HIF-1 α y los genes reloj evaluados en el estudio.

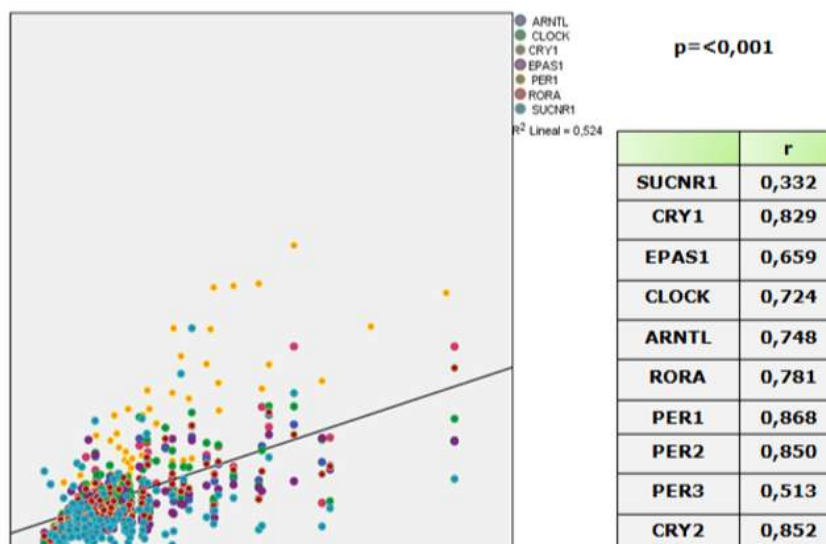
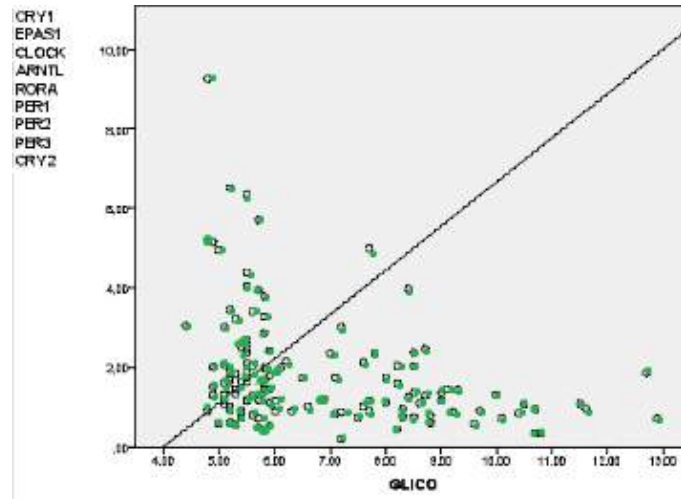
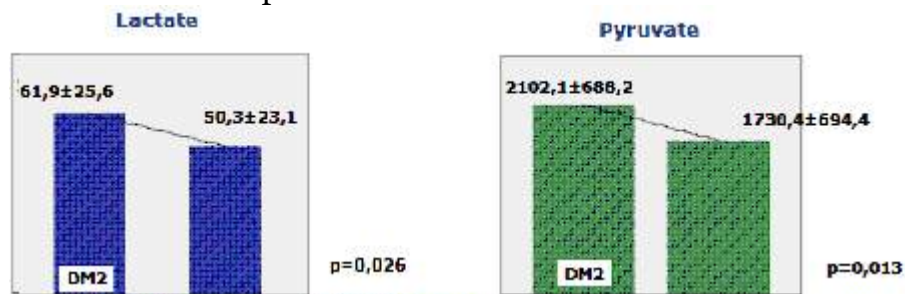


Figura 22. Correlación lineal entre la expresión relativa de los genes reloj y la HbA1c.



En los pacientes con DM tipo 2 se observó también un incremento significativo en los niveles de piruvato, más no de lactato. Este dato podría indicar una inadecuada respuesta celular a la hipoxia nocturna con una menor glicólisis anaeróbica (**Figura 23**).

Figura 23. Concentración de piruvato y lactato en función de la presencia o no de DM tipo 2.



En el análisis de regresión múltiple encontramos una interacción significativa entre diversos genes reloj y el nivel de HbA1c con la expresión relativa de HIF-1 α (**Tabla 7**).

Tabla 7. Análisis de regresión múltiple (por pasos): variables asociadas de forma independiente con la expresión relativa de HIF-1 α .

	β	p
Edad (años)	0.001	0.946
HbA1c (%)	-0.099	0.033
IMC (kg/m²)	0.012	0.369
Género (mujer/hombre)	-0.133	0.479
CLOCK	1.202	<0.001
CRY	1.976	<0.001
CRY 2	0.963	0.003
PER	1.159	<0.001
PER 2	0.761	<0.001
PER 3	1.028	<0.001
RORα	1.146	<0.001
EPAS1	1.139	<0.001
SUCNR	0.456	<0.001
Constante	-	0.594
R²=0.550		

Por último, en el subgrupo de 40 pacientes con DM tipo 2 en los que se dispone de un estudio del sueño nocturno, el valor de CT90 se relacionó de manera inversa con la expresión relativa de los genes estudiados; así, a mayor tiempo en hipoxia nocturna menor expresión de genes reloj y de genes relacionados con la transcripción en condiciones de hipoxia. Esta relación fue estadísticamente significativa para los genes: HIF-1 α , PER1, PER2, PER3, CRY1, CRY2 y EPAS1. **(Tabla 8)**

Tabla 8. Correlaciones lineales entre la expresión relativa de los genes estudiados y el CT90 en el grupo de pacientes con DM tipo 2 que disponen de estudio de poligrafía cardiorrespiratoria.

	CT90	
PER1	-0.205	0.003
PER2	-0.492	0.015
PER3	-0.307	0.014
HIF-1α	-0.449	0.028
EPAS1	-0.421	0.040
CRY 1	-0.262	0.021
CRY 2	-0.413	0.045

En conclusión, este estudio demuestra que la DM tipo 2 altera la expresión génica de HIF-1 α y de diversos genes reloj, lo que se correlaciona con el grado de control metabólico. Además, la hipoxia nocturna mantenida disminuye la expresión relativa de HIF-1 α y a su vez, la expresión de genes reloj.

Nuestros resultados ponen el foco sobre una vía fisiopatológica que podría estar implicada en el desarrollo de algunas de las complicaciones tardías de la diabetes y que podría, por lo tanto, convertirse en un potencial nuevo objetivo terapéutico.

CONTRIBUCIÓN CIENTÍFICA COMO PÓSTER:

López-Cano C, Gutiérrez-Carrasquilla LP, Fernández-Veledo S, Sánchez E, Martí R, Campos A, Lecube A. *Efecto de la diabetes tipo 2 en la expresión de HIF-1. ¿Existe relación con los genes reloj?* XXX Congreso Nacional de la SED. Sevilla. Abril 2019.

López-Cano C, Gutiérrez-Carrasquilla LP, Sánchez E, Campos A, Hernández M, Fernández-Veledo S, Vendrell J, Lecube A. *Effect of type 2 diabetes on the expression of hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1α): Is there a relationship with the clock genes?* 55th EASD (European Association for the Study of Diabetes) Annual Meeting. Barcelona. Septiembre 2019.

Lecube A, **López-Cano C**, Gutiérrez-Carrasquilla LP, Sánchez E, Campos A, Ruano R, Hernández M, Rius F, Fernández-Veledo S, Vendrell J. *Efecto de la diabetes mellitus tipo 2 sobre la hipoxia nocturna y la cronodisrupción. ¿Es dormir perjudicial?* 60 congreso Nacional de la SEEN. Bilbao. Octubre 2019

CONTRIBUCIÓN CIENTÍFICA COMO PONENCIA:

López Cano C. *Cronodisrupción, hipoxia nocturna y diabetes tipo 2*. En la reunión anual: TARRACO-MALACCA VI JOINT WORKSHOP, An update on new players in obesity and type 2 diabetes. Málaga. Abril 2019.

ESTUDIO 3

Proteína surfactante sérica D como biomarcador para medir el compromiso pulmonar en pacientes obesos con diabetes tipo 2

López-Cano C, Lecube A, García-Ramírez M, Muñoz X, Sánchez E, Seminario A, Hernández M, Ciudin A, Gutiérrez L, Hernández C, Simó R. *Serum Surfactant Protein D as a Biomarker for Measuring Lung Involvement in Obese Patients With Type 2 Diabetes*. J Clin Endocrinol Metab. 2017; 102: 4109-4116

RESUMEN

La disfunción pulmonar es una de las complicaciones crónicas no “clásicas” de la DM tipo 2. Si bien su fisiopatología no está completamente elucidada, se han descrito alteraciones en el surfactante bronquiolar. Cuando la capa de surfactante bronquiolar se daña, las proteínas que lo componen migran del espacio alveolar al torrente sanguíneo. Así, se han descrito dos proteínas tensoactivas hidrófilas del surfactante, D y A (SP-D y SP-A, respectivamente) como potenciales biomarcadores sistémicos para evaluar la lesión pulmonar.

Con el fin de examinar si los niveles circulantes de SP-D y SP-A podrían ser útiles para identificar pacientes con DM tipo 2 y daño pulmonar establecido, diseñamos un estudio transversal de casos y controles. La población a estudio se definió según los siguientes criterios de inclusión: **(i)** edad \geq 18 años, **(ii)** IMC igual o mayor de 30 kg/m², **(iii)** DM tipo 2 con al menos 5 años de evolución conocida, **(iv)** sin historia de tabaquismo y **(v)** sin enfermedad pulmonar conocida (**Tabla 9**). Para los 49 pacientes obesos con DM tipo 2 reclutados se incluyeron, en una proporción 2:1, 98 individuos control sin diabetes, estrictamente apareados por edad, sexo, IMC y circunferencia de cintura.

Tabla 9. Principales características clínicas y metabólicas de los sujetos incluidos en el estudio

	DM tipo 2	No DM tipo	Diferencia media (95% IC)	P
n	49	98	-	-
Edad (años)	51,3 \pm 10,6	48,5 \pm 9,4	2,8 (-0,5 a 6,2)	0,103
Mujer, n (%)	37 (75,5)	74 (75,5)	-	1,000
IMC (kg/m²)	42,0 \pm 7,7	42,6 \pm 6,7	-0,6 (-3,1 to 1,8)	0,633
Circunferencia cuello (cm)	125,9 \pm 12,0	123,3 \pm 9,1	2,5 (-4,6 to 9,7)	0,480
GPA (mmol/l)	9,2 \pm 3,4	5,5 \pm 0,6	3,6 (2,5 to 4,6)	<0,001
HbA1c (%)	8,0 \pm 1,9	5,6 \pm 0,4	2,4 (1,8 to 3,0)	<0,001
HbA1c (mmol/mol)	64,0 \pm 5,7	38,0 \pm 1,2	27,0 (5,4 to 9,0)	<0,001
Tratamiento insulina, n (%)	10 (20,4)	-	-	-

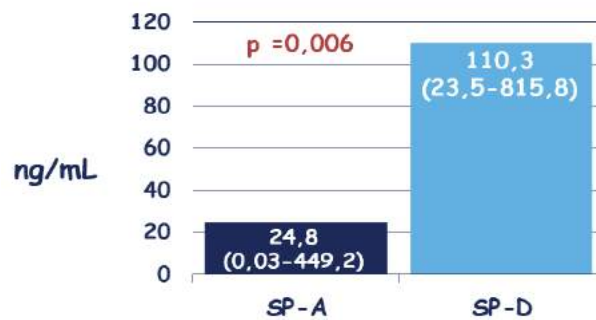
Datos son media \pm SD o mediana (rango); GPA: glucosa plasmática en ayunas; HbA1c: hemoglobina glicosilada

Se midieron los niveles séricos de SP-D y SP-A mediante ensayo inmunoenzimático. La función pulmonar se evaluó mediante una espirometría forzada, seleccionando la mejor luego de un mínimo de tres mediciones

reproducibles, y los volúmenes pulmonares estáticos se evaluaron mediante pletismografía.

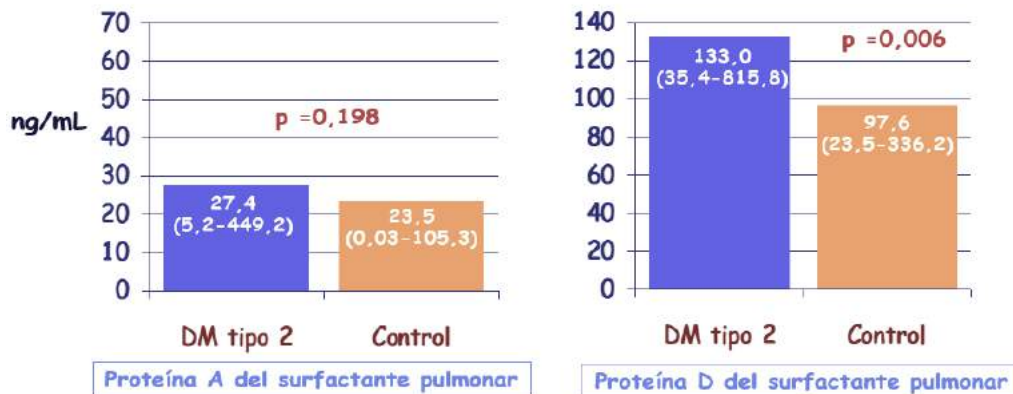
En el conjunto de toda la población, la concentración sérica de SP-D fue cuatro veces mayor que los niveles séricos de SP-A [110,3 (23,5 – 815,8) vs. 24,8 (0,3 – 449,2) ng/ml, $p < 0,001$], exhibiendo los hombres valores más altos de SP-D que las mujeres [134,3 (36,9 – 413,3) vs. 94,4 (23,5 – 815,8), $p = 0,003$]. (**Figura 24**).

Figura 24. Comparación entre las concentraciones séricas de las proteínas A y D del surfactante pulmonar en toda la población estudiada.



La concentración sérica de SP-D fue significativamente mayor en pacientes con DM tipo 2 que en los sujetos control [133,0 (35,4 – 815,8) vs. 97,6 (23,5 – 336,2) ng/mL, $p = 0,006$]. Sin embargo, no encontramos diferencias en los niveles de SP-A entre ambos grupos (**Figura 25**).

Figura 25. Comparación entre las concentraciones séricas de las proteínas A y D del surfactante pulmonar en toda la población estudiada.



Por su parte, en los pacientes con DM tipo 2 se detectó una mayor prevalencia de defectos ventilatorios, con cifras de VEF1, CVF y FEF25-75 significativamente más bajas que el grupo control (**Tabla 10**).

Tabla 10. Espirometría forzada y volumen pulmonar estático de sujetos incluidos en el estudio.

	DM tipo 2	No DM tipo	Diferencia media (95% IC)	p
CPT (% teórico)	92,2±18,4	94,4±19,5	-1,8 (-13,8 a 10,1)	0,759
CVF (% teórico)	79,7±21,7	92,9±11,0	-13,2 (-22,5 a 3,8)	0,007
VEF1 (% teórico)	82,9±25,9	101,1±13,1	-18,1 (-29,2 a -7,0)	0,002
FEF₂₅₋₇₅ (% teórico)	73,9±32,5	100,2±25,1	-26,2 (-42,5 a -10,0)	0,001
VR (% teórico)	97,5±24,8	80,5±18,0	16,9 (4,0 a 29,8)	0,011
Defecto ventilatorio no obstructivo, n (%)	13 (26,5)	3 (3,0)	-	<0,001
Defecto ventilatorio obstructivo, n (%)	17 (34,6)	4 (4,0)	-	<0,001

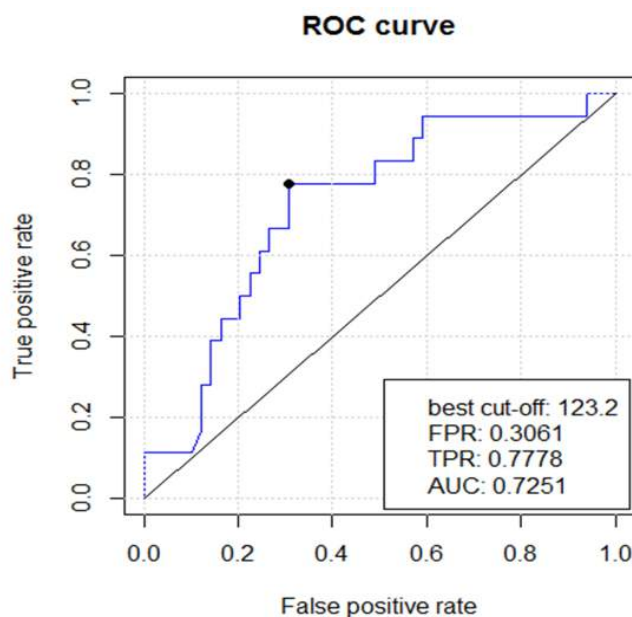
Los datos son media ± DE. CPT: capacidad pulmonar total; CVF: capacidad vital forzada; VEF1: volumen espiratorio forzado en un segundo; FEF₂₅₋₇₅: flujo espiratorio medio máximo; VR: volumen residual. Defecto ventilatorio no obstructivo: VEF1 < 80 % con una ratio VEF1/CVF > 70%. Defecto ventilatorio obstructivo: VEF1 < 80% con una ratio VEF1/CVF < 70%.

En el análisis bivariado, al analizar a toda la población incluida en el estudio, hallamos una correlación inversa y significativa entre la concentración sérica de SP-D y el FEV₁ (r=-0,265, p=0,029), así como una relación positiva y significativa entre SP-D y el volumen residual (VR) (r=0,293, p=0,043). Sin embargo, no encontramos correlaciones entre los niveles séricos de SP-A y la función pulmonar, ni tampoco entre las proteínas séricas del surfactante (SP-A y SP-D) y los parámetros de control glucémico (glucemia en ayunas y HbA1c).

La precisión de la concentración sérica de SP-D como medida de interés para discriminar sujetos con un FEV₁ inferior al 80% del teórico en el total de la población se evaluó mediante un análisis de curva de características operativas del receptor (ROC). A partir de este análisis, el mejor punto de corte para SP-D (combinando sensibilidad más especificidad) fue 123,2 ng/ml (**Figura 26**). En este valor, el área bajo la curva fue de 0,725, con una sensibilidad del 77,7% y una especificidad del 69,4%. Así, los sujetos con una concentración sérica de SP-

D superior a 132,3 ng/ml exhibieron un valor significativamente más bajo de FEV1 [$87,2 \pm 22,6$ vs. $98,1 \pm 18,8\%$ del predicho; diferencia media $-10,9$ (IC 95% $-21,2$ a $-0,7$); $p=0,035$] y una relación FEV1 / FVC más baja [$78,8 \pm 26,6$ vs. $92,2 \pm 13,4$; diferencia media $-13,4$ (IC 95%: $-24,2$ a $2,6$); $p=0,016$] en comparación con sujetos con menor concentración de SP-D.

Figura 26. Análisis de la curva ROC para evaluar la precisión de la concentración sérica de SP-D en la discriminación de sujetos con un valor de VEF1 inferior al 80% de sujetos con un valor normal.



TPR: tasa de falsos positivos; TPR: verdadera tasa positiva; AUC: área bajo la curva.

El análisis de regresión multivariante paso a paso reveló que la presencia de DM tipo 2, junto con la edad, el sexo y una concentración sérica de SP-D $\geq 132,3$ ng/mL se asociaron de manera independiente con una medición del VEF1 inferior al 80% del valor teórico (**Tabla 11**). Por otro lado, sólo la existencia de DM tipo 2 se asoció de forma independiente con las concentraciones séricas de SP-D.

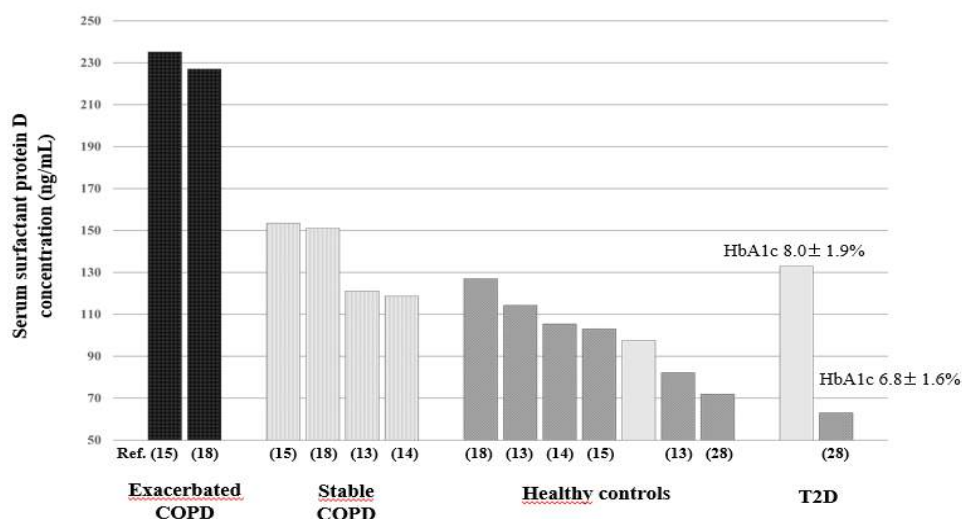
Si comparamos las concentraciones séricas del SP-D encontrados en nuestra cohorte de pacientes con DM tipo 2 con los hallazgos reportados en pacientes con patología pulmonar y en población sana, podemos poner en perspectiva nuestros resultados (**Figura 27**).

Tabla 11. Análisis de regresión multivariante paso a paso de variables asociadas con (i) un volumen espiratorio forzado en 1 segundo inferior al 80% del teórico y (ii) la concentración sérica de SP-D

		Beta	p
VEF1<80%			
	DM tipo 2 (si/no)	0.302	0.010
	Género (M/H)	0.286	0.010
	SP-D (≥ 132 ng/mL)	0.297	0.011
	Edad (años)	0.250	0.023
	HbA1c (mmol/mol)	-0.091	0.511
	IMC (kg/m^2)	0.169	0.865
	Constante	-	0.032
	$R^2 = 0.407$		
SP-D sérico			
	DM tipo 2 (si/no)	0.371	0.004
	HbA1c (mmol/mol)	-0.238	0.170
	VEF1 (% predicho)	-0.155	0.249
	IMC (kg/m^2)	0.117	0.353
	Género (M/H)	0.084	0.503
	Edad (años)	-0.106	0.902
	Constante	-	<0.001
	$R^2 = 0.138$		

Beta: coeficiente de regresión estandarizado. SP-D: proteína D surfactante sérico; IMC: índice de masa corporal; VEF1: volumen espiratorio forzado en un segundo.

Figura 27. Concentraciones séricas de la proteína D del surfactante durante la exacerbación de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), EPOC estable, controles sanos y pacientes con diabetes tipo 2.



Datos son media \pm SD ^{15, 18} y mediana (rango) ^{13, 14, 28}. Los resultados comprenden resultados de estudios observacionales como el *Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate Endpoints* (ECLIPSE) ¹³ [164] y el *Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian* (PLCO) ¹⁴ [165], que evaluó la proteína D del surfactante sérico en 2,385 y 1,114 individuos, respectivamente; y también pequeños estudios con 324 ²⁸ [166] 171 ¹⁵ [167], and 81 ¹⁸ [168] individuos. En todos los estudios, SP-D sérico fue medido por

ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas. COPD: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; T2D: diabetes tipo 2.

La mediana del nivel sérico de SP-D fue ligeramente mayor que el límite superior más alto encontrado en controles sanos y dentro del límite inferior previamente reportado en pacientes con EPOC estable. Sin embargo, fue mucho más bajo que la observada en pacientes con EPOC exacerbada o fibrosis pulmonar. De manera similar, la magnitud de la diferencia de la mediana entre nuestros pacientes y controles (35,4 ng/mL) fue similar a la diferencia observada entre pacientes con EPOC y sujetos no fumadores sanos (38,1 ng/mL).

En el único estudio que previamente al nuestro había evaluado los niveles circulantes de la SP-D, Fernández-Real y colaboradores reportaron, en los pacientes con DM tipo 2, niveles séricos más bajos en comparación con pacientes no diabéticos. Sin embargo, la población con diabetes seleccionada no era obesa y presentaba un excelente control glucémico, probablemente relacionado con el hecho de que una proporción significativa de pacientes fue diagnosticado a propósito del estudio mediante la prueba de tolerancia a la glucosa oral de 75 g. Estas diferentes características clínicas, y en particular, la mayor duración de la diabetes en aquellos pacientes incluidos en nuestro estudio, podría ser la razón que explique las discrepancias entre ambos estudios.

En conclusión, nuestro trabajo muestra una elevación de las concentraciones séricas de SP-D en los pacientes con obesidad y DM tipo 2, y que su concentración se relaciona de forma directa con la función pulmonar. Por lo tanto, la determinación de los niveles circulantes de SP-D parece ser un biomarcador útil para evaluar la afectación pulmonar en pacientes obesos con DM tipo 2.

CONTRIBUCIÓN CIENTÍFICA COMO PÓSTER:

Lecube A; García-Ramírez M; **López-Cano C**; Ciudin A; Sánchez E; Hernández C; Turino C; Seminario A; Simó R. *Serum surfactant D protein as a new marker for screening pulmonary disease in patients with type 2 diabetes. A case-control study.* 52nd Annual Meeting of EASD (Asociación Europea para el Estudio de la Diabetes). Munich. Septiembre 2016.

CONTRIBUCIÓN CIENTÍFICA COMO COMUNICACIÓN ORAL:

Lecube A, García-Ramírez M, Sánchez E, **López-Cano C**, Ciudin A, Hernández C, Simó R. *Determinación de los niveles séricos de surfactante como marcador de lesión pulmonar en la diabetes mellitus tipo 2: ¿Tiene alguna utilidad?* 58º Congreso de la SEEN (Sociedad Española de Endocrinología). Málaga. Octubre 2016

López-Cano C, García-Ramírez M, Muñoz X, Sánchez E, Seminario A, Hernández M, Ciudin A, Gutiérrez LP, Hernández C, Simó R, Lecube A. *Proteína surfactante D sérica como biomarcador de lesión pulmonar en la diabetes mellitus tipo 2.* XIX Congrés Societat catalana d'Endocrinologia i Nutrició. Barcelona. Noviembre 2016.

Lecube A, García-Ramírez M, Sánchez E, **López-cano C**, Ciudin A. Hernández C, Simó R. *En busca de marcadores de lesión pulmonar en la diabetes mellitus tipo 2: ¿Puede sernos de utilidad los niveles séricos de surfactante pulmonar?* XXVII Congreso Nacional SED (Sociedad Española de Diabetes). Bilbao. Abril 2016

Serum surfactant proteins in type 2 diabetes

Serum Surfactant Protein D as a Biomarker for Measuring Lung Involvement in Obese Type 2 Diabetic Patients.

Carolina López-Cano (M.D.)^{1*}, Albert Lecube (M.D., Ph.D.)^{1,2*}, Marta García-Ramírez (Ph.D.)^{2,3}, Xavier Muñoz (M.D., Ph.D.)^{4,5}, Enric Sánchez (Ph. Student)¹, Asunción Seminario (M.D.)^{5,6}, Marta Hernández (M.D.)¹, Andreea Ciudin (M.D.)³, Liliana Gutiérrez (M.D.)¹, Cristina Hernández (M.D., Ph.D.)^{2,3}, Rafael Simó (M.D., Ph.D.)^{2,3}

¹ *Endocrinology and Nutrition Department, Hospital Universitari Arnau de Vilanova. Institut de Recerca Biomèdica (IRB) de Lleida. Universitat de Lleida. Lleida, Catalonia, Spain.*

² *Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain.*

³ *Endocrinology and Nutrition Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron. Diabetes and Metabolism Research Unit, Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR). Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, Catalonia, Spain.*

⁴ *Pneumology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron. Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR). Barcelona, Catalonia, Spain.*

⁵ *Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain.*

⁶ *Respiratory Department, Hospital Universitari Arnau de Vilanova-Santa Maria. Institut de Recerca Biomèdica (IRB) de Lleida. Universitat de Lleida. Lleida, Catalonia, Spain*

Received 18 April 2017. Accepted 08 September 2017.

Abbreviations (arranged in alphabetical order):

- BAL: bronchoalveolar lavage
- BMI: body mass index
- COPD: chronic obstructive pulmonary disease
- ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay
- FEF25-75: maximum midexpiratory flow
- FEV1: forced expiratory volume in 1 second
- FVC: forced vital capacity
- GLP-1: glucagon like peptide 1
- GOLD: Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
- HbA1c: glycated haemoglobin
- ROC: receiver operating characteristic
- RV: residual volume
- SP-A: surfactant protein A
- SP-D: surfactant protein D
- T2D: type 2 diabetes

Context: Lung impairment is a new target for late diabetic complications. Biomarkers that could facilitate the identification of patients requiring functional respiratory tests have not been reported.

Objective: The aim of this study is to examine whether serum surfactant protein D (SP-D) and A (SP-A) could be useful biomarkers of lung damage in obese patients with type 2 diabetes without known lung disease.

Design and Setting: A case-control study conducted in an ambulatory obesity unit. *Patients:* 49 obese patients with type 2 diabetes and 98 non-diabetic subjects, matched by age, gender, BMI, and waist circumference were included.

Interventions: Serum SP-D and SP-A were measured using enzyme-linked immunosorbent assay. Forced spirometry and static pulmonary volume were assessed.

Results: Patients with T2D exhibited higher serum SP-D concentrations than control subjects ($p=0.006$). No differences in serum SP-A concentrations were observed. There was an inverse association between forced expiratory volume in one second (FEV1) and serum SP-D ($r=-0.265$, $p=0.029$), as well as a significant positive relation between SP-D and residual volume ($r=0.293$, $p=0.043$). From Receiver Operating Characteristic analysis, the best SP-D cut-off to identify a FEV1<80% of predicted was 132.3 ng/mL (area under the curve 0.725, sensitivity 77.7%, specificity 69.4%). Stepwise multivariate regression analysis showed that serum SP-D \geq 132.3 ng/mL was independently associated with a FEV1<80% of predicted ($R=0.406$). Only the existence of type 2 diabetes contributed independently to serum SD-P variance among all subjects ($R=0.138$).

Conclusions: Serum SP-D can be considered a useful biomarker for detecting lung impairment in obese type 2 diabetic patients.

Case-control study to test serum surfactant proteins as biomarkers for lung damage in type 2 diabetes. Serum SP-D concentrations had an inverse association with forced expiratory volume in one second.

1. Introduction The deleterious effects of type 2 diabetes (T2D) on pulmonary function has not classically been included among the chronic complications of this disease. However, lung parenchyma combines its significant vascularization with abundant elastin and collagen fibers, thus rendering it a potential target for chronic hyperglycemia. [1, 2] In fact, epidemiological studies have described how subjects with T2D exhibit lower forced expiratory volume in one second (FEV1) and forced vital capacity (FVC) values than healthy control populations. [3-5] In addition, fasting plasma glucose and glycated haemoglobin (HbA1c) have shown an inverse association with spirometric values. [3, 4] The underlying causes contributing to the development of pulmonary dysfunction in T2D are still not fully known. However, insulin resistance, low-grade chronic inflammation, microvascular damage, and defects in the bronchiolar surfactant layer have been considered the main pathogenic factors. [6-9] In addition, a reduction in FVC and FEV1 has been reported in obesity, which is frequently associated with T2D, thus contributing to restrictive lung disease. [10,11] When the bronchiolar surfactant layer, a complex mixture composed of approximately 90% of phospholipid and four specific associated proteins, involved in maintaining airway stability and caliber, is damaged, surfactant proteins migrate from the alveolar space into the bloodstream. [12] Two hydrophilic surfactant proteins, D and A (SP-D and SP-A, respectively), have been described. [13, 14] SP-D is a large member of the collagen-containing C-type lectins. It is produced primarily by alveolar type II cells in the lung epithelium, participates in pulmonary immunity and homeostasis, and has been used as

indicator to detect short-term changes in lung integrity. [13, 14, 15] On the other hand, SP-A is the major protein component of the surfactant, regulate surfactant phospholipid synthesis, secretion, and recycling. In addition to this important role in the structure of the extracellular form of surfactant, SP-A also modulates host response to microbes and particulates at the level of the alveolus [15-7]. Lung epithelium-specific proteins such as SP-D and SP-A, as they may reflect pulmonary epithelial injury and consequent increased permeability, have been identified as potential systemic biomarkers for assessing lung injury in a variety of diseases, such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD), lung cancer, and acute respiratory distress syndrome. [18-20] In addition, an inverse relation between serum SP-D concentration and FEV1 values has been reported, thus reinforcing the concept that serum surfactant proteins could be a useful biomarker of pulmonary function. [20-23] However, it is unknown whether SP-D and SP-A could be useful for identifying type 2 diabetic patients with pulmonary damage. On the basis, our hypothesis is that a contributing factor to the impairment of airway caliber regulation in patients with T2D may be related to defects in the bronchiolar surfactant layer, favoring the scape of its proteins from the alveolar space into the vascular compartment. Therefore, we have designed a case-control study aimed at examining whether circulating levels of SP-D and SP-A are increased, and could be used as potential biomarkers and alternative method for evaluating the integrity of the alveolar capillary membrane in obese T2D subjects without known pulmonary disease.

2. Materials and Methods

Ethics statement The protocol and consent forms were approved by the Ethical Committee of the Hospital Universitari Vall d'Hebron, and an informed written consent was obtained from each patient.

Design of the study and description of the study population We evaluated the effect of T2D and the degree of glycemic control on the serum levels of SP-D and SP-A following the Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology guidelines for reporting case-control studies. [24] A total of 221 Caucasian patients with T2D attending the obesity unit of our endocrinology department during the year 2015 were examined at the time of their regular visit (Supplemental figure 1). The inclusion criteria were: age > 18 years, non-smoking status, BMI of 30 kg/m² for higher, and T2D with at least 5 years of follow-up. Using the standard deviation of serum SP-D detected in a previous study, we determined that the minimum sample size required was 44 subjects. [20] Among the 84 patients who met the inclusion criteria, we excluded 35 for the following reasons: chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (n=8), heart failure (n=3), active malignancy (n=2), a glomerular filtration rate lower than 60 ml/min/per 1.73 m² (n=5), an age older than 80 years (n=3), chronic treatment with steroids (n=4), and pregnancy (n=2). In addition, since the glucagon-like peptide 1 (GLP-1) receptor has been found abundantly in the lungs, where could be implicated in the regulation of the lipid fraction of surfactants, we excluded 8 patients receiving treatment with human GLP-1 receptor agonists. [25] Therefore, a total of 49 cases were included. We aimed to select two controls for every case, and we assembled a control group consisting of 98 non-diabetic subjects visiting the same unit at our hospital during the same period. The controls were closely matched to the cases in terms of age, gender, BMI, and waist circumference. The primary clinical characteristics and metabolic data of the study population are listed in Table 1. In addition, when we observed that patients with T2D exhibited substantial differences in pulmonary flow and volume measures than the control group, we decided to recruit a third set of 38 obese non-diabetic

subjects (age: 41.5 ± 11.6 years; BMI: 43.8 ± 7.7 kg/m²; waist circumference: 130.8 ± 10.2 cm; FPG: 5.1 ± 0.5 mmol/l; HbA1c: 34.7 ± 5.1 mmol/mol, $5.3 \pm 0.4\%$) without known lung disease, that were matched to the cases not only by BMI and waist circumference, but also by spirometric values. This approach would permit us to rule out that the changes in serum surfactant proteins were merely related to the presence lung impairment rather than T2D. Type 2 diabetes was defined according to the criteria recommended by the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes. [26] Treatment for type 2 diabetes included diet alone (12.2%), metformin alone (22.4%), metformin plus sulphonylureas (16.3%), metformin plus basal insulin (18.3%), and basal plus or basal bolus therapy (6.1%). The remaining 11 patients (24.4%) were receiving different oral treatment combinations.

Sample collection. After an overnight fast of 12 h, we collected venous blood from the antecubital vein. We separated the samples by centrifugation (3.000g at 4° C for 20 min), and the aliquots were stored at -80°C for batched analysis. Serum SP-D and SP-A concentrations (ng/ml) were assessed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; BioVendor R&D, Deltaclon, Barcelona, Spain). The ELISA was performed according to the method described by the manufacturer. The SP-D and SP-A samples were diluted 1:11 and 1:10 respectively with the dilution buffer provided in the kit and vortexed. The limit of SP-D detection was 0.01ng/mL and the assay limit was 500ng/mL; the coefficient of variation (CV) intra-assay value was 2.1% and the CV inter-assay value was 3.7%. The limit of SP-A detection was 0.16ng/mL and the assay limit 500 ng/mL; the coefficient of variation (CV) intra-assay value was 3.3% and the CV inter-assay value was 10.2%.

Measurement of respiratory function Forced spirometry was performed using a MasterLab apparatus (MasterLab; Jaeger; Würzburg, Germany), and the static pulmonary volumes were measured using the plethysmography method. All the tests were performed following guidelines proposed by the European Respiratory Society. [27] Before each assessment, the procedure was demonstrated to the patient, who was asked to do some practice efforts. Subjects were required to perform a minimum of three reproducible measurements, and the output which produced the highest sum of FVC and FEV1 was chosen for the analysis. According to the Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), a normal FEV1 was defined as a value equal or higher than 80% of predicted, a “non-obstructive ventilatory defect” was defined by a FVC 70%, and an “obstructive ventilatory defect” by a $FEV1 < 80\%$ of the predicted 218 value and $FEV1/FVC$ ratio $< 70\%$ [28, 29].

Statistical analysis We evaluated the normality of the variables using the Kolmogorov-Smirnov test. Data were expressed as the arithmetic mean \pm SD or percentage. Given its skewed distribution, serum SP-D and SP-A were expressed as the median (range) and the geometrical mean. Comparisons between groups were made using the Student’s t-test and the Mann-Whitney U test for continuous variables, and the χ^2 test for categorical variables. For the rest of statistical analysis, serum SP-D and SP-A were logarithmically transformed to achieve a normal distribution. The relation between the continuous variables was assessed by the Pearson linear correlation test. The accuracy of SP-D as a measurement of interest to discriminate diseased cases (patients with FEV1 lower than 80% of predicted) from normal cases was evaluated using a Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analysis and a complete sensitivity/specificity report. The total area under the ROC curve value was interpreted following the next guidelines: 0.9 to 1.0, excellent test; 0.8 to 0.9, good test; 0.7 to 0.8, fair test; 0.6 to 0.7, poor test, and 0.5 to 0.6, not useful. To explore the variables that

were independently associated with serum SP-D, and a FEV1 lower than 80% of predicted, stepwise multivariate regression analyses were used. The independent variables included in the analyses were age, BMI, gender, the presence of type 2 diabetes, HbA1c, and the best cut-off value in terms of the sensitivity and specificity of SP-D obtained from the ROC analysis. All the p values were based on a two-sided test of statistical significance. Significance was accepted at the level of $p < 0.05$. The statistical analyses were performed using the SPSS statistical package (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY, USA).

3. Results Serum SP-D concentration was significantly higher in patients with T2D than in the control subjects [133.0 (35.4 - 815.8) 241 vs. 97.6 (23.5 - 336.2) ng/mL, $p=0.006$] [geometric means: 139.9 vs. 99.4 ng/mL] (Figure 1). However, no differences in circulating SP-A levels were found between the groups. In the entire population, serum SP-D concentration was four times higher than serum SP-A levels [110.3 (23.5 - 815.8) vs. 24.8 (0.3 - 449.2) ng/ml, $p < 0.001$] [geometric means: 114.9 244 vs. 23.2 ng/mL]. In addition, men exhibited higher values of SP-D than women [134.3 (36.9 - 413.3) vs. 94.4 (23.5 - 245 815.8), $p=0.003$] [geometric means: 153.7 vs. 106.7 ng/mL]. The parameters of pulmonary function are displayed in **Table 2**. Type 2 diabetic patients presented a significantly lower FEV1, FVC and maximum mid-expiratory flow (FEF25-75) than the non-diabetic control group. In addition, a higher residual volume (RV), as well as a higher prevalence of ventilatory defects, was detected in T2D patients in comparison with non-diabetic control subjects. When we evaluated the entire population in the univariate analysis, we noted a significant inverse correlation between serum SP-D and FEV1 ($r=-0.265$, $p=0.029$), as well as a significant positive relation between SP-D and RV ($r=0.293$, $p=0.043$) (Table 3). Serum SP-A levels did not correlate with any of the pulmonary parameters. In addition, we did not observe any correlation between serum surfactant proteins and parameters of glycemic control (fasting plasma glucose and HbA1c). From the ROC analysis, the serum SP-D value itself was a good indicator for identifying patients with a FEV1 lower than 80% of predicted. The best cut-off point for circulating SP-D (combining sensitivity plus specificity) was 123.2 ng/mL. At this value, the area under the curve was 0.725, sensitivity was 77.7%, and specificity was 69.4% (Figure 2). In fact, subjects with a serum SP-D concentration higher than 132.3 ng/mL exhibited a significantly lower FEV1 [87.222.6 vs. 98.118.8% of predicted; mean difference -10.9 (95% CI -21.2 to -0.7); $p=0.035$], and lower FEV1/FVC ratio [78.8±26.6 vs. 92.2±13.4; mean difference -13.4 (95% CI -24.2 to 2.6); $p=0.016$] in comparison with subjects with lower serum SP-D concentrations. The stepwise multivariate regression analysis revealed that the presence of T2D along with age, gender, and a serum SP-D ≥ 132.3 ng/mL (but not HbA1c or BMI) were independently associated with a FEV1 measurement lower than 80% of predicted ($R^2 = 0.406$). On the other hand, only the existence of T2D (but not age, BMI, HbA1c, gender, or FEV1) was independently associated with serum SD-P concentrations ($R^2 = 0.138$) (Table 4). Finally, when we compare patients with T2D and the group of obese non-diabetic subjects with similar decreased spirometric values [FEV1: 80.7±10.7 % of predicted; FVC: 80.8±11.9 % of predicted; FEF25-75: 72.6±30.0 % of predicted; $p=0.697$, $p=0.845$, and $p=0.877$, respectively], serum SP-D concentrations remained significantly higher in the former [133.0 (35.4 - 815.8) vs. 112.5 (44.8 - 195.4) ng/mL, $p=0.043$] [geometric means: 139.9 vs. 103.8 ng/mL].

5. **Discussion** To the best of our knowledge, this study is the first to evaluate circulating surfactant proteins as biomarkers of lung injury in obese type 2 diabetic patients. We provide evidence that serum SP-D but not SP-A serum levels increase in obese patients with T2D in comparison with obese non-diabetic control subjects. In addition, a significant correlation between SP-D serum levels and functional parameters of lung impairment was found. Surfactant protein D is a large multimeric collagenous glycoprotein formed by type II alveolar epithelial and Clara cells in the lungs. [12-14] In the alveolar epithelium, SP-D maintains lung immune homeostasis, and removes apoptotic cells so allowing harmful inhaled pathogens to be cleared. [12] Its serum concentration has been evaluated in a large variety of pulmonary diseases, and it has been proposed as a potential systemic biomarker for some lung diseases. [20] In addition, it is worth mentioning that elevated serum levels of SP-D have also been found in non-pulmonary diseases that adversely affect the lungs as part of their systemic repercussion. [30, 31] Furthermore, circulating SP-D could also have a potential role as a prognostic factor. In this regard, an association between increased SP-D serum levels and the risk of death in patients with acute lung injury, and specifically lung cancer risk, has been reported. [19, 32] Notably, an opposite relationship between the SP-D levels obtained in serum and in the fluid from bronchoalveolar lavage (BAL) has been reported in COPD, thus supporting the concept that the enhancement in circulating levels of SP-D is related to the increased transmigration of SP-D from the alveolar space into the blood. [33, 34] The median level of serum SP-D herein reported in type 2 diabetes was slightly higher than the higher upper limit found in healthy controls and within the lower limit previously reported in patients with stable COPD (Supplemental figure 2). However, it was much lower than that observed in patients with either exacerbated COPD or pulmonary fibrosis. [18, 20, 35] Similarly, the magnitude of the median difference between our patients and controls (35.4ng/mL) was similar to the difference noted between COPD patients and healthy non-smoking controls (38.1ng/mL) in the Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate Endpoints (ECLIPSE) study. [18] Therefore, in our group of patients without known lung disease and well-established T2D, serum SP-D may reflect mild pulmonary damage in the absence of clinical illness. Several hypotheses have been proposed to explain the increase in peripheral circulation of SP-D associated with lung injury. [20, 32] However, the most plausible is based on the fact that SP-D is more hydrophilic than SP-A, and that it escapes from the alveolar space into the vascular compartment because of changes in the alveolar epithelial permeability induced by low-grade chronic inflammation in lung parenchyma. [32] Supporting this hypothesis, treatment with systemic steroids induces a decrease in serum SP-D levels in subjects with COPD. [20] Fernández-Real et al [36] made the interesting hypothesis that lung innate immunity, as inferred from circulating SP-D concentrations, is at the cross-roads of inflammation, obesity, and insulin resistance. In this study, lower rather than higher serum levels of SP-D were detected in T2D patients when compared with non-diabetic patients. However, the selected type 2 diabetic population was non-obese and a significant proportion of patients were diagnosed de novo by the 75-g oral glucose tolerance test. These different clinical features, in particular the longer duration of diabetes in those patients included in our study, might be the reason for the different results. Our results also highlight one of the potential causes that contributes to the initiation and aggravation of pulmonary dysfunction in T2D. Although these pathophysiological mechanisms (i.e.: insulin resistance, low-grade chronic inflammation, leptin resistance, microvascular damage, autonomic neuropathy) are usually described separately, each

may explain a part of the whole picture, and many of them may act simultaneously. [6-9] In addition, our finding that serum SP-D concentration was higher in T2D patients than in non-diabetic subjects with similar lung functional impairment, points to the bronchiolar surfactant layer dysfunction as a contributing factor to the impairment of airway caliber regulation that occurs T2D patients. Our data may help to identify T2D patients for whom a respiratory function study would be recommendable. When serum SP-D levels were evaluated in patients with various degrees of COPD, a significant inverse relation between this biomarker and various lung function measurements was observed. [20-23] These data have been replicated in our study. In this regard, a negative correlation between FEV1, FVC, and FEF25-75 values and serum levels of serum SP-D was detected in obese type 2 diabetic patients. Therefore, the measurement of serum SP-D can be contemplated as a serum biomarker of lung impairment in obese patients with T2D, which could be useful as a first step screening test. In our study, a value of 123.2 mg/mL was the best cut-off point to identify subjects with a FEV1 lower than 80% of predicted. Those patients with elevated SP-D could be candidates for further examination by means of respiratory function tests. Nevertheless, further studies and cost-effectiveness analyses aimed at examining the role of SP-D measurements in the clinical practice are needed. We did not find any difference in serum SP-A concentrations between T2D patients and healthy controls. These results are in agreement with data from the National Heart, Lung, and Blood Institute ARDS (acute respiratory distress syndrome) Network trial which revealed that baseline serum SP-A levels were not related to any clinical outcome. [28] However, more data is needed before to rule out the possible relationship between SP-A and the lung impairment in T2D. Some potential limitations are associated with our study. First, our investigation was a cross-sectional study and, therefore, a causal link between T2D and serum SP-D levels could not be established. Second, a decrease of renal clearance of surfactant proteins due to impairment in the glomerular filtration rate could account for the increase of SP D levels in diabetic patients. However, the exclusion of patients with creatinine levels > 1.4 mg/dL, and the single increase of SP-D and not SP-A, make this possibility very unlikely. Finally, our study evaluated only a selected population of subjects with obesity; a condition not only associated with either a wide range of lung disorders or T2D, but also with decreased levels of SP-D. [18, 36] Therefore, additional studies focusing on less-obese patients are required to better understand how defects in the bronchiolar surfactant layer impact on the pulmonary function of patients with T2D.

5. Conclusion We have shown that serum SP-D concentrations are elevated in obese T2D patients, and that they are related to pulmonary function values. Therefore, circulating SP-D seems a useful biomarker for testing lung involvement in obese T2D patients. Additional studies to examine whether serum SP-D could be a reliable and cost-effective screening test for identifying T2D patients requiring a pulmonary function examination are needed.

Acknowledgements Funding: This study was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII, Fondo de Investigación Sanitaria, PI12/00803 and PI15/00260), European Union (European Regional Development Fund, Fondo Europeo de Desarrollo Regional, FEDER, “Una manera de hacer Europa”), and the Fundación Sociedad Española Endocrinología y Nutrición (FSEEN). CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM) and CIBER de Enfermedades

Respiratorias (CIBERES) are an initiative of the Instituto Carlos III. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author contributions: C.L.C. and A.L. designed the study, recruited subjects, collected and analyzed data, and wrote the manuscript; C.H. and R.S. designed the study, supervised the statistical analyses, interpreted data, critically revised drafts of the article, and gave the final approval of the version for publication; M.G.R., X.M., A.S. analyzed data, supervised the research, and reviewed the manuscript; M.H., A.C. and L.G. collected data and contributed to discussion; E.S. collected data, supervised the research, and wrote the first version of the manuscript. All authors provided an important scientific contribution to the study and assisted with the drafting or revising of the manuscript. Guarantor: A.L. and R.S. are the guarantors of this work and, as such, have full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

7. References

- 1.- Van den Borst B, Gosker HR. Pulmonary function in diabetes. A metaanalysis. *Chest* 2010; 138: 393-406.
- 2.- Lecube A, Simó R. Type 2 diabetes impairs pulmonary function in morbidly obese women. A case-control study. *Diabetologia* 2010; 53: 1210-6.
- 3.- Lange P, Jensen G. Copenhagen City Heart Study: longitudinal analysis of ventilatory capacity in diabetic and nondiabetic adults. *Eur Respir J* 2002; 20: 1406-12.
- 4.- Walter RE, Gottlieb DJ. Association between glycemic state and lung function: the Framingham Heart Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 911-6.
- 5.- Yeh HC, Punjabi NM, Wang NY, all authors. Cross-sectional and prospective study of lung function in adults with type 2 diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Diabetes Care* 2008; 31:741-6.
- 6.- Chance WW, Rhee C, Yilmaz C, all authors. Diminished alveolar microvascular reserves in type 2 diabetes reflect systemic microangiopathy. *Diabetes Care* 2008; 31: 1596-601.
- 7.- Lecube A, Simó R. Insulin resistance is related to impaired lung function in morbidly obese women: a case-control study. *Diabetes Metab Res Rev* 2010; 26: 639-45.
- 8.- Dennis RJ, Maldonado D, Rojas MX, all authors. Inadequate glucose control in type 2 diabetes is associated with impaired lung function and systemic inflammation: a cross-sectional study. *BMC Pulm Med* 2010; 10: 38.
- 9.- Lecube A, Simó R. TNF- α system and lung function impairment in obesity. *Cytokine* 2011; 54: 121-4.
- 10.- Brazzale DJ, Schachter LM. Optimizing respiratory function assessments to elucidate the impact of obesity on respiratory health. *Respirology*. 2015; 20: 715-21.
- 11.- Carpio C, Alvarez-Sala R. Changes in lung function testing associated with obesity. *Nutr Hosp*. 2014; 30: 1054-62.
- 12.- Hartl D, Griese M. Surfactant protein D in human lung diseases. *Eur J Clin Invest* 2006; 36: 423-35.
- 13.- Crouch EC. Structure, biologic properties, and expression of surfactant protein D (SP-D) *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*. 1998; 1408: 278-89.

- 14.- Kishore U, Greenhough TJ, Waters P, all authors. Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors. *Mol Immunol* 2006; 43: 1293-315.
- 15.- Cheng G, Ueda T, Numao T, all authors. Increased levels of surfactant protein A and D in bronchoalveolar lavage fluids in patients with bronchial asthma. *Eur Respir J*. 2000; 16: 831-5.
- 16.- Greene KE, Wright JR, Steinberg KP, all authors. Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999; 160: 1843-50.
- 17.- Haagsman HP, Diemel RV. Surfactant-associated proteins: functions and structural variation. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2001; 129: 91-108.
- 18.- Lomas DA, Silverman EK, Edwards LD, all authors. Serum surfactant protein D is steroid sensitive and associated with exacerbations of COPD. *Eur Respir J* 2009; 34: 95-102.
- 19.- Shiels MS, Engels EA. Circulating markers of interstitial lung disease and subsequent risk of lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; 20: 2262-72.
- 20.- Ju CR, Chen RC. Serum surfactant protein D: biomarker of chronic obstructive pulmonary disease. *Dis Markers*. 2012; 32: 281-7.
- 21.- Sin DD, Leung R, Gan WQ, all authors. Circulating surfactant protein D as a potential lung-specific biomarker of health outcomes in COPD: a pilot study. *BMC Pulm Med* 2007; 7: 13
- 22.- Winkler C, Atochina-Vasserman EN, Holz O, all authors. Comprehensive characterization on pulmonary and serum surfactant protein D in COPD. *Respir Res* 2011; 12: 29.
- 23.- Shakoori TA, Bokhari NH. Serum surfactant protein D during acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Disease Markers* 2009; 27: 287-94.
- 24.- Von Elm E, Vandenbroucke JP; STROBE Initiative. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *Lancet*. 2007 ; 370 : 1453-7.
- 25.- Román-Pérez M, Outeiriño-Iglesias V, Moya CM, all authors. Activation of the GLP-1 receptor by liraglutide increases ACE2 expression, reversing right ventricle hypertrophy, and improving the production of SP-A and SP-B in the lungs of type 1 diabetes rats. *Endocrinology* 2015; 156: 3559-69.
- 26.- American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2014; 37 (Suppl. 411 1): S81-S90.
- 27.- Quanjer PH, Yernault JC. Lung volumes and forced ventilatory flows. Report working party standardization of lung function tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J* 1993; 16 (suppl): 5-40
- 28.- Pauwels RA, Hurd SS; GOLD Scientific Committee. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:1256-76.
- 29.- Gold WM. Pulmonary function testing. In: Murray JF, Nadel JA, Mason RJ, Boushey HA, eds. *Textbook of Respiratory Medicine*. 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2000: 781-881.
- 30.- Osaka A, Yanagihara K, Yamada Y, all authors. Elevation of serum KL-6 glycoprotein or surfactant protein-D in adult T-cell leukemia with distinct pulmonary complications. *Tohoku J Exp Med* 2009; 218: 99-105.

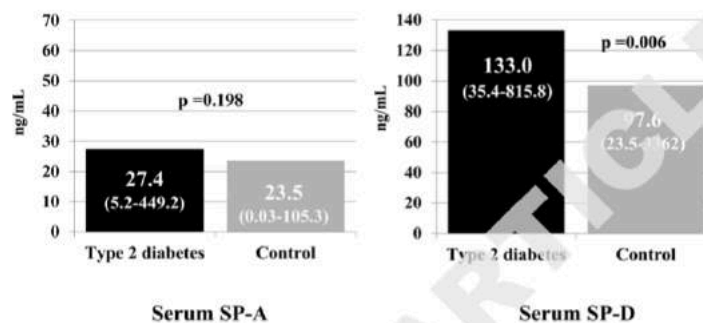
- 31.- Bonella F, Volpe A, Caramaschi P, all authors. Surfactant protein D and KL-6 serum levels in systemic sclerosis: correlation with lung and systemic involvement. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2011; 28: 27-33.
- 32.- Eisner MD, Greene K, the Acute Respiratory Distress Syndrome Network. Plasma surfactant protein levels and clinical outcomes in patients with acute lung injury. *Thorax* 2003; 58: 983-8.
- 33.- Sin DD, Man SF. Surfactant protein D: a lung specific biomarker in COPD? *Ther Adv Respir Dis* 2008; 2: 65-74.
- 34.- Moré JM, Bowler RP. Smoking reduces surfactant protein D and phospholipids in patients with and without chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Pulm Med* 2010; 10: 53.
- 35.- Weynand B, Rahier J. Diabetes mellitus induces a thickening of the pulmonary basal lamina. *Respiration* 1999; 66: 430 14–9.
- 36.- Fernández-Real JM, Valdés S, Manco M, all authors. Surfactant protein D, a marker of lung innate immunity, is positively associated with insulin sensitivity. *Diabetes Care*. 2010; 33: 847-53.

Table 1. Primary clinical and metabolic characteristics of the subjects included in the study.

	Type 2 diabetes	Non-Type 2 diabetes	Mean difference (95% IC)	P
N	49	98	-	-
Age (yrs)	51.3±10.6	48.5±9.4	2.8 (-0.5 to 6.2)	0.103
Women, n (%)	37 (75.5)	74 (75.5)	-	1.000
BMI (kg/m ²)	42.0±7.7	42.6±6.7	-0.6 (-3.1 to 1.8)	0.633
Waist circumference (cm)	125.9±12.0	123.3±9.1	2.5 (-4.6 to 9.7)	0.480
FPG (mmol/l)	9.2±3.4	5.5±0.6	3.6 (2.5 to 4.6)	<0.001
HbA1c (%)	8.0±1.9	5.6±0.4	2.4 (1.8 to 3.0)	<0.001
HbA1c (mmol/mol)	64.0±5.7	38.0±1.2	27.0 (5.4 to 9.0)	<0.001
Insulin treatment, n (%)	10 (20.4)	-	-	-

Data are mean±SD or median (range); FPG: fasting plasma glucose; HbA1c: glycated hemoglobin

Figure 1. Serum surfactant proteins A and D concentrations according to the presence of type 2 diabetes.



SP: surfactant protein.

Table 2. Forced spirometry and static pulmonary volume of subjects included in the study with available data.

	Type 2 diabetes	Non-Type 2 diabetes	Mean difference (95% IC)	P
TLC (% predicted)	92.2±18.4	94.4±19.5	-1.8 (-13.8 to 10.1)	0.759
FVC (% predicted)	79.7±21.7	92.9±11.0	-13.2 (-22.5 to 3.8)	0.007
FEV1 (% predicted)	82.9±25.9	101.1±13.1	-18.1 (-29.2 to -7.0)	0.002
FEF ₂₅₋₇₅ (% predicted)	73.9±32.5	100.2±25.1	-26.2 (-42.5 to -10.0)	0.001
RV (% predicted)	97.5±24.8	80.5±18.0	16.9 (4.0 to 29.8)	0.011
Non-obstructive ventilatory defect, n (%)	13 (26.5)	3 (3.0)	-	<0.001
Obstructive ventilatory defect, n (%)	17 (34.6)	4 (4.0)	-	<0.001

Data are mean±SD. TLC: total lung capacity; FVC: forced vital capacity; FEV1: forced expiratory volume in one second; FEF₂₅₋₇₅: maximum mid-expiratory flow; RV: residual volume.

Table 3. Correlations of serum surfactant proteins with clinical and metabolic variables in the entire population.

	Serum surfactant protein D (log transformed)		Serum surfactant protein A (log transformed)	
	r	P	r	p
FPG (mmol/l)	0.118	0.160	0.102	0.222
HbA1c (mmol/mol)	0.145	0.118	0.145	0.117
Age (yrs)	0.057	0.496	-0.121	0.142
BMI (kg/m ²)	-0.193	0.021	0.073	0.384
FEV1 (% predicted)	-0.265	0.029	-0.204	0.096
FVC (% predicted)	-0.234	0.055	-0.097	0.431
FEF ₂₅₋₇₅ (% predicted)	-0.202	0.115	-0.005	0.971
VR (% predicted)	0.293	0.043	0.037	0.803

FPG: fasting plasma glucose; HbA1c: glycated hemoglobin; FEV1: forced expiratory volume in one second; FVC: forced vital capacity; FEF₂₅₋₇₅: maximum mid-expiratory flow; RV: residual volume.

Table 4. Stepwise multivariate regression analysis of variables associated with: A) Forced expiratory volume in 1 second lower than 80% of predicted, and B) Serum concentration on surfactant protein D.

	Beta	p
FEV1 <80%		
T2D (yes/no)	0.302	0.010
Gender (M/F)	0.286	0.010
SP-D (≥132 ng/mL)	0.297	0.011
Age (yrs)	0.250	0.023
HbA1c (mmol/mol)	-0.091	0.511
BMI (kg/m ²)	0.169	0.865
Constant	-	0.032
R ² = 0.407		
Serum SP-D		
T2D (yes/no)	0.371	0.004
HbA1c (mmol/mol)	-0.238	0.170
FEV1 (% predicted)	-0.155	0.249
BMI (kg/m ²)	0.117	0.353
Gender (M/F)	0.084	0.503
Age (yrs)	-0.106	0.902
Constant	-	<0.001
R ² = 0.138		

Beta: Standardized regression coefficient. T2D: type 2 diabetes; SP-D: serum surfactant protein D; BMI: body mass index; FEV1: forced expiratory volume in one second.

ESTUDIO 4

Influencia del síndrome de apnea del sueño y de la hipoxia intermitente en la vasa vasorum de la adventicia carotídea

Article Source: **The influence of sleep apnea syndrome and intermittent hypoxia in carotid adventitial vasa vasorum**
López-Cano C, Rius F, Sánchez E, Gaeta AM, Betriu À, et al. (2019) PLOS ONE 14(2): e0211742. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211742>

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY).

RESUMEN

La arteriopatía de la vasa vasorum (VV) juega un papel como marcador temprano en el desarrollo de la aterosclerosis. En un estudio previo de nuestro grupo demostramos que los sujetos con obesidad mórbida presentaban un incremento significativo de la densidad de la VV en la adventicia carotídea en comparación con un grupo control con normopeso. Y no solo eso, sino que tras la pérdida ponderal conseguida mediante cirugía bariátrica dicha densidad tendía a igualarse. En los sujetos con SAHOS se ha descrito un aumento del grosor de la íntima-media de la carótida (GIMc), pero no existen datos sobre marcadores precoces como la densidad de VV.

El objetivo de este estudio transversal fue determinar si existía asociación entre la densidad de la VV de la adventicia carotídea y marcadores séricos de daño endotelial con las características del SAHOS en una población de sujetos obesos.

Para ello incluimos 55 pacientes controlados en la Unidad de Obesidad del Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida, que cumplían criterios de elegibilidad para cirugía bariátrica y que no tenían enfermedad clínica cardiovascular ni nefropatía (definida como una tasa de filtrado glomerular menor de 60 ml/min/por 1.73 m²) establecidas (**Tabla 12**). De la población estudiada, 40 pacientes (72,7%) tenían algún grado de SAHOS, definido como un IAH superior o igual a 10 eventos por hora de sueño. De éstos, 16 pacientes (40%) contaban también con el diagnóstico de DM tipo 2.

A todos los pacientes se les realizó una ecografía carotídea de alta resolución en modo B, evaluándose la carótida común, externa e interna de ambos lados, y midiendo el grosor íntima-media arterial según el consenso de Mannheim. Se determinó la densidad media de los VV mediante ecografía de las carótidas externas tras la administración de un contraste de hexafluoruro de azufre. También, se realizó una poligrafía respiratoria no asistida en el domicilio del paciente. Finalmente, se midió la concentración sérica de ICAM-1, VCAM-1, P-Selectina y Lipocalina-2 en duplicado mediante inmunoensayo, usando un Milliplex Map Kit.

Tabla 12. Principales características clínicas, metabólicas y de la respiración durante el sueño de los participantes del estudio de acuerdo con la presencia o no de un síndrome de apneas hipoapneas del sueño.

	Todos pacientes	SAHOS	No-SAHOS	p
N	55	40	15	-
Mujer, n (%)	29 (70,9)	26 (65,0)	13 (86,6)	0,184
Edad (años)	46,1 ± 10,9	47,8 ± 11,7	41,7 ± 7,0	0,023
IMC (Kg/m ²)	44,4 ± 6,6	44,8 ± 7,1	43,0 ± 5,3	0,370
Circunferencia cintura (cm)	127,0 ± 14,9	128,6 ± 13,7	123,0 ± 16,0	0,211
Circunferencia cuello (cm)	40,8 ± 5,2	41,4 ± 5,4	39,0 ± 4,1	0,118
Fumador actual / previo (%)	34 (61,8)	25 (62,5)	9 (60,0)	0,865
DM tipo 2, n (%)	17 (30,9)	16 (40,0)	1 (6,6)	0,022
GPA (mmol/l)	6,3 ± 2,1	6,6 ± 2,5	5,6 ± 0,7	0,033
Hipertensión, n (%)	23 (41,8)	19 (47,5)	4 (26,6)	0,224
Tensión sistólica (mmHg)	125,9 ± 17,8	126,9 ± 17,9	123,1 ± 18,0	0,481
Tensión diastólica (mmHg)	77,9 ± 11,9	77,4 ± 12,9	79,1 ± 9,0	0,652
Triglicéridos (mmol/l)	1,5 (0,1-4,3)	1,6 (0,7-4,3)	1,3 (0,7-2,5)	0,302
Colesterol- LDL (mmol/l)	2,7 ± 0,8	2,6 ± 0,8	2,9 ± 0,7	0,261
Colesterol- HDL (mmol/l)	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,3	1,2 ± 0,1	0,228
IAH (eventos/hora)	20,0 (1,0-83,0)	31,5 (10,0-83,0)	5,0 (1,0-8,0)	<0,001
CT90 (%)	9,0 (0-88,0)	12,0 (0,1-88,0)	1,0 (0-14,0)	<0,001

Datos son media ± DE, mediana (rango) o n (porcentaje). SAHOS: síndrome apnea-hipopnea del sueño, IMC: índice masa corporal; GPA: glucosa plasmática en ayunas; LDL: lipoproteína de baja densidad; IAH: índice apnea-hipopnea; CT90: porcentaje del tiempo con saturaciones de oxígeno debajo 90%.

El grupo de pacientes con SAHOS, en comparación con el grupo control, presentaba valores de densidad media de VV más elevados ($0,801 \pm 0,125$ vs. $0,697 \pm 0,082$, $p=0,005$). Este resultado se observó también por separado en carótida izquierda y derecha por separado ($p=0,038$ y $p=0,027$, respectivamente) (Tabla 13). Sin embargo, no se observaron diferencias en el GIMc.

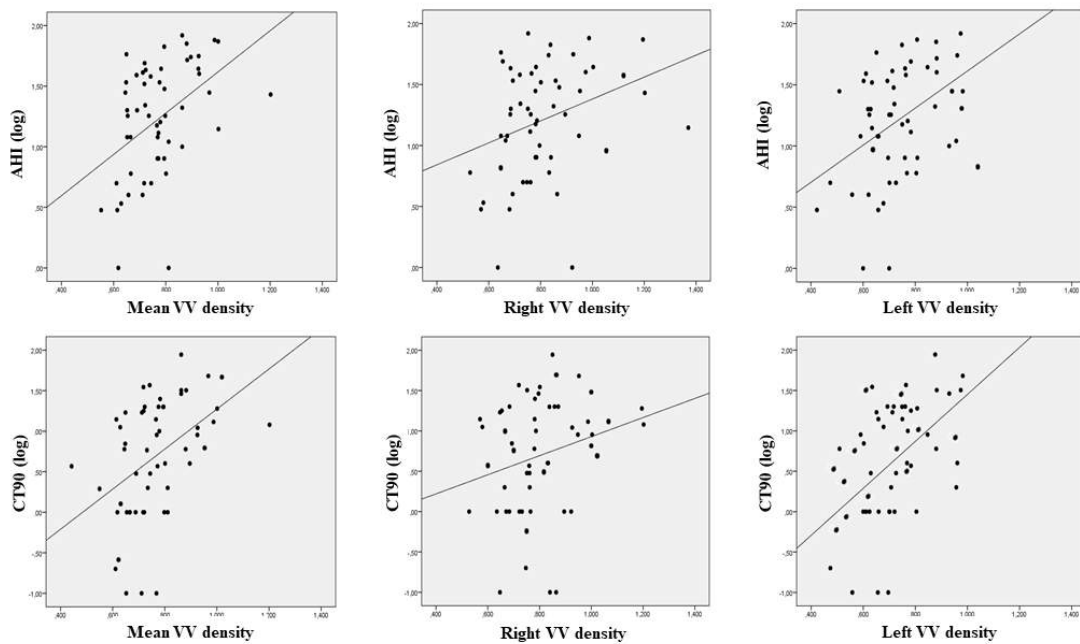
Tabla 13. Densidad de los VV en la adventicia carotidea y GIMc en los sujetos incluidos en el estudio en función de la presencia de SAHOS.

	SAHOS	No SAHOS	Diferencia media (95% CI)	p
n	40	15	-	-
Media VV	0.801 ± 0.125	0.697 ± 0.082	0.103 (0.033-0.173)	0.005
VV lado derecho	0.829 ± 0.164	0.729 ± 0.115	0.099 (0.005-0.193)	0.038
VV lado izquierdo	0.750 ± 0.124	0.665 ± 0.113	0.085 (0.010-0.160)	0.027
Media GIMc (mm)	0.743 ± 0.127	0.683 ± 0.133	0.060 (-0.018-0.139)	0.128

Datos son media ± DE. SAHOS: síndrome apnea-hipopnea del sueño. GIMc: grosor de la íntima-media de la carótida.

En toda la población estudiada, se observó un aumento progresivo de la densidad media de VV en paralelo con la severidad del SAHOS, más no se apreciaron estas diferencias en la evaluación del GIMc (**Figura 28**). Es decir, existe una asociación positiva entre la densidad media de VV, el IAH y el CT90.

Figura 28. Correlaciones entre el índice de apneas hipopneas (AIH) y el tiempo de registro con saturaciones de oxígeno inferiores al 90% (CT90) con la densidad de la vasa vasorum (media, carótida derecha y carótida izquierda).



En cuanto a los marcadores séricos de daño endotelial evaluados, la población con SAHOS exhibió mayor concentración sérica de VCAM-1 [(745.2±137.8 vs 643.3±122.7 ng/ml) p=0.035] en comparación con los sujetos con IAH menor a 10 eventos/hora (**Tabla 14**).

Por último, en el análisis multivariante, donde se incluyeron las variables clínicas y analíticas que clásicamente se asocian con la enfermedad ateromatosa, la densidad media de VV en la adventicia carotídea se relacionó de manera independiente con el IAH y con los valores de glucemia en ayunas (**Tabla 15**).

Tabla 14. Marcadores séricos de daño endotelial de los sujetos incluidos en el estudio en función de la presencia de SAHOS.

	SAHOS	No-SAHOS	Diferencia media (95% CI)	p
N	40	15	-	-
sICAM-1 (ng/ml)	100,4 ± 37,8	104,0 ± 42,5	-3,6 (-28,4 a 21,2)	0,771
P-Selectina (ng/ml)	123,0 ± 42,5	123,6 ± 34,3	-0,5 (-29,0 a 27,8)	0,967
Lipocalina-2 (ng/ml)	176,4 ± 77,0	194,8 ± 66,0	-18,3 (-65,7 a 28,9)	0,438
sVCAM-1 (ng/ml)	742,8 ± 132,7	636,8 ± 120,5	105,9 (23,9 a 188,0)	0,012

Datos son media ± DE. SAHOS: síndrome apnea-hipopnea del sueño. sICAM1: molécula adhesión intercelular tipo 1 soluble; sVCAM-1: molécula de adhesión vascular tipo 1 soluble.

Tabla 15. Análisis de regresión lineal múltiple por pasos: variables asociadas con la densidad VV advertencia media.

		β	Beta (95% CI)	p
Densidad media VV	Género (mujer/hombre)	0,394	0,104 (0,038 a 0,170)	<0,001
	GPA (mmol/l)	0,294	0,015 (0,003 a 0,028)	0,015
	IAH (log)	0,257	0,067 (0,002 a 0,132)	0,043
	Colesterol- LDL (mmol/l)	0,204	-	0,081
	Triglicéridos (log)	0,172	-	0,150
	Colesterol- HDL (log)	-0,124	-	0,307
	Edad (años)	-0,132	-	0,311
	Tabaquismo ^a	-0,117	-	0,333
	IMC (kg/m ²)	0,106	-	0,394
	CT90 (log)	0,098	-	0,466
	Tensión diastólica (mmHg)	0,069	-	0,557
	Circunf. abdominal (cm)	0,045	-	0,731
	Tensión sistólica (mmHg)	-0,028	-	0,817
	Circunf. cuello (cm)	-0,005	-	0,977
Constante	-	0,467 (0,346 a 0,589)	<0,001	
R ² = 0,401				

β : coeficiente estandarizado; GPA: glucosa en plasma en ayunas; IAH: índice de apnea-hipopnea; CT90: porcentaje de tiempo con saturaciones de oxígeno debajo del 90%; IMC: índice de masa corporal; ^a: fumador actual / previo vs. no fumador.

En conclusión, según los resultados obtenidos en este estudio, una alta densidad de VV está presente en sujetos obesos con SAHOS. La hipoxia intermitente crónica y la hiperglucemia en ayunas se distinguen como factores de riesgo independientes para el desarrollo temprano de la enfermedad ateromatosa en este grupo de sujetos.

CONTRIBUCIÓN CIENTÍFICA COMO COMUNICACIÓN ORAL:

López-Cano C, Rius Riu F, Gutiérrez-Carrasquilla LP, Sánchez E, Turino C, Seminario M.A, Barbé F, Lecube A. *La Vasa vasorum en la obesidad: marcador de aterosclerosis relacionado con SAOS*. XIII Congreso Nacional de la SEEDO (Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad). Sevilla. Marzo 2017

López-Cano C, Mizab C, Rius Riu F, Betriu A, Gutiérrez-Carrasquilla LP, Sánchez E, Gaeta AM, Sánchez M, Hernández M, Bueno M, Barbé F, Lecube A. *La Vasa vasorum en la obesitat: marcador d'aterosclerosi relacionat amb SAOS*. XX Congrés Societat catalana d'endocrinologia i Nutrició. Noviembre 2017

PLOS ONE

The influence of sleep apnea syndrome and intermittent hypoxia in carotid adventitial vasa vasorum --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	PONE-D-18-29666R2
Article Type:	Research Article
Full Title:	The influence of sleep apnea syndrome and intermittent hypoxia in carotid adventitial vasa vasorum
Short Title:	Sleep apnea syndrome and vasa vasorum
Corresponding Author:	Albert Lecube Hospital Universitari Arnau de Vilanova Lleida, Lleida SPAIN
Keywords:	vasa vasorum; Sleep apnea; intermittent hypoxia; atherosclerosis; obesity.
Abstract:	<p>Subjects with sleep apnea-hypopnea syndrome (SAHS) show an increased carotid intima-media thickness. However, no data exist about earlier markers of atheromatous disease, such as the proliferation and expansion of the adventitial vasa vasorum (VV) to the avascular intima in this setting. Our aim was to assess carotid VV density and its relationship with sleep parameters in a cohort of obese patients without prior vascular events. A total of 55 subjects evaluated for bariatric surgery were prospectively recruited. A non-attended respiratory polygraphy was performed. The apnea-hypopnea index (AHI) and the cumulative percentage of time spent with oxygen saturation below 90% (CT90) were assessed. Serum concentrations of soluble intercellular adhesion molecule 1, P-selectin, lipocalin-2 and soluble vascular cell adhesion molecule 1 (sVCAM-1) were measured. Contrast-enhanced carotid ultrasound was used to assess the VV density. Patients with SAHS (80%) showed a higher adventitial VV density (0.801 ± 0.125 vs. 0.697 ± 0.082, $p=0.005$) and higher levels of sVCAM-1 (745.2 ± 137.8 vs. 643.3 ± 122.7 ng/ml, $p=0.035$) than subjects with an AHI lower than 10 events/hour. In addition, a positive association exist between mean VV density and AHI ($r=0.445$, $p=0.001$) and CT90 ($r=0.399$, $p=0.005$). Finally, in the multiple linear regression analysis, female sex, fasting plasma glucose and AHI (but not CT90) were the only variables independently associated with the mean adventitial VV density ($R^2=0.327$). In conclusion, a high VV density is present in obese subjects with SAHS, and chronic intermittent hypoxia is pointed as an independent risk factor for the development of this early step of atheromatous disease.</p>
Order of Authors:	Carolina López-Cano Ferran Rius Enric Sánchez Anna Michela Gaeta Àngels Betriu Elvira Fernández Andree Yeramian Marta Hernández Marta Bueno Liliana Gutiérrez-Carrasquilla Mireia Dalmases Albert Lecube

Introduction

There is considerable evidence that obesity is a causal factor for sleep-disordered breathing (SDB) with more than 50% of patients having a body mass index (BMI) greater than 30 Kg/m² [1, 2]. Sleep apnea-hypopnea syndrome (SAHS), the most common type of SDB, has been well established as an independent risk factor for some components of the metabolic syndrome, such as hypertension and glucose abnormalities, along with other cardiovascular risk factors [3, 4]. In this regard, early signs of atherosclerosis, such as an increase in carotid intima-media thickness (cIMT), have been reported in patients with SAHS without other cardiovascular diseases [5]. In fact, observational studies have shown that patients with SAHS have an increased risk of death, especially from stroke and myocardial infarction [6, 7]. However, the correction of nocturnal chronic intermittent hypoxia (CIH) using continuous positive airway pressure (CPAP) has not been associated with a decreased risk of cardiovascular outcomes or death for patients with SAHS [8, 9]. These data increase the need for studies that describe better all mechanisms by which intermittent hypoxia damages the endothelial wall.

Atherosclerosis, a chronic inflammatory disorder of the wall of large and medium arteries, initiates several decades before reaching clinical significance [10]. Although the cIMT represents an early surrogate marker for atherosclerosis, an increasing amount of evidence supports the hypothesis that the atheromatosis process begins with the hyperplasia and pathological extension of the adventitial vasa vasorum (VV) to the avascular intima [11, 12]. The VV are a network of microvessels physiologically located in the third and most external wall coat of the medium and large arteries. Their main function is to supply the required nutrients and oxygen to the vessel cells [12, 13]. However, its proliferation and expansion from the adventitial layer is the earliest defensive response to endothelial injury by deleterious stimuli, such as hypoxia, inflammation, and hyperglycemia [11, 12, 14-17]. In fact, the lack of correlation between cIMT and adventitial VV density in clinical studies support the hypothesis that both measures evaluate different moments in the development of atheromatous disease [17, 18]. In the last decade, the contrast-enhanced ultrasound (CEU) has emerged as a useful and non-invasive technique for direct visualization of the VV in the carotid arteries. Consequently, CEU represent a novel approach to detect the development of premature stages of atherosclerosis [18-20] which has not been previously used to explore the relationship between SDB and carotid VV density.

To shed light in the deleterious impact of nocturnal intermittent hypoxia in carotid wall, we have assessed the carotid adventitial VV density and its relationship with the sleep study in a cohort of obese patients without any prior vascular event evaluated for bariatric surgery.

Material and methods

Description of the study population

A total of 55 morbidly obese patients of Caucasian origin without previous episodes of vascular disease were prospectively recruited for the study between January 2016 and July 2017 at the outpatient Obesity Unit. All the candidates were contacted during one of the visits in the outpatient clinic or by telephone once the sleep breathing evaluation included in the established protocol for bariatric surgery was available. If the patient was willing to participate, we gave them detailed information about the objectives and procedures of the study.

Using the standard deviation of adventitial VV from a previous study, we determined that the minimum necessary sample size was 35 subjects [21]. Therefore, the study surveyed a total of 69 consecutive individuals who met the eligibility criteria for gastrointestinal surgery established by the guidelines of the National Institutes of Health Consensus Conference [22]. We

excluded 12 patients for the following reasons: treatment with CPAP ($n = 7$), previous medical history of any cardiovascular event ($n = 3$), a former bariatric procedure ($n = 1$), and a glomerular filtration rate lower than 60 ml/min/per 1.73 m² ($n = 1$). Additionally, two patients were excluded for technical problems (fast clearance of the contrast that did not allow a proper assessment of VV density) from the final analysis. No pregnant women were included.

Ethic statement

The study was approved by the human ethics committee at Arnau de Vilanova University Hospital (CEIC-1275) and was conducted according to the ethical guidelines of the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments. Informed written consent was obtained from all participants included in the study.

Measurement of sleep-disordered breathing

A non-attended respiratory polygraphy was performed at patient's home with a Somnea polygraph (Compumedics, Abbotsford, Australia) which records nasal airflow (nasal cannula), respiratory effort (chest and abdominal bands), snoring, body position and finger pulse oximetry [23, 24]. The same technician manually checked all sleep studies to avoid variability. Studies with less than 5 hours of correct signal recording were discarded and repeated. An apnea was defined as cessation of airflow for more than 10 seconds. Differentiation between obstructive and central apneas was based according to the respiratory effort channels and the presence or absence of thoracoabdominal movements. Hypopnea was defined as a decrement in nasal cannula tracing of at least 50% with duration of at least 10 seconds, which is associated with a cyclical dip in arterial oxygen saturation of 4% or more [25]. The apnea-hypopnea index (AHI) was defined as the sum of apneas plus hypopneas divided by the recording time in bed. On this basis, SAHS was defined as an AHI ≥ 10 events/hour (e/h), and patients were divided in non-SAHS (AHI < 10 e/h), mild SAHS (AHI between 10 and 20 e/h), moderate SAHS (AHI between 21 and 30 e/h), and severe SAHS (AHI > 30 e/h) [26]. The cumulative percentage of time spent with oxygen saturations below 90% (CT90) was also assessed. In addition, the degree of sleepiness was evaluated by using the Epworth Sleepiness Scale, a widely-used questionnaire assessment of the tendency to fall asleep during various daytime situations [27].

Measurement of the carotid adventitial VV density and ultrasound parameters

CEU examinations were completed using a Siemens Sequoia 512 ultrasound system (equipped with a 15L8W linear array probe) and with ultrasound contrast software (Cadence contrast Pulse Sequencing technology). A phospholipidic shell containing sulphur hexafluoride served as a contrast agent (Sonovue, Bracco Spa, Milan, Italy). Once the contrast was solubilized in 5 ml of saline, a 2.5 ml bolus was injected in the antecubital vein for each carotid artery explored (20-gauge needle to avoid microbubbles rupture). Adventitial VV content in the far adventitial layer was calculated as the average of the ratios of the intensities in the 2 mm above the intima-lumen boundary and the intensities of the 2 mm below the media-adventitia boundary of the common carotid artery 1 cm proximal to the bifurcation. The result (VV signal) was calculated as the average of 10 to 20 ratios calculated for each diastolic frame in which both the lumen intensity and the adventitial intensity was high and stable within a 1-minute video recording [21, 28]. Results are displayed on the right and left sides, and the mean VV signal of both sides is presented. As a ratio, VV signal has no units. All the studies were stored digitally for a posterior analysis by the same blinded investigator. Additionally, all participants underwent a B-

mode ultrasound examination of the extra-cranial carotid arteries and the cIMT of the far wall of the common carotid artery was measured following the Mannheim consensus procedures.

Laboratory assessment

Blood sampling by direct puncture of the antecubital vein was obtained after an overnight fast of 8 hours and just before administration of the contrast agent. Samples were separated by centrifugation (2,000 g at 4°C for 20 min) and analyzed in the clinical laboratory of our hospital using standard methods to obtain biochemical parameters. In addition, aliquots were frozen at -80°C for batched analysis. Serum concentrations of soluble intercellular adhesion molecule 1 (sICAM-1), P-Selectin, lipocalin-2 and soluble vascular cell adhesion molecule 1 (sVCAM-1) were measured in duplicate using the Human Cardiovascular Disease Magnetic Bead Panel 2 from Milliplex Map Kit (Cat. No. HCVD2MAG-67K, Billerica, MA).

Blood pressure was measured with an automated oscillometer (Omron HEM-705CP) as the average of three readings separated by one minute after ten minutes of rest. Normal blood pressure was diagnosed when participants not receiving antihypertensive treatment had a blood pressure below 120/80 mmHg.

Statistical analysis

Normal distribution of the variables was assessed using the Kolmogorov-Smirnov test. Data were expressed either as the mean \pm standard deviation or percentage. Given their skewed distribution, AHI, CT90 and serum triglycerides are shown as median (total range). For parametric tests, all three parameters were logarithmically transformed to achieve a normal distribution. Comparisons between groups were performed using Student *t* tests and ANOVA testing for continuous variables, and the χ^2 test for categorical variables. The relationship between the continuous variables was examined by the Pearson linear correlation test.

A stepwise multiple regression analysis was performed in a backward direction to explore the variables independently related to VV. The independent variables included in the analyses were related with polysomnographic parameters (AHI and CT90), clinically relevant with potential impact in atheromatous disease [age, sex, body mass index (BMI), systolic and diastolic blood pressure, HDL and LDL-cholesterol, and smoking status (current or former smoker vs. non-smoker)], and significantly associated with the mean VV density in the univariate analysis (triglycerides, fasting plasma glucose, and neck and waist circumferences). The significance level at which independent variables were removed from the model was a F-test value <0.05 .

All *p* values were based on a two-sided test of statistical significance. Significance was accepted at the level of $p < 0.05$. Statistical analyses were performed using the SPSS statistical package (IBM SPSS, Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY, USA).

Results

The main clinical features and metabolic data of the study population are presented in [Table 1](#). A total of 40 patients (72.7%) were diagnosed with some degree of SAHS: 14 (35.0%) with mild, 6 (15.0%) with moderate and 20 (50.0%) with severe SAHS. In addition to a higher daytime sleepiness, subjects with SAHS were older and presented a higher prevalence of type 2 diabetes than patients without SAHS.

The mean adventitial VV density was significantly higher in patients with SAHS compared to subjects with an AHI <10 e/h (0.801 ± 0.125 vs. 0.697 ± 0.082 , $p = 0.005$). This result was also observed on the right and left sides ($p = 0.038$ and $p = 0.027$, respectively) ([Table 2](#)). A progressive increase in the mean adventitial VV density was observed from participants

Table 1. Baseline main clinical, metabolic and sleep-breathing characteristics of participants in the study according to the diagnosis of sleep apnea-hypopnea syndrome.

	All patients	SAHS	Non-SAHS	p
N	55	40	15	-
Women, n (%)	29 (70.9)	26 (65.0)	13 (86.6)	0.184
Age (years)	46.1 ± 10.9	47.8 ± 11.7	41.7 ± 7.0	0.023
BMI (kg/m ²)	44.4 ± 6.6	44.8 ± 7.1	43.0 ± 5.3	0.370
Waist circumference (cm)	127.0 ± 14.9	128.6 ± 13.7	123.0 ± 16.0	0.211
Neck circumference (cm)	40.8 ± 5.2	41.4 ± 5.4	39.0 ± 4.1	0.118
Current/former smoker (%)	34 (61.8)	25 (62.5)	9 (60.0)	0.865
Type 2 diabetes, n (%)	17 (30.9)	16 (40.0)	1 (6.6)	0.022
FPG (mmol/l)	6.3 ± 2.1	6.6 ± 2.5	5.6 ± 0.7	0.033
Hypertension, n (%)	23 (41.8)	19 (47.5)	4 (26.6)	0.234
Systolic BP (mmHg)	125.9 ± 17.8	126.9 ± 17.9	123.1 ± 18.0	0.481
Diastolic BP (mmHg)	77.9 ± 11.9	77.4 ± 12.9	79.1 ± 9.0	0.652
Triglycerides (mmol/l)	1.5 (0.1–4.3)	1.6 (0.7–4.3)	1.3 (0.7–2.5)	0.302
LDL-cholesterol (mmol/l)	2.7 ± 0.8	2.6 ± 0.8	2.9 ± 0.7	0.261
HDL-cholesterol	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.3	1.2 ± 0.1	0.228
ESS	4.1 ± 4.7	4.9 ± 5.2	1.5 ± 1.2	0.012
AHI (events/hour)	20.0 (1.0–83.0)	31.5 (10.0–83.0)	5.0 (1.0–8.0)	<0.001
CT90 (%)	9.0 (0–88.0)	12.0 (0.1–88.0)	1.0 (0–14.0)	<0.001

Data are mean ± SD, median (range) or n (percentage). SAHS: sleep apnea-hypopnea syndrome, BMI: body mass index; FPG: fasting plasma glucose; BP: blood pressure; LDL: low density lipoprotein; ESS: Epworth Sleepiness Scale; AHI: apnea-hypopnea index; CT90: percentage of time spent with oxygen saturations below 90%.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211742.t001>

without SAHS to those with mild (0.757 ± 0.097), moderate (0.865 ± 0.199) and severe (0.811 ± 0.111) SAHS ($p = 0.008$, respectively). However, no differences were appreciated between subjects with and without SAHS when the mean cIMT was evaluated (0.743 ± 0.127 vs. 0.683 ± 0.133 , $p = 0.613$). Among serum markers of endothelial damage, patients with SAHS showed significantly higher levels of sVCAM-1 than subjects with an AHI lower than 10 e/h (742.8 ± 132.7 vs. 636.8 ± 120.5 , $p = 0.012$). The serum concentration of VCAM-1 also exhibited a progressive increase throughout SAHS severity: 636.8 ± 120.5 (non-SAHS), 699.1 ± 124.5 (mild), 799.9 ± 79.1 (moderate) and 761.9 ± 145.9 (severe) ng/ml (p

Table 2. Carotid adventitial VV density, cIMT and serum biomarkers of endothelial damage of the individuals included in the study according to the presence of sleep apnea-hypopnea syndrome.

	SAHS	Non-SAHS	Mean difference (95% CI)	p
N	40	15	-	-
Mean VV	0.801 ± 0.125	0.697 ± 0.082	0.103 (0.033–0.173)	0.005
Right side VV	0.829 ± 0.164	0.729 ± 0.115	0.099 (0.005–0.193)	0.038
Left side VV	0.750 ± 0.124	0.665 ± 0.113	0.085 (0.010–0.160)	0.027
Mean cIMT (mm)	0.743 ± 0.127	0.683 ± 0.133	0.060 (-0.018–0.139)	0.128
sICAM-1 (ng/ml)	100.4 ± 37.8	104.0 ± 42.5	-3.6 (-28.4 to 21.2)	0.771
P-Selectin (ng/ml)	123.0 ± 42.5	123.6 ± 34.3	-0.5 (-29.0 to 27.8)	0.967
Lipocalin-2 (ng/ml)	176.4 ± 77.0	194.8 ± 66.0	-18.3 (-65.7 to 28.9)	0.438
sVCAM-1 (ng/ml)	742.8 ± 132.7	636.8 ± 120.5	105.9 (23.9 to 188.0)	0.012

Data are mean ± SD. SAHS: sleep apnea-hypopnea syndrome, cIMT: carotid intima-media thickness; sICAM1: soluble intercellular adhesion molecule 1; sVCAM-1: soluble vascular cell adhesion molecule 1.

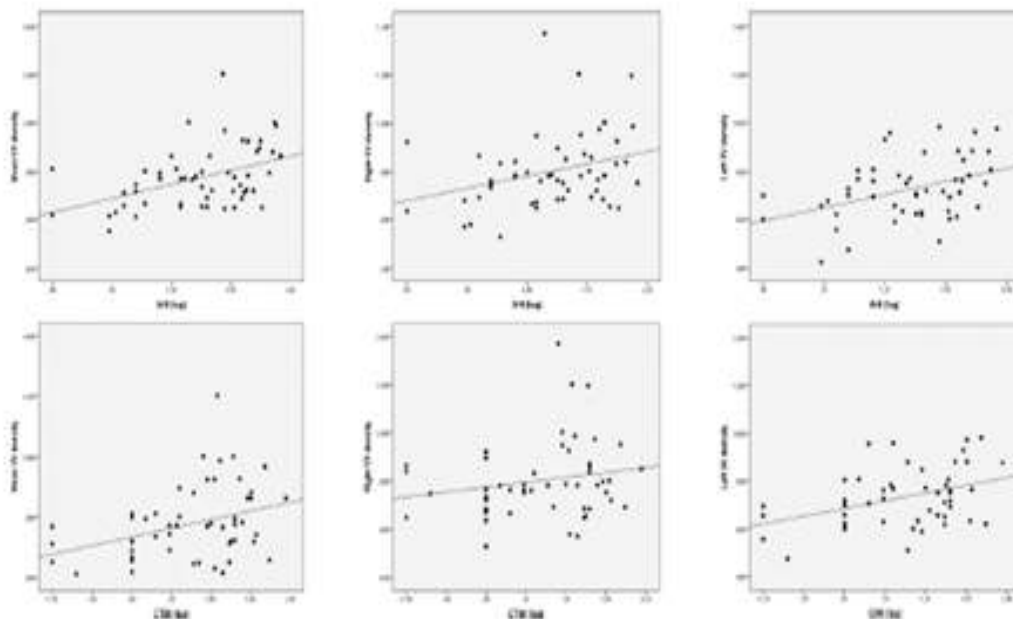


Fig 1. Correlations of the apnea-hypopnea index (AHI) and the percentage of time spent with oxygen saturations below 90% (CT90) with vasa vasorum (VV) density (mean, right side and left side).

<https://doi.org/10.3371/journal.pone.0211742.g001>

ANOVA = 0.029). Subjects without SAHS showed serum VCAM-1 concentrations significantly lower than patients with moderate ($p = 0.013$) and severe ($p = 0.016$) SAHS.

Univariate analysis showed a positive and significant association between the mean adventitial VV density and the AHI (log) ($r = 0.445$, $p = 0.001$) and CT90 (log) ($r = 0.399$, $p = 0.005$) (Fig 1). The associations between carotid VV density and both nocturnal hypoxia parameters were maintained for the left side (AHI: $r = 0.408$, $p = 0.003$; CT90: $r = 0.469$, $p = 0.001$) but partially disappeared for the right one (AHI: $r = 0.302$, $p = 0.029$; CT90: $r = 0.222$, $p = 0.142$, respectively). We also found significant correlations between the mean VV density and fasting plasma glucose ($r = 0.321$, $p = 0.017$), triglycerides (log) ($r = 0.304$, $p = 0.030$), neck ($p = 0.003$, $p = 0.388$) and waist circumferences ($p = 0.028$, $r = 0.296$), as well as with the serum concentration of sVCAM-1 ($r = 0.345$, $p = 0.014$). However, no significant association between the mean adventitial VV density and total cholesterol ($r = 0.062$, $p = 0.668$), HDL-cholesterol ($r = 0.160$, $p = 0.268$) and LDL-cholesterol ($r = 0.110$, $p = 0.446$) was found.

Finally, the multiple linear regression analysis showed that female sex, fasting plasma glucose and AHI (but not CT90, blood pressure, lipid profile, smoking status, age and anthropometric indices) were the only variables independently associated with the mean adventitial VV density ($R^2 = 0.401$) (Table 3).

Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study to establish a relationship between repetitive nocturnal upper airway obstructions and adventitial VV density, one of the earlier steps in the development of atheromatous disease. We also provide evidence that the CT90% correlates with VV density in the univariate analysis. However, this late characterization of the severity of nocturnal hypoxemia disappears as an independent variable of the onset of atheromatous disease in the multivariate regression analysis.

Table 3. Stepwise multiple linear regression analysis of variables associated with the mean adventitial VV density.

		β	Beta (95% CI)	P
Mean VV density	Sex (female/male)	0.394	0.104 (0.038 to 0.170)	<0.001
	FPG (mmol/l)	0.294	0.015 (0.003–0.028)	0.015
	AHI (log)	0.257	0.067 (0.002 to 0.132)	0.043
	LDL-cholesterol (mmol/l)	0.204	-	0.081
	Triglycerides (log)	0.172	-	0.150
	HDL-cholesterol (log)	-0.124	-	0.307
	Age (years)	-0.132	-	0.311
	Smoking status*	-0.117	-	0.333
	BMI (kg/m ²)	0.106	-	0.394
	CT90 (log)	0.098	-	0.466
	Diastolic BP (mmHg)	0.069	-	0.557
	Waist circumference (cm)	0.045	-	0.731
	Systolic BP (mmHg)	-0.028	-	0.817
	Neck circumference (cm)	-0.005	-	0.977
	R ² = 0.401	Constant	-	0.467 (0.346 to 0.589)

β : standardized coefficient; Beta: non-standardized coefficient; FPG: fasting plasma glucose; AHI: apnea-hypopnea index; CT90: percentage of time spent with oxygen saturations below 90%; BMI: body mass index; BP: blood pressure

* current/former smoker vs. non-smoker. Equation for multiple regression: [Mean VV density = 0.467 + 0.104 x sex (female = 1, male = 0) + 0.015 x FPG (mmol/l) + 0.067 x AHI (log)].

SAHS is a highly prevalent disease characterized by cyclical episodes of desaturation-reoxygenation associated with higher carbon dioxide levels and sleep disruption [29]. It is also a key mediator of cardiac and vascular disease and dysfunction and appears as an independent risk factor for all-cause and cardiovascular mortality [6, 7, 30, 31]. Accordingly, large population observations and prospective studies have consistently shown a gradual increase in the prevalence of cardiovascular events as the AHI increases [30–32]. A recent meta-analysis of 17 prospective cohort studies reported that the incidence of cardiovascular disease was significantly increased in moderate-severe SAHS, with a pooled relative risk compared to the reference group of 1.37 (0.95–1.98) for coronary heart disease and 2.02 (1.40–2.90) for stroke [33]. This association persisted after controlling for classic vascular risk factors such as type 2 diabetes, hypertension, smoking habit and dyslipidemia [34]. In addition, data from the *Sleep Heart Health Study* reinforced the critical role of intermittent hypoxia. They described how hypopneas, defined by a threshold of 4% or more decrease in oxygen saturation, were independently associated with self-reported prevalent cardiovascular disease [35].

The presence of coronary artery calcification (CAC), as a surrogate of subclinical coronary artery disease, was evaluated on 202 consecutive subjects who underwent an overnight-sleep study [36]. CAC was found in 67% of patients with an AHI ≥ 5 e/h in comparison with the 31% in non-SAHS patients ($p = 0.001$), with a progressive increase in median CAC score with SAHS severity [36]. In the same vein as this result, we found that AHI was an independent predictor of the mean VV density in multiple regression analysis.

The underlying causes by which nocturnal intermittent hypoxia initiates and worsens arterial neovascularization have not been fully elucidated. A few pathophysiological mechanisms have been suggested to participate in the endothelial injury, such as insulin resistance and glucose intolerance, disruptions in the pathways of inflammation and in the function of macrophages, lipid metabolism defects and sympathetic activation [34, 37, 38]. Although each one may explain a part of the whole picture, we believe many of them act in chorus in subjects with

SAHS. In this regard, severe nocturnal oxyhemoglobin desaturations have been associated with high fasting levels of very low-density lipoprotein [39]. In addition, CIH also activates the production of reactive oxygen species (ROS) that generate systemic inflammation and endothelial dysfunction through the induction of cytokines and cell adhesion molecules [40–42]. Our results demonstrated an increase in serum concentration of sVCAM-1 among subjects with SAHS, and its measurement had a positive and significant correlation with the carotid VV density. Actually, in superoxide dismutase deficient mice, an animal model of increased oxidative stress, sVCAM-1 plays an important role in its increased susceptibility to severe ocular neovascularization [43]. In other tissues, such as the endothelium of the large and medium arteries, ROS also activates the hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α), which mediates angiogenesis induction of vascular endothelial growth factor and nitric oxide synthase genes [14, 44]. The role of VCAM-1 in the development of atheromatous disease in patients with SAHS is also supported by data showing how intermittent hypoxia produces increased expression in coronary artery endothelial cells [45]. Similarly, the lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1), a single transmembrane receptor mainly expressed on endothelial cells that mediates the uptake of oxidized LDL and also plays an important role in ischemia-induced angiogenesis, upregulates the expression of VCAM [46].

Experimental evidence supports that the expansion of the adventitial vessels to the intima layer plays a central role in the initiation and progression of the atherosclerotic process. The appearance of new blood vessels in the intima would facilitate the extravasation and accumulation in the outer intima of blood-borne oxidized low-density lipoprotein particles that will facilitate plaque initiation and formation [47, 48]. Therefore, the evaluation of VV appears to be a more accurate tool to reflect earlier stages of atherosclerosis, even before the development of an increased cIMT. Our data support this concept, as carotid adventitial VV density progressively increases together with AHI severity in subjects without previous vascular disease. Finally, the exposure to both nocturnal hypoxia patterns may exert differential modulation of the hemodynamic and hemorheology responses. In morbidly obese subjects AHI appears to be a better predictor of VV density than sleep measurements related with the overall time spent in severe hypoxemia and classical vascular risk factors such as age, lipid profile, tobacco, obesity and blood pressure [49, 50].

Although AHI appears as an independent predictor of the mean VV density in the multiple linear regression analysis, by itself it has a limited impact on the overall variance of this variable. We believe it is important to highlight this fact in order to achieve a better interpretation of our results. Our study has also identified other factors that influence the mean VV density, such as female sex and fasting plasma glucose. Undoubtedly, all these variables act jointly and probably synergistically in the initial development of atheromatous disease. The importance of our study lies in the addition of intermittent hypoxia to the most classic cardiovascular risk factors.

With the carotid adventitial VV imaging we focus our attention on the onset of atheromatous disease, when the pathological changes are potentially reversible. Our group has recently documented a significant 12.0% decrease in mean carotid adventitial VV density after the marked reduction in body weight and the improvement of the main metabolic comorbidities achieved after bariatric surgery [18]. In addition, in a novel animal model, the early structural cardiovascular remodeling induced by intermittent hypoxia was normalized after resumption of normoxic breathing [51]. Whether changes observed after CPAP treatment, as the improvement in postprandial triglycerides and total cholesterol levels, the favorable effect on antioxidant capacity and the enhancement in cardiovascular risk biomarkers may also have a direct impact in carotid VV in patients with SAHS still needs to be elucidated [52–54].

Our study has some limitations. First, we have not performed full polysomnographies but a home non-attended respiratory polygraphies. Therefore, we have no data about other key sleep features with a potential impact in cardiovascular disease such as sleep latency, microarousals, changes in stage 2 sleep and rapid eye movement sleep. In addition, the AHI was calculated from time in bed, not from sleeping time, and could underestimate the prevalence of SAHS. Second, our results are unlikely to change current practices in SAHS because the CEU examination is not routinely available in clinical practice and is rather expensive and time consuming. However, the opportunity of recognizing the arteriosclerotic process in its early stages may be used to implement preventive strategies to reduce the risk of future cardiovascular events in selected vulnerable subjects with SAHS. Third, the high percentage of women included in our study (70.9% of our sample) makes difficult to generalize our results to the entire population. However, this percentage is similar to 74.2% of women among obese subjects who underwent bariatric surgery in public Spanish hospitals between years 2000 and 2014 [55].

In conclusion, we observe a high VV density in obese subjects with SAHS, and we find that CIH is an independent risk factor for the development of this precocious remodeling of the arterial wall in the setting of atheromatous disease. We believe that the measurement of this cardiovascular risk marker, preceding intimal thickening and atherosclerotic plaque formation, is a good tool to achieve a better assessment of subjects with SAHS and increased vascular risk. However, specific studies in patients with SAHS are needed to determine whether a precocious detection and intervention (for example, with CPAP treatment) on this form of sub-clinical atheromatous disease could prevent or slow down the development of cardiovascular events in this population.

Acknowledgements

The authors would like to thank Virtudes Maria and Ma del Valle Peña (from the Unit for the Detection and Treatment of Atherothrombotic Diseases), Olga Mínguez and Lidia Pascual (from the Sleep Unit) for their help in the study.

References

1. - Young T, Skatrud J, Peppard PE. Risk factors for obstructive sleep apnea in adults. *JAMA*. 2004; 291: 2013-2016.
2. - Young T, Peppard PE, Taheri S. Excess weight and sleep-disordered breathing. *J Appl Physiol*. 2005; 99: 1592-1599.
- 3.- Sánchez-de-la-Torre M, Campos-Rodriguez F, Barbé F. Obstructive sleep apnoea and cardiovascular disease. *Lancet Respir Med*. 2013; 1: 61-72.
4. - Drager LF, Togeiro SM, Polotsky VY, Lorenzi-Filho G. Obstructive sleep apnea: a cardiometabolic risk in obesity and the metabolic syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2013; 62: 569-576.
5. - Drager LF, Bortolotto LA, Lorenzi MC, Figueiredo AC, Krieger EM, Lorenzi-Filho G. Early signs of atherosclerosis in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 172: 613-618.
6. - Birkbak J, Clark AJ, Rod NH. The effect of sleep disordered breathing on the outcome of stroke and transient ischemic attack: a systematic review. *J Clin Sleep Med*. 2014; 10: 103-108.
7. - Marin JM, Carrizo SJ, Vicente E, Agustí AG. Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study. *Lancet*. 2005; 365: 1046-1053.

- 8.- Yu J, Zhou Z, McEvoy RD, Anderson CS, Rodgers A, Perkovic V, et al. Association of positive airway pressure with cardiovascular events and death in adults with sleep apnea: A systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2017; 318: 156-166.
- 9.- McEvoy RD, Antic NA, Heeley E, Luo Y, Ou Q, Zhang X, et al. CPAP for prevention of cardiovascular events in obstructive sleep apnea. *N Engl J Med*. 2016; 375: 919-931.
- 10.- Tuttolomondo A, Di Raimondo D, Pecoraro R, Arnao V, Pinto A, Licata G. Atherosclerosis as an inflammatory disease. *Curr Pharm Des*. 2012; 18: 4266-4288.
11. - Subbotin VM. Excessive intimal hyperplasia in human coronary arteries before intimal lipid depositions is the initiation of coronary atherosclerosis and constitutes a therapeutic target. *Drug Discov Today*. 2016; 21:1578-1595.
12. - Sedding DG, Boyle EC, Demandt JAF, Sluimer JC, Dutzmann J, Haverich A, et al. Vasa vasorum angiogenesis: Key player in the initiation and progression of atherosclerosis and potential target for the treatment of cardiovascular disease. *Front Immunol*. 2018; 9: 706.
13. - Kawabe J, Hasebe N. Role of the vasa vasorum and vascular resident stem cells in atherosclerosis. *Biomed Res Int*. 2017; 701571.
14. - Ferns GAA, Heikal L. Hypoxia in Atherogenesis. *Angiology*. 2017; 68: 472-493.
15. - Halle M, Christersdottir T, Bäck M. Chronic adventitial inflammation, vasa vasorum expansion, and 5-lipoxygenase up-regulation in irradiated arteries from cancer survivors. *FASEB J*. 2016; 30: 3845-3852.
16. - Veerman KJ, Venegas-Pino DE, Shi Y, Khan MI, Gerstein HC, Werstuck GH. Hyperglycaemia is associated with impaired vasa vasorum neovascularization and accelerated atherosclerosis in apolipoprotein-E deficient mice. *Atherosclerosis*. 2013; 227: 250-258.
- 17.- Sampson UK, Harrell FE Jr, Fazio S, Nwosu S, Mercaldo N, Mensah GA, et al. Carotid adventitial vasa vasorum and intima-media thickness in a primary prevention population. *Echocardiography*. 2015; 32: 264-270.
- 18.- Rius F, Sánchez E, Betriu À, Baena-Fustegueras JA, Yeramian A, Vidal T, et al. Influence of morbid obesity and bariatric surgery impact on the carotid adventitial vasa vasorum signal. *Obes Surg*. 2018; 28: 3935-3942.
19. - Feinstein SB. Contrast ultrasound imaging of the carotid artery vasa vasorum and atherosclerotic plaque neovascularization. *J Am Coll Cardiol*. 2016; 48: 236–243.
20. - Staub D, Schinkel AF, Coll B, Coli S, van der Steen AF, Reed JD, et al. Contrast-enhanced ultrasound imaging of the vasa vasorum: from early atherosclerosis to the identification of unstable plaques. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2010; 3: 761-771.
- 21.- Arcidiacono MV, Rubinat E, Borrás M, Betriu A, Trujillano J, Vidal T, et al. Left carotid adventitial vasa vasorum signal correlates directly with age and with left carotid intima-media thickness in individuals without atheromatous risk factors. *Cardiovasc Ultrasound*. 2015; 13:20.
22. - Gastrointestinal surgery for severe obesity. National Institutes of Health Conference Statement. *Am J Clin Nutr*. 1992; 55: 615S-619S.
23. - Esnaola S, Duran J, Infante-Rivard C, Rubio R, Fernández A. Diagnostic accuracy of a portable device (Mesam IV) in suspected sleep apnoea. *Eur Respir J*. 1996; 9: 2597-2605.
24. - Lloberes P, Sampol G, Levy G, Aristizabal D, Sagales T, De la Calzada M, et al. Influence of setting on unattended respiratory monitoring in the sleep apnoea-hypopnoea syndrome. *Eur Respir J*. 2001; 16: 530-534.
25. - Mbata G, Chukwuka J. Obstructive sleep apnea hypopnea syndrome. *Ann Med Health Sci Res*. 2012; 2: 74-77.
- 26.- Lecube A, Sampol G, Lloberes P, Romero O, Mesa J, Morell F, et al. Asymptomatic sleep-disordered breathing in premenopausal women awaiting bariatric surgery. *Obes Surg*. 2010; 20: 454-461.
27. - Johns MW. A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale. *Sleep*. 1991; 14: 540-545.
- 28.- Arcidiacono MV, Traveset A, Rubinat E, Ortega E, Betriu A, Hernández M, et al. Microangiopathy of large artery wall: a neglected complication of diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 2013; 228: 142-147.

29. - Dewan NA, Nieto FJ, Somers VK. Intermittent hypoxemia and OSA: implications for comorbidities. *Chest*. 2015; 147: 266-274.
30. - Marshall NS, Wong KK, Liu PY, Cullen SR, Knuiman MW, Grunstein RR. Sleep apnea as an independent risk factor for all-cause mortality: the Busselton Health Study. *Sleep*. 2008; 31: 1079-1085.
31. - Young T, Finn L, Peppard PE, Szklo-Coxe M, Austin D, Nieto FJ, et al. Sleep disordered breathing and mortality: eighteen-year follow-up of the Wisconsin sleep cohort. *Sleep*. 2008;31: 1071-1078.
32. - Punjabi NM, Caffo BS, Goodwin JL, Gottlieb DJ, Newman AB, O'Connor GT, et al. Sleep disordered breathing and mortality: a prospective cohort study. *PLoS Med*. 2009; 6: e1000132.
34. - McNicholas WT, Bonsignore MR. Management Committee of EU COST ACTION B26. Sleep apnoea as an independent risk factor for cardiovascular disease: current evidence, basic mechanisms and research priorities. *Eur Respir J*. 2007; 29: 156-178.
35. - Punjabi NM, Newman AB, Young TB, Resnick HE, Sanders MH. Sleep-disordered breathing and cardiovascular disease: an outcome-based definition of hypopneas. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008; 177: 1150-1155.
- 36.- Sorajja D, Gami AS, Somers VK, Behrenbeck TR, Garcia-Touchard A, Lopez-Jimenez F. Independent association between obstructive sleep apnea and subclinical coronary artery disease. *Chest*. 2008; 133:927-933.
37. - Lam DC, Lam KS, Ip MS. Obstructive sleep apnoea, insulin resistance and adipocytokines. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2015; 82: 165-177.
38. - Drager LF, Polotsky VY, Lorenzi-Filho G. Obstructive sleep apnea: an emerging risk factor for atherosclerosis. *Chest*. 2011; 140: 534-542.
39. - Savransky V, Jun J, Li J, Nanayakkara A, Fonti S, Moser AB, et al. Dyslipidemia and atherosclerosis induced by chronic intermittent hypoxia are attenuated by deficiency of stearyl coenzyme A desaturase. *Circ Res*. 2008; 103: 1173-1180.
40. - Chen L, Einbinder E, Zhang Q, Hasday J, Balke CW, Scharf SM. Oxidative stress and left ventricular function with chronic intermittent hypoxia in rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 172: 915-920.
41. - Lavie L. Oxidative stress in obstructive sleep apnea and intermittent hypoxia - Revisited - The bad ugly and good: Implications to the heart and brain. *Sleep Med Rev*. 2015; 20: 27-45.
42. - Jelic S, Padeletti M, Kawut SM, Higgins C, Canfield SM, Onat D, et al. Inflammation, oxidative stress, and repair capacity of the vascular endothelium in obstructive sleep apnea. *Circulation*. 2008; 117: 2270-2278.
43. - Dong A, Shen J, Zeng M, Campochiaro PA. Vascular cell-adhesion molecule-1 plays a central role in the proangiogenic effects of oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108: 14614-14619.
44. - Toffoli S, Roegiers A, Feron O, Van Steenbrugge M, Ninane N, Raes M, et al. Intermittent hypoxia is an angiogenic inducer for endothelial cells: role of HIF-1. *Angiogenesis*. 2009; 12: 47-67.
- 45.- Kaczmarek E, Bakker JP, Clarke DN, Csizmadia E, Kocher O, Veves A, et al. Molecular biomarkers of vascular dysfunction in obstructive sleep apnea. *PLoS One*. 2013; 8: e70559.
- 46.- Shiraki T, Aoyama T, Yokoyama C, Hayakawa Y, Tanaka T, Nishigaki K, et al. LOX-1 plays an important role in ischemia-induced angiogenesis of limbs. *PLoS One*. 2014; 9: e114542.
47. - Fong GH. Potential contributions of intimal and plaque hypoxia to atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2015; 17: 510.
- 48.- Zhang Y, Cliff WJ, Schoefl GI, Higgins G. Immunohistochemical study of intimal microvessels in coronary atherosclerosis. *Am J Pathol*. 1993; 143: 164-172.
- 49.- Kang J, Li Y, Hu K, Lu W, Zhou X, Yu S, et al. Chronic intermittent hypoxia versus continuous hypoxia: Same effects on hemorheology? *Clin Hemorheol Microcirc*. 2016; 63: 245-255.

- 50.- Rodway GW, Sethi JM, Hoffman LA, Conley YP, Choi AM, Sereika SM, et al. Hemodynamic and molecular response to intermittent hypoxia (IH) versus continuous hypoxia (CH) in normal humans. *Transl Res.* 2007; 149: 76-84.
- 51.- Castro-Grattoni AL, Alvarez-Buvé R, Torres M, Farré R3, Montserrat JM4, Dalmases M, et al. Intermittent hypoxia-induced cardiovascular remodeling is reversed by normoxia in a mouse model of sleep apnea. *Chest.* 2016; 149: 1400-1408.
52. - Xu H, Yi H, Guan J, Yin S. Effect of continuous positive airway pressure on lipid profile in patients with obstructive sleep apnea syndrome: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Atherosclerosis.* 2014; 234: 446-453.
53. - Schein AS, Kerkhoff AC, Coronel CC, Plentz RD, Sbruzzi G. Continuous positive airway pressure reduces blood pressure in patients with obstructive sleep apnea; a systematic review and meta-analysis with 1000 patients. *J Hypertens.* 2014; 32: 1762-1773.
54. - Monneret D, Tamisier R, Ducros V, Faure P, Halimi S, Baguet JP, et al. Glucose tolerance and cardiovascular risk biomarkers in non-diabetic non-obese obstructive sleep apnea patients: Effects of long-term continuous positive airway pressure. *Respir Med.* 2016; 12:119-125.
- 55.- Lecube A, de Hollanda A, Calañas A, Vilarrasa N, Rubio MA, Breton I, et al. Trends in Bariatric Surgery in Spain in the Twenty-First Century: Baseline Results and 1-Month Follow Up of the RICIBA, a National Registry. *Obes Surg.* 2016; 26: 1836-1842.

ESTUDIO 5

Función pulmonar y respiración del sueño: dos nuevos objetivos para el cuidado de la diabetes tipo 2.

Lecube A, Simó R, Pallayova M, Punjabi NM, López-Cano C, Turino C, Hernández C, Barbé F. *Pulmonary Function and Sleep Breathing: Two New Targets for Type 2 Diabetes Care*. *Endocr Rev*. 2017; 38: 550-573.

Este trabajo no forma parte de los 4 estudios que engloba mi proyecto de Tesis Doctoral, y no debe ser tenido en cuenta para su evaluación. Sin embargo, mi implicación en la línea de investigación que aborda el impacto negativo de la DM tipo 2 sobre la función pulmonar y la respiración durante el sueño (IP: Dr Albert Lecube) me ha permitido ser coautora de esta revisión, publicada en una de las revistas con un factor de impacto más elevado de nuestra especialidad. Como mi participación tuvo lugar de forma paralela al desarrollo del proyecto de Tesis Doctoral, me permitió profundizar mucho más en esta temática y comprender mucho mejor los mecanismos fisiopatológicos que se establecen entre la DM tipo 2 y el pulmón. Es por estos motivos que la incluyo también en este libro, pues me es difícil desligar los 4 trabajos de la Tesis Doctoral de este trabajo de revisión.

RESUMEN

En este artículo se realiza una revisión de los datos publicados en relación con el impacto de la DM tipo 2 en la función pulmonar y la respiración durante el sueño. Se resumen los estudios poblacionales realizados durante las dos últimas décadas, la mayoría de ellos transversales, cohortes relativamente grandes que han tenido en cuenta varios factores de confusión como la edad, el sexo, el IMC y el tabaquismo. Los datos proporcionan evidencia de una menor capacidad pulmonar, con valores disminuidos de la CVF y el VEF1 en los adultos con DM tipo 2. Esta reducción en la función pulmonar se asocia a un aumento de la glucosa plasmática en ayunas y de la HbA1c, así como con la gravedad y duración de la diabetes.

Entre los mecanismos fisiopatológicos bien reconocidos, se enumeran: **(i)** las vías metabólicas relacionadas con la resistencia a la insulina, **(ii)** la inflamación crónica de bajo grado, **(iii)** la resistencia a la leptina, **(iv)** el daño microvascular, y **(v)** la neuropatía autonómica. También se describen otros posibles mecanismos patogénicos, de los que se dispone menor evidencia, como: **(vi)** disminución de la fuerza muscular, **(vii)** glucosilación no enzimática de proteínas pulmonares como el colágeno y la elastina, **(viii)** defectos en la capa de surfactante bronquiolar, y **(ix)** déficit en las concentraciones de GLP-1.

Se exhiben los cambios histopatológicos (en modelos experimentales y humanos) causados en el pulmón por estos mecanismos: **(i)** engrosamiento de los epitelios alveolares y lámina basal capilar pulmonar, **(ii)** reducción del espacio alveolar, **(iii)** un mayor grado de fibrosis, **(iv)** la presencia de enfisema centrolobulillar y microangiopatía pulmonar, así como **(v)** modificaciones en la secreción del moco. Además, se expone la disfunción pulmonar de los pacientes con fibrosis quística como modelo de investigación de la relación entre DM tipo 2 y función pulmonar; y se ahonda en el posible efecto de las terapias antihiper glucémicas en la lesión pulmonar.

En esta revisión también se examina la creciente evidencia sobre el impacto negativo que ejerce la DM tipo 2 sobre la respiración durante el sueño, donde la diabetes se convierte en un factor de riesgo independiente para tasas más altas de episodios de apnea del sueño, hipoxemia nocturna, somnolencia excesiva diurna y alteraciones en la arquitectura del sueño. Entre los mecanismos fisiopatológicos implicados se describen: **(i)** un umbral anormal de la activación de quimiorreceptores, **(ii)** la presencia de trastornos en la conducción neuronal aferente y eferente, **(iii)** un aumento de la actividad simpática, **(iv)** cambios en la función muscular respiratoria, **(v)** resistencia a la insulina y a la leptina, y **(vi)** cambios en el patrón de respiración y el ritmo ventilatorio.

En resumen, los pacientes con DM tipo 2 deben ser considerados un grupo especialmente vulnerable para sufrir cierto grado de disfunción pulmonar. Son, por lo tanto, necesarias investigaciones dirigidas a dilucidar cómo detectar el daño pulmonar en la población con diabetes de una manera rentable y proporcionar datos válidos sobre capacidad de revertir o mejorar la función pulmonar y la respiración durante el sueño de los pacientes con DM tipo 2 a través de la optimización del control glucémico.

Pulmonary function and sleep breathing: two new targets for type 2 diabetes care.

Albert Lecube (Ph.D.), Rafael Simó (Ph.D.), Maria Pallyova (Ph.D.), Naresh M Punjabi (Ph.D.), Carolina López-Cano (M.D.), Cecilia Turino (M.D.), Cristina Hernández (Ph.D.), Ferran Barbé (Ph.D.)

Endocrine Reviews
Endocrine Society

Submitted: June 26, 2017
Accepted: August 29, 2017
First Online: September 04, 2017

Advance Articles are PDF versions of manuscripts that have been peer reviewed and accepted but not yet copyedited. The manuscripts are published online as soon as possible after acceptance and before the copyedited, typeset articles are published. They are posted "as is" (i.e., as submitted by the authors at the modification stage), and do not reflect editorial changes. No corrections/changes to the PDF manuscripts are accepted. Accordingly, there likely will be differences between the Advance Article manuscripts and the final, typeset articles. The manuscripts remain listed on the Advance Article page until the final, typeset articles are posted. At that point, the manuscripts are removed from the Advance Article page.

DISCLAIMER: These manuscripts are provided "as is" without warranty of any kind, either express or particular purpose, or non-infringement. Changes will be made to these manuscripts before publication. Review and/or use or reliance on these materials is at the discretion and risk of the reader/user. In no event shall the Endocrine Society be liable for damages of any kind arising references to, products or publications do not imply endorsement of that product or publication.

Search strategy and selection criteria: References for this review were identified through searches of PubMed for articles published from January 1979 to May 2017, by use of the terms type 2 diabetes, pulmonary function, pulmonary dysfunction, spirometry, sleep apnea syndrome, sleep breathing disorders, fasting plasma glucose, and glycated hemoglobin. Selection for inclusion was based on our expertise and our perception of the relevance and impact on the field of lung diseases and type 2 diabetes.

Population based studies showing the negative impact of type 2 diabetes (T2D) on lung function are overviewed. Among the well-recognized pathophysiological mechanisms, the metabolic pathways related to insulin resistance, low-grade chronic inflammation, leptin resistance, microvascular damage, and autonomic neuropathy are emphasized.

Histopathological changes are exposed, and findings reported from experimental models are clearly differentiated from those described in humans. The accelerated decline in pulmonary function that appears in patients with cystic fibrosis with related abnormalities of glucose tolerance and diabetes is considered as an example to further investigate the relationship between T2D and the lung. Furthermore, a possible causal link between antihyperglycemic therapies and pulmonary function is examined.

T2D similarly affect breathing during sleep, becoming an independent risk factor for higher rates of sleep apnea, leading to nocturnal hypoxemia and daytime sleepiness. Therefore, the impact of T2D on sleep breathing and its influence on sleep architecture is analyzed. Finally, the effect of improving some pathophysiological mechanisms, primarily insulin resistance and inflammation, as well as the optimization of blood glucose control on sleep breathing is evaluated.

In summary, the lung should be considered by those providing care for people with diabetes, and raise the central issue of whether the normalization of glucose levels can improve pulmonary function and ameliorate sleep-disordered breathing. Therefore, patients with T2D should be considered a vulnerable group for pulmonary dysfunction. However, further research aimed at elucidating how to screen for the lung impairment in diabetic population in a cost-effective manner is needed.

Current evidence supporting the link between type 2 diabetes, pulmonary dysfunction, and sleep disorders is reviewed. We conclude the lung is a new target for the deleterious effects of diabetes.

ESSENTIAL POINTS

1. Type 2 diabetes exerts a deleterious effect on pulmonary function.
2. The reduced lung function is negatively associated with fasting plasma glucose, glycated hemoglobin, diabetes duration, and its severity.
3. Insulin and leptin resistance, low-grade chronic inflammation, microvascular damage, and autonomic neuropathy play an essential role in the lung damage associated with type 2 diabetes.
4. The histopathological findings include the thickening of the alveolar epithelia and pulmonary capillary basal lamina, the reduction of the alveolar space, higher degrees of fibrosis and microangiopathy, and modifications in mucus secretion.
5. Type 2 diabetes affect breathing during sleep, is an independent risk factor for higher rates of sleep apnea, and leads to nocturnal hypoxemia and daytime sleepiness.
6. The role of some therapeutic options such as insulin sensitizers and incretin-based therapies on lung function deserve further research.
7. Patients with type 2 diabetes are recommended to be considered a vulnerable group for pulmonary dysfunction.

14.- DISCUSIÓN GENERAL

En esta tesis hemos profundizado en las complicaciones “no clásicas” de la diabetes en relación con los trastornos del sueño, la hipoxia nocturna y la disfunción pulmonar. Es bien sabida la alta prevalencia de DM tipo 2 y, por tanto, la imposibilidad de realizar programas de diagnóstico de SAHOS y de disfunción pulmonar en toda esta población. Por ello, hemos centrado nuestro interés en: **(i)** la búsqueda de biomarcadores [factor inducible por hipoxia (HIF-1 α) y las proteínas séricas A y D del surfactante pulmonar (SP-A y SP-D)] que permitan identificar a los sujetos con DM tipo 2 más vulnerables de desarrollar esta complicación tardía, **(ii)** en el estudio de algunos de los mecanismos que pueden explicar esta relación (hiperactivación simpática y cronodisrupción), y **(iii)** en evaluar el impacto de la hipoxia nocturna [el índice de apneas-hipoapneas (IAH) y el tiempo de sueño con saturaciones de oxígeno inferiores al 90% (CT90)] sobre la ateromatosis subclínica a través del estudio de la densidad de la vasa vasorum en la adventicia carotídea. De todo ello surgen los cuatro estudios transversales que componen esta Tesis Doctoral.

1.- PRIMER ESTUDIO: Evaluar la activación simpática en un grupo de pacientes con DM tipo 2 y la relación de esta activación con la hipoxia nocturna.

La diabetes aumenta el riesgo cardiovascular por múltiples vías; entre las que se cuenta la hiperactivación simpática. En las últimas décadas; se ha recogido evidencia de la disfunción autonómica en la DM tipo 2, incluso en estadios tempranos de la enfermedad. Así, se ha observado una alteración en la función autonómica cardíaca medida por la variabilidad de la frecuencia cardíaca en sujetos con DM tipo 2 de poco tiempo de evolución. Esta variabilidad se relaciona con la hiperinsulinemia, el estrés oxidativo y la hiperglucemia, convirtiéndose en un factor clave en la progresión de la diabetes e incluso, un predictor de la progresión de la aterosclerosis de estos pacientes. [169, 170] Ya que el origen de la alteración del estado autonómico no se conoce con exactitud,

proponemos que uno de los nexos de unión entre la hiperactivación simpática y la DM tipo 2 es la hipoxia durante el sueño. De forma paralela, está descrito también desde hace más de 20 años la existencia de cierto grado de hiperactividad simpática en los sujetos con SAHOS. [171, 172]

En nuestro trabajo hemos puesto de manifiesto una secreción aumentada de metanefrinas urinarias durante la noche, que no sólo se relaciona con la hipoxia nocturna intermitente (CT90) sino también con una pérdida del tono parasimpático en reposo.

Estos resultados van en concordancia con otros estudios que han propuesto que la hiperactivación simpática en individuos con SAHOS influye en el desarrollo de la alteración en la sensibilidad a la insulina. En este sentido, Oltmanns y colaboradores llevaron a cabo un estudio con 14 sujetos sanos que al ser sometidos a períodos de hipoxia aguda desarrollaron intolerancia a la glucosa medida mediante un clamp euglucémico; y ésta, se asoció a un aumento en los niveles plasmáticos de catecolaminas. [173] Todos estos hallazgos sugieren que la relación entre hipoxia nocturna, hiperactivación simpática y DM tipo 2 podría ser bidireccional y perpetuar las alteraciones existentes.

Los estudios hasta ahora publicados han fallado en demostrar una relación significativa entre los parámetros de hipoxia nocturna (IAH y/o CT90) y cambios en la variabilidad cardíaca en sujetos con DM tipo 2. Así, Amra y colaboradores mostraron que la correlación hallada entre el IAH y la variabilidad cardíaca en sujetos con SAHOS desaparecía al estudiar a los sujetos que además del trastorno respiratorio nocturno presentaban también una DM tipo 2. [174] Mientras, Véber y colaboradores evidenciaron una pérdida del tono parasimpático y una alteración en el patrón diurno simpático-vagal en relación con el SAHOS; sin embargo, se trataba de una población sólo masculina y con síndrome metabólico. [175]

La población incluida en nuestro estudio presenta una obesidad leve, con un IMC medio de 33 kg/m². Es difícil analizar el impacto de este grado de obesidad

en nuestros datos, ya que el exceso de peso se relaciona con mayor prevalencia de SAHOS, resistencia a la insulina y también con un patrón inflamatorio capaz de influir en el sistema nervioso autónomo. [176] Sin embargo, también se ha descrito un aumento de la variabilidad cardíaca en sujetos con IMC normal y alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, en relación con la presencia de resistencia a la insulina. [177] Además, también hay evidencia de alteraciones en la sensibilidad a la insulina en sujetos delgados con SAHOS. [178] En cualquier caso, es necesario ampliar este estudio con sujetos con un IMC menor.

Nuestro estudio tiene ciertas limitaciones que requieren ser comentadas. Primero, se trata de un estudio transversal, por lo que no podemos establecer una relación causal entre la hipoxia nocturna y los trastornos de la hiperactividad simpática encontrados en los pacientes con DM tipo 2. Además, es una población de estudio pequeña, lo que plantea la necesidad de replicar este estudio con mayor número de sujetos con un patrón de hipoxia nocturna similar al de nuestra población.

2.- SEGUNDO ESTUDIO: Evaluar la expresión de HIF-1 α y de los principales genes reloj en los pacientes con DM tipo 2 en comparación con sujetos sin diabetes.

Se ha descrito que la respuesta a la hipoxia está alterada en los pacientes con DM tipo 2, pero se desconocen los mecanismos que contribuyen a la patogenia de la misma y sus complicaciones. Sabemos también que en los sujetos con DM tipo 2 hay mayor incidencia de hipoxia nocturna que activaría la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), favoreciendo la generación de inflamación sistémica y disfunción endotelial. A su vez, las ROS activan también a HIF-1 α . En este estudio, hemos intentado dar luz a la relación entre la hipoxia nocturna, la respuesta alterada a HIF-1 α y los ritmos circadianos en los pacientes con DM tipo 2.

HIF-1 α no sólo está presente ante la hipoxia en todos los tejidos susceptibles de desarrollar complicaciones en la diabetes; sino que además está involucrado en la función de las células β pancreáticas. Así, tanto la pérdida en su función como la inducción de la misma influyen en la patogenia de la diabetes. [179]

En relación con los ritmos circadianos y los genes reloj, debe recordarse que el metabolismo de la glucosa está definido entre otros por los ejes cronobiológicos. Así, los estudios genómicos de los genes circadianos en humanos han mostrado que sus variaciones favorecen la aparición de alteraciones metabólicas tales como la obesidad, la hipertensión y el síndrome metabólico. [180,181] Por su parte, estudios previos han evidenciado una alteración en la expresión de los genes reloj en sujetos con DM tipo 2 y trastornos del sueño. [182]

Nuestro estudio pone en evidencia que la hipoxia nocturna mantenida se relaciona con una disminución de la expresión relativa de HIF-1 α y de los genes reloj. Y es importante destacar que dichas alteraciones están estrechamente asociadas con el grado de control metabólico. Dado que se trata de un estudio transversal, nos es imposible demostrar causalidad, pero probablemente la relación entre los ritmos circadianos y la expresión de HIF-1 α en la DM tipo 2 sea de características bidireccionales, donde la estimulación o la disminución de la expresión de cualquiera de estos genes altere también el metabolismo glucídico.

Es plausible pensar que el tratamiento de la hipoxemia nocturna mediante CPAP pueda restablecer parte de la transcripción alterada de HIF-1 α y a su vez, de los genes reloj. A este respecto, Moreira y colaboradores fallaron en encontrar mejoría en la expresión de CLOCK con el tratamiento con CPAP en 17 varones con SAHOS grave. [183] Sin embargo, se trataba de sujetos sin diabetes y la alteración en la transcripción de los genes reloj dependía del trastorno del sueño (alteraciones en el sueño de onda lenta) pero no de la hipoxemia nocturna ni de la expresión de HIF-1 α . También debemos plantearnos el potencial efecto que la mejoría del control glucémico puede ejercer sobre la expresión parcial de HIF-1 α y los genes reloj que encontramos infra expresados en nuestro estudio.

Como factor limitante de nuestro estudio debemos destacar que la población reclutada es marcadamente obesa, por lo cual sería interesante replicar los resultados en una población con un IMC menor. En cualquier caso, esto no resta importancia a nuestros datos, ya que el aumento en la prevalencia de la obesidad ha llevado al aumento en la prevalencia de la DM tipo 2 y a acuñar términos como “diabesidad”.

En conclusión, y hasta donde sabemos, esta es la primera evidencia de la asociación entre la hipoxia nocturna presente en la DM tipo 2 y la alteración en la expresión génica de HIF-1 α y de los genes reloj. Estos trastornos se relacionan con el grado de control metabólico, y constituyen un nuevo mecanismo fisiopatológico que potencialmente podría ayudar al desarrollo de las complicaciones de la DM tipo 2.

3.- TERCER ESTUDIO: Evaluar los niveles séricos de las proteínas D y A del surfactante pulmonar (SP-D y SP-A) en pacientes con DM tipo 2 y su relación con lesión pulmonar no conocida.

En el presente estudio se evaluó la concentración sérica de las proteínas D y A del surfactante pulmonar como marcadores biológicos de lesión pulmonar en pacientes con DM tipo 2. En él aportamos pruebas de que el nivel sérico de SP-D, pero no SP-A, está aumentado en los sujetos con DM tipo 2 en comparación con los sujetos control sin diabetes. Además, se encontró una correlación negativa y significativa entre los niveles séricos de SP-D y los parámetros de función pulmonar como la CVF y el VEF1. Por lo tanto, en nuestro grupo de pacientes con DM tipo 2 sin enfermedad pulmonar conocida, la concentración sérica elevada de SP-D refleja la presencia de cierto grado de disfunción pulmonar.

Se han propuesto varias hipótesis para explicar el aumento sérico de SP-D como reflejo de la existencia de lesión pulmonar. [184] Hasta ahora la teoría más

aceptada es que la SP-D, siendo más hidrófila que SP-A, se escapa del espacio alveolar al compartimiento vascular cuando existen cambios en la permeabilidad del epitelio alveolar inducidos por inflamación crónica de bajo grado. Este fenómeno se encuentra también en estrecha relación con el papel conocido de la SP-D en la inmunidad innata del pulmón. Así, la asociación entre los trastornos metabólicos y la función pulmonar podría estar determinada por la inflamación crónica, la obesidad y la resistencia a la insulina. [185]

A este respecto, Fernández-Real y colaboradores evaluaron la SP-D sérica en cuatro cohortes diferentes y encontraron que las concentraciones de SP-D eran significativamente menores en los sujetos no obesos con DM tipo 2. En ese estudio, la concentración sérica de SP-D se correlacionó con diferentes variables metabólicas como los niveles de glucemia, pero no se asoció de manera significativa con los parámetros de la función pulmonar. Sin embargo, se establece una relación entre la concentración de SP-D y la alteración del metabolismo glucídico ya que, en las regresiones lineales múltiples, los niveles de glucemia y de triglicéridos en ayunas se identificaron como variables independientes que determinaban la variabilidad en la concentración de SP-D. [186] Este resultado, contrario a nuestros hallazgos, puede justificarse por alguno de los siguientes motivos: **(i)** la población con diabetes seleccionada no era obesa y presentaba un excelente control glucémico, probablemente relacionado con el hecho de que una proporción significativa de pacientes fue diagnosticado a propósito del estudio mediante la prueba de tolerancia a la glucosa oral de 75 g, **(ii)** directamente asociado con el diagnóstico reciente de la DM tipo 2, la menor duración de la diabetes previene el desarrollo de complicaciones crónicas, incluida la disfunción pulmonar.

Al igual que en los 2 trabajos previos, y debido al carácter transversal de nuestro estudio, no se ha podido establecer un vínculo causal entre la DM tipo 2 y el nivel sérico de SP-D, pero se delinea claramente una relación con la lesión pulmonar subclínica en estos pacientes y el papel que puede llegar a jugar su determinación como biomarcador de lesión pulmonar en sujetos con DM tipo 2. Si bien la medición de la concentración sérica de SP-D se ha utilizado en el

marco de procesos propiamente pulmonares, como la exacerbación de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, también existe evidencia de su utilidad como biomarcador de enfermedad cardiovascular. Así, un estudio reciente en una población de sujetos gemelos demostró una relación entre los niveles más altos de SP-D y un aumento de la mortalidad por cualquier causa. [187]

Hay pocos datos ex vivo del efecto positivo sobre la función pulmonar del tratamiento mediante SP-D recombinante y ningún ensayo clínico en curso. Así pues, la utilidad de nuestros hallazgos estaría enmarcada en la identificación de los pacientes con DM tipo 2 más vulnerables a presentar una lesión pulmonar y por tanto ser susceptibles del estudio de su función respiratoria.

4. CUARTO ESTUDIO: Evaluar el impacto del SAHOS y la hipoxia intermitente nocturna en la pared carotídea, mediante la evaluación de la densidad de vasa vasorum de la adventicia.

El SAHOS es una enfermedad de alta prevalencia que se caracteriza por episodios de hipoxemia intermitente y que se relaciona con las alteraciones del sueño. Estos dos elementos tienen un papel importante en la fisiopatología de las enfermedades vasculares y en las disfunciones cardíacas; considerándose entonces como factores de riesgo para eventos cardiovasculares y mortalidad por cualquier causa. Así, tanto estudios poblacionales de carácter observacional como y estudios prospectivos han evidenciado un aumento gradual en la prevalencia de eventos cardiovasculares en relación con el aumento del IAH. [188-191] Diversas vías fisiopatológicas se han descrito como responsables de este riesgo cardiovascular aumentado, y la mayoría de ellas se basan en el daño endotelial y el aumento de la aterosclerosis.

En el estudio de la enfermedad ateromatosa se ha intentado ahondar en la identificación de marcadores de diagnóstico precoz con el afán de evitar los eventos cardiovasculares. Así, ha surgido el estudio de la vascularización de la

vasa vasorum carotidea. El aumento de la vascularización de la capa adventicia se ha descrito en otras patologías relacionadas con un mayor riesgo cardiovascular, como la insuficiencia renal crónica, la obesidad, la DM tipo 1 y la DM tipo 2. [192-194]

El objetivo de nuestro último estudio fue evaluar si la hipoxia nocturna que sufren los pacientes afectos de SAHOS estaba relacionada con el grado de densidad de la vasa vasorum en la adventicia de la pared carotídea, como marcador precoz de enfermedad ateromatosa. Así, en la población de sujetos obesos con SAHOS hemos observado un aumento en la densidad de la vasa vasorum, y cómo el IAH se perfila como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de esta enfermedad ateromatosa precoz.

El papel de factores como VCAM-1 en el desarrollo de la enfermedad ateromatosa en pacientes con SAHOS ha sido estudiado por otros grupos y existen datos que muestran cómo la hipoxia intermitente produce una mayor expresión en las células endoteliales de la arteria coronaria. [195,196] En esta línea, nuestros resultados demostraron también un aumento en la concentración sérica de VCAM-1 entre los sujetos con SAHOS, correlacionándose de manera significativa con el aumento en la densidad de la vasa vasorum carotidea.

Somos conscientes que el carácter transversal y el pequeño tamaño muestral es una limitación de nuestro estudio. De igual manera, el gran número de mujeres incluidas dificulta la extrapolación de nuestros resultados en la población general. A pesar de que se necesitan estudios para validar estos hallazgos en poblaciones con mayor porcentaje de sexo masculino y/o en sujetos con menor IMC, nuestra población de estudio es similar a la que acude habitualmente a las Consultas Externas de los Servicios de Endocrinología y Nutrición. Por lo tanto, estos hallazgos siguen siendo de utilidad en la identificación de sujetos con mayor riesgo cardiovascular y en la necesidad de implementar el diagnóstico precoz como pilar fundamental en el inicio de las estrategias de prevención.

Queda por descubrir el verdadero papel de tratamiento del SAHOS en la prevención cardiovascular en esta fase tan precoz de la enfermedad, pues la evidencia hasta ahora es controvertida. Se ha observado que el tratamiento con CPAP mejora el perfil lipídico y las cifras de tensión arterial, [197-199] pero desconocemos el efecto de esta mejoría en el estrés oxidativo y en la disfunción endotelial. También hay datos, en una población italiana de más de 400 pacientes seguidos durante 81 meses, de un aumento del riesgo cardiovascular en aquellos sujetos con SAHOS moderado a grave; sin embargo, no hay disminución de este riesgo tras el tratamiento con CPAP. [200] En conclusión, aún son precisos estudios que evalúen el efecto beneficioso de la corrección de la hipoxia nocturna sobre la densidad de la vasa vasorum y los marcadores séricos de lesión endotelial.

15.- CONCLUSIONES

I.- La hipoxia nocturna en pacientes con DM tipo 2 conduce a cambios en el patrón de secreción nocturna de metanefrinas que se relacionan con pérdida del tono autonómico en reposo. Así, los trastornos del sueño y de la respiración presentes en la DM tipo 2 podrían ser responsables de la hiperactividad simpática descrita en estos pacientes. Esto podría aumentar la disfunción endotelial y perpetuar la enfermedad ateromatosa característica de la DM tipo 2.

II.- La respuesta celular frente a la hipoxia nocturna se encuentra alterada en los pacientes con DM tipo 2. Así, existe una disminución en la expresión génica de HIF-1 α y de genes reloj, que se correlaciona con el grado de control metabólico y con la hipoxemia nocturna.

III.- En los pacientes con DM tipo 2 existe una mayor prevalencia de disfunción pulmonar, que se relaciona con un aumento en las concentraciones séricas de SP-D. La concentración de SP-D circulante es una determinación potencialmente útil como biomarcador para evaluar el grado de lesión pulmonar presente en la DM tipo 2.

IV.- El SAHOS es una patología de prevalencia aumentada en la población con DM tipo 2. La densidad de VV, como marcador temprano de aterosclerosis, está incrementada en sujetos obesos con SAHOS y presenta una correlación positiva con la hipoxia intermitente crónica y la hiperglucemia en ayunas. Así, estos dos elementos serían factores de riesgo para aterosclerosis en estadios iniciales en los pacientes con DM tipo 2.

16.- PERSPECTIVAS DE FUTURO

Todos los resultados expuestos en esta Tesis Doctoral plantean nuevas incógnitas y vías fisiopatológicas a estudiar. En un intento por resumir el camino a seguir, podemos enumerar los siguientes objetivos que ya están en marcha y en los que estoy implicada:

1.- La consecución de un algoritmo de decisión que nos permita identificar a los sujetos con DM tipo 2 tributarios de un estudio de función pulmonar. Para ello pretendemos integrar en lo posible la determinación sérica de SP-D con los parámetros antropométricos y de control metabólico.

2.- Una vez identificados los pacientes con DM tipo 2, establecer si debe optarse por un tratamiento antidiabético específico ante la presencia de patología pulmonar. En este sentido, estamos finalizando un ensayo clínico doble ciego, aleatorizado, multicéntrico y cruzado para evaluar los efectos del tratamiento con un análogo del receptor de GLP-1, liraglutide, sobre la función pulmonar y las concentraciones séricas de SP-D y SP-A (estudio LIRALUNG).

3.- Profundizar en la identificación de los pacientes con DM tipo 2 con mayor riesgo de presentar un SAHOS. De forma similar al punto 1, la integración en un score predictivo de los niveles de metanefrinas recogidas durante el tiempo de sueño, junto con variables antropométricas claramente relacionadas con el SAHOS como el IMC y valores séricos de parámetros como HIF-1 α o la propia glucemia capilar deben ser considerados y evaluados.

4.- Nuestro grupo ya ha demostrado cómo la mejoría del control glucémico ejerce un impacto positivo sobre la función pulmonar. Debemos abordar también el efecto de la mejora del control glucémico sobre los parámetros que reflejan la hipoxia nocturna (IAH y CT90).

5.- Discernir si existe un impacto diferencial entre la hipoxia mantenida y la hipoxia intermitente en los sujetos con DM tipo 2. Para ello estamos finalizando el análisis de los resultados obtenidos tras someter a cultivos de adipocitos

maduros en normo e hiperglucemia a condiciones de normoxia, hipoxia mantenida e hipoxia intermitente.

6.- En línea con el anterior punto, debemos explorar el efecto diferencial producido (por ejemplo, sobre la actividad simpática y la expresión de HIF-1 α y de los genes reloj) tras el inicio del tratamiento con CPAP en pacientes con y sin DM tipo 2.

7.- Finalmente, en algunas secciones de esta Tesis Doctoral se ha hablado de una afectación pulmonar “subclínica” en los pacientes con DM tipo 2. En los próximos meses queremos evaluar el grado de sensación disneica en sujetos con DM tipo 2 y estudiar la asociación de los resultados con parámetros como el tiempo de evolución de la enfermedad, la coexistencia de otras complicaciones tardías de la diabetes o el grado de control metabólico.

17.- BIBLIOGRAFÍA

1. Care D, Suppl SS. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2019. *Diabetes Care* [Internet]. 2019 Jan 17;42(Supplement 1):S13–28.
2. Leslie RD1, Kolb H, Schloot NC et al. Diabetes classification: grey zones, sound and smoke: Action LADA 1. *Diabetes Metab Res Rev*. 2008 Oct;24(7):511-9. doi: 10.1002/dmrr.877.
3. Cho N, Shaw JE, Karuranga S et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018 Apr; 138:271-281. doi: 10.1016/j.diabres.2018.02.023. Epub 2018 Feb 26.
4. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas, 9th edn*. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2019. <http://www.diabetesatlas.org>
5. Soriguer F, Goday A, Bosch-Comas A, et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetología*. 2012; 55: 88-93.
6. Knowler WC Pettitt DJ, Saad MF, Bennett PH. Diabetes mellitus in the Pima Indians: incidence, risk factors and pathogenesis. *Diabetes Metab Res*. 1990 Feb;6(1):1-27.
7. Wu Y, Ding Y, Tanaka Y, Zhang W. Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention. *Int J Med Sci*. 2014;11(11):1185-200.
8. Sladek, R., Rocheleau, G., Rung, J., et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature*, 445(7130), 881–885. <https://doi.org/10.1038/nature05616>
9. Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2018 Dec 8;14(2):88–98.
10. Donath MY, Dalmas E, Sauter NS, et al. Inflammation in obesity and diabetes: islet dysfunction and therapeutic opportunity. *Cell Metab* 2013; 17: 860-872.
11. Poitout V, Amyot J, Semache M, et al. Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1801: 289-298.
12. Trayhurn P. Hypoxia and adipocyte physiology: implications for adipose tissue dysfunction in obesity. *Annu Rev Nutr* 2014; 34: 207-236.
13. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, et al. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. 1995;95(5):2409–2415. doi:10.1172/JCI117936
14. Lee, Y.H., Wang, MY., Yu, XX. et al. Glucagon is the key factor in the development of diabetes. *Diabetologia* (2016) 59: 1372. <https://doi->

- org.ressources-electroniques.univ-lille.fr/10.1007/s00125-016-3965-9
15. Drucker DJ. The biology of incretin hormones. *Cell Metab* 2006; 3: 153-65
 16. Andersen A, Lund A, Knop FK, Vilsbøll T. Glucagon-like peptide 1 in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2018;14(7):390–403. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0016-2>
 17. Rahmoune H, Thompson PW, Ward JM, et al. Glucose Transporters in Human Renal Proximal Tubular Cells Isolated from the Urine of Patients with Non–Insulin-Dependent Diabetes. *Diabetes* Dec 2005, 54 (12) 3427-3434; **DOI:** 10.2337/diabetes.54.12.3427
 18. Gallo LA, Wright EM, Vallon V. Probing SGLT2 as a therapeutic target for diabetes: basic physiology and consequences. *Diab Vasc Dis Res*. 2015;12(2):78–89. doi:10.1177/1479164114561992
 19. Zelniker TA, Braunwald E Cardiac and Renal Effects of Sodium-Glucose Co-Transporter 2 Inhibitors in Diabetes: *JACC* State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol*. 2018 Oct 9; 72(15): 845-1855. doi: 10.1016/j.jacc.2018.06.040
 20. Gore O, McGuire D, Lingvay I, Rosenstock J. Predicting Cardiovascular Risk in Type 2 Diabetes: The Heterogeneity Challenges. *Curr Cardiol Rep*. 2015 Jul;17(7):607. doi: 10.1007/s11886-015-0607-7.
 21. Burke GL, Evans GW, Riley WA, et al. Arterial wall thickness is associated with prevalent cardiovascular disease in middle-aged adults. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Stroke* 1995 Mar;26(3):386-91.
 22. Rasmussen-Torvik L, Li M, Kao W, et al. Association of a fasting glucose genetic risk score with subclinical atherosclerosis. *Diabetes* Jan 2011, 60 (1) 331-335; DOI: 10.2337/db10-0839
 23. Low Wang CC, Hess CN, Hiatt WR, Goldfine AB. Clinical Update: Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus: Atherosclerotic Cardiovascular Disease and Heart Failure in Type 2 Diabetes Mellitus - Mechanisms, Management, and Clinical Considerations. *Circulation*. 2016;133(24):2459–2502. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.022194
 24. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev*. 2013; 93: 137-188.
 25. Okon EB, Chung AW, Rauniyar P, et al. Compromised arterial function in human type 2 diabetic patients. *Diabetes* 54: 2415–2423, 2005
 26. Hartge MM, Unger T, Kintscher U. The endothelium and vascular inflammation in diabetes. *Diab Vasc Dis Res*. 2007; 4: 84–88
 27. Hecht H. The Deadly Double Standard (The Saga of Screening for Subclinical Atherosclerosis). *Am J Cardiol*. 2008;101: 1805-1807
 28. Papageorgiou N, Briasoulis A, Androulakis E, Tousoulis D. Imaging

- subclinical atherosclerosis: Where do we stand? *Curr Cardiol Rev.* 2017;13: 47-55
29. Touboul P, Hennerici MG, Meairs S, et al. Mannheim carotid intima-media thickness consensus (2004-2006-2011). An update on behalf of the Advisory Board of the 3rd and 4th Watching the Risk Symposium, 13th and 15th European Stroke Conferences, Mannheim, Germany, 2004, Brussels, Belgium, 2006 and Hamburg, Germany, 2011. *Cerebrovasc Dis.* 2012;34: 290-6.
 30. Xu j, Lu X, Shi GP. Vasa vasorum in atherosclerosis and clinical significance. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 11574-608.
 31. Feinstein SB. Contrast ultrasound imaging of the carotid artery vasa vasorum and atherosclerotic plaque neovascularization. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 48: 236-43.
 32. Arcidiacono MV, Traveset A, Rubinat E, et al. Microangiopathy of large artery wall: a neglected complication of diabetes mellitus. *Atherosclerosis.* 2013 May;228(1):142-7
 33. Sedding DG, Boyle EC, Demandt JAF, et al. Vasa Vasorum Angiogenesis: Key Player in the Initiation and Progression of Atherosclerosis and Potential Target for the Treatment of Cardiovascular Disease. *Front Immunol.* 2018;9:706. doi:10.3389/fimmu.2018.00706
 34. Sampol G, Lecube A. Type 2 diabetes and the lung: a bidirectional relationship. *Endocrinol Nutr.* 2012; 59: 95–97
 35. Van den Borst B, Gosker HR, Zeegers MP, Schols AMWJ. Pulmonary function in diabetes. A metaanalysis. *Chest.* 2010; 138: 393–406.
 36. Lecube A, Sampol G, Muñoz X, Hernández C, et al. Type 2 diabetes impairs pulmonary function in morbidly obese women. A case-control study. *Diabetología.* 2010; 53: 1210–1216.
 37. Kida K, Utsuyama M, Takizawa T, Thurlbeck WM. Changes in lung morphologic features and elasticity caused by streptozotocin-induced diabetes mellitus in growing rats. *Am Rev Respir Dis.* 1983 Jul;128(1):125-31.
 38. Kohn RR, Schnider SL. Glucosylation of human collagen. *Diabetes* 1982; 31:47-51.
 39. Foster DJ, Ravikumar P, Bellotto DJ, et al. Fatty diabetic lung: altered alveolar structure and surfactant protein expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2010; 298: L392–403
 40. Kuziemski K, Pienkowska J, Slominski W, et al. Pulmonary capillary permeability and pulmonary microangiopathy in diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 2015 Jun;108(3): e56-9. doi: 10.1016/j.diabres.2015.02.033. Epub 2015 Mar 6.
 41. Lecube A, Simó R, Pallayova M, et al. Pulmonary Function and Sleep Breathing: Two New Targets for Type 2 Diabetes Care. *Endocr Rev.* 2017;

- 38: 550-573.
42. Davis WA, Knuiiman M, Kendall P, Grange V, et al. Fremantle Diabetes Study. Glycemic exposure is associated with reduced pulmonary function in type 2 diabetes: the Fremantle Diabetes Study. *Diabetes Care*. 2004; 27: 752–757.
 43. Walter RE, Beiser A, Givelber RJ, et al. Association between glycemic state and lung function: the Framingham Heart Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003; 167: 911–916.
 44. Lawlor DA, Ebrahim S, Smith GD. Associations of measures of lung function with insulin resistance and Type 2 diabetes: findings from the British Women's Heart and Health Study. *Diabetologia*. 2004; 47:195–203.
 45. Litonjua AA, Lazarus R, Sparrow D, et al. Lung function in type 2 diabetes: The Normative Aging Study. *Respir Med*. 2005; 99: 1583–1590.
 46. Lange P, Parner J, Schnohr P, Jensen G. Copenhagen City Heart Study: longitudinal analysis of ventilatory capacity in diabetic and nondiabetic adults. *Eur Respir. J* 2002; 20: 1406–1412.
 47. Yeh HC, Punjabi NM, Wang NY, et al. Cross-sectional and prospective study of lung function in adults with type 2 diabetes: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Diabetes Care*. 2008; 31:741–746.
 48. Yeh F, Dixon AE, Marion S, et al. Obesity in adults is associated with reduced lung function in metabolic syndrome and diabetes: The Strong Heart Study. *Diabetes Care*. 2011; 34: 2306–2313.
 49. Barrett-Connor E, Frette C. NIDDM, impaired glucose tolerance, and pulmonary function in older adults. The Rancho Bernardo Study. *Diabetes Care*. 1996; 19: 1441–1444
 50. Chance WW, Rhee C, Yilmaz C, et al. Diminished alveolar microvascular reserves in type 2 diabetes reflect systemic microangiopathy. *Diabetes Care*. 2008; 31: 1596–1601.
 51. Oda E, Kawai R. A cross-sectional relationship between vital capacity and metabolic syndrome and between vital capacity and diabetes in a sample Japanese population. *Environ Health Prev Med*. 2009; 14: 284–291.
 52. Klein OL, Kalhan R, Williams MV, et al. Lung spirometry parameters and diffusion capacity are decreased in patients with Type 2 diabetes. *Diabet Med*. 2012; 29: 212–219.
 53. Klein OL, Aviles-Santa L, Cai J, et al. Hispanics/Latinos with type 2 diabetes have functional and symptomatic pulmonary impairment mirroring kidney microangiopathy: Findings from the Hispanic Community Health Study/Study of Latinos (HCHS/SOL). *Diabetes Care*. 2016; 39: 2051-2057.
 54. Schunemann HJ, Dorn J, Grant BJ, et al. Pulmonary function is a long-term predictor of mortality in the general population: 29-year follow-up of

- the Buffalo Health Study. *Chest*. 2000 Sep;118(3):656-64.
55. Lee HM, Liu MA, Barrett-Connor E, Wong ND. Association of lung function with coronary heart disease and cardiovascular disease outcomes in elderly: The Rancho Bernardo study. *Respir Med*. 2014;108(12):1779–1785. doi: 10.1016/j.rmed.2014.09.016
 56. Engström G, Hedblad B, Nilsson P, et al. Lung function, insulin resistance and incidence of cardiovascular disease: a longitudinal cohort study. *Journal of Internal Medicine*, 253: 574-581. doi: 10.1046/j.1365-2796.2003.01138.x
 57. Ford E, Mannino D. Prospective Association Between Lung Function and the Incidence of Diabetes. *Diabetes Care* Dec 2004, 27 (12) 2966-2970; DOI: 10.2337/diacare.27.12.2966
 58. Hsia CC, Raskin P. The diabetic lung: relevance of alveolar microangiopathy for the use of inhaled insulin. *Am J Med*. 2005 Mar;118(3):205-11.
 59. Guvener N, Tutuncu NB, Akcay S, et al. Alveolar gas exchange in patients with type 2 diabetes mellitus. *Endocr J*. 2003 Dec;50(6):663-7.
 60. Ljubić S, Metelko Z, Car N, Roglić G, Dražić Z. Reduction of diffusion capacity for carbon monoxide in diabetic patients. *Chest*. 1998; 114: 1033-1035.
 61. Weir DC, Jennings PE, Hendy MS, et al. Transfer factor for carbon monoxide in patients with diabetes with and without microangiopathy. *Thorax*. 1988; 43: 725–726.
 62. Marvisi M, Bartolini L, del Borrello P, et al. Pulmonary function in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Respiration*. 2001; 68: 268-272.
 63. Agarwal AS, Fuladi AB, Mishra G, Tayade BO. Spirometry and diffusion studies in patients with type-2 diabetes mellitus and their association with microvascular complications. *Indian J Chest Dis Allied Sci*. 2010; 52:213-216.
 64. Lau AC, Lo MK, Leung GT, et al. Altered exercise gas exchange are related to microalbuminuria
 65. Petersen KF, DufourS, BefroyD et al. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2004; 350: 664–671.
 66. Singh S, Prakash YS, Linneberg A, Agrawal A. Insulin and the lung: connecting asthma and metabolic syndrome. *J Allergy (Cairo)*. 2013; 2013: 627384.
 67. Lazarus R, Sparrow D, Weiss ST. Impaired ventilatory function and elevated insulin levels in nondiabetic males: The Normative Aging Study. *Eur Respir J*. 1998; 12: 635-640
 68. Lazarus R, Sparrow D, Weiss ST. Baseline ventilatory function predicts

- the development of higher levels of fasting insulin and fasting insulin resistance index: The Normative Aging Study. *European Respiratory Journal* Sep 1998, 12 (3) 641-645.
69. Dennis RJ, Maldonado D, Rojas MX, et al. Inadequate glucose control in type 2 diabetes is associated with impaired lung function and systemic inflammation: a cross-sectional study. *BMC Pulmonary Medicine*. 2010; 10: 38.
 70. Lecube A, Sampol G Muñoz X, et al. TNF- α system and lung function impairment in obesity. *Cytokine* 2011 May; 54(2):1 21-4. doi: 10.1016/j.cyto.2011.01.010.
 71. Naveed B, Weiden MD, Kwon S, et al. Metabolic syndrome biomarkers predict lung function impairment: a nested case-control study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012; 185: 392-399.
 72. Hickson DA, Burchfiel CM, Petrini MF, et al. Leptin is inversely associated with lung function in African Americans, independent of adiposity: the Jackson Heart Study. *Obesity (Silver Spring)*. 2011; 19: 1054-1061.
 73. Park HK, Ahima RS. Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism. *Metabolism*. 2015; 64: 24-34.
 74. Sin DD, Man SF. Impaired lung function and serum leptin in men and women with normal body weight: a population-based study. *Thorax*. 2003; 58: 695-698.
 75. Kohn RR, Schnider SL. Glycosylation of human collagen. *Diabetes*. 1982; 31: 47-51.
 76. Laurent GJ. Lung collagen: More than scaffolding. *Thorax* 1986; 41: 418-428.
 77. Sternberg M, Cohen-Forterre L, Peyroux J. Connective tissue in diabetes mellitus: Biochemical alterations of the intercellular matrix with special reference to proteoglycans, collagen and basement membranes. *Diabetes Metab*. 1985; 11: 27-50.
 78. Fuso L, Pitocco D, Longobardi A, et al. Reduced respiratory muscle strength and endurance in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev*. 2012; 28: 370-375.
 79. Schnapf BM, Banks RA, Silverstein JH, et al. Pulmonary function in insulin-dependent diabetes mellitus with limited joint mobility. *Am Rev Respir Dis*. 1984; 130: 930-932
 80. Katsuoka F, Kawakami Y, Arai T, et al. Type II alveolar epithelial cells in lung express receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 238: 512-516.
 81. Ota C, Ishizawa K, Yamada M, et al. Receptor for advanced glycation end products expressed on alveolar epithelial cells is the main target for hyperoxia-induced lung injury. *Respir Investig*. 2016; 54: 98-108

82. Sin DD, Pahlavan PS, Man SF. Surfactant protein D: a lung specific biomarker in COPD? *Ther Adv Respir Dis.* 2008; 2: 65-74.
83. Ju CR, Liu W, Chen RC. Serum surfactant protein D: biomarker of chronic obstructive pulmonary disease. *Dis Markers.* 2012; 32: 281-287.
84. Osaka A, Yanagihara K, Yamada Y, et al. Elevation of serum KL-6 glycoprotein or surfactant protein-D in adult T-cell leukemia with distinct pulmonary complications. *Tohoku J Exp Med.* 2009; 218: 99-105.
85. Akasaka H, Ohnishi H, Narita Y, et al. SPRUCE project investigators, The Serum Level of KL-6 Is Associated with the Risk of Insulin Resistance and New-onset Diabetes Mellitus: The Tanno-Sobetsu Study, *Internal Medicine,* 2017; 56: 3009-3018
86. Fernández-Real JM, Chico B, Shiratori M, et al. Circulating surfactant protein A (SP-A), a marker of lung injury, is associated with insulin resistance. *Diabetes Care.* 2008; 31: 958–963.
87. Körner M, Stöckli M, Waser B, Reubi JC. GLP-1 receptor expression in human tumors and human normal tissues: potential for in vivo targeting. *J Nucl Med* 2007; 48: 736–743.
88. Vara E, Arias-Díaz J, García C, et al. Glucagon-like peptide-1(7-36) amide stimulates surfactant secretion in human type 2 pneumocytes. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 163: 840–846.
89. Romani-Pérez M, Outeiriño-Iglesias V, Gil-Lozano M, et al. Pulmonary GLP-1 receptor increases at birth and exogenous GLP-1 receptor agonists augmented surfactant-protein levels in litters from normal and nitrofen-treated pregnant rats. *Endocrinology.* 2013; 154: 1144–1155.
90. Romani-Pérez M, Outeiriño-Iglesias V, Moya CM, et al. Activation of the GLP-1 receptor by liraglutide increases ACE2 expression, reversing right ventricle hypertrophy, and improving the production of SP-A and SP-B in the lungs of type 1 diabetes rats. *Endocrinology.* 2015; 156: 3559–3569
91. Marin JM, Carrizo SJ, Vicente E, et al. 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.
92. Marshall NS, Delling L, Grunstein RR, et al. Self-reported sleep apnoea and mortality in patients from the Swedish Obese Subjects study. *Eur Respir J.* 2011; 38: 1349-54.
93. Senaratna CV, Perret JL, Lodge C, et al. Prevalence of Obstructive Sleep Apnea in the general population: A systematic review, *Sleep Medicine Reviews* (2016), doi: 10.1016/j.smrv.2016.07.002.
94. Tasali E, Mokhlesi B, Van Cauter E. Obstructive sleep apnea and type 2 diabetes. Interacting epidemics. *Chest.* 2008; 133: 496–506.
95. Reutrakul S, Mokhlesi B. Obstructive Sleep Apnea and Diabetes: A State of the Art. Review. *Chest.* 2017; 152(5): 1070–1086. doi: 10.1016/

96. Weisbrod CJ, Eastwood PR, O'Driscoll G, Green DJ. Abnormal ventilatory responses to hypoxia in Type 2 diabetes. *Diabet Med.* 2005; 22: 563–568.
97. Nishimura M, Miyamoto K, Suzuki A, et al. Ventilatory and heart rate responses to hypoxia and hypercapnia in patients with diabetes mellitus. *Thorax.* 1989; 44: 1–257.
98. Malli F, Papaioannou AI, Gourgoulianis KI, Daniil Z. The role of leptin in the respiratory system: an overview. *Respir Res.* 2010; 11: 152.
99. Bassi M, Furuya WI, Zoccal DB, et al. Facilitation of breathing by leptin effects in the central nervous system. *J Physiol.* 2016; 594: 1617-1625.
100. Vgontzas AN, Zoumakis E, Lin HM, et al. Marked Decrease in Sleepiness in Patients with Sleep Apnea by Etanercept, a Tumor Necrosis Factor- α Antagonist. *J Clin Endocrinol Metab* 2004 Sep;89(9):4409-13.
101. Narkiewicz K, Kato M, Phillips BG, et al. Nocturnal Continuous Positive Airway Pressure Decreases Daytime Sympathetic Traffic in Obstructive Sleep Apnea. *Circulation* 1999 Dec 7;100(23):2332-5.
102. Somers VK, Dyken ME, Mark AL, et al. Sympathetic-nerve activity during sleep in normal subjects. *N Engl J Med.* 1993;328(5): 303-307. 27.
103. Somers VK, Dyken ME, Clary MP, et al. Sympathetic neural mechanisms in obstructive sleep apnea. *J Clin Invest.* 1995;96(4): 1897-1904. 28.
104. Ramadan W, Dewasmes G, Petitjean M, et al. Sleep Apnea Is Induced by a High-fat Diet and Reversed and Prevented by Metformin in Non-obese Rats. *Obesity*, 15: 1409-1418. doi:10.1038/oby.2007.169
105. Lecube A, Sampol G, Lloberes P, et al. Diabetes is an independent risk factor for severe nocturnal hypoxemia in obese patients. A case-control study. *PLoS One.* 2009; 4: e4692
106. Resnick HE, Redline S, Shahar E, et al. Sleep Heart Health Study. Diabetes and sleep disturbances: findings from the Sleep Heart Health Study. *Diabetes Care.* 2003; 26: 702–709.
107. Lecube A, Ciudin A, Sampol G, et al. Effect of Glycemic Control on Nocturnal Arterial Oxygen Saturation. A case-control study in Type 2 Diabetic patients. *Journal of Diabetes.* 7. 10.1111/1753-0407.12197.
108. Lecube A, Sampol G, Hernández C, et al. Characterization of Sleep Breathing Pattern in Patients with Type 2 Diabetes: Sweet Sleep Study. *PLoS One.* 2015 Mar 11;10(3): e0119073. doi: 10.1371/journal.pone.0119073
109. Pallayova M, Donic V, Gresova S, et al. differences in sleep architecture exist between persons with type 2 diabetes and nondiabetic controls? *J Diabetes Sci Technol.* 2010; 4: 344–352.
110. Shpilsky D, Erqou S, Patel SR et al. Association of obstructive sleep apnea

- with microvascular endothelial dysfunction and subclinical coronary artery disease in a community-based population. *Vasc Med*. 2018 Aug; 23(4): 331-339. doi: 10.1177/1358863X18755003.
111. Catrina SB. Impaired hypoxia-inducible factor (HIF) regulation by hyperglycemia. *J Mol Med (Berl)*. 2014 oct;92(10):1025-34. doi: 10.1007/s00109-014-1166-x.
 112. Lecube A, Sánchez E, Gómez-Peralta F, et al. Global assessment of the impact of type 2 diabetes on sleep through specific questionnaires. A case-control study. *PLoS One*. 2016; 11: e0157579.
 113. Luyster FS¹, Dunbar-Jacob J. Sleep quality and quality of life in adults with type 2 diabetes *Diabetes Educ*. 2011; 37: 347-355.
 114. Lecube A, Sánchez E, Gómez-Peralta F, Abreu C, Valls J, Mestre O, Romero O, Martínez MD, Sampol G, Ciudin A, Hernández C, Simó R. Global assessment of the impact of type 2 diabetes on sleep through specific questionnaires. A case-control study. *PLoS One*. 2016; 11: e0157579.
 115. Cavalcanti-Ferreira P, Daher LBN, Campus T, Araujo J, et al. A nonparametric methodological analysis of rest-activity rhythm in type 2 diabetes. *Sleep Sci*. 2018;11(4):281-289
 116. Chen C, Chen W, Chen C et al. Genetic variations in the serotonergic system contribute to body-mass index in Chinese adolescents. *PLoS One*. 2013; 8(3): e58717.
 117. Jenkinson CP, Cray K, Walder K et al. Novel polymorphisms in the neuropeptide-Y Y5 receptor associated with obesity in Pima Indians. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000 May; 24(5):580-4.
 118. Siddiq A; Gueorguiev M, Samson C et al. Single nucleotide polymorphisms in the neuropeptide Y2 receptor (NPY2R) gene and association with severe obesity in French white subjects. *Diabetologia*. 2007 Mar; 50(3):574-84.
 119. Esler M, Rumantir M, Wiesner G, et al. Sympathetic nervous system and insulin resistance: from obesity to diabetes. *Am J Hypertens*. 2001 nov;14(11 Pt 2):304S-309S.
 120. Smith MM, Minson CT. Obesity and adipokines: effects on sympathetic overactivity. *J Physiol*. 2012; 590: 1787-801
 121. K. Nonogaki et al. New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia* 43 (2000) 533–549.
 122. Zarich S, Waxman S, Freeman RT et al. Effect of autonomic nervous system dysfunction on the circadian pattern of myocardial ischemia in diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 24:956–962, 1994
 123. Stevens MJ, Raffel DM, Allman KC et al. Cardiac sympathetic dysinnervation in diabetes: implications for enhanced cardiovascular risk. *Circulation*. 1998 Sep 8; 98(10):961-8.

124. Kuehl M, Stevens M. Cardiovascular autonomic neuropathies as complications of diabetes mellitus. *J. Nat. Rev. Endocrinol.* 8, 405–416 (2012) doi: 10.1038/nrendo.2012.21
125. Rahman S, Ismail et al. Increased arterial stiffness in normoglycaemic offspring of newly diagnosed, never treated type 2 diabetic and impaired glucose tolerance parents. *Br J Diabetes Vasc Dis* 2009, 9: 65-68.
126. Schram MT, Henry RM, van Dijk RA et al, Increased central artery stiffness in impaired glucose metabolism and type 2 Diabetes: The Hoorn Study. *Hypertension* 2004, 43: 176-181.
127. Ruzskowska-Ciastek B, Sokup A, Wernik T et al. Effect of uncontrolled hyperglycemia on levels of adhesion molecules in patients with diabetes mellitus type 2. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2015 May; 16(5):355-61
128. Carnagarin R, Kiuchi MG, Ho JK, et al. Sympathetic Nervous System Activation and Its Modulation: Role in Atrial Fibrillation. *Front. Neurosci.* 12:1058. doi: 10.3389/fnins.2018.01058
129. Lecube A, Romero O, Sampol G, et al. Sleep biosignature of Type 2 diabetes: a case-control study. *Diabet Med.* 2017; 34: 79-85.
130. Pallayova M, Donic V, Gresova S, et al. Do differences in sleep architecture exist between persons with type 2 diabetes and nondiabetic controls? *J Diabetes Sci Technol.* 2010; 4: 344–352.
131. Xie, J.B. Skatrud, D.S. Puleo et al. Exposure to hypoxia produces long-lasting sympathetic activation in humans, *J. Appl. Physiol.* 91 (2001) 1555–1562.
132. Irwin M, Thompson J, Miller C et al. Effects of sleep and sleep deprivation on catecholamine and interleukin-2 levels in humans: clinical implications. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 1999 jun; 84(6):1979-85.
133. Peltier AC, Consens FB, Sheikh K, et al. Autonomic dysfunction in obstructive sleep apnea is associated with impaired glucose regulation. *Sleep Med.* 2007; 8: 149–155.
134. Punjabi NM, Polotsky VY. Disorders of glucose metabolism in sleep apnea. *J Appl Physiol.* 2005; 99: 1998–2007
135. Knutson KL, Van Cauter E, Zee P, et al. Cross-sectional associations between measures of sleep and markers of glucose metabolism among subjects with and without diabetes: The Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Sleep Study. *Diabetes Care.* 2011; 34: 1171-1176. 7371300995763
136. Ekstedt M, Akerstedt T, Söderström M. Microarousals during sleep are associated with increased levels of lipids, cortisol, and blood pressure. *Psychosom Med.* 2004; 66: 925-931.
137. Chouchou F, Pichot V, Pépin JL; PROOF Study Group. Sympathetic overactivity due to sleep fragmentation is associated with elevated diurnal systolic blood pressure in healthy elderly subjects: the PROOF-SYNAPSE

- study. *Eur Heart J.* 2013; 34: 2122-2131
138. Carreras A, Zhang SX, Peris E et al. Chronic sleep fragmentation induces endothelial dysfunction and structural vascular changes in mice. *Sleep.* 2014 nov 1; 37(11):1817-24
 139. Neto JC, Lira FS, Venancio DP et al. Sleep deprivation affects inflammatory marker expression in adipose tissue. *Lipids Health Dis.* 2010 oct 30; 9:125.
 140. Dumaine J, Ashley NT. Acute sleep fragmentation induces tissue-specific changes in cytokine gene expression and increases serum corticosterone concentration. *American Journal of Physiology* Jun 2015, 308 (12) R1062-R1069
 141. Dodt C, Breckling U, Derad I et al. Plasma epinephrine and norepinephrine concentrations of healthy humans associated with night time sleep and morning arousal. *Hypertension.* 1997 jul; 30(1 Pt 1):71-6
 142. Barbadoro P, Santarelli L, Croce N et al. Rotating shift-work as an independent risk factor for overweight Italian workers: a cross-sectional study. *PLoS ONE.* 2013; 8: e63289.
 143. Karlsson B, Knutsson A, Lindahl B. Is there an association between shift work and having a metabolic syndrome? Results from a population-based study of 27,485 people. *Occup Environ Med.* 2001;58(11):747-752. doi:10.1136/oem.58.11.747
 144. Taub LF, Redeker NS. Sleep disorders, glucose regulation, and type 2 diabetes. *Biol Res Nurs.* 2008; 9: 231-243.
 145. La Fleur SE, Kalsbeek A, Wortel J, et al. A daily rhythm in glucose tolerance: a role for the suprachiasmatic nucleus. *Diabetes.* 2001; 50(6):1237-1243.
 146. Esquirol Y, Bongard V, Ferrieres J et al. Shiftwork and higher pancreatic secretion: ¿early detection of an intermediate state of insulin resistance? *Chronobiol Int.* 2012; 29:1258-1266.
 147. Pan A, Schernhammer ES, Sun Q, Hu FB. Rotating night shift work and risk of type 2 diabetes: two prospective cohort studies in women. *PLoS Med.* 2011;8(12): e1001141. doi: 10.1371/journal.pmed.1001141
 148. Kurose T, Takanori H, Daisuke Y, et al. The role of chronobiology and circadian rhythms in type 2 diabetes mellitus: implications for management of diabetes. *ChronoPhysiology and Therapy.* 41. 10.2147/CPT.S44804.
 149. Huang W, Ramsey KM, Marcheva B et al. Circadian rhythms, sleep, and metabolism. *J Clin Invest* 2011; 121: 2133
 150. Storch KF, Lipan O, Leykin I, Viswanathan N, Davis FC, Wong WH, Weitz CJ. Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature.* 2002; 417(6884):78-83.

151. Ueda HR, Chen W, Adachi A, et al. A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature*. 2002; 418(6897):534–539.
152. Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, et al. PERIOD2: LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101(15):5339–5346.
153. Kalsbeek A, Yi CX, La Fleur SE et al. The hypothalamic clock and its control of glucose homeostasis. *Trends Endocrinol Metab*. 2010; 21:402–410.
154. Vieira E, Burris TP, Quesada I. Clock genes, pancreatic function, and diabetes. *Trends Mol Med*. 2014;20(12):685–693. doi:10.1016/j.molmed.2014.10.007
155. Turek FW, Joshu CE, Kohsaka A, et al. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science*. 2005 May 13; 308(5724): 1043–1045. doi:10.1126/science.1108750.
156. Rudic RD, McNamara P, Curtis AM et al. BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biol*. 2004; 2: e377.
157. Zhang EE, Liu Y, Dentin R et al. Cryptochrome mediates circadian regulation of cAMP signaling and hepatic gluconeogenesis. *Nat Med*. 2010; 16:1152–1156.
158. Sookoian S, Gemma C, Gianotti TF et al. Genetic variants of Clock transcription factor are associated with individual susceptibility to obesity. *Am J Clin Nutr*. 2008; 87:1606–1615.
159. Liu C, Li H, Qi L et al. Variants in GLIS3 and CRY2 are associated with type 2 diabetes and impaired fasting glucose in Chinese Hans. *PLoS ONE*. 2011; 6: e21464.
160. Englund A, Kovanen L, Saarikoski ST et al. NPAS2 and PER2 are linked to risk factors of the metabolic syndrome. *J Circadian Rhythms*. 2009; 7:5.
161. Pappa KI, Gazouli M, Anastasiou E et al. The major circadian pacemaker ARNT-like protein-1 (BMAL1) is associated with susceptibility to gestational diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 2013; 99:151–157.
162. Woon PY, Kaisali PJ, Bragança J et al. Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (BMAL1) is associated with susceptibility to hypertension and type 2 diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104:14412–14417.
163. Stenvers DJ, Scheer FAJL, Schrauwen P, la Fleur SE, Kalsbeek A. Circadian clocks and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol*. 2019;15(2):75–89. doi: /10.1038/s41574-018-0122-1
164. Crouch EC. Structure, biologic properties, and expression of surfactant protein D (SP-D). *Biochim Biophys Acta*. 1998 Nov 19;1408(2-3):278-89.

165. Kishore U, Greenhough TJ, Waters P, et al. Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors. *Mol Immunol.* 2006 Mar;43(9):1293-315. Epub 2005 Oct 5.
166. Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, et al. GOLD Scientific Committee. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Apr;163(5):1256-76
167. Cheng G, Ueda T, Numao, T et al. Increased levels of surfactant protein A and D in bronchoalveolar lavage fluids in patients with bronchial asthma. *European Respiratory Journal* Nov 2000, 16 (5) 831-835.
168. Lomas DA, Silverman EK, Edwards LD, et al. Serum surfactant protein D is steroid sensitive and associated with exacerbations of COPD. *European Respiratory Journal* Jul 2009, 34 (1) 95-102. DOI: 10.1183/09031936.00156508
169. Thiyagarajan R, Subramanian SK, Sampath N, et al. Association between cardiac autonomic function, oxidative stress and inflammatory response in impaired fasting glucose subjects: cross-sectional study. *PLoS One.* 2012;7(7): e41889. doi: 10.1371/journal.pone.0041889.
170. Gottsäter A, Ahlgren AR, Taimour S, Sundkvist G. Decreased heart rate variability may predict the progression of carotid atherosclerosis in type 2 diabetes. *Clin Auton Res.* 2006 Jun;16(3):228-34.
171. Leuenberger U, Jacob E, Sweer L, et al. Surges of muscle sympathetic nerve activity during obstructive apnea are linked to hypoxemia. *J Appl Physiol* 1995; 79:581–588
172. Carlson JT, Hedner J, Elam M, et al. Augmented resting sympathetic activity in awake patients with obstructive sleep apnea. *Chest* 1993; 103:1763–1768
173. Oltmanns KM, Gehring H, Rudolf S, et al. Hypoxia causes glucose intolerance in humans. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; 169:1231–7.
174. Amra B, Behjati M, Penzel T, et al. Nocturnal heart rate variation in diabetic and non-diabetic patients with sleep apnea syndrome. *Sleep Medicine*, 29, 57–60. doi: 10.1016/j.sleep.2016.11.003
175. Véber O, Lendvai Z, Ronai KZ, et al. Obstructive sleep apnea and heart rate variability in male patients with metabolic syndrome: cross-sectional study. *Metab Syndr Relat Disord.* 2014 Mar;12(2):117-24. doi: 10.1089/met.2013.0111.
176. Thayer JF, Yamamoto SS, Brosschot JF. The relationship of autonomic imbalance, heart rate variability and cardiovascular disease risk factors. *Int J Cardiol.* 2010; 141:122–31.
177. Saito I, Hitsumoto S, Maruyama K. Heart Rate Variability, Insulin Resistance, and Insulin Sensitivity in Japanese Adults: The Toon Health

- Study. *J Epidemiol* 2015;25(9):583-591 doi:10.2188/jea.JE20140254
178. Pamidi S, Wroblewski K, Broussard J, et al. Obstructive sleep apnea in young lean men: Impact on insulin sensitivity and secretion. *Diabetes Care*. 2012; 35:2384–9
 179. Cheng K, Ho K, Stokes R, et al. Hypoxia-inducible factor-1 alpha regulates beta cell function in mouse and human islets. *J Clin Invest*. 2011; 120 (6): 2183–2191.
 180. Kalsbeek A, Fliers E. Circadian and endocrine rhythms. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2017 Oct;31(5):443. doi: 10.1016/j.beem.2017.11.005.
 181. Scott EM, Carter AM, Grant PJ. Association between polymorphisms in the Clock gene, obesity and the metabolic syndrome in man. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32(4):658–662.
 182. Huang Y, Wang H, Li, Y, et al. Poor Sleep Quality Is Associated with Dawn Phenomenon and Impaired Circadian Clock Gene Expression in Subjects with Type 2 Diabetes Mellitus. *International Journal of Endocrinology*. Volume 2017, Article ID 4578973, 8 pages. doi: 10.1155/2017/4578973
 183. Moreira S, Rodrigues R, Barros A, et al. Changes in Expression of the CLOCK Gene in Obstructive Sleep Apnea Syndrome Patients Are Not Reverted by Continuous Positive Airway Pressure Treatment. *Front. Med.*, 06 November 2017 doi: 10.3389/fmed.2017.00187
 184. Eisner MD, Parsons P, Matthay MA et al; Acute Respiratory Distress Syndrome Network. Plasma surfactant protein levels and clinical outcomes in patients with acute lung injury. *Thorax*. 2003;58(11):983-988
 185. Sorensen GL; Surfactant Protein D in Respiratory and Non-Respiratory Diseases. *Front. Med*. 5:18. doi: 10.3389/fmed.2018.00018
 186. Fernández-Real JM, Valdes S, Manco M, et al. Surfactant protein D, a marker of lung innate immunity, is positively associated with insulin sensitivity. *Diabetes Care* (2010) 33:847–53. doi:10.2337/dc09-0542
 187. Wulf-Johansson H, Thinggaard M, Tan Q et al. Circulating surfactant protein D is associated to mortality in elderly women: a twin study. *Immunobiology* (2013) 218:712–7. doi:10.1016/j.imbio.2012.08.272
 188. Dewan NA, Nieto FJ, Somers VK. Intermittent hypoxemia and OSA: implications for comorbidities. *Chest*. 2015; 147: 266–274. doi:10.1378/chest.14-0500
 189. Birkbak J, Clark AJ, Rod NH. The effect of sleep disordered breathing on the outcome of stroke and transient ischemic attack: a systematic review. *J Clin Sleep Med*. 2014; 10: 103–108. doi: 10.5664/jcsm.3376.
 190. Marshall NS, Wong KK, Liu PY, et al. Sleep apnea as an independent risk factor for all-cause mortality: the Busselton Health Study. *Sleep*. 2008;

- 31: 1079–1085.
191. Young T, Finn L, Peppard PE, et al. Sleep disordered breathing and mortality: eighteen-year follow-up of the Wisconsin sleep cohort. *Sleep*. 2008; 31: 1071–1078.
 192. Arcidiacono MV, Martínez-Alonso M, Belart M, et al. High levels of hemoglobin promote carotid adventitial vasa vasorum neoangiogenesis in chronic kidney disease. *Mediat Inflamm*. 2017; 2017:3795142.
 193. Rubinat E, Ortega E, Traveset A, et al. Microangiopathy of common carotid vasa vasorum in type 1 diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 2015; 241:334–8
 194. Rius F, Sánchez E, Betriu À, Baena-Fustegueras JA, Yeramian A, Vidal T, et al. Influence of morbid obesity and bariatric surgery impact on the carotid adventitial vasa vasorum signal. *Obes Surg*. 2018; 28: 3935–3942. doi: 10.1007/s11695-018-3410-x.
 195. Kaczmarek E, Bakker JP, Clarke DN, Csizmadia E, Kocher O, Veves A, et al. Molecular biomarkers of vascular dysfunction in obstructive sleep apnea. *PLoS One*. 2013; 8: e70559. doi: 10.1371/journal.pone.0070559
 196. Jelic S, Padeletti M, Kawut SM, et al. Inflammation, oxidative stress, and repair capacity of the vascular endothelium in obstructive sleep apnea. *Circulation*. 2008; 117:2270–2278. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.741512
 197. Xu H, Yi H, Guan J, Yin S. Effect of continuous positive airway pressure on lipid profile in patients with obstructive sleep apnea syndrome: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Atherosclerosis*. 2014; 234:446–453. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.03.034.
 198. Schein AS, Kerkhoff AC, Coronel CC, et al. Continuous positive airway pressure reduces blood pressure in patients with obstructive sleep apnea; a systematic review and meta-analysis with 1000 patients. *J Hypertens*. 2014; 32: 1762–1773. doi:10.1097/HJH.0000250
 199. Monneret D, Tamisier R, Ducros V, et al. Glucose tolerance and cardiovascular risk biomarkers in non-diabetic non-obese obstructive sleep apnea patients: Effects of long- term continuous positive airway pressure. *Respir Med*. 2016; 12:119–125.
 200. Baratta F, Pastori D, Fabiani M, et al. Severity of OSAS, CPAP and cardiovascular events: A follow-up study. *Eur J Clin Invest*. 2018 May;48(5): e12908. doi: 10.1111/eci.12908.