

David Sanz Rubio

Micro-RNAs de Exosomas Circulantes en Apnea Obstruktiva del Sueño

Departamento
Farmacología y Fisiología

Director/es
Martín Burriel, Imaculada
Marín Trigo, José María

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



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

**MICRO-RNAS DE EXOSOMAS CIRCULANTES EN
APNEA OBSTRUCTIVA DEL SUEÑO**

Autor

David Sanz Rubio

Director/es

Martín Burriel, Imaculada
Marín Trigo, José María

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Farmacología y Fisiología

2019



**Universidad
Zaragoza**



GRUPO DE TRASTORNOS RESPIRATORIOS DEL SUEÑO

Unidad de Investigación Traslacional

IIS Aragón

Universidad de Zaragoza

Micro-RNAs de Exosomas Circulantes en Apnea Obstruktiva del Sueño

Memoria presentada por:

David Sanz Rubio

Para optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza

Zaragoza, enero 2019



Dña. **Inmaculada Martín Burriel**, Profesora Titular del Departamento de Anatomía, Embriología y Genética Animal, y D. **José M^a Marín Trigo**, Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICAN QUE:

D. David Sanz Rubio ha realizado, bajo nuestra dirección, los trabajos correspondientes a su tesis doctoral titulada «*MicroRNAs de Exosomas Circulantes en Apnea Obstructiva del Sueño*» que corresponde con el proyecto de tesis aprobado por la Comisión de Doctorado en septiembre de 2016 y cumple los requisitos mínimos exigidos para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza, por lo que autorizan su presentación para que pueda ser juzgado por el Tribunal correspondiente.

Lo que suscribimos como directores del trabajo en Zaragoza, a 10 de enero de 2019.

Fdo: Inmaculada Martín Burriel

Fdo: José M^a Marín Trigo

0. Contenido

1.	Resumen	1
2.	Introducción.....	5
2.1.	Apnea Obstructiva del Sueño	7
2.1.1.	Definición.....	7
2.1.2.	Epidemiología.....	7
2.1.3.	Manifestaciones clínicas.....	8
2.1.4.	Diagnóstico.....	9
2.1.5.	Tratamiento.....	11
2.1.6.	Comorbilidades asociadas a la AOS.....	12
2.1.7.	Comorbilidades cardiovasculares.....	13
2.2.	Exosomas	16
2.2.1.	Definición.....	16
2.2.2.	Biogénesis exosomal	18
2.2.3.	Carga de los exosomas	19
2.2.4.	Aislamiento y caracterización exosomal.....	21
2.2.5.	Implicaciones clínicas de los exosomas	23
2.3.	MicroRNAs.....	26
2.3.1.	Definición	26
2.3.2.	Biogénesis y transporte de los miRNAs.....	26
2.3.3.	miRNAs exosomales	28
2.3.4.	miRNAs en la AOS	29
2.4.	Exosomas y AOS.....	29
3.	Justificación e Hipótesis	31
4.	Objetivos.....	35

5.	Material y Métodos.....	39
5.1.	Ética	41
5.2.	Población de estudio	41
5.3.	Estudio del Sueño	43
5.4.	Estudio de la presencia de aterosclerosis subclínica.....	43
5.5.	Obtención de muestra	43
5.6.	Análisis de variables clínicas.....	44
5.7.	Aislamiento de exosomas	44
5.7.1.	Métodos de precipitación	44
5.7.1.1.	miRCURY exosome isolation kit (Exiqon).....	45
5.7.1.2.	Total Exosome Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific).....	45
5.7.2.	Método de exclusión molecular.....	46
5.7.2.1.	Preparación de la columna.....	46
5.7.2.2.	Aislamiento de exosomas	47
5.7.2.3.	Conservación de las columnas.....	48
5.8.	Caracterización de exosomas.....	48
5.8.1.	Caracterización proteica	48
5.8.2.	Análisis morfológico	50
5.8.2.1.	Microscopia Electrónica de Transmisión	50
5.8.2.2.	Análisis de DLS.....	51
5.9.	Análisis de miRNAs	51
5.9.1.	Extracción de RNA total	51
5.9.2.	Retrotranscripción	52
5.9.3.	Cuantificación de miRNAs (RT-qPCR).....	52

5.9.4.	Selección de miRNAs.....	53
5.9.5.	Controles internos.....	55
5.9.6.	Normalización de los niveles de miRNAs.....	56
5.9.7.	Determinación de la cantidad relativa de miRNAs	56
5.10.	Análisis estadístico	57
6.	Resultados y Discusión.....	59
6.1.	Estudio I. “Optimización del método de aislamiento y caracterización de exosomas circulantes de plasma en pacientes con AOS”.....	61
6.1.1.	Caracterización proteica	62
6.1.2.	Caracterización morfológica	63
6.1.2.1.	TEM.....	63
6.1.2.2.	DLS.....	64
6.1.3.	Análisis de miRNAs	65
6.1.3.1.	Evaluación de controles internos.....	65
6.1.3.2.	Valores de miRNAs.....	66
6.1.3.3.	Análisis del Coeficiente de Variación	67
6.1.4.	Discusión.....	71
6.2.	Estudio II. “Estabilidad de miRNAs de exosomas circulantes en sujetos sanos”	73
6.2.1.	Sujetos	73
6.2.2.	Aislamiento y caracterización	74
6.2.3.	Selección de un miRNA exosomal como normalizador.....	75
6.2.4.	Efecto de la congelación previa o tras el aislamiento de exosomas	77
6.2.5.	Dispersión inter-individuos	79

6.2.6.	Estabilidad de los miRNAs exosomales en el tiempo	79
6.2.7.	Discusión	83
6.3.	Estudio III. “Cambios en el perfil de miRNAs de exosomas circulantes de plasma en pacientes con AOS con y sin presencia de aterosclerosis subclínica”	85
6.3.1.	Sujetos	85
6.3.2.	Caracterización exosomal.....	88
6.3.3.	Control de hemólisis y controles internos	88
6.3.4.	Selección del miRNA normalizador.....	88
6.3.5.	Cuantificación relativa del conjunto de miRNAs mediante RT-qPCR....	89
6.3.6.	Discusión	91
6.4.	Estudio IV, “Efectos del tratamiento con CPAP en el perfil de miRNAs exosomales en pacientes con AOS con y sin aterosclerosis subclínica”	95
6.4.1.	Sujetos	95
6.4.2.	Control de hemólisis y controles internos	97
6.4.3.	Selección de normalizador y miRNAs de estudio.....	99
6.4.4.	Cuantificación de miRNAs mediante RT-qPCR.....	100
	101
6.4.5.	Discusión	103
6.5.	Estudio V, “Cambios en los niveles de miR-21 y miR-320a en pacientes con AOS con y sin aterosclerosis subclínica y efecto del tratamiento con CPAP sobre estos miRNAs”	107
6.5.1.	Sujetos	107
6.5.2.	Controles internos, control de hemólisis y normalización	111
6.5.3.	Cuantificación de miR-21 y miR-320a en visita basal.....	111
	112

6.5.4.	Cuantificación de miR-21 y miR-320a tras 1 año.....	112
6.5.5.	Discusión.....	114
7.	Discusión general.....	117
8.	Conclusiones.....	123
9.	Bibliografía.....	127
10.	Abreviaturas.....	153

1. Resumen

La apnea obstructiva del sueño (AOS) es una patología caracterizada por el colapso de la vía aérea superior durante el sueño, lo que provoca trastornos de este que ocasionan somnolencia diurna y la continua activación del sistema nervioso simpático durante la noche. Aunque la AOS no tiene habitualmente consecuencias fatales, sí que se ha asociado, además de con la pérdida de calidad de vida de los pacientes, con una senescencia acelerada y con la aparición de diversas comorbilidades, especialmente cardiovasculares como la aterosclerosis.

Los exosomas, pequeñas vesículas extracelulares de entre 30 y 150 nm, son claves en la comunicación célula-célula. Formando parte de su contenido, se ha descrito la presencia de microRNAs (miRNAs), pequeñas moléculas de 18 a 25 nucleótidos que participan en la regulación post-transcripcional de los genes. El papel de los miRNAs libres en fluidos biológicos como biomarcadores ha sido ampliamente estudiado durante las últimas décadas debido a su participación en un gran número de procesos biológicos. Sin embargo, en los últimos años, los miRNAs exosomales han ido ganando importancia y se postulan con un potencial como biomarcadores incluso mayor que los miRNAs libres. Las ventajas de su encapsulación son una mayor estabilidad y una mayor especificidad, ya que se ha descrito que estos son introducidos en los exosomas de manera específica y que la carga de los exosomas puede variar en función del estado en el que se encuentre la célula que los libera.

En la presente tesis doctoral nos planteamos el estudio de un conjunto de miRNAs, relacionados con aterosclerosis, procesos inflamatorios e hipoxia intermitente, en exosomas de plasma sanguíneo con el objetivo de evaluar su potencial como biomarcadores de la presencia de AOS, del desarrollo de comorbilidades cardiovasculares y de la eficacia del tratamiento de la AOS con CPAP.

Para la consecución de este objetivo, se llevaron a cabo 5 estudios. En el Estudio I se seleccionó la técnica de aislamiento de exosomas idónea para el análisis de sus miRNAs. El aislamiento de exosomas mediante kit comercial basado en su precipitación fue la técnica que proporciono mayor intensidad de señal para el estudio de los miRNAs exosomales. El Estudio II evaluó la estabilidad de los miRNAs analizados a lo largo del tiempo en sujetos control y se determinó el protocolo más adecuado de criopreservación de las muestras. Este trabajo mostró

por primera vez la estabilidad a lo largo del tiempo de un conjunto de miRNAs en exosomas circulantes. Además, se determinó que el protocolo más adecuado para conservar las muestras era criopreservar la muestra de plasma, evitando los ciclos de descongelación de los exosomas ya aislados. Tras haber determinado la metodología más adecuada, se analizaron en el Estudio III los miRNAs seleccionados para evaluar posibles diferencias entre sujetos control, pacientes con AOS y aterosclerosis subclínica (AS) y pacientes con AOS y sin AS en una visita basal. Cuatro de los miRNAs exosomales analizados, miR-21, miR-145, miR-223 y miR-320a se encontraron elevados en los sujetos con AOS y AS. Posteriormente, en el Estudio IV, se determinaron los valores de estos miRNAs en el mismo conjunto de individuos tras un año de seguimiento. En este estudio se dividieron los dos grupos de pacientes con AOS de la visita inicial en dos subgrupos cada uno en función de si recibieron terapia con CPAP o no. De esta manera se trató de evaluar la eficacia del CPAP sobre los cambios observados en estos miRNAs en la visita inicial. En este caso, miR-21, miR-126 y miR-143 se encontraron elevados en sujetos con AOS sin AS que no recibieron CPAP, mientras que miR-320a se encontró elevado en todos los grupos de pacientes con AOS independientemente de la presencia de AS y de la prescripción de CPAP. Finalmente, se procedió al Estudio V, en el cual se seleccionaron los miRNAs con mayor interés, según los resultados obtenidos en los estudios III y IV (miR-21 y miR-320a), y se validaron en una nueva población clasificada de la misma manera que en los estudios anteriores tanto en la visita basal como en la visita tras un año. Se corroboró que ambos miRNAs se encontraban elevados en la visita basal en pacientes con AOS y AS y que tras un año, miR-21 era sensible al tratamiento con CPAP mientras que miR-320a no respondía.

Este trabajo de tesis doctoral ha permitido determinar dos miRNAs, miR-21 y miR-320a, como posibles intermediarios en el desarrollo de comorbilidades cardiovasculares asociadas a AOS. Su respuesta al tratamiento con CPAP fue inversa, miR-21 respondió frente a él y constituiría un biomarcador pronóstico de riesgo de aterosclerosis prevenible con CPAP, sin embargo, miR-320a no lo hizo, sugiriendo que el riesgo cardiovascular asociado a este biomarcador permanece a pesar del tratamiento. Estos resultados abren la puerta a nuevos ensayos que determinen las implicaciones biológicas y clínicas de estos miRNAs.

2. Introducción

2.1. Apnea Obstructiva del Sueño

2.1.1. Definición

La apnea obstructiva del sueño (AOS) es un trastorno respiratorio del sueño con una alta prevalencia entre la población adulta occidental. La AOS se caracteriza por el colapso periódico de la vía aérea superior (VAS) durante el sueño. Este colapso de la faringe produce un cese completo (apnea) o parcial (hipopnea) del flujo aéreo¹. Los ciclos de apnea e hipoapnea producen en los pacientes con AOS un estado de hipoxia intermitente (HI) y ocasionan despertares repentinos durante los ciclos de sueño. Se considera la presencia de AOS cuando se registran 5 o más apneas o hipoapneas por hora de sueño. A esta medida de la densidad de apneas/hipoapneas se le conoce como Índice de Apnea Hipoapnea (IAH). La duración (al menos 10 segundos) y repetitividad (IAH) de estos procesos determina el grado de severidad de la patología. El término síndrome de apnea-hipopnea del sueño (SAOS) se establece cuando además de la presencia de AOS, coexisten síntomas de somnolencia diurna. En 2005, el Documento Nacional de Consenso de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) definió el SAOS o Síndrome de Apnea-Hipopnea del Sueño (SAHS) como un cuadro de somnolencia excesiva (ESD), trastornos cognitivo-conductuales, respiratorios, cardíacos, metabólicos o inflamatorios secundarios a los episodios de apnea/hipoapnea².

2.1.2. Epidemiología

La alta prevalencia de esta patología en la población occidental ha sido descrita en diversos estudios a lo largo de los años. En 1993, Young y colaboradores, a partir de los datos del *Wisconsin Sleep Cohort Study*, comunicaron que un 9% de las mujeres y un 24 % de los hombres de mediana edad presentaban AOS, mientras que un 2% y un 4% de las mujeres y hombres, respectivamente, mostraban además somnolencia diurna (SAOS)³. Las diferencias entre géneros, así como los porcentajes, fueron similares en otros estudios realizados sobre la prevalencia del SAOS^{4,5}. Las diferencias entre géneros se reducen cuando las mujeres superan la menopausia^{6,7}. Estudios más recientes, como el realizado sobre una población Suiza (HypnoLaus)⁸ o un nuevo trabajo sobre la cohorte perteneciente al *Wisconsin Sleep Cohort Study*⁹ mostraron tasas de prevalencia del SAOS más elevadas que las descritas previamente, en torno al 6% y 10 % de

mujeres y hombres de mediana edad, respectivamente. Además de las diferencias debidas al género, se presentan diferencias en la incidencia debido a la etnia ¹⁰. El aumento del SAOS en la población está relacionado con el aumento de uno de sus factores patogénicos primordial, el sobrepeso y la obesidad ^{11,12}; un problema de salud pública de los países desarrollados. A pesar de la alta prevalencia del SAOS, se estima que un alto porcentaje de los casos están sin diagnosticar ^{4,11,13}, suponiendo un gran coste para la salud pública ya que los pacientes con SAOS no tratados desarrollan comorbilidades metabólicas y cardiovasculares, que en última instancia favorecen un aumento de la morbi-mortalidad en estos pacientes¹¹. En la población española, la prevalencia de SAOS se ha estimado en 4-6 % de la población ¹⁴, con un 19% de los hombres y un 14% de las mujeres que muestran un IAH ≥ 10 ⁵. Las tasas de prevalencia siguen aumentando, por ejemplo, se estima que entre la población general de EEUU existe una prevalencia de AOS del 15-17% ¹⁵ y en Francia del 19% aproximadamente ¹⁶.

2.1.3. Manifestaciones clínicas

La sintomatología de los pacientes con SAOS se justifica por la propia obstrucción de la VAS durante el sueño y por las consecuencias fisiopatológicas asociadas a corto y largo plazo. El síntoma inicial de la disfunción suele ser el ronquido, que habitualmente es el causante mayoritario de las consultas por SAOS. Este síntoma afecta a prácticamente el 100% de sujetos, es de intensidad variable y dado que en muchos casos afecta la calidad de vida del entorno, suele ser el compañero de dormitorio del enfermo quien demanda la consulta con el médico. En la Tabla 1 se muestran los síntomas que aparecen durante la noche y durante el día, así como los porcentajes de pacientes afectados.

Tabla 1. Sintomatología asociada en pacientes con Apnea obstructiva del sueño y porcentaje de pacientes afectados (en paréntesis).

SÍNTOMAS NOCTURNOS	SÍNTOMAS DIURNOS
Apneas observadas (60%)	Excesiva somnolencia diurna (80%)
Ronquidos (100%)	Cefalea matutina (40%)
Despertares frecuentes (50%)	Concentración reducida (40%)
Insomnio (40%)	Déficit de memoria (30%)
Inquietud psicomotora nocturna (30%)	Irritabilidad (30%)
Nicturia (30%)	Depresión (25%)
Reflujo gastro-esofágico (25%)	Disminución de la libido (25%)
Diaforesis (25%)	Impotencia (25%)

Las apneas e hipoapneas que sufren los pacientes durante la noche suelen asociarse a caídas del nivel de saturación arterial de oxígeno (SaO₂) (desaturación o des-oxigenación) y recuperación del nivel de SaO₂ al finalizar la apnea (re-oxigenación). Este fenómeno, llamado hipoxia intermitente, supone una alteración del sistema biológico que aumenta el riesgo de desarrollar otras comorbilidades como las cardiovasculares (Apartado 3.1.6). Por otro lado, el final de una apnea/hipopnea se produce como consecuencia del aumento de la descarga simpática cortical (“despertar o arousal”), que a su vez aumenta el tono muscular de la faringe y con ello la eliminación del colapso de la VAS y la restauración del flujo aéreo. Estos continuos despertares nocturnos producen una alteración de la arquitectura del sueño que se cree es la responsable de la hipersomnia diurna. A pesar de que la excesiva somnolencia diurna (ESD) es el síntoma diurno más importante, este es difícil de medir y evaluar. La forma más habitual de análisis es mediante la realización de un cuestionario subjetivo realizado por el paciente y que se conoce como escala Epworth¹⁷. Este cuestionario es de rutina en las unidades de sueño de nuestro país¹⁸.

2.1.4. Diagnóstico

El diagnóstico de la AOS es relativamente sencillo. En primer lugar, se debe realizar una aproximación diagnóstica del paciente mediante la evaluación de su sintomatología haciendo hincapié en los síntomas referidos en la Tabla 1. La exploración física típica del sujeto suele

caracterizarse por la presencia de obesidad de grado variable y especialmente porque muchos pacientes poseen un cuello desproporcionadamente ancho en relación con su altura. En todo caso existe una gran variabilidad fenotípica.

Debe realizarse una cuantificación de la somnolencia diurna del paciente mediante alguno de los cuestionarios subjetivos existentes como es la escala Epworth. Cuando existe la sospecha de SAOS, el método de referencia para confirmar su diagnóstico es la polisomnografía convencional (PSG) (Figura 1). LA PSG es el registro simultaneo de múltiples señales fisiológicas durante el sueño nocturno del paciente.

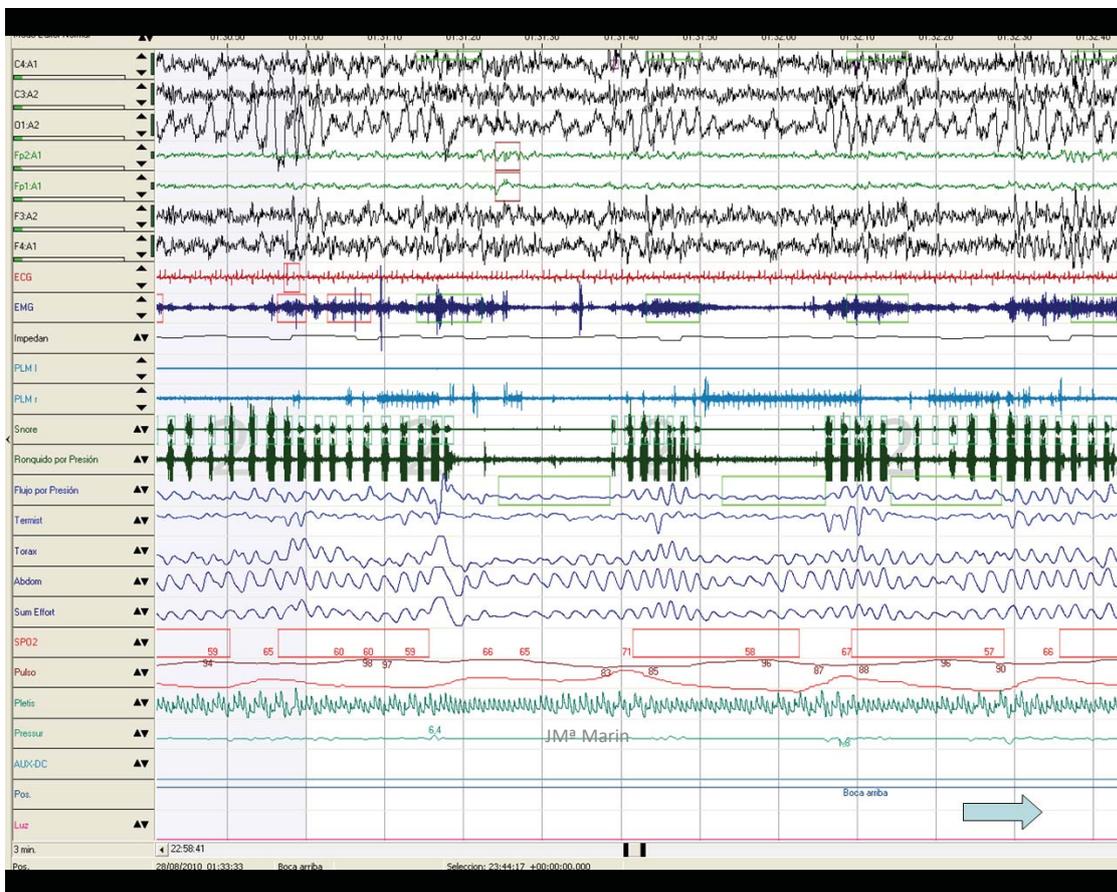


Figura 1. Polisomnografía nocturna completa.

Este análisis permite evaluar la cantidad y calidad del sueño, además de identificar posibles alteraciones respiratorias. Las señales que se pueden evaluar en la PSG se engloban en tres grupos; señales relacionadas con la calidad del sueño, entre las que se encuentran el electroencefalograma o el electromiograma; señales de monitorización cardiaca, como el electrocardiograma; y señales relacionadas con la función respiratoria, entre las que están el

esfuerzo toraco-abdominal, la oximetría o la medición del flujo aéreo. Para que la PSG tenga una calidad adecuada, esta debe realizarse en el horario habitual de sueño del paciente, normalmente nocturno, y debe realizarse un registro de más de 6,5 horas que incluya como mínimo 3 horas de sueño. LA PSG es una prueba compleja y costosa que requiere del ingreso en hospital durante una noche. Dada la alta prevalencia de SAOS, se han buscado alternativas más costo-efectivas a la PSG. De entre ellas, el estudio más extendido para evaluar y confirmar la presencia de AOS en pacientes con alta sospecha es la poligrafía respiratoria (PR) (Figura 2).

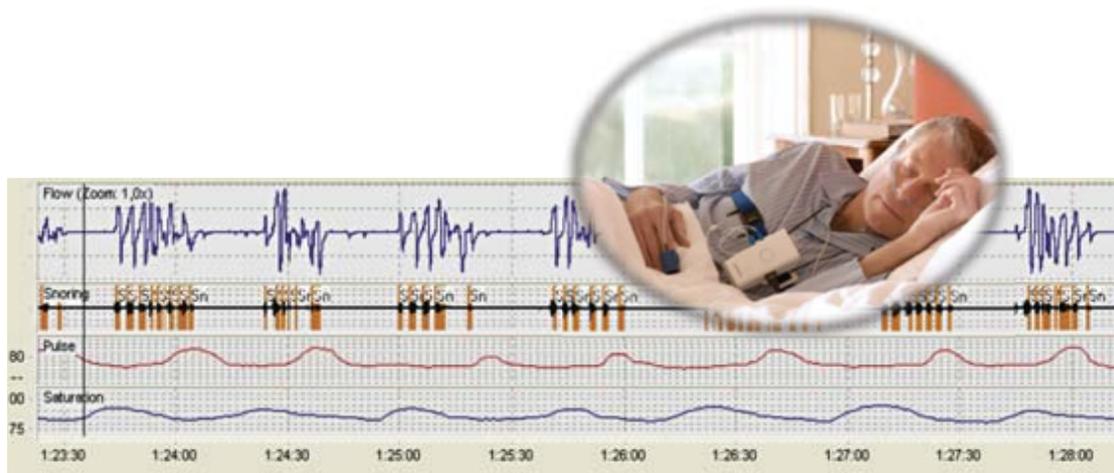


Figura 2. Poligrafía respiratoria a domicilio.

Este estudio aporta una evidencia suficiente de la presencia de la patología como alternativa a las PSG convencionales ¹⁹, permitiendo un estudio más sencillo que puede realizarse tanto de manera hospitalaria como a domicilio. La PR se acepta para el diagnóstico y tratamiento del SAOS en aquellos casos con sospecha clínica moderada o alta ²⁰. Se estima que existe todavía un amplio porcentaje de casos no diagnosticados ¹⁶.

2.1.5. Tratamiento

El tratamiento del SAOS consiste en eliminar la apnea/hipoapnea. La consecuencia inmediata será la restauración de un flujo aéreo normal, la normalización del intercambio gaseoso y la normalización de la estructura del sueño. Clínicamente, el paciente mejora en su calidad de vida y nota que se reduce en gran medida la somnolencia diurna. El compañero(a) de cama

evidencia ausencia de la roncopatía y mejoría general en el estado neuro-cognitivo del sujeto. A la hora de plantear el tratamiento del paciente, es necesario en primer lugar evaluar la presencia de algunos factores etiológicos y predisponentes, que pueden estar potenciando la aparición de AOS. Estos factores incluyen: la obesidad ²¹, la ingesta de fármacos sedante, alcohol o tabaco ²², la obstrucción nasal o la presencia de alteraciones anatómicas que puedan afectar al colapso de la VAS ²³.

El tratamiento de los pacientes con SAOS es, en la mayoría de las ocasiones, un tratamiento personalizado y multifactorial ²⁰. Es común a todos los pacientes, recomendar la abstinencia en la ingesta de alcohol, tabaco y fármacos hipnóticos. El tratamiento de la obesidad, si coexiste como morbilidad, es básico necesario para que el paciente ya que no va a curarse en tanto en cuanto mantenga los niveles de sobrepeso/obesidad. Cuando existen anomalías anatómicas (macroglosia, retrognatía, hipertrofia de amígdalas, etc..), debe plantearse la aplicación de tratamientos quirúrgicos específicos.

En todo caso, el tratamiento primario para remediar los efectos del SAOS es la aplicación de presión positiva continua de aire mediante una máscara. Este tratamiento se conoce como CPAP por sus siglas en inglés, *Continuous Positive Airway Pressure*. La CPAP evita la presencia de apneas y ronquidos, eliminando de esta manera las continuas desaturaciones de oxígeno y los despertares nocturnos, lo que mejora la arquitectura del sueño ^{24,25}. El tratamiento mediante CPAP ha mostrado también una mejora respecto a las comorbilidades que se encuentran en asociación al SAOS ^{26,27}. Se desconocen todavía los mecanismos moleculares que asocian el tratamiento con CPAP a la reducción de la morbi-mortalidad general y cardiovascular en particular.

2.1.6. Comorbilidades asociadas a la AOS

La AOS, se ha asociado a lo largo de los años con una variedad de comorbilidades que aparecen con una prevalencia mayor que entre la población sana. La afectación más evidente, es el deterioro neuro-cognitivo que surge por la desestructuración del sueño. Esta alteración produce la presencia de somnolencia diurna y una disminución de la calidad de vida, así como alteraciones

cognitivas, laborales y sociales. Se ha demostrado, que los pacientes con AOS presentan un incremento en la tasa de accidentes de tráfico entre 3 y 7 veces superior a la población no afectada²⁸. Otros trastornos que se asocian habitualmente con la AOS son trastornos metabólicos como la diabetes mellitus tipo 2²⁹, hipotiroidismo³⁰, acromegalia³¹ o el síndrome de Cushing³². De los trastornos metabólicos asociados a AOS, el más extendido entre los pacientes es el denominado síndrome metabólico. Este incluye obesidad abdominal, resistencia a la insulina, hipertensión arterial, hipertrigliceridemia e hiperglucemia^{33,34}. Además, estas morbilidades suponen *per se* un riesgo a padecer otras comorbilidades cardiovasculares.

2.1.7. Comorbilidades cardiovasculares

Nuestro grupo demostró en 2005 la relación existente entre padecer AOS de grado severo (IAH > 30) y el aumento en el riesgo de padecer eventos cardiovasculares²⁶. Estos hallazgos fueron confirmados posteriormente por otros grupos^{35,36} y refuerzan la evidencia de que padecer AOS severo aumenta la morbilidad y mortalidad cardiovascular, con una alta prevalencia de accidentes cerebrovasculares y cardiopatía isquémica^{26,35,36}. Otro aspecto reseñable del estudio realizado en 2005 por Marín y colaboradores fue que en los pacientes tratados con CPAP de forma eficiente la prevalencia de sufrir episodios cardiovasculares descendía, como se puede observar en la Figura 3. En años posteriores, este efecto del tratamiento con CPAP sobre la reducción de las morbi-mortalidades cardiovasculares ha sido corroborado por otros autores^{37,38}.

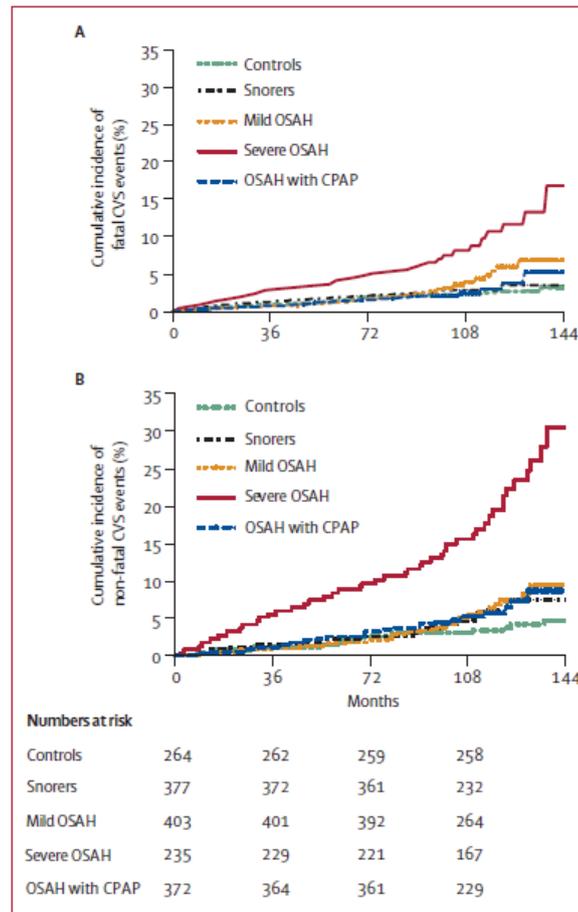


Figura 3. Eventos cardiovasculares en grupos con y sin SAOS, tratados o no tratados con CPAP ²⁶.

La alteración intermitente en el intercambio de gases (hipoxemia e hipercapnia), el exceso de actividad simpática y el incremento de la presión negativa intratorácica son considerados mecanismos intermediarios que justifican el exceso de morbi-mortalidad (Figura 4). Estos procesos inducen un estado proinflamatorio en el individuo, disfunción endotelial, un exceso de estrés oxidativo, la activación de mecanismos procoagulantes y disregulación metabólica. Estas alteraciones de la homeostasis del individuo conllevan al desarrollo de comorbilidades tales como hipertensión arterial ³⁹, diabetes mellitus tipo 2 ^{29,40}, enfermedades cardiovasculares ²⁶ o síndrome metabólico ⁴¹.

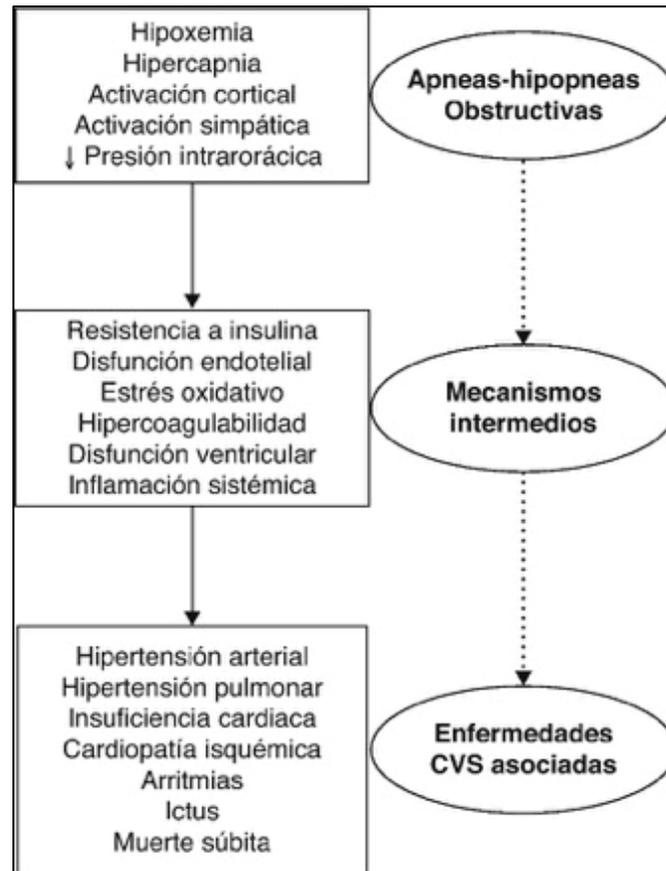


Figura 4. Mecanismos fisiopatogénicos de las consecuencias cardiovasculares del SAHS

20

Entre las morbilidades cardiovasculares asociadas a la AOS, la hipertensión arterial (HTA) ha sido descrita como una de las comorbilidades cardiovasculares más importantes ⁴². Diversos estudios muestran que esta asociación es independiente de otros factores como la edad, la obesidad o el sexo ^{43,44} y es todavía mayor en los casos de hipertensión resistente, considerándose la AOS como una de las principales causas de la misma ⁴⁵.

Aunque la HTA es un factor de riesgo para el desarrollo de problemas cardiovasculares, la aterosclerosis es la lesión que precede a la arteriopatía generalizada isquémica. Estudios como el de Drager L.F. y colaboradores muestran la relación entre la AOS y la presencia de aterosclerosis subclínica ⁴⁶. Como muestra la Figura 5, las consecuencias asociadas a la AOS, como la dislipemia, la inflamación sistémica, la resistencia a la insulina, la HTA o el estrés oxidativo, provocan la disfunción endotelial mediante la formación en la capa íntima de células espumosas, la promoción de procesos apoptóticos y la migración y proliferación de células

musculares lisas. Estos procesos provocan el aumento del grosor de la íntima media, lo que puede llevar a generar placas de ateromas y producir eventos cardiovasculares fatales cuando estas se rompen.

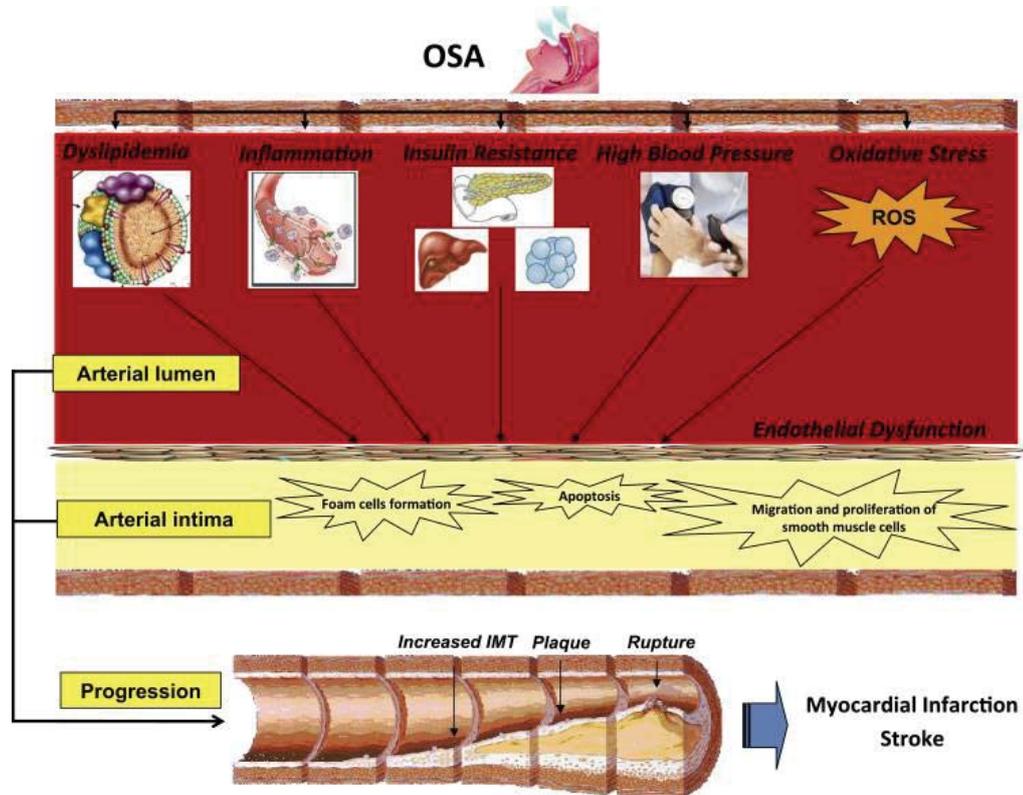


Figura 5. Esquema representativo de la fisiopatología de la AOS en el desarrollo de aterosclerosis ⁴⁵.

2.2. Exosomas

2.2.1. Definición

Los exosomas se clasifican como vesículas extracelulares (VE). Las VE son producidas por la mayoría de células eucariotas y se caracterizan por poseer una forma esférica, una bicapa lipídica que presenta marcadores específicos procedentes de la célula parental y contener en su interior material citosólico de las mismas ⁴⁷, denominado cargo. Las VE pueden originarse a partir de la membrana plasmática o a partir del lumen de compartimentos internos de la célula. Las VE han sido propuestas como un mecanismo de comunicación célula a célula mediante el transporte de su cargo ⁴⁸. Entre este cargo, se ha descrito la presencia de receptores, lípidos bioactivos,

proteínas y ácidos nucleicos como RNA mensajero y microRNAs (miRNAs)⁴⁹. Actualmente, las VE se clasifican en función de su tamaño, distinguiendo tres grupos: exosomas, microvesículas (también conocidas como ectosomas o micropartículas) y cuerpos apoptóticos^{47,50,51}.

Los exosomas son vesículas de tamaño nanométrico (30-150 nm) rodeados por una doble bicapa lipídica y que tienen una forma esférica en su visualización al microscopio electrónico. La existencia de estas vesículas fue descrita por primera vez en reticulocitos de rata en 1983⁵², aunque el término “exosoma” no les fue otorgado hasta 1987 por el grupo de Johnstone^{53,54}. Desde ese momento, se ha descrito la producción de exosomas por un amplio espectro de tipos celulares entre los que se encuentran linfocitos B⁵⁵, células dendríticas⁵⁶, linfocitos T⁵⁷, plaquetas⁵⁸ o células tumorales⁵⁹. Los exosomas se liberan a los fluidos biológicos por los distintos tipos celulares y su presencia ha sido descrita en la mayoría de ellos, incluyendo el plasma^{60,61}, la orina^{62,63}, el líquido cefalorraquídeo^{64,65}, la leche⁶¹ y la saliva⁶¹.

Originalmente, los exosomas fueron considerados como depósitos de basura celular para su expulsión⁶⁶, sin embargo, actualmente son considerados como uno de los ejes de la comunicación célula-célula⁶⁷⁻⁷⁰. De esta manera, los exosomas se encargarían de transferir la información desde la célula donadora hasta la célula receptora⁷¹. Una parte de la literatura propone que su función depende de la célula o tejido de origen. Por ejemplo, los exosomas producidos por células del sistema inmune, como las células dendríticas o las células B, podrían mediar la reacción inmune adaptativa en respuesta a patógenos o tumores⁷². Los exosomas también participan en otros procesos biológicos como la hemostasia mediante la potenciación de la coagulación. Su papel en la regulación de la homeostasis los convierte en piezas clave de los procesos de senescencia⁷³⁻⁷⁶ y envejecimiento⁷⁷⁻⁷⁹.

Los exosomas también desempeñan un papel importante en condiciones patológicas. Tanto la cantidad como el contenido de las exosomas puede variar⁸⁰, transportando de esta manera el contenido patológico a una célula sana y modificando su estado⁸¹. Los procesos de estrés celular⁸², senescencia^{73,74} o de hipoxia^{83,84} parecen alterar el número de exosomas secretados por las células.

2.2.2. Biogénesis exosomal

Las VE son clasificadas en los distintos grupos en función de su tamaño, como se ha descrito previamente. Sin embargo, esta no es la única diferencia existente entre los grupos. En el caso de los exosomas, estos se diferencian del resto de vesículas extracelulares no solo por su tamaño sino también por su mecanismo de biogénesis. Mientras que el resto de VE se generan a partir de la evaginación de la membrana plasmática de la célula, los exosomas son generados por un complejo proceso que termina con su liberación tras fusionarse los cuerpos multivesiculares (CMVs) con la membrana plasmática ^{85,86}.

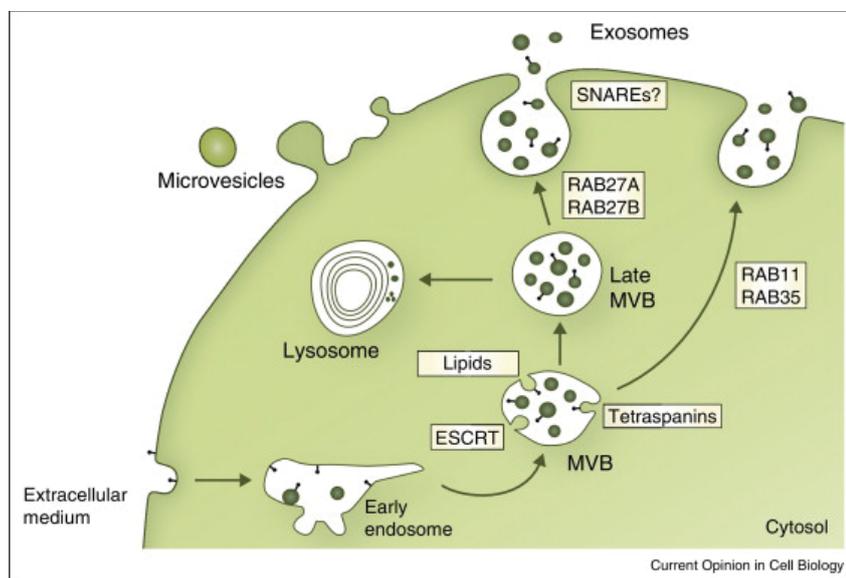


Figura 6. Biogénesis exosomal ⁸⁷

Como se observa en la Figura 6, la biogénesis de los exosomas comienza con la maduración de los endosomas tempranos a los endosomas tardíos o CMVs. Durante este proceso, la membrana endosomal puede sufrir procesos de invaginación generando las vesículas intraluminales (VILs) ⁸⁸, precursoras de los futuros exosomas. Para que este proceso de formación de las VILs se realice correctamente, se requiere la participación de la maquinaria ESCRT, por sus siglas del inglés *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*. ESCRT está formado por cuatro complejos proteicos y una ATPasa asociada ⁸⁹. Diferentes estudios han mostrado la alteración en la liberación de exosomas al bloquear distintas partes del complejo ESCRT ^{86,90,91}. Otras proteínas que también parecen tener un papel importante en la biogénesis exosomal son

ALIX y las sinteninas, las cuales favorecen la producción de VILs ⁹². A pesar de que ESCRT parece tener un papel importante en la biogénesis exosomal, algunos estudios han probado que esta maquinaria no es imprescindible para que se lleve a cabo. Estos mecanismos alternativos pueden ayudarse de proteínas de la familia de las tetraspaninas como CD9 y CD82 ⁹³ o CD63 ⁹⁴. Además de las proteínas, distintos tipos de lípidos poseen un papel relevante en la biogénesis exosomal ⁹⁵, como la ceramida ^{86,96}, aunque su función no parece ser relevante en todos los tipos celulares. Otros lípidos relacionados con la liberación de exosomas son los glicosfingolípidos en asociación con la flotilina ⁹⁷. Otro lípido, la esfingomiélin, modula la secreción de exosomas en las neuronas promoviendo la eliminación del péptido β -amiloide extracelular por parte de la microglía ⁹⁸.

Por tanto, la formación y liberación de exosomas depende tanto de proteínas como de lípidos. A pesar de que la vía más estudiada para esta biogénesis es la dependiente de ESCRT, también se puede realizar de manera independiente e incluso de manera sinérgica entre ambas. Además, es de gran importancia tanto el tipo celular como el estado de éste para determinar los mecanismos preferentes que controlan la secreción de exosomas.

2.2.3. Carga de los exosomas

Los exosomas están formados en su mayoría con material procedente del citosol celular. Entre su principal contenido se encuentran proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, entre los que destacan los RNAs mensajeros (mRNAs) y los miRNAs (Figura 7). Una de las bases de datos más actualizadas que recoge el contenido descrito en los exosomas, ExoCarta, define que los exosomas pueden contener 9.769 tipos de proteínas, 3.408 tipos de mRNAs y 2.838 tipos de miRNAs diferentes ⁹⁹.

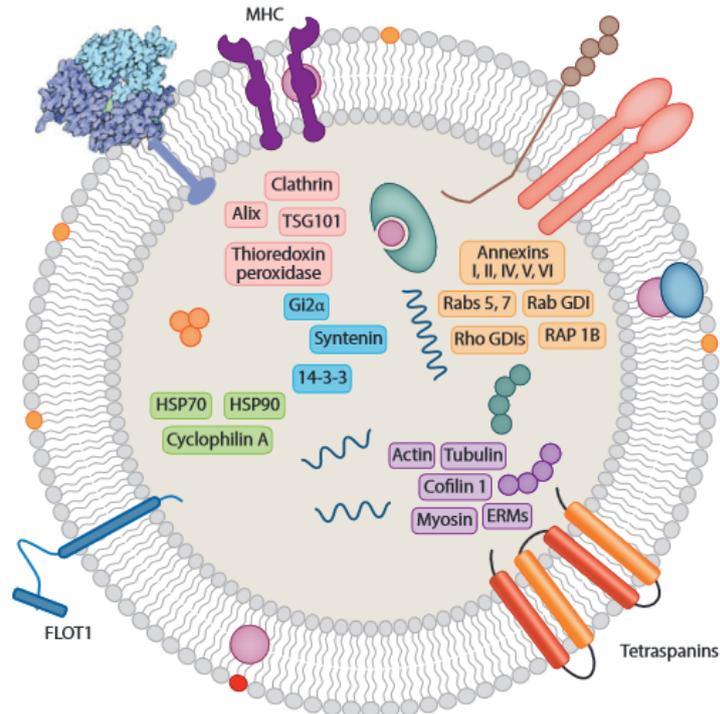


Figura 7. Estructura típica y contenido exosomal ¹⁰⁰.

Uno de los aspectos más relevantes y que les confiere a los exosomas un papel de gran relevancia biológica es el proceso de empaquetamiento de su carga. Aunque todavía se desconoce el mecanismo de formación y carga exacto, diversos estudios han mostrado la no aleatoriedad del mismo ^{101,102}. Se cree además que el contenido exosomal depende del tipo de célula que lo produce, pudiendo verse modificado si esta se encuentra en un estado celular alterado o si ha sido sometida a algún tipo de tratamiento. Entre los tres grupos de moléculas biológicas que se encuentran en los exosomas, son los miRNAs de los que se conoce con algo más de profundidad su procesos de empaquetamiento ¹⁰¹. Los miRNAs pueden ser introducidos en los exosomas selectivamente por diversos mecanismos ^{85,103}. Este proceso puede estar mediado por su unión a la proteína Ago2 ¹⁰², la cual forma parte del complejo miRISC. Otra posibilidad es la vía dependiente de proteínas de unión de RNA, también conocida como vía dependiente de chaperonas. En esta vía, proteínas como hnRNPA2B1 ¹⁰⁴ o YBX1 ¹⁰⁵ reconocen determinados motivos de la secuencia presentes en los miRNAs. Los mRNAs también son empaquetados de manera específica. Se ha observado un enriquecimiento de fragmentos 3'UTR en los mRNAs

exosomales¹⁰⁶. En cuanto a las proteínas, el mecanismo de dirección parece estar mediado por la modificación de estas, ya que se ha encontrado una mayor presencia de proteínas ubiquitinadas^{107,108}. Por último, la composición lipídica exosomal se encuentra selectivamente enriquecida en colesterol, esfingomiélin y glicofosfolípidos¹⁰⁹.

Tras el proceso de carga selectiva, los CMVs se desplazan por el interior celular mediante el citoesqueleto. Su destino puede ser fusionarse con la membrana para liberar exosomas o fusionarse con los lisosomas para su degradación. El proceso de transporte a través del citoesqueleto y la fusión con la membrana plasmática parece estar mediada por RabGTPasas, de las cuales ha sido descrita su presencia en exosomas⁸⁶.

2.2.4. Aislamiento y caracterización exosomal

La producción científica en el campo de las VEs y particularmente de los exosomas ha crecido exponencialmente durante la última década. A pesar de que en la bibliografía se han descrito numerosas técnicas y métodos de aislamiento^{110,111}, no existe todavía una metodología óptima estandarizada para todas las aplicaciones^{70,86,112}. Actualmente, la técnica de elección para el aislamiento de exosomas dependerá de la aplicación que se pretenda realizar con estos¹¹³.

Las técnicas basadas en ultracentrifugación son hoy en día las más extendidas. Algunas de las ventajas que otorga esta metodología es la posibilidad de usar volúmenes elevados de muestra de origen o la no adición de reactivos intermedios que puedan contribuir a la contaminación de las muestras^{86,110,114,115}. Sin embargo, esta técnica posee también diversas desventajas entre las que se encuentran la baja reproducibilidad inter-laboratorio, el alto coste del equipamiento, los largos tiempos de centrifugación o la posibilidad de que los exosomas aislados tengan algún tipo de daño mecánico debido a las altas velocidades de centrifugación a las que son sometidos^{70,110,113,116}.

Otra técnica que se puede utilizar para el aislamiento es la cromatografía de exclusión molecular (SEC, *Size Exclusion Chromatography*). Esta técnica se basa en la separación de partículas en base a su tamaño y permite evitar algunos de los inconvenientes que tenía la ultracentrifugación. La SEC no requiere el uso de equipos sofisticados y no somete a los exosomas

a ninguna condición adversa por lo que estos se aíslan sin sufrir daños ¹¹⁷. Además, al igual que en la ultracentrifugación, no es necesaria la utilización de ningún reactivo adicional. A pesar de estas ventajas, la SEC no es la técnica idónea para todas las aplicaciones y muestras ya que presenta desventajas como la dificultad de trabajo con grandes volúmenes de muestra inicial y el menor rendimiento de aislamiento final, ya que la muestra que se obtiene tras la elución se encuentra más diluida que en el resto de técnicas ¹¹⁷.

Por último, las casas comerciales están llevando a cabo el desarrollo de numerosos kits para el aislamiento de exosomas. La mayoría de estos se basan en la precipitación de los exosomas mediante el uso de un polímero. Entre sus principales ventajas se encuentran su rapidez y sencillez, además de que solo requieren el instrumental común de laboratorio ¹¹⁶. En cuanto a sus desventajas, su mayor problema es la presencia en las muestras de los agentes de precipitación, los cuales podrían interferir en el desarrollo de las posteriores aplicaciones ^{70,113,115}. Aunque son menos habituales, también se han desarrollado kits comerciales basados en la inmunofinidad entre anticuerpos y proteínas presentes en la membrana exosomal. Los anticuerpos suelen encontrarse inmovilizados en columnas o recubriendo bolitas magnéticas. Este tipo de aislamiento permite una elevada especificidad y sensibilidad, pero requiere del paso de limpieza posterior de la muestra ya que se han introducido factores externos ¹¹⁰.

La Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV, *International Society for Extracellular Vesicles*) sugiere unas determinaciones mínimas para confirmar la presencia de exosomas en las muestras ¹¹⁸. Estas determinaciones se basan en la técnica de Western Blot y proponen analizar al menos tres proteínas que se encuentren en al menos dos de los siguientes grupos: I) proteínas transmembrana o de unión a lípidos presentes en exosomas (CD9, CD63, CD81, ...), II) proteínas citosólicas también presentes en exosomas (TSG101, anexinas, RAB GTPasas o sintetina) y III) proteínas intracelulares procedentes del retículo endoplasmático, del aparato de Golgi (GM130) o de las mitocondrias (CytC) que deberán estar ausentes en el aislado.

Adicionalmente a las técnicas de análisis proteico, se pueden utilizar otros métodos para la caracterización de los exosomas. Su morfología esférica se puede visualizar mediante técnicas de microscopía electrónica de transmisión (TEM, *Transmission Electron Microscopy*) o de

barrido (SEM, *Scatter Electron Microscopy*)¹¹⁵. Otras técnicas comúnmente utilizadas son aquellas que permiten conocer la distribución de tamaños de las nanopartículas que se encuentran en la muestra. Para ello se puede utilizar la técnica de DLS (*Dinamic Light Scattering*) o NTA (*Nanoparticle Tracking Analysis*), en las cuales un láser incide sobre la muestra y se obtiene la distribución de partículas en función de la medida de dispersión de la luz. Otra posibilidad es el TRSP (*Tunable Resistive Pulse Sensing*), en el cual las nanopartículas son detectadas al pasar a través de una membrana de tamaño de poro ajustable^{110,113}. Tanto el NTA como el TRSP permiten además conocer la concentración aproximada de nanopartículas en la muestra¹¹¹.

2.2.5. Implicaciones clínicas de los exosomas

A pesar de que, como se ha descrito previamente, los exosomas fueron considerados en su inicio meros transportadores de materiales de desecho celular⁸⁶, actualmente se les considera comunicadores intercelulares. Esta función conlleva que los exosomas estén implicados en el correcto funcionamiento de un amplio espectro de procesos fisiológicos y que puedan tener un papel relevante en los procesos patológicos al transferir la información de una célula patológica a otra sana modificando el estado de esta última. En la Figura 8, se presentan algunas de las funciones asociadas a los exosomas y sus potenciales aplicaciones clínicas¹¹⁹.

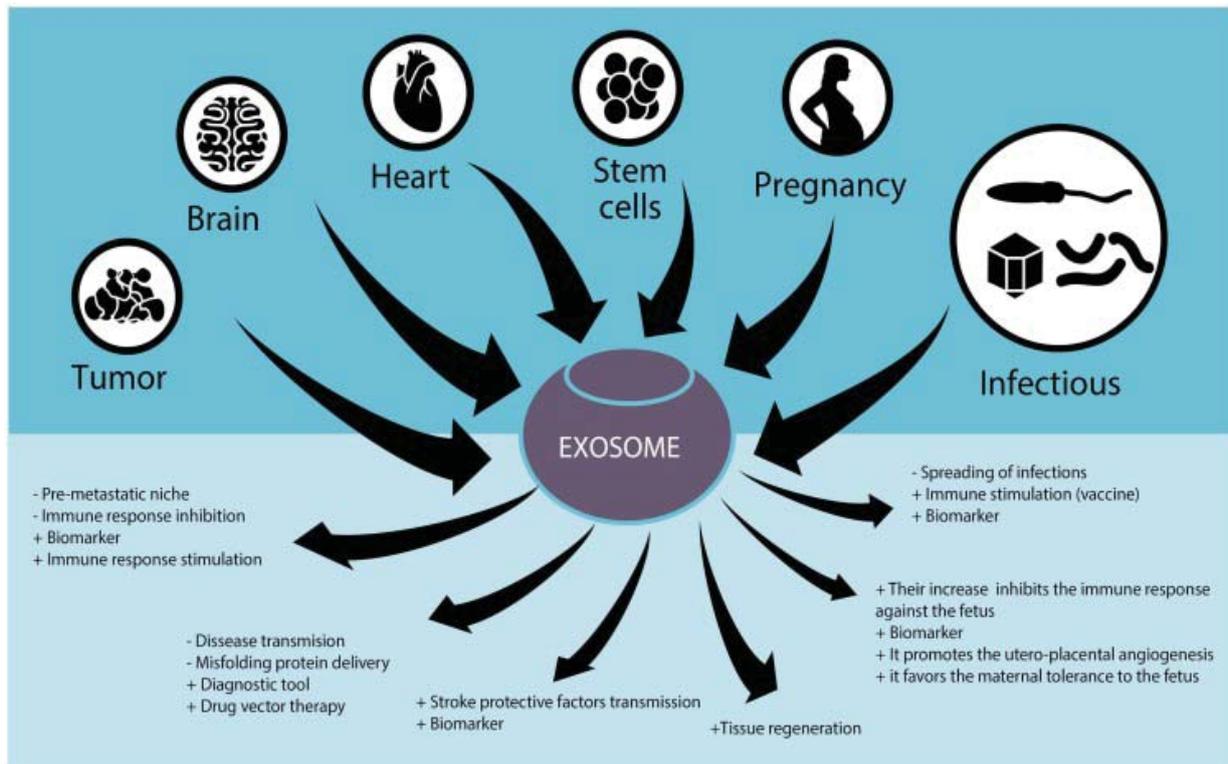


Figura 8. Funciones de los exosomas en distintas situaciones tanto fisiológicas como patológicas 119.

Los exosomas desempeñan un papel importante en el sistema inmune ¹²⁰. Por ejemplo, los exosomas producidos por células dendríticas o células B pueden ser captados por células T e intervenir en la presentación antigénica regulando así la respuesta inmune ⁵⁵. Un estudio realizado por Lancaster y Febbraio demostró que los exosomas que presentaban HSP70 en su carga podían activar las células NK (*Natural Killer*) y los macrófagos ¹²¹. Este avance se está intentando utilizar en distintos estudios clínicos en fase I y fase II para el tratamiento de cáncer ^{122,123}.

El papel de los exosomas en el cáncer también ha sido estudiado. Debido a su función como comunicadores intercelulares, a su estabilidad y a la capacidad de viajar a puntos alejados de la célula de origen, los exosomas han sido propuestos como candidatos a encargarse de generar el microambiente pro-tumoral necesario en los nichos metastáticos ¹²⁴. En este aspecto, un estudio realizado por el grupo de Peinado ha demostrado que los exosomas procedentes de melanoma que contienen la oncoproteína MET modulan las células derivadas de la médula ósea para generar un fenotipo pro-vascular en el pulmón ¹²⁵.

El sistema nervioso, tanto en su estado fisiológico como patológico, es otro de los tejidos en los que participan los exosomas. En estado fisiológico, existe comunicación célula-célula entre neuronas y oligodendrocitos mediada por exosomas ¹²⁶. Sin embargo, los exosomas también pueden ser importantes en la patogenia de las enfermedades. Han sido descritos como “caballos de Troya de la Neurodegeneración” por su capacidad para transportar agentes tóxicos a células del sistema nervioso, provocando de esta manera la alteración de las células receptoras, lo que acaba desembocando en los procesos de neurodegeneración ¹²⁷.

Los exosomas también se encuentran implicados en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares ¹¹⁹. En estas patologías, estas microvesículas parecen tener un efecto doble. Por un lado, Chen y colaboradores mostraron que los exosomas derivados de células progenitoras cardíacas podían proteger a los cardiomiocitos del estrés oxidativo mediante la inhibición de la apoptosis inducida por isquemia ¹²⁸. Por otro lado, los cardiomiocitos pueden producir TNF- α tras su inducción a través del factor inducible por hipoxia (HIF-1) y liberarla en los exosomas durante condiciones de hipoxia, produciendo inflamación y remodelación cardíaca ¹²⁹.

Un proceso en el que se ha demostrado la participación necesaria de los exosomas para su correcto desarrollo es el embarazo. La placenta produce de manera continua y constitutiva exosomas que son transportados a través del torrente sanguíneo materno. Estos exosomas tienen una composición específica con un mayor número de moléculas capaces de producir un efecto inmunosupresor, el cual es necesario para bloquear el sistema inmune materno y asegurar la supervivencia del feto ^{130,131}.

Las implicaciones de los exosomas en un gran espectro de patologías los convierte a ellos y su cargo en potenciales biomarcadores. Además, su capacidad inmunomoduladora puede ser utilizada como herramienta clave para la clínica. Por último, su capacidad de transporte hace que numerosos estudios planteen su uso como vector terapéutico.

2.3. MicroRNAs

2.3.1. Definición

Los miRNAs son pequeñas moléculas, de entre 18 y 25 nucleótidos, de RNA no codificante que participan en la regulación post-transcripcional de los genes y pueden encontrarse tanto en el tejido como en circulación. Los miRNAs se unen al extremo 3' del transcrito no traducido del mRNA diana para su actuación¹³². El grado de complementariedad con el transcrito con el que se empareja determina el nivel de regulación que ejerce¹³³. Desde que fue definida su actividad biológica en las células de mamíferos^{134,135}, se han descrito más de 2.500 miRNAs y su función como reguladores génicos en más de 1.500¹³⁶. Cada miRNA es capaz de actuar sobre cientos de mRNAs dianas distintos y, a su vez, un mRNA puede estar regulado por distintos miRNAs¹³⁷. Esto provoca que los miRNAs estén encargados de regular de manera fisiológica una gran cantidad de procesos fisiológicos. Por ejemplo, se ha descrito la importancia de los miRNAs para el correcto desarrollo de las células β y las isletas pancreáticas¹³⁸, el papel de algunos miRNAs como el miR-122 en el control del colesterol hepático¹³⁹ y el metabolismo lipídico, la necesidad de los miRNAs para el correcto desarrollo muscular¹³⁷ o su papel en el mantenimiento de una correcta fisiología cardiovascular¹⁴⁰. Además, su alteración se ha relacionado con la presencia de determinados estados patológicos como enfermedades neurodegenerativas o cáncer, por lo que se postulan como moléculas diagnósticas de algunas de ellas¹⁴¹⁻¹⁴⁴. Por último, su capacidad reguladora los hace también candidatos para su uso terapéutico^{145,146}.

2.3.2. Biogénesis y transporte de los miRNAs

La Figura 9 muestra de forma esquemática el proceso de formación de los miRNAs. Codificados en el genoma de las células nucleadas, los genes de los miRNAs se transcriben mediante la RNA polimerasa II o III en largos transcritos de RNA que se pliegan sobre sí mismos para formar los miRNA primarios (pri-miRNAs). Estas estructuras son reconocidas y procesadas a precursores de miRNAs (pre-miRNAs) por la ribonucleasa III nuclear (RNasa III, Drosha) junto con DCGR8¹⁴⁶. El pre-miRNA es transportado al citoplasma por la exportina-5, donde es procesado por completo por otra RNasa III, Dicer, formándose el miRNA de cadena simple ya

maduro. El miRNA maduro puede formarse a partir del lado de la horquilla que se encuentra más cercano al extremo 5', en cuyo caso se le conoce con la terminación 5p, o puede formarse a partir del fragmento más cercano al extremo 3', teniendo en este caso la terminación 3p. La prevalencia de uno u otro depende del tejido o el tipo celular que se estudie. Este miRNA maduro puede incorporarse al complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) y dirigirse a sus RNAs mensajeros (mRNAs) inhibiéndolos o degradándolos ¹⁴⁷.

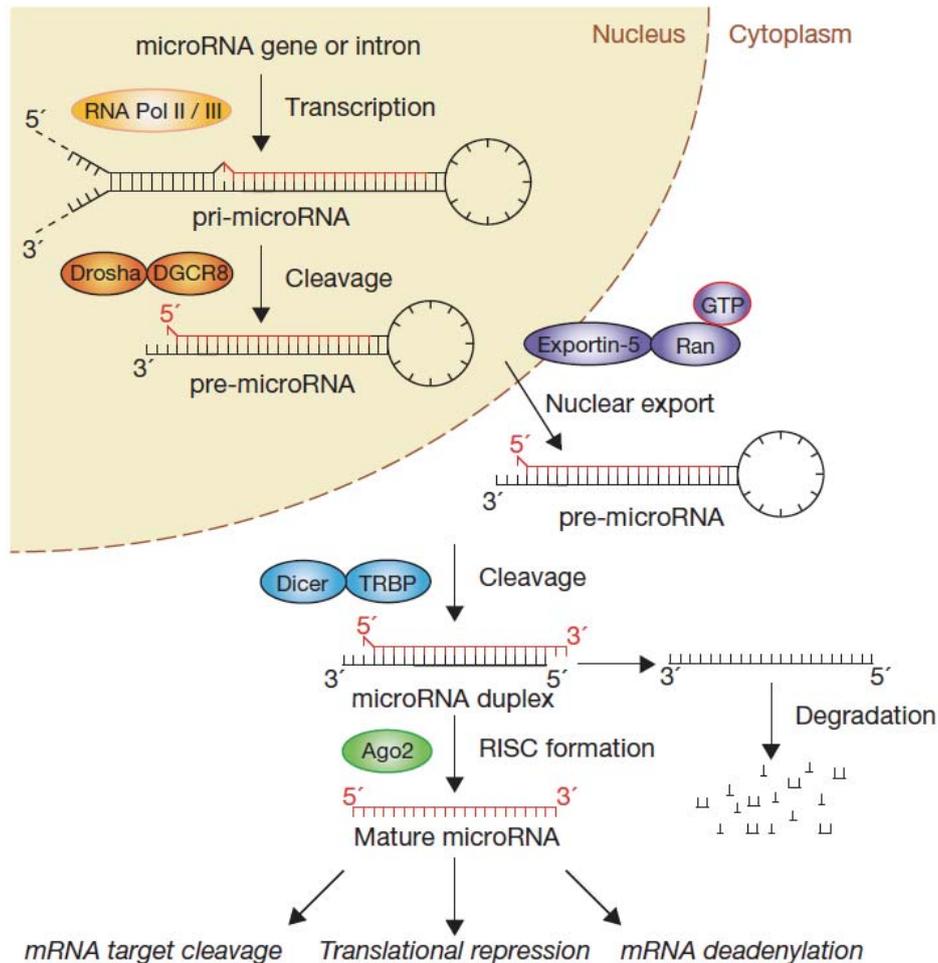


Figura 9. Biogénesis de los miRNAs ¹⁴⁸.

Se ha demostrado la presencia de miRNAs en fluidos extracelulares como la sangre, el plasma o el suero ¹⁴⁹. Sin embargo, el mecanismo exacto por el que éstos son secretados y mantienen su estabilidad aún no se conoce. Algunas teorías proponen que podrían ser secretados y protegidos mediante su introducción en exosomas ¹⁵⁰, otra posibilidad sería su encapsulación en microvesículas ¹⁵¹ o en cuerpos apoptóticos. Pese a ello, la mayoría de los miRNAs no se transportan en asociación a vesículas, sino que se asocian a proteínas como la nucleoplasmina o

la proteína Argonauta 2 (AGO2)¹⁵², a lipoproteínas de alta densidad (HDL)¹⁵³ o incluso podrían secretarse en solitario¹⁵⁴.

2.3.3. miRNAs exosomales

Como se ha descrito en el apartado anterior, los miRNAs pueden estar en circulación a través de distintos mecanismos, ya sea libres, unidos a proteínas o encapsulados. A pesar de que los miRNAs que son transportados mediante su encapsulación en exosomas no es el grupo mayoritario, estos tienen un importante papel biológico. Su transporte en estas estructuras les confiere un alto grado de protección debido a la bicapa lipídica que los rodea y protege^{155,156}. Además, la presencia de esta bicapa evita que los miRNAs puedan ejercer su actividad biológica sobre otro punto que no sea la célula de destino.

Los miRNAs transportados a través de los exosomas tienen un proceso de control más exhaustivo. En primer lugar, se debe realizar la encapsulación de los mismos, proceso que, aunque no se conoce por completo, no se produce de manera aleatoria. Este proceso de carga contrasta con la producción y liberación pasiva de miRNAs que se da de manera continua en las células en función de sus necesidades¹⁵⁷. El otro punto de control es la capacidad de la membrana exosomal de dirigirse a determinados receptores celulares que favorezcan su internalización, siendo de esta manera dirigidos a determinados tipos celulares¹⁵⁸.

El proceso de carga selectiva de los miRNAs se altera al producirse cambios patológicos en las células productoras. Este hecho tiene un impacto directo en el contenido exosomal y su efecto sobre las células diana. Por ejemplo, los exosomas procedentes de células tumorales del pulmón tienen alterada su carga de miRNAs y estimulan la proliferación tumoral¹⁵⁹. Los miRNAs exosomales producidos por las células tumorales parecen tener también un papel importante en la promoción de los procesos de angiogénesis¹¹³. Estos cambios provocados por el estado anómalo de la célula hacen de los miRNAs exosomales posibles biomarcadores para distintos tipos de patologías como las enfermedades neurodegenerativas¹⁶⁰, cáncer¹⁶¹⁻¹⁶³, enfermedades respiratorias¹⁶⁴ o cardiovasculares¹⁶⁵. Pero su única aplicación no es solo el diagnóstico, sino que también han sido propuesto su uso terapéutico en el Alzheimer¹⁶⁰, cáncer^{162,166} o como cardioprotectores¹⁶⁷. Para ello, el mecanismo más extendido es la introducción de miRNAs

sintéticos en los exosomas para que sean transportados hasta las células patológicas controlando de esta manera su alteración.

2.3.4. miRNAs en la AOS

Los continuos episodios de hipoxia intermitente que sufren los pacientes con AOS, junto con los continuos despertares y el aumento del estrés oxidativo, pueden causar alteraciones a nivel epigenético. Entre estos cambios, la variación en el perfil de miRNAs de los pacientes con AOS es uno de los propuestos, aunque son pocos los trabajos realizados hasta el momento en este campo. Un estudio realizado en ratas sometidas a ciclos de hipoxia intermitente, mostró que el perfil de miRNAs en el hipocampo estaba alterado, lo que se asoció a la disfunción cognitiva de las ratas sometidas a la hipoxia ¹⁶⁸. Otro estudio, realizado por Li y colaboradores ¹⁶⁹, describió que los pacientes con AOS tenían un perfil de miRNAs distinto a los sujetos control, identificando un total de 104 miRNAs diferencialmente expresados y proponiendo algunos de ellos (hsa-miR-485-5p, hsa-miR-107, hsa-miR-574-5p, and hsa-miR-199-3p) como potencialmente implicados en la patogenia de la AOS. Posteriormente, se evaluó el potencial de los miRNAs alterados en la predicción de una de las comorbilidades más asociadas a la AOS, la aterosclerosis ¹⁷⁰, describiendo la asociación del miR-664-3p con el IAH y con el espesor de la capa íntima media de la carótida, un indicador de la presencia de aterosclerosis. Este miRNA circulante podría estar relacionado tanto con la patogenia del AOS como con el desarrollo de aterosclerosis en estos pacientes. Por último, un estudio realizado en pacientes con AOS e hipertensión resistente a fármacos ¹⁷¹, mostró que los niveles de un clúster de miRNAs específico permitía discriminar entre aquellos pacientes que iban a responder al tratamiento con CPAP con una disminución de la presión arterial respecto a los que no lo iban a hacer. Ninguno de estos hallazgos ha sido replicado en otras cohortes.

2.4. Exosomas y AOS

A lo largo de esta introducción, se han mostrado los efectos inmediatos (hipoxia intermitente, fragmentación de sueño, hiperactividad simpática) que padecen los pacientes con AOS y que a su vez promueven el desarrollo del exceso de morbi-mortalidad asociada a esta patología. Entre ellos, los ciclos de hipoxia intermitente son los que parecen tener un mayor efecto

en el desarrollo de las principales comorbilidades asociadas al AOS, especialmente en las cardiovasculares. Los exosomas, como se ha descrito, sufren un empaquetamiento específico y su carga se ve afectada cuando se cambian las condiciones celulares. Estos ciclos de hipoxia podrían provocar la alteración celular para que el contenido de los exosomas variase. Así, el grupo de Gozal y colaboradores detectó en niños con AOS la alteración de miRNA-630 en exosomas circulantes y estos mostraron la capacidad de producir daño endotelial *in vitro* ¹⁷². Estudios posteriores mostraron que, en adultos sanos jóvenes sometidos a condiciones de hipoxia intermitente, se observaban cambios en los miRNAs exosomales ¹⁷³ y sus exosomas también provocaban daño endotelial *in vitro*, proponiendo algunos de estos miRNAs exosomales como posibles implicados en la disfunción endotelial asociada a la AOS. Por su parte, Almendros y colaboradores describieron que los exosomas circulantes secretados bajo condiciones de hipoxia intermitente en un modelo animal *in vivo*, inducían propiedades de células tumorales de pulmón en cultivo ¹⁷⁴. Resultados similares han sido descritos en un modelo animal de fragmentación del sueño y en pacientes adultos con AOS ¹⁷⁵. En ambos casos, el cargo de miRNAs de los exosomas se encontraba alterado y provocaba una potenciación en la proliferación, migración y extravasación de un cultivo de células tumorales de pulmón TC1. Finalmente, en pacientes adultos con AOS y obesidad, los exosomas de plasma circulante contribuyen a la disfunción metabólica de los adipocitos ¹⁷⁶ y modifican el fenotipo del endotelio promoviendo así la disfunción endotelial ¹⁷⁷. Los estudios descritos en humanos con AOS presentan limitaciones de interpretación dado que la propia obesidad y las comorbilidades asociadas de los pacientes (p.e. hipertensión, dislipemia, diabetes, etc.), son factores de confusión que no permiten establecer una relación directa entre AOS (y su severidad) y estos cambios epigenéticos.

En todo caso, la literatura actual sugiere que los exosomas podrían tener un papel importante como mediadores de dos de las comorbilidades con mayor incidencia en pacientes con AOS, las patologías cardiovasculares y el cáncer.

3. Justificación e Hipótesis

Durante la introducción de la presente tesis doctoral, se ha pretendido plasmar el creciente interés por el estudio de los exosomas. Estas pequeñas vesículas extracelulares, que se encuentran en la mayoría de los fluidos biológicos, parecen tener una gran importancia en los procesos de comunicación celular tanto a nivel fisiológico como patológico. Por ello, el conocimiento de su carga en ambos estados puede ser clave a la hora de conocer los mecanismos de patogénesis a nivel celular de un gran abanico de enfermedades. Además, su fácil accesibilidad, el uso de técnicas poco invasivas para su obtención y la especificidad de su carga, especialmente en lo referente a miRNAs, les confiere un alto potencial como futuros biomarcadores.

Entre las distintas patologías en las que los exosomas podrían participar, en la presente tesis nos centraremos en la AOS. Este trastorno respiratorio del sueño tiene una alta prevalencia entre la población y se ha asociado con un aumento de riesgo de sufrir otras comorbilidades, entre las que destacan las enfermedades cardiovasculares (ECV). Estudios recientes han propuesto los exosomas y su carga como mediadores del daño endotelial asociado a la AOS y por lo tanto podrían ser clave en el proceso de desarrollo de este tipo de comorbilidades de los pacientes con AOS.

Por todo ello, en la presente tesis doctoral planteamos la siguiente hipótesis: “en los pacientes con AOS los procesos de hipoxia intermitente podrían alterar el proceso de carga fisiológica de los exosomas, modificando de esta manera el perfil de miRNAs exosomales. Entre los miRNAs alterados, se encontrarán aquellos asociados previamente con enfermedades cardiovasculares cuya patogenia primaria es el daño endotelial. Además, el tratamiento con CPAP, al restablecer las condiciones de oxigenación de los pacientes, corregirá el perfil de miRNAs. Por tanto, estos miRNAs podrán ser utilizados como biomarcadores de riesgo de enfermedad cardiovascular en AOS”.

4. Objetivos

El objetivo principal de esta tesis doctoral es evaluar la presencia de miRNAs asociados con procesos inflamatorios, hipoxia y aterogénesis en exosomas circulantes de plasma sanguíneo de pacientes con AOS, su implicación en la patogenia de esta enfermedad y el desarrollo de comorbilidades cardiovasculares.

Para la consecución de este objetivo principal, planteamos los siguientes objetivos secundarios.

- I. Determinar el procedimiento óptimo para el aislamiento y caracterización de exosomas circulantes de plasma y la posterior evaluación de miRNAs en nuestra población de estudio.
- II. Analizar la estabilidad a lo largo del tiempo de un conjunto de miRNAs asociados con ECV e hipoxia en exosomas de una población sana control.
- III. Comparar los niveles del conjunto de miRNAs seleccionados en exosomas circulantes de plasma obtenido de sujetos sanos y pacientes con AOS.
- IV. Evaluar los cambios en los mismos miRNAs exosomales producidos por la presencia de aterosclerosis subclínica.
- V. Determinar el efecto del tratamiento con CPAP sobre los niveles de los miRNAs exosomales en pacientes de AOS con y sin presencia de aterosclerosis subclínica.

5. Material y Métodos

A continuación, se describirán las técnicas y materiales utilizados para la consecución de los objetivos planteados y la obtención de los resultados que se expondrán y discutirán posteriormente.

5.1. Ética

Todos los métodos utilizados durante la presente tesis se encuentran acordes con las normativas y leyes oficiales más relevantes. Los protocolos experimentales han sido aprobados por el Comité de Ética de la Investigación de la Comunidad de Aragón (Código del CEICA 15/2016). De acuerdo a las recomendaciones de la Declaración de los Derechos Humanos, la Conferencia de Helsinki y las regulaciones de las instituciones locales, todos los sujetos del estudio firmaron el consentimiento informado antes de ser incluidos en el proyecto y realizarse la extracción de sangre.

5.2. Población de estudio

Todos los sujetos, tanto la población control como los pacientes con AOS, con y sin presencia de AS, en la visita basal o en las visitas de seguimiento, se encuentran englobados dentro del proyecto EPIOSA (GovTrials, NCT014575421). El proyecto EPIOSA es un estudio de cohorte longitudinal realizado a lo largo de un amplio periodo de tiempo¹⁷⁸. El objetivo principal de este estudio es conocer los mecanismos que median las complicaciones asociadas a la AOS, con un especial interés en las comorbilidades cardiovasculares. Para ello, los pacientes que acuden al centro ambulatorio con sospecha de padecer AOS, son derivados a la Unidad de Investigación Traslacional del Hospital Universitario Miguel Servet (UIT). En la Tabla 2 se muestran los criterios de inclusión y exclusión del estudio. Los sujetos que cumplen con estos criterios se incluyen en el estudio para la realización de la visita basal, en la que se clasifican en función de su estado, y posteriormente se realiza su seguimiento en las visitas anuales. De manera adicional, un conjunto de voluntarios (n = 7) pertenecientes al grupo control del proyecto EPIOSA fueron incluidos para la consecución del Estudio II, el cual incluyó una serie de extracciones sanguíneas adicionales.

Tabla 2. Criterios de inclusión y exclusión del proyecto EPIOSA.

Inclusión	Exclusión
<ul style="list-style-type: none"> • Edad entre 20-60 años 	<ul style="list-style-type: none"> • Consumo de tabaco
<ul style="list-style-type: none"> • IAH < 5 para el grupo control • IAH > 5 para el grupo de AOS 	<ul style="list-style-type: none"> • Abuso del alcohol
<ul style="list-style-type: none"> • Disposición a la participación en el estudio mediante la firma del consentimiento 	<ul style="list-style-type: none"> • Hipertensión arterial (presión sistólica >140 mmHg y/o presión diastólica >90 mmHg; tomar fármacos antihipertensos)
<ul style="list-style-type: none"> • Disponibilidad para realizar visita basal y visitas de seguimiento anuales 	<ul style="list-style-type: none"> • Alteración del metabolismo del colesterol (HDL < 40 mg/dl o LDL > 130 mg/dl)
	<ul style="list-style-type: none"> • Historial de enfermedades cardiovasculares
	<ul style="list-style-type: none"> • Presencia de enfermedades crónicas infecciosas, respiratorias, inflamatorias o enfermedades autoinmunes
	<ul style="list-style-type: none"> • Presencia de otros trastornos del sueño distintos a la AOS
	<ul style="list-style-type: none"> • Alteración de la glucosa en plasma (> 126 mg/dl) o tomar fármacos para la diabetes
	<ul style="list-style-type: none"> • Presencia de enfermedades metabólicas
	<ul style="list-style-type: none"> • Haber sido operado de la vía aérea superior o haber sido tratado previamente con CPAP

5.3. Estudio del Sueño

Los estudios de sueño fueron realizados mediante un polígrafo cardio-respiratorio tipo 3 con un equipo de monitorización portátil. Estos estudios incluyeron la grabación continuada del flujo de aire nasal, el movimiento toraco-abdominal, la saturación de oxígeno, los ronquidos y la posición corporal. Una apnea se definió como la ausencia de flujo aéreo durante al menos 10 segundos, mientras que una hipopnea se definió como una reducción del flujo mayor al 50% con una reducción de la saturación de oxígeno del 4%. La presencia de apneas obstructivas se detecta mediante la presencia de movimiento toraco-abdominal. El IAH se calculó mediante la media de eventos de apnea e hipopnea por hora recogidos durante el tiempo de grabación.

5.4. Estudio de la presencia de aterosclerosis subclínica

En la visita basal y en las visitas de seguimiento se realizó la valoración del espesor de la íntima-media de las arterias carótidas (IMT, *Intima-Media Thicknes*). Esta medida se realizó mediante una ultrasonografía (IU22 Philips, © 2012 Koninklijke Philips Electronics N.V. Royal Philips Electronics, The Netherlands). Las imágenes se obtuvieron a través de sondas lineales ecográficas bidimensionales de alta frecuencia siguiendo el protocolo de estudio de Bioimagen¹⁷⁹. La placa carotidea se definió como una estructura focal que protruye en el lumen de la arteria carotidea al menos 0.5 mm o > 50% del espesor de lo que le rodea. Las medidas fueron realizadas por triplicado y se realizaron sobre la pared distal de ambas carótidas, a 1 cm del punto de bifurcación. Tanto la toma de las imágenes como las mediciones de interés fueron realizadas por un técnico entrenado y sin conocimiento del tipo de patología subyacente del sujeto.

5.5. Obtención de muestra

Las muestras de sangre completa fueron obtenidas en ayunas y extraídas mediante una aguja de mariposa 21G. Las muestras se recogieron en tubos EDTA BD Vacutainer®. Estos se centrifugaron durante 15 minutos a 3.000 g y 4 °C. Tras ello se recogieron 7 alícuotas de plasma por muestra. En la práctica totalidad de las muestras, estas alícuotas fueron inmediatamente congeladas a -80 °C para su criopreservación. Solo en un pequeño grupo muestral, dos de las alícuotas fueron procesadas de manera instantánea como se detallará en el Estudio II.

5.6. Análisis de variables clínicas

Durante el mismo proceso de extracción sanguínea, se obtuvo también la muestra necesaria para realizar los análisis de sangre de las variables clínicas rutinarias. La glucosa en suero, triglicéridos, colesterol total y HDL fueron medidos mediante espectrofotometría (Chemical Analyzer ILAB 650, Instrumentation Laboratory), mientras que las apolipoproteínas A y B se cuantificaron mediante nefelometría cinética (Immunochemistry Analyzer IMAGE 800, BeckmanCoulter). Por último, en las dos horas tras la extracción, se determinó la proteína C-reactiva de alta sensibilidad (CRP) mediante una técnica basada en el inmuno ensayo turbidimétrico potenciado por partícula.

5.7. Aislamiento de exosomas

En la introducción de la presente tesis doctoral se ha mostrado la controversia existente en el aislamiento de exosomas. Debido a ello, se decidió realizar el aislamiento mediante dos metodologías distintas, la precipitación usando kits comerciales y la selección por tamaño utilizando columnas de exclusión molecular. La metodología basada en la ultracentrifugación se decidió descartar ya que el volumen de nuestra muestra de partida era reducido y, como se ha discutido en la bibliografía, esta técnica aumenta la variabilidad, lo que es desaconsejable para nuestro objetivo.

5.7.1. Métodos de precipitación

En la presente tesis doctoral se utilizaron dos kits comerciales para el aislamiento de exosomas. Ambos basan su metodología en la precipitación de los exosomas mediante el uso de un polímero que altera la solubilidad de estos. Para asegurar la reproducibilidad de la metodología, debido a la importancia de los volúmenes utilizados durante el proceso de aislamiento, las pipetas fueron calibradas de manera previa a cada extracción. Además, el PBS utilizado para ambos kits fue filtrado con un filtro de jeringa con un tamaño de poro de 0,22 μm previamente a cada aislamiento. A continuación, se describirá brevemente el protocolo utilizado para cada uno de ellos.

5.7.1.1. miRCURY exosome isolation kit (Exiqon)

Se descongelaron las muestras de partida (600 µl de plasma) a temperatura ambiente (TA). Después, se centrifugaron a 10.000 g durante 5 minutos para precipitar y eliminar los restos celulares de mayor tamaño. Se tomaron 600 µl de sobrenadante, a los cuales se les añadieron 6 µl de trombina (200 U), y se incubó durante 5 minutos a TA. Se volvió a centrifugar a 10.000 g durante 5 minutos a TA y se tomaron 500 µl del sobrenadante. A este volumen se añadieron 200 µl de Buffer de precipitación A formando una nebulosa mediante pipeteo, primero en el fondo del tubo y ascendiendo poco a poco con la pipeta hasta que todo el contenido del tubo tuviera un aspecto homogéneo, turbio y blanquecino. Se mezcló en un agitador tipo vórtex durante 5 segundos y se dejó incubar durante 1 hora a 4 °C. Por último, se realizaron 2 centrifugaciones a 500 g y TA durante 5 minutos, eliminando por completo el sobrenadante y resuspendiendo finalmente el pellet en 270 µl de PBS. Es importante eliminar por completo el sobrenadante antes de resuspender el pellet, ya que la presencia de un pequeño volumen de este sobrenadante podría interferir en las posteriores aplicaciones de los exosomas aislados.

5.7.1.2. Total Exosome Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific)

Este kit comercial utiliza un volumen de muestra más pequeño, partiendo de 200 µl de plasma. Por ello, fue necesario realizar tres extracciones de cada muestra para que el volumen inicial fuera similar al del otro kit y poder comparar los resultados. Las muestras se descongelaron a TA (200 µl de plasma/extracción) y se sometieron a dos centrifugaciones de 10.000 g a TA durante 22 minutos. Tras la primera, se recogieron 180 µl del sobrenadante, los cuales se sometieron a la segunda centrifugación. Tras esta última, se tomaron 167 µl del sobrenadante a los que se añadió 84 µl de PBS. Las muestras se incubaron con 7,5 µl de proteinasa K del kit durante 12 minutos a 37 °C. Posteriormente, se añadieron 50 µl del agente precipitante formando una nebulosa mediante el pipeteo y mezclándolo por completo en vórtex. Inmediatamente después, se incubaron las muestras a 4 °C durante 35 minutos. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron durante 6 minutos a 10.000 g y TA, descartando por completo el sobrenadante. Este proceso se realizó una segunda vez para asegurar la eliminación del precipitante y el pellet se resuspendió en 90 µl de PBS.

Por último, las 3 extracciones procedentes de la muestra de un mismo sujeto se mezclaron en un tubo para sus futuras aplicaciones, obteniendo de esta manera un volumen de 270 μ l, similar al obtenido con el kit miRCURY.

5.7.2. Método de exclusión molecular

Las columnas de exclusión molecular fueron preparadas de manera manual en el laboratorio de la UIT. A continuación, se describirá la preparación de la columna, así como el proceso de extracción y el tratamiento posterior para su reutilización.

5.7.2.1. Preparación de la columna

En la punta de una jeringuilla de plástico de 10 ml, se introdujo un trozo de media de nylon 20D y se colocó una llave de tres vías. Previamente a su uso, la media de nylon fue sumergida en etanol 80% durante al menos 1 hora y posteriormente se lavó utilizando agua destilada para eliminar los restos de etanol. Después, con la jeringuilla colocada en posición vertical, se añadió Sepharosa CL-2B (GE Healthcare Bio-Sciences AB) hasta la superficie. Se dejó reposar y se eliminó el sobrenadante abriendo la vía. Se continuó añadiendo pequeños volúmenes de Sepharosa hasta conseguir un lecho de 10 ml (Figura 10). Finalmente, se equilibró la columna mediante el paso de 3 volúmenes de PBS por cada columna.

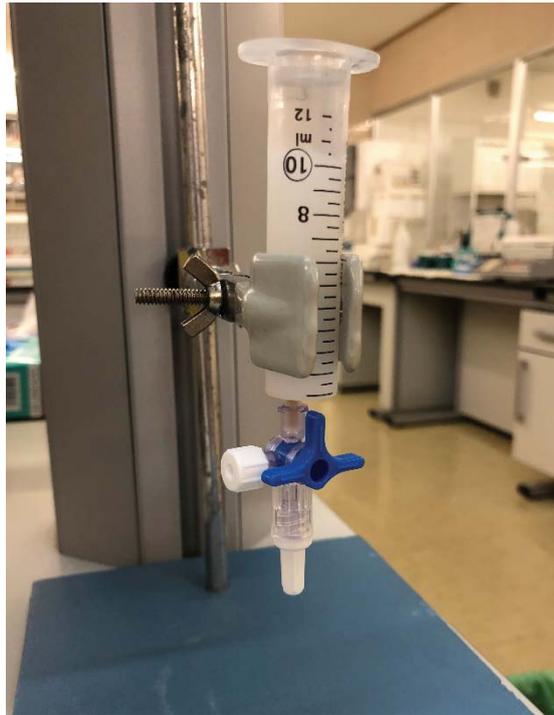


Figura 10. Columna de Exclusión Molecular utilizada para el aislamiento de exosomas.

5.7.2.2. Aislamiento de exosomas

Antes de comenzar el proceso de fraccionamiento, se equilibró la columna mediante el paso de 2 volúmenes de PBS filtrado (aproximadamente 20 ml), exceptuando los casos en los que se acabase de preparar la columna y ya se hubiese equilibrado con los 3 volúmenes. Se introdujo la muestra (600 μ l de plasma) en la columna, se abrió la llave y se fue descartando hasta que la muestra entró por completo en la columna. Tras ello, se fue añadiendo PBS filtrado hasta recoger 24 fracciones de 0.5 ml cada una. Para cada columna se seleccionaron, de las 24 fracciones obtenidas, las 3 en las que se habían eluido principalmente los exosomas de la muestra. Para ello, se midió la cantidad de proteína de cada una de las 24 fracciones con el espectrofotómetro NANODROP 2000c (Thermo Fisher Scientific). Se determinó así el perfil de elución de cada columna.

En la Figura 11, se muestra la determinación del perfil de elución de una de las columnas utilizadas, y la selección de las 3 fracciones que contenían los exosomas. Se esperaba obtener, para cada columna, dos picos de elución: el primero se debe al contenido proteico de los exosomas

que, debido a su tamaño, se eluyen antes. El segundo pico corresponde a la proteína soluble de la muestra. Se seleccionaron, para cada columna, las 3 fracciones del primer pico de elución que mayor concentración de proteína tenían.

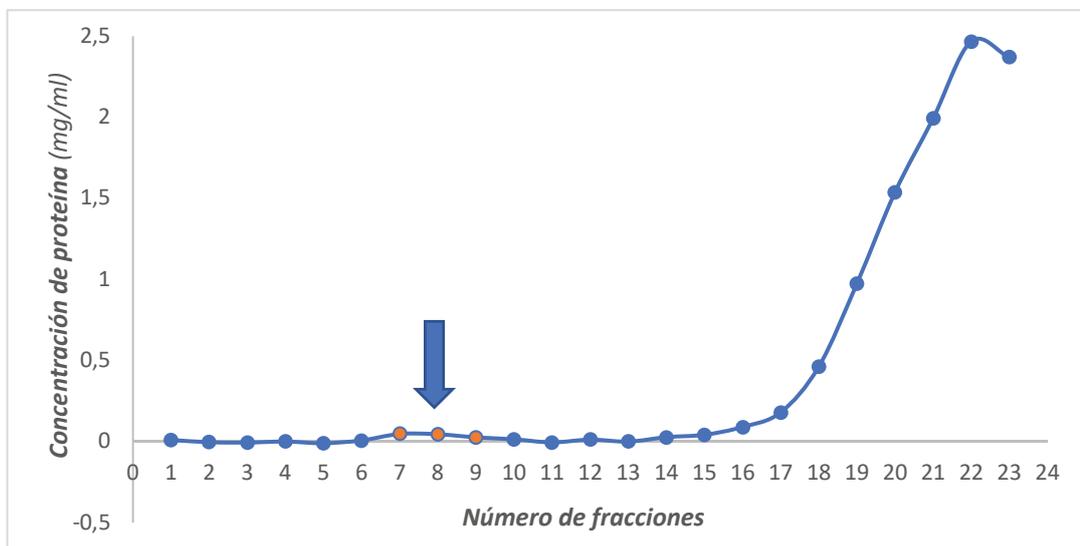


Figura 11. Perfil proteico de elución de una columna de exclusión molecular.

Finalmente se mezcló el contenido de las 3 fracciones seleccionadas en un solo vial (obteniendo un volumen de 1,5 ml de exosomas aislados por cada muestra) y se almacenaron dichos viales a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.7.2.3. Conservación de las columnas

Después de cada uso de una columna, se pasó un volumen (10 ml) de PBS (Sigma), un volumen de SDS (Sigma) 0,1%, y un volumen de azida (Sigma). Las columnas se conservaron siempre en azida a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, y tapadas con Parafilm.

5.8. Caracterización de exosomas

5.8.1. Caracterización proteica

Se realizó un análisis por *Western Blot* para detectar dos marcadores positivos de presencia de exosomas (CD63 y HSP70) y para confirmar la ausencia de dos marcadores negativos (GM130 y CytC). En primer lugar, se cuantificó la cantidad de proteína total en las muestras por el método del ácido bicinónico o BCA (B9643, C2284, Sigma), usando el

espectrofotómetro *Infinite F200* (Tecan Ibérica Instrumentación). La cuantificación de proteína total permitió calcular el volumen de muestra necesario para realizar el *Western Blot* y cargar siempre una cantidad determinada de proteína. Así, suponiendo que las muestras están purificadas y que la distribución proteica en los exosomas es homogénea, se cargó y analizó una cantidad similar de exosomas por cada muestra. Se realizaron algunas pruebas cargando diferentes cantidades de proteína y se determinó que la cantidad de proteína idónea para cargar eran 20 µg.

Se hizo una dilución 1:1 del volumen de muestra correspondiente a 20 µg de proteína en tampón de carga 2x (Tabla 3). Todo ello se sometió durante 5 minutos a una temperatura de 95 °C para desnaturalizar la proteína. Los 20 µg de proteína total ya desnaturalizada se cargaron en el gel de poliacrilamida comercial *ExpressPlus PAGE Gel* (GenScript). A continuación, se realizó la electroforesis durante 90 minutos a un voltaje de 120 voltios, usando el kit *Mini-PROTEAN Tetra Cell* (Bio-Rad) y tampón de electroforesis (Tabla 3).

Tras la electroforesis se realizó la transferencia de proteínas a una membrana PVDF *Hybond-P* (GE Healthcare Life Sciences). Para ello se utilizó la cubeta *Mini Trans-Blot cell* (Bio-Rad), se añadió tampón de transferencia (Tabla 3) y se aplicó un amperaje de 0,2 amperios durante 60 minutos.

Para comprobar que la transferencia se había realizado correctamente, se sometieron las membranas a una tinción con *Ponceau S* (Sigma), que tiñe las proteínas inespecíficamente. Para eliminarlo se realizaron tres lavados de 30 minutos con TTBS (Tabla 3).

Tabla 3. Composición de soluciones de Western Blot.

Solución	Composición
• Tampón de carga 2x	100 mM Tris-HCl pH 6,8, 4 % SDS, 20 % glicerol, 5 % β-mercaptoetanol, 2,5 % azul bromofenol al 0,5 % y etanol al 10 %
• Tampón de electroforesis	50 mM Tris-HCl, 192 mM glicina, 0,2 % SDS
• Tampón de transferencia	50 mM Tris-HCl, 192 mM glicina, 20 % metanol
• TTBS	20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20

A continuación, se bloquearon las membranas con una solución de TTBS con 5 % de leche desnatada en polvo durante 1 hora a TA. Para la determinación de los marcadores exosomales positivos y negativos, se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios frente a epítopos humanos: *anti-CD63 rabbit IgG EXOAB-CD63A-1* [System Bioscience], *anti-HSP70 mouse-monoclonal IgG sc32239* [Santa Cruz Biotechnology], *anti-cytC mouse-monoclonal IgG sc-13156* [Santa Cruz Biotechnology] y *anti-GM130 mouse-monoclonal IgG sc-55591* [Santa Cruz Biotechnology]. Los anticuerpos primarios se diluyeron 1:1.000 en tampón de bloqueo (TTBS y leche en polvo al 5 %). La incubación con los anticuerpos primarios se realizó durante toda la noche a 4 °C. Para eliminar el anticuerpo primario, se realizaron tres lavados de 15 minutos con TTBS (Tabla 3). Los anticuerpos secundarios (*goat anti-mouse IgG-HRP sc-2005* [Santa Cruz Biotechnology] y *goat anti-rabbit IgG-HRP secondary antibody EXOAB-HRP* [System Bioscience]) fueron diluidos 1:20.000 en tampón de bloqueo. Las membranas se incubaron durante 1 hora a TA con las soluciones de anticuerpos secundarios. Al final se eliminó el exceso de anticuerpos con 3 lavados de 10 minutos con TTBS. Finalmente, se añadió el sistema quimioluminescente *Luminata Crescendo Western HRP Substrate* (Millipore) hasta cubrir la membrana, que 5 minutos después se reveló con *Versadoc™ Imaging System* (Bio-Rad).

5.8.2. Análisis morfológico

5.8.2.1. Microscopia Electrónica de Transmisión

La morfología de los exosomas fue evaluada mediante su visualización en el TEM utilizando la metodología descrita previamente por Lötvald y colaboradores¹⁸⁰. La tinción se llevó a cabo en el servicio de Microscopia de Sistemas Biológicos de la Universidad de Zaragoza. Brevemente, en primer lugar, la proteína total de cada muestra se evaluó mediante BCA (B9643, C2284, Sigma). Una gota de 10 µg de proteína exosomal fue colocada en una lámina de Parafilm. Los exosomas fueron fijados con glutaraldehído al 2,5 % y después se lavaron con agua desionizada. El contraste aplicado a la muestra se realizó con acetato de uranilo al 2 %, se incrustó en metil celulosa al 0,13 % y 0,4 % de acetato de uranilo. Posteriormente, las muestras se visualizaron en el Instituto de Nanociencia de Aragón (INA). Se utilizó el microscopio electrónico Tecnai T20 (FEI Company), con un filamento de LaB₆. El voltaje utilizado para la visualización

fue de 200 KV y la adquisición de las imágenes se realizó con una cámara CCD 2K x 2K modelo Veleta (Olympus).

5.8.2.2. Análisis de DLS

La distribución de tamaño de nanopartículas de nuestras muestras fue determinada mediante un ensayo de dispersión dinámica de la luz en el INA. Para ello, se diluyeron 25 µl de muestra hasta un volumen final de 500 µl con PBS filtrado. Las medidas se realizaron utilizando el NanoBrook 90Plus PALS Particle Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation). Las muestras fueron incididas por un láser de diodo de 35 mW, que permitía discriminar tamaños de partícula de entre 0,3 nm y 6 µm.

5.9. Análisis de miRNAs

La metodología utilizada para la extracción de miRNAs, su retrotranscripción y el proceso de análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) fueron similares para los tres tipos de extracciones de exosomas realizadas. Durante todo el proceso, se utilizó una superficie limpia, libre de RNasas, se utilizaron tubos libres de RNasas y se siguieron todas las medidas necesarias para evitar la degradación de miRNAs. A continuación, se describirán brevemente los protocolos y materiales utilizados para las distintas etapas.

5.9.1. Extracción de RNA total

El RNA total de los exosomas fue extraído mediante el kit comercial *miRCURY RNA Exosome Isolation Kit* (Exiqon) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se partió de 200 µl de la solución de exosomas purificados anteriormente. A esta se le añadieron 60 µl del reactivo de lisis, se mezcló y se incubó durante 3 minutos a TA. Tras ello, se añadieron 20 µl de reactivo de precipitación proteica, se agitó y se incubó 1 minuto a TA. La muestra se centrifugó 3 minutos a 11.000 g y TA y se recogió el sobrenadante en un tubo nuevo, al que también se añadieron 400 µl de isopropanol. Esta mezcla se cargó en la columna *microRNA Mini Spin Column BF*. Se realizaron varios ciclos de lavado en la columna y posteriormente se procedió a la elución del RNA total con 100 µl de agua libre de RNasas. El RNA total eluido en un nuevo tubo libre de RNasas fue almacenado a -70 °C hasta su uso.

5.9.2. Retrotranscripción

La retrotranscripción (síntesis de cDNA a partir de RNA) se llevó a cabo con el kit comercial *miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR kit* (Exiqon). Para cada reacción se añadieron 2 μ l de tampón 5x, 4,5 μ l de agua libre de RNasas, 1 μ l de retrotranscriptasa, 0,5 μ l del control interno (véase apartado 6.9.4) y 2 μ l del RNA total. Para cada ensayo, se preparó una mezcla común (exceptuando el RNA total) y se añadieron 8 μ l por reacción. Por último, se añadieron los 2 μ l de RNA total. El proceso de retrotranscripción se realizó en el termociclador Veriti (Applied Biosystems) siguiendo el siguiente protocolo: 60 minutos a 42 °C, 5 minutos a 95 °C y posterior mantenimiento a 4 °C. El cDNA fue conservado a -20 °C hasta el momento de su utilización.

5.9.3. Cuantificación de miRNAs (RT-qPCR)

La PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) permite cuantificar DNA gracias a la medida de la fluorescencia emitida por un fluorocromo que se une al producto de PCR. Para llevar a cabo esta reacción se usaron los reactivos e indicaciones del kit *miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR* (Exiqon), que permite amplificar y cuantificar el cDNA procedente de algunos miRNAs de las muestras originales. El volumen final de reacción fue de 10 μ l. Antes de llevar a cabo la RT-qPCR se realizó la dilución del cDNA 1:80 en agua libre de RNasas. Se añadieron 4 μ l de cDNA diluido, 5 μ l de PCR Master Mix (Exiqon) y 1 μ l de LNA PCR Primer Mix (Exiqon). La preparación previa de los cebadores LNA se realizó de manera similar para los correspondientes a los miRNAs de análisis y los controles internos. Se añadieron 220 μ l de agua libre de RNasas, se incubó a RT durante 20 minutos y se mezcló mediante vórtex.

La RT-qPCR se realizó con el termociclador *ViiA 7* (Applied Biosystems) y el reactivo que se utilizó para cuantificar fue *ExiLENT SYBR Green master mix* (Exiqon). La molécula de *SYBR Green* es una molécula capaz de intercalarse entre las dos hebras de la doble hélice de DNA y emitir fluorescencia. Conforme la DNA polimerasa crea nuevas copias de la hebra molde, incrementa la intensidad de la fluorescencia, ya que el *SYBR Green* se une a todas las cadenas de doble hélice, obteniéndose un incremento en la intensidad de la fluorescencia que es directamente proporcional a la cantidad de producto de PCR producido. Debido al instrumento de medida, para

que la cuantificación de fluorescencia medida sea correcta, se añadió una determinada concentración de ROX sobre la mezcla de *SYBR Green* inicial (1:100), antes de preparar la mezcla de reacción.

El programa de reacción de RT-qPCR fue el siguiente: un paso inicial de activación de la polimerasa 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de un primer intervalo 10 segundos a 95 °C y un segundo intervalo de 60 °C durante 1 minuto.

5.9.4. Selección de miRNAs

La selección de los miRNAs se realizó a partir de la bibliografía disponible. Se buscaron y seleccionaron miRNAs que pudiesen estar implicados en procesos de hipoxia, que se relacionasen con inflamación o que participasen en procesos aterogénicos. En la Tabla 4 se presentan los miRNAs de estudio junto al indicio por el que se incluyeron en el análisis. Además, se incluyeron 2 miRNAs que son propuestos en numerosos trabajos como miRNAs normalizadores en exosomas como son miR-16¹⁸¹ y let-7a¹⁸², y los miRNAs para el control de la hemólisis miR-451 y miR-23a^{183,184}.

Tabla 4. miRNAs seleccionados.

miRNA	Selección
hsa-miR-21-5p	Posible contribución al inicio de los procesos aterogénicos ¹⁸⁵ y considerado un posible marcador de daño endotelial debido a hipoxia ¹⁸⁶
hsa-miR-126-5p	Puede bloquear la aterosclerosis a través del inhibidor de Notch1, Dlk1 ¹⁸⁷
hsa-miR-143-5p	Participa en los procesos de control aterogénico junto a miR-145 ^{188,189}
hsa-miR-145-5p	Participa en los procesos de control aterogénico junto a miR-143 ¹⁸⁸
hsa-miR-150-5p	Relacionado con procesos aterogénicos ¹⁹⁰ y en procesos inflamatorios asociados con hipoxia ¹⁹¹
hsa-miR-155-5p	Relacionado con situaciones de hipoxia a través del factor inducible por hipoxia 1 α ^{192,193}
hsa-miR-222-3p	Responde a situaciones de hipoxia ¹⁹⁴ y parece estar implicado en el daño endotelial ¹⁹⁵
hsa-miR-223-3p	Implicado en enfermedades cardiovasculares e hipoxia ^{196,197}
hsa-miR-320a	Tiene un efecto pro-aterogénico mediante el control del factor de respuesta del Suero (SRF) ¹⁹⁸
hsa-let-7 g-5p	Implicado en la regulación de la aterosclerosis ¹⁹⁹
hsa-miR-630	miRNA propuesto como mediador del daño endotelial ²⁰⁰
hsa-miR-16-5p	miRNA propuesto como normalizador ¹⁸¹
hsa-let-7a-5p	miRNA propuesto como normalizador ¹⁸²
hsa-miR-451	miRNA de control de hemólisis ^{183,184}
hsa-miR-23a	miRNA de control de hemólisis ^{183,184}

5.9.5. Controles internos

Los procesos de extracción y análisis de miRNAs son sensibles a posibles pérdidas de material genético debido a la actuación de RNasas. A pesar de que durante todo el proceso se trabajan con unas condiciones adecuadas para evitar este efecto, es necesario introducir controles en concentraciones conocidas a lo largo de todo el proceso que permitan corroborar la integridad de la muestra (Tabla 5). De esta manera, los posibles cambios que se encuentren se asociarán a los cambios en las características y el estado de los pacientes y se descartará la inferencia de factores externos metodológicos en los resultados. En los experimentos realizados durante la presente tesis doctoral, se introdujeron controles internos en dos puntos del proceso de extracción y análisis de los miRNAs exosomales, durante la extracción del RNA y en la retrotranscripción. En el proceso de extracción del RNA total, se añadió 1 µl de una mezcla que contiene los controles UniSp2, UniSp4 y UniSp5 (RNA sintético, Exiqon) por cada 60 µl de solución de lisis. En el proceso de retrotranscripción se añadieron 0,5 µl por cada muestra de una mezcla de cel-miR-39 y UniSp6 (RNA sintético, Exiqon).

Tabla 5. Controles internos y punto de adición durante el proceso de análisis.

MiRNA	Punto de adición
UniSP2	Extracción RNA total
UniSP5	Extracción RNA total
UniSP6	Retrotranscripción
Cel-miR-39	Retrotranscripción

La preparación de los controles internos siguió un proceso parecido para ambos. En el caso de los controles para la extracción del RNA total (UniSp2, UniSp4 y UniSp5), se centrifugó brevemente el vial, se añadieron 80 µl de agua libre de RNasas y se reposó durante 25 minutos en hielo. Tras ello, se mezcló en vórtex y se volvió a centrifugar brevemente. Esta solución de control interno se alicuotó en fracciones adecuadas para su uso y se congeló a -20 °C. En el caso del control del proceso de retrotranscripción, este proceso fue ligeramente distinto ya que UniSp6 y cel-miR-39 se encuentran almacenados liofilizados en dos viales independientes. Por ello, en

primer lugar, se realizó la resuspensión con 80 μ l de agua libre de RNasas de UniSp6 y posteriormente, con esos mismos 80 μ l se resuspendió cel-miR-39. En este caso se realizó también el proceso de alicuotado para su congelación y evitar de esta manera los ciclos de congelación/descongelación.

5.9.6. Normalización de los niveles de miRNAs

En el análisis de miRNAs en exosomas circulantes existe también cierta controversia sobre la metodología a utilizar para la normalización de los resultados. En los primeros ensayos realizados en miRNAs exosomales, se utilizó como normalizador los controles internos como cel-miR-39 que se introducían a lo largo del proceso de extracción en concentraciones conocidas y similares para todas las muestras. Sin embargo, esta metodología ha quedado en desuso y se ha sustituido por el uso de miRNAs que se encuentran en el interior de los propios exosomas. Debido a que el contenido exosomal puede variar en función del tipo celular que los secreta y el estado en el que se encuentra la misma, es necesario estudiar para cada tipología de grupo de muestras el miRNA que se encuentra más estable en todo el conjunto muestral. Con este objetivo, se utilizó la herramienta online *RefFinder* que permite determinar el miRNA normalizador más idóneo entre los analizados ²⁰¹. Esta herramienta combina tres programas distintos para ello, *BestKeeper*, *Normfinder* y *geNorm*.

5.9.7. Determinación de la cantidad relativa de miRNAs

El estudio cuantitativo de los niveles de miRNAs se basó en el análisis de los valores de ciclo umbral (Ct, *Cycle Threshold*) obtenidos mediante la RT-qPCR. Este valor se corresponde con el número mínimo de ciclos de PCR necesarios para que se produzca una señal cuantificable, es decir, el ciclo en el que la señal de fluorescencia cruza la línea umbral. Este aumento en la señal se produce debido a la amplificación del material genético analizado. En los análisis realizados, la línea umbral de fluorescencia (umbral) se ajustó de manera manual con el objetivo de evitar la presencia de posibles artefactos y disminuir en la medida de lo posible la presencia de ruido de fondo sin pérdida de señal. Este ajuste se realizó mediante el programa informático *QuantStudio™ Real-Time PCR Software v1.2.4* (Applied Biosystems). Para la evaluación de los niveles de miRNAs entre los grupos se utilizó el método de $\Delta\Delta Ct$ ²⁰². Tras la obtención del Ct, se

obtuvo el valor de ΔCt mediante la sustracción al valor de Ct del miRNA el del Ct del miRNA normalizador. Tras ello, se calculó el ΔCt medio de cada grupo de análisis y se restó el valor de ΔCt medio del grupo de referencia a los demás grupos, obteniendo de esta manera el valor de $\Delta\Delta Ct$. Por último, para transformar el proceso exponencial en una relación lineal, se utilizó la conversión $2^{-\Delta\Delta Ct}$. El valor límite de Ct que se considero de confianza para considerar cuantificable la señal de un miRNA fue 36.

5.10. Análisis estadístico

Los resultados que se presentarán en esta tesis doctoral se engloban en dos grupos principales. Por un lado, los datos correspondientes a la descripción de poblaciones y las variables clínicas analizadas, que se presentarán como valores medios \pm desviación estándar (DE). En el caso del Estudio II, que evalúa la estabilidad de los miRNAs a lo largo del tiempo en una población control, los datos se presentarán de manera específica para cada sujeto control. El segundo grupo datos analizados contendrá todos aquellos procedentes de los análisis realizados sobre los miRNAs exosomales. Para el análisis de estos datos se utilizarán los valores de ΔCt (Ct de la muestra para un miRNA menos el Ct del miRNA normalizador para esa misma muestra) para realizar los pertinentes análisis estadísticos. Este valor se relaciona de manera inversa con los niveles de miRNAs (Mayor ΔCt implica menor cantidad de miRNA y viceversa). De manera previa al análisis, se realizó la búsqueda y eliminación en dicho caso de valores anómalos mediante el test de ROUT utilizando GraphPad Prism 6 (GraphPad Software). Adicionalmente, los gráficos de comparaciones intergrupales mostrarán los valores de tasa de cambio calculada mediante el método de $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ usando GraphPad Prism 6.

Los procedimientos estadísticos que se utilizaron durante los análisis de resultados de la presente tesis son los siguientes: I) El análisis de normalidad de las muestras se realizó mediante la prueba de Kolmogorv-Smirnov; II) la evaluación de los cambios intergrupales se llevó a cabo mediante contrastes paramétricos t-Student o ANOVA, si la variable seguía una distribución normal, mientras que, si no seguían una distribución normal, se utilizaron el test U de Mann-Whitney (para comparar 2 grupos) o el test H de Kruskal Wallis (para comparar más de 2 grupos); III) la variabilidad interindividual se evaluó mediante el cálculo del coeficiente de variabilidad

(CV); IV) la variabilidad intraindividual a lo largo del tiempo fue definida a partir del análisis de regresión lineal para los valores de miRNAs exosomales en cada visita; V) la robustez del método de análisis de miRNAs exosomales fue analizada mediante el test de Bland-Altman; VI) los efectos del tratamiento con CPAP se evaluaron mediante pruebas pareadas, en el caso de variables normales se utilizó la prueba t de Student pareada, mientras que para las variables no paramétricas se utilizó el test de Wilcoxon.

Los paquetes estadísticos utilizados para realizar estos análisis y la elaboración de los gráficos fueron GraphPad Prism 6 (GraphPad Software) y SPSS versión 23.0 (IBM).

6. Resultados y Discusión

6.1. Estudio I. “Optimización del método de aislamiento y caracterización de exosomas circulantes de plasma en pacientes con AOS”

Este primer estudio (estudio piloto), se llevó a cabo con un reducido número de muestras con el fin de determinar, en primer lugar, la presencia de exosomas en nuestras muestras de plasma y, posteriormente, evaluar qué técnica de aislamiento era más eficaz para realizar los posteriores estudios de perfiles de miRNAs exosomales. Para ello, se realizó la extracción de exosomas mediante el kit comercial basado en la precipitación con polímero *miRCURY Exosome Isolation Kit* y mediante columnas de exclusión molecular (*Size Exclusion Chromatography, SEC*) preparadas de manera manual. En la Figura 12, se muestra el flujo de trabajo que se siguió con el tamaño muestral de cada grupo.

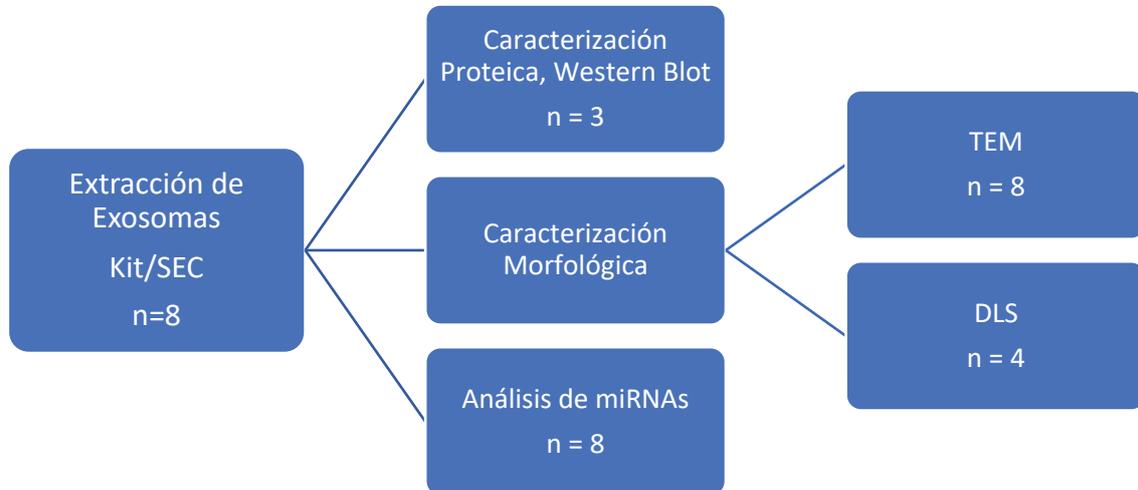


Figura 12. Diagrama de trabajo seguido en el Estudio I. La extracción de exosomas se llevó a cabo mediante el kit comercial miRCURY Exosome Isolation kit y mediante columnas de exclusión molecular (SEC). Se realizó la extracción de exosomas en 8 muestras para cada metodología y aparece el número de muestras (n) analizado para cada tipo de metodología.

6.1.1. Caracterización proteica

Los análisis de caracterización proteica se realizaron mediante la técnica de *Western Blot*, determinando como marcadores positivos de exosomas las proteínas CD63 y HSP70 y como marcadores negativos una proteína de localización mitocondrial, CytC, y otra del aparato de Golgi, GM130.

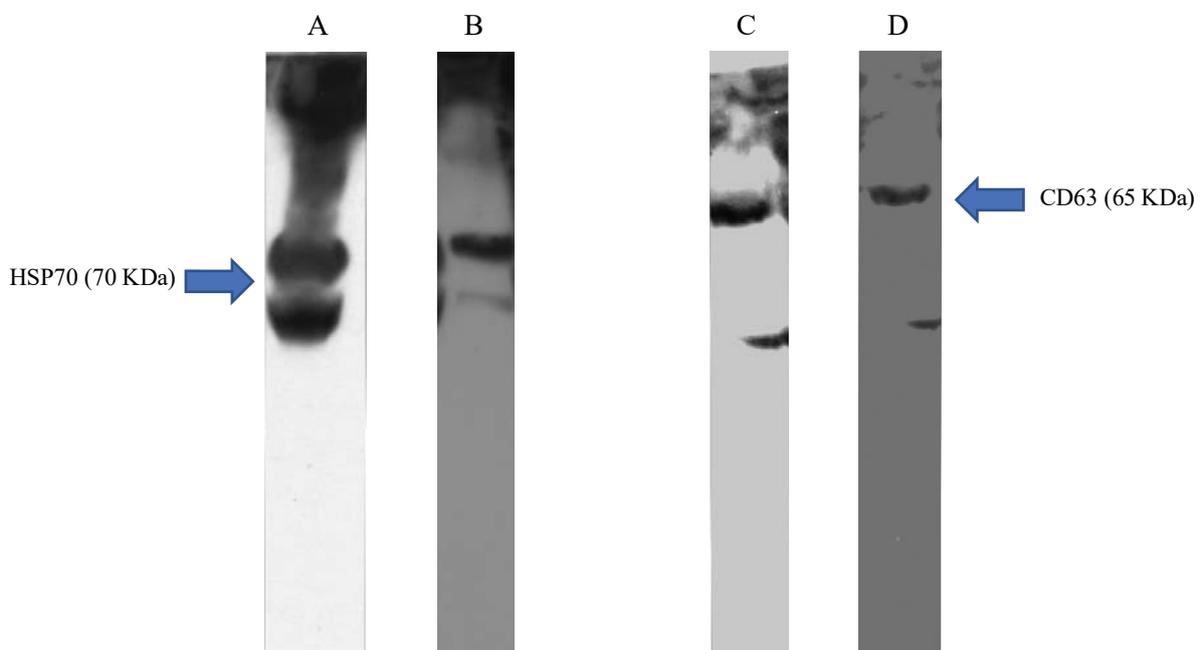


Figura 13. Imágenes de *Western Blot* frente a Hsp70 (A y B) y a CD63 (C y D) de las muestras obtenidas por SEC (B y D) y por el kit de Exiqon (A y C).

Como se muestra en la Figura 13, se confirmó la presencia de exosomas por la visualización de una doble banda en torno a 75 kDa en el caso de HSP70 y una banda de aproximadamente 65 kDa para CD63. En el caso de las muestras aisladas por SEC, debido a la dilución de los exosomas durante la elución y la baja concentración proteica de estas muestras, no fue posible cargar la cantidad proteica indicada, sino que se cargó el volumen máximo (20 μ l)

y la intensidad de señal para la muestra obtenida mediante SEC fue notablemente menor. La ausencia de impurezas fue comprobada por la ausencia de señal para CytC y GM130.

6.1.2. Caracterización morfológica

Para evaluar la integridad de los exosomas y determinar su presencia en las muestras obtenidas se realizó la caracterización de su morfología mediante las dos técnicas descritas, TEM y DLS.

6.1.2.1. TEM

En primer lugar, como se observa en la Figura 14, se visualizó mediante TEM la solución en la que se resuspendieron y/o eluyeron los exosomas, PBS filtrado, con el objetivo de descartar falsos positivos debido a su interferencia. Como se puede comprobar, no se observó la presencia de esferas que se pudiesen asemejar a exosomas, detectándose tan solo un fondo gris aparentemente homogéneo.

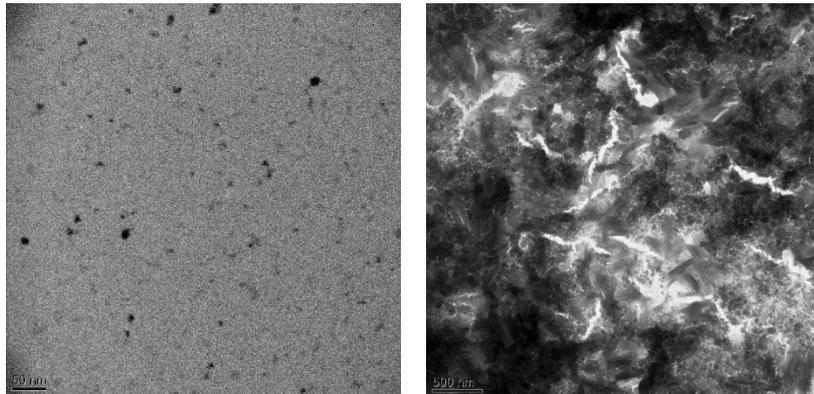


Figura 14. Imágenes de TEM correspondientes al PBS filtrado

La Figura 15 muestra las imágenes correspondientes a los exosomas aislados de las muestras. Se encontraron vesículas de diferentes tamaños (desde 30 nm hasta aproximadamente 150 nm), además de estructuras de mayor tamaño, que podrían corresponder a agregados de varios exosomas (Figura 15-E). Comparando las imágenes obtenidas mediante las dos metodologías, los exosomas aislados mediante la precipitación con polímero mostraron mayor contraste al TEM, como se puede observar en la Figura 15A-C. En estas, se aprecian estructuras esféricas con borde oscuro, debido a que sus membranas aparecen más intensamente teñidas por su mayor densidad

electrónica. En las muestras extraídas mediante SEC, Figura 15D-F, también se observó el contraste de la membrana exosomal. La menor cantidad de exosomas en las muestras aisladas mediante SEC se pudo observar de manera cualitativa en el TEM. Esto concuerda con las medidas proteicas que se realizaron en el apartado anterior.

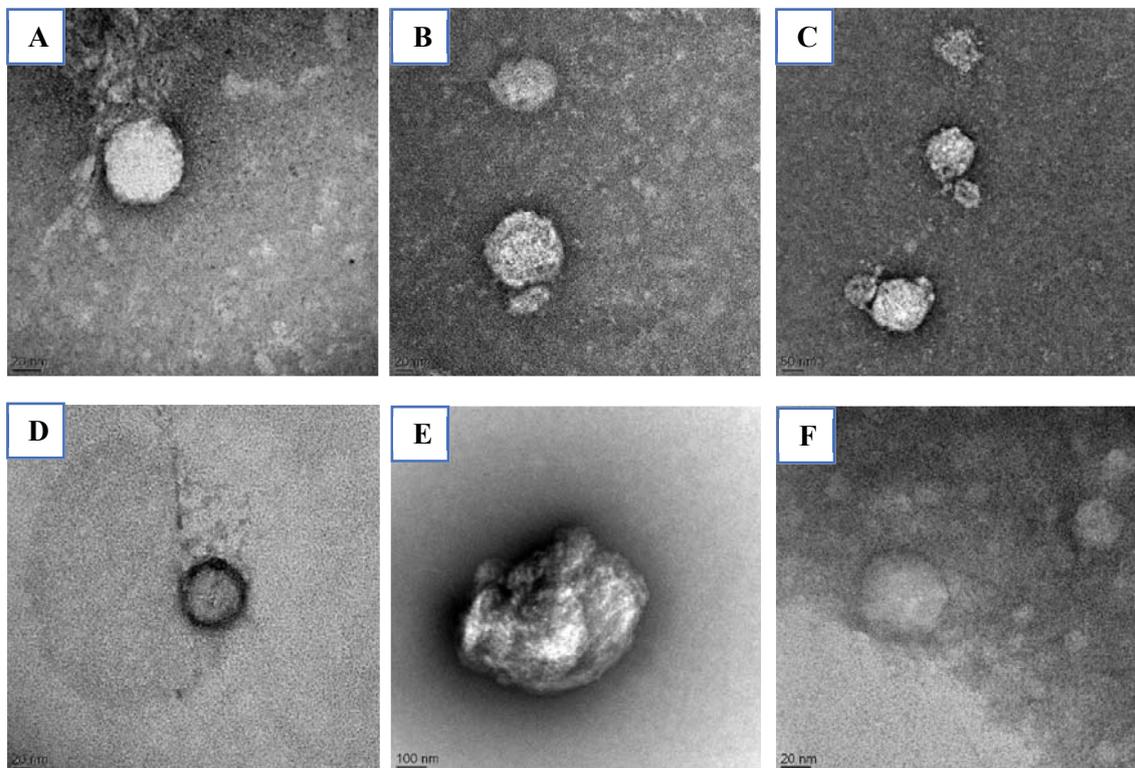


Figura 15. Imágenes de exosomas obtenidas mediante TEM (A, B, C exosomas obtenidos mediante precipitación con polímero; D, E, F exosomas aislados mediante SEC)

6.1.2.2. DLS

A pesar de haber observado que el tamaño de las vesículas determinado mediante el TEM correspondía con el rango esperado para los exosomas, se llevaron a cabo análisis de DLS para evaluar la distribución de tamaño global de las microvesículas presentes en nuestras muestras. En la Figura 16 se presenta una muestra representativa de cada una de las metodologías utilizadas. El tamaño de las vesículas es heterogéneo al igual que se apreciaba en el TEM. Sin embargo, sí que se puede apreciar que existe una mayor proporción de vesículas pequeñas, de entre 30-50 nm. En el caso de la SEC, se observó una población con un rango de diámetro más estrecho (20-50 nm), mientras que, para el kit, se observaron más poblaciones, con un rango de tamaños más amplio (20 y 100 nm).

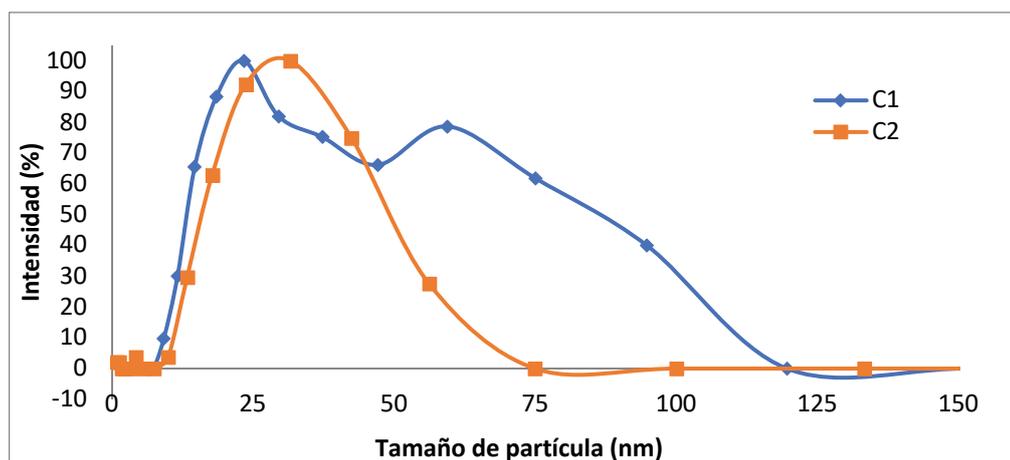


Figura 16. Gráfica del análisis de DLS de las muestras de exosomas aislados con el kit (C1) y mediante SEC (C2). Se representa el % de intensidad medido por DLS (proporcional al % de partículas detectadas) para un rango de tamaño de partícula de 0 a 150 nm.

6.1.3. Análisis de miRNAs

Tras haber comprobado la presencia de exosomas en las muestras obtenidas mediante ambas metodologías, se procedió al análisis de miRNAs para evaluar cuál de las metodologías era más adecuada para este fin.

6.1.3.1. Evaluación de controles internos

En primer lugar, para comprobar la integridad de las muestras y que no hubiera pérdida de RNA debido a su manipulación, se analizaron cuatro controles internos. UniSp2 y UniSp5 se utilizaron como controles internos del proceso de extracción del RNA, mientras que cel-miR39 y UniSp6 se usaron como controles internos de la retrotranscripción.

Como se observa en la Tabla 6, para todos los controles internos, excepto UniSp5, se obtuvieron valores bajos de Ct, además de una intensidad de señal por encima del umbral en todas las muestras analizadas. Estos resultados son coherentes con las indicaciones del fabricante, ya que la concentración de UniSp5 es 10.000 veces menor que la de UniSp2 en la mezcla de controles internos añadida a la muestra previamente a la extracción del RNA. Esta diferencia en la concentración implicaría que el Ct obtenido para UniSp5 debería ser de en torno a 12 unidades mayor que para UniSp2. Las diferencias obtenidas en nuestro estudio entre ambos controles son de 11-12 unidades, encontrándose entre los rangos esperados según el fabricante. Estos resultados

permiten confirmar que la extracción del RNA y su retrotranscripción se han realizado con una eficiencia adecuada y se descarta la presencia de inhibidores de la PCR y la degradación sustancial del RNA debida a la manipulación de muestras.

Tabla 6. **Resultados de la qPCR para los controles internos.** Se recogen los valores medios de Ct (\bar{Ct}) con su desviación estándar (SD) y el número de muestras con señal detectable por encima del umbral de fluorescencia ($n_{\text{señal}}$).

<i>Spike-in / miRNA</i>	Plasma - Kit			Plasma - SEC		
	$\bar{Ct} \pm SD$	n	n señal	$\bar{Ct} \pm SD$	n	n señal
UniSp2	22,23 \pm 0,73	8	8	24,41 \pm 1,48	8	8
UniSp5	34,19 \pm 0,05	8	2	33,62	8	1
cel-miR39	23,88 \pm 0,46	8	8	24,92 \pm 0,83	8	8
UniSp6	18,76 \pm 0,31	8	8	19,02 \pm 0,29	8	8

6.1.3.2. Valores de miRNAs

La Tabla 7 presenta los valores de Ct obtenidos para los distintos miRNAs analizados para cada tipo de aislamiento, así como el número de muestras para las que se obtuvo señal por encima del ciclo umbral. Hay que tener en cuenta para este último dato, que el total de muestras analizadas en ambos métodos fue el mismo ($n=8$). Los valores medios de Ct fueron menores en las muestras de plasma aisladas por kit comercial (Tabla 7), lo cual indica una mayor concentración de los miRNAs amplificados en dichas muestras respecto a las aisladas por SEC. Además, el aislamiento mediante el kit comercial proporcionó señal por encima del umbral en un mayor número de muestras.

Tabla 7. **Resultados de la RT-qPCR para los miRNAs analizados.** Valores medios de Ct (\bar{Ct}) con su desviación estándar (SD) y número de muestras con señal detectable ($n_{\text{señal}}$).

miRNA	Plasma Kit		Plasma SEC	
	$\bar{Ct} \pm SD$	n señal	$\bar{Ct} \pm SD$	n señal
let7a	32,70 ± 1,40	8	35,66 ± 1,86	2
miR16	23,84 ± 1,09	8	30,47 ± 0,47	7
miR21	26,74 ± 0,90	8	33,57 ± 2,38	7
miR34	32,14 ± 0,44	5	-	0
miR126	29,2 ± 0,83	8	33,35 ± 0,86	4
miR133	34,23 ± 0,66	2	-	0
miR145	35,15 ± 1,27	8	35,46 ± 0,07	2
miR146	30,97 ± 1,27	8	-	0
miR155	34,80 ± 0,45	2	-	0
miR223	25,75 ± 1,02	8	31,30 ± 0,61	6
miR320	31,97 ± 1,11	8	35,71 ± 3,47	2

6.1.3.3. Análisis del Coeficiente de Variación

El coeficiente de variación ($CV = 100 \cdot SD / \bar{Ct}$) proporciona una medida de la dispersión de los datos: cuanto más alto sea este valor, mayor es la heterogeneidad o dispersión de los datos. Como se puede comprobar en la Tabla 8, se obtuvieron valores de CV bajos, lo cual indica que los datos son homogéneos y no existe gran dispersión entre ellos. Los miRNAs cuyos niveles son más heterogéneos son miR21 y miR320, sobre todo para los exosomas aislados por SEC. Para el resto se obtienen valores bajos de CV, que respaldan la homogeneidad de los valores de Ct obtenidos para las diferentes muestras.

Tabla 8. Coeficiente de variación (CV). CV expresado en % de los valores de Ct obtenidos para cada microRNA analizado por RT-qPCR, para los exosomas aislados de plasma con kit comercial (Plasma-Kit) y mediante columnas de exclusión (Plasma-SEC). $CV=\infty$ implica que, para el correspondiente método y miRNA, ninguna o solamente una de las muestras analizadas produjo una señal por encima del umbral en la RT-qPCR.

miRNA	Plasma-Kit	Plasma-SEC
Let-7a	4,28 %	5,23 %
miR-16	4,57 %	1,56 %
miR-21	3,38 %	7,10 %
miR-34	1,37 %	∞
miR-126	2,85 %	2,58 %
miR-133	1,94 %	∞
miR-145	3,62 %	0,21 %
miR-146	4,09 %	∞
miR-155	1,30 %	∞
miR-223	3,97 %	1,96%
miR-320	3,49 %	9,73 %

6.1.3.4. Comparación entre metodologías

Con el objetivo de determinar cuál de las dos técnicas utilizadas es más idónea para la cuantificación de miRNAs mediante RT-qPCR, se compararon los resultados obtenidos para la batería de miRNAs seleccionada.

En la Figura 17, se muestran los gráficos de barras de los Ct que se obtuvieron al cuantificar mediante qPCR los miRNAs de exosomas aislados mediante ambas técnicas. Los valores de Ct eran más bajos en los exosomas aislados mediante el kit comercial y por lo tanto el nivel de miRNAs en estas muestras era mayor que en los obtenidos mediante SEC. Además, en el caso de la SEC, no se obtuvo señal cuantificable para 4 de los miRNAs analizados: miR-34, miR-133, miR-146 y miR-155.

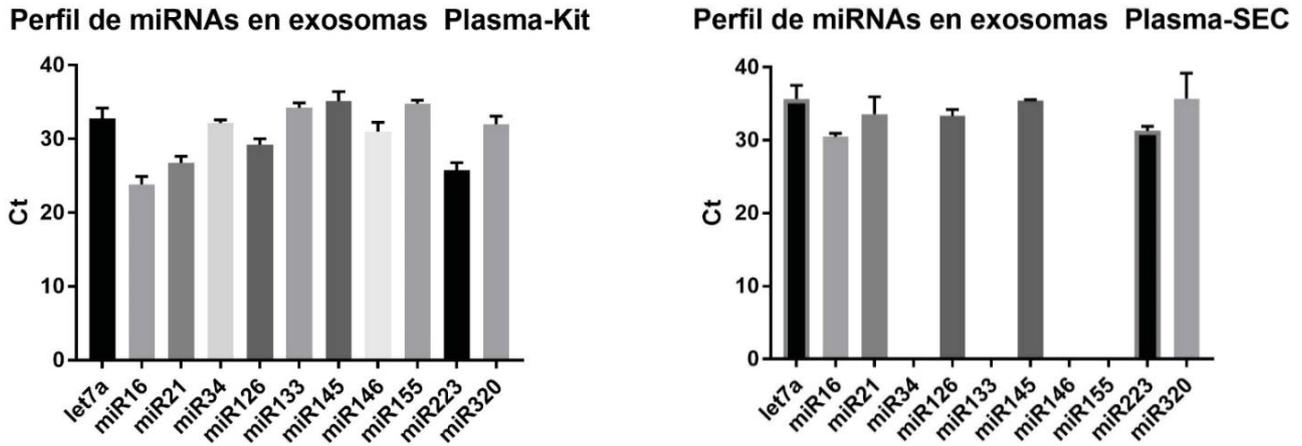


Figura 17. Perfil de miRNAs analizados mediante RT-qPCR. Muestras de exosomas aislados mediante kit comercial (izquierda) y mediante columna de exclusión molecular (SEC, derecha). Las barras representan los valores medios de Ct obtenidos para cada uno de los miRNAs analizados, con sus correspondientes barras de error (desviación estándar).

Para evaluar la relevancia de estas diferencias se decidió comparar los datos obtenidos para la muestra de cada individuo con cada una de las dos metodologías. En la Figura 18 se puede observar con cada punto el valor de Ct que se obtuvo para cada individuo en las dos técnicas y unido mediante una línea aquellos que pertenecen a un mismo individuo, de manera que se pueda observar si existe una tendencia general al aumento del Ct en las muestras extraídas mediante SEC en la muestra de cada individuo. Para analizar estadísticamente estos valores, se realizó la prueba t de Student pareada, obteniéndose diferencias significativas ($P < 0,05$) para 5 de los 11 miRNAs analizados: miR16, miR21, miR126, miR223 y miR320. Para 4 de los 11 miRNAs no se pudieron comparar los Ct obtenidos con ambos métodos de aislamiento debido a que solo se obtuvo señal en los exosomas aislados con el kit.

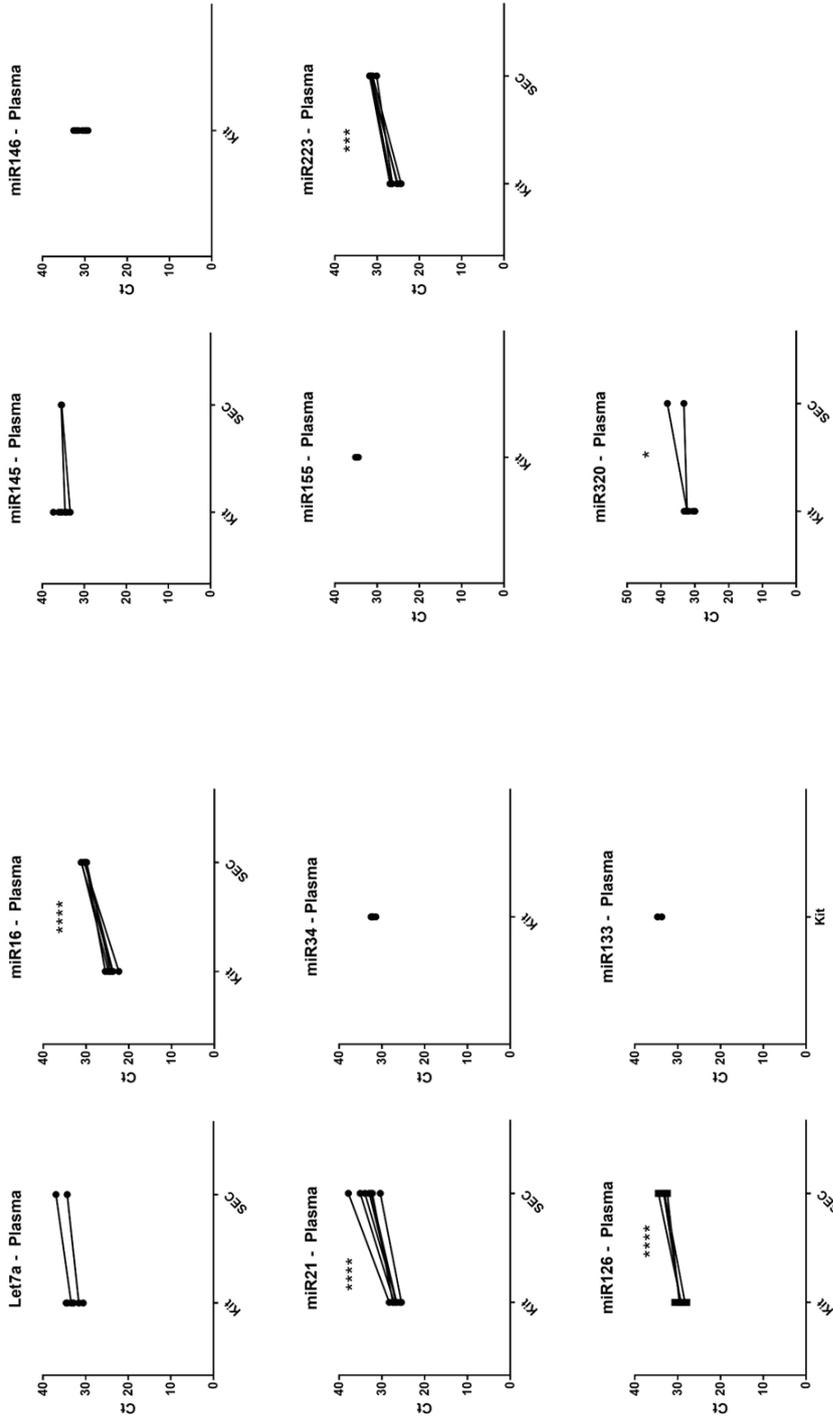


Figura 18. Diferencias pareadas entre los valores de Ct obtenidos para cada miRNA con los dos métodos de extracción, kit comercial (kit) y columna de exclusión molecular (SEC). Los puntos representan los valores de Ct obtenidos en la qPCR para todas las muestras de plasma analizadas. Las líneas unen los valores de Ct correspondientes a una misma muestra de exosomas aislados por cada uno de los dos métodos. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001; ***** p < 0,00001.

Con la comparación de los valores de Ct obtenidos en exosomas aislados con los dos métodos podemos concluir que cuando el Ct medio obtenido en los exosomas aislados mediante el kit para un miRNA es < 30 , los valores en los exosomas obtenidos por SEC presentan una señal cuantificable, con Ct medios aproximadamente 6 unidades mayores que los obtenidos con el kit. Por otro lado, si el Ct medio en los exosomas del kit para un miRNA es > 30 , en los exosomas aislados mediante SEC no se obtuvo señal.

6.1.4. Discusión

Este estudio se llevó a cabo con el objetivo de determinar la metodología más idónea para realizar los análisis de miRNAs exosomales a partir de muestras de plasma. Además, se caracterizaron los exosomas para comprobar que estos estaban siendo aislados de manera correcta. La caracterización mostró la presencia de exosomas en las muestras obtenidas mediante ambas metodologías. Sin embargo, las muestras obtenidas mediante SEC parecían tener una menor concentración como se observó en la señal obtenida en el *Western Blot* y en la visualización de una menor cantidad de vesículas mediante TEM.

Nuestros resultados indican que, para muestras pertenecientes a los mismos sujetos, se detecta una mayor concentración de miRNAs exosomales en los exosomas aislados mediante el uso del kit comercial que en los aislados por SEC. Este resultado es acorde con lo descrito por otros autores en otro biofluido como la orina en el que se obtuvieron los mayores rendimientos de aislamiento de miRNAs mediante el uso de kits comerciales basados en precipitación^{203,204}. Aunque los resultados no fueron completamente satisfactorios en el caso del aislamiento mediante SEC hay que tener en cuenta, por un lado, que en el procedimiento experimental del kit comercial se siguieron las indicaciones del fabricante, por lo que este proceso junto a la aplicación de las muestras para cuantificación de miRNAs estaba optimizado; por otra parte, en el caso de la SEC su acoplamiento a los reactivos de cuantificación de miRNAs no es tan óptimo. Además, es importante tener en cuenta que, según se indica en el apartado 5.7.1.1 y 5.7.2.2., los exosomas se aislaron a partir de 0,5 ml de plasma en ambos casos. Sin embargo, con el kit comercial se obtuvieron los exosomas diluidos en un volumen final de 300 μ l, mientras que, en el aislamiento

con SEC, se obtuvo un volumen final de 1.500 μ l de exosomas. Es decir, los exosomas aislados mediante SEC estaban 5 veces más diluidos que los exosomas aislados mediante kit comercial. Por ello, fue coherente que en la qPCR se obtuviese más señal (menores Ct) en los exosomas del Kit que en los exosomas de la SEC.

Este estudio nos llevó a concluir que, en nuestro tipo de muestras, partiendo de un volumen inicial de 0,5 ml de plasma, el método de elección para el aislamiento de exosomas con el objetivo de cuantificar sus miRNAs es la precipitación mediante un polímero.

6.2. Estudio II. “Estabilidad de miRNAs de exosomas circulantes en sujetos sanos”

El papel de los exosomas y su cargo en diferentes procesos tanto fisiológicos como patológicos, junto con su obtención a partir de biofluidos fácilmente accesibles, proporciona a los miRNAs exosomales unas propiedades muy interesantes para ser utilizados como biomarcadores. Tras haber aislado y caracterizado los exosomas de plasma en el Estudio I, en este Estudio II nos planteamos el objetivo de determinar si los miRNAs exosomales objeto de nuestro estudio permanecían estables en el tiempo en sujetos control. Además, comparamos la eficiencia de dos kits comerciales para llevar a cabo este objetivo y el efecto que la congelación previa o posterior a la extracción de exosomas puede tener en la integridad de los mismos y en los niveles de miRNAs detectados. Estos aspectos son fundamentales para la posible aplicación clínica del análisis de miRNAs como elementos de diagnóstico.

Los resultados que se exponen a continuación han sido publicados en la revista *Scientific Reports* en el trabajo de D. Sanz-Rubio y colaboradores titulado “*Stability of Circulating Exosomal microRNAs in Healthy Subjects*”, DOI:10.1038/s41598-018-28748-5, publicado el 9 de Julio de 2018.

6.2.1. Sujetos

La población de estudio en este trabajo constó de 3 hombres y 4 mujeres, todos ellos sin patología asociada, de edades comprendidas entre los 25 y los 62 años, sin diferencias de edad media entre sexos. En la Tabla 9 se presenta un resumen de los datos clínicos de cada sujeto. Las muestras de sangre se extrajeron a lo largo de 4 visitas separadas cada una de ellas por aproximadamente una semana.

Tabla 9. Datos clínicos de los sujetos.

Sujeto	Género	Edad años	IMC kg/m ²	Glucosa mg/dl	Triglicéridos mg/dl	Colesterol mg/dl	HDL mg/dl	LDL mg/dl
C1	Hombre	25	20,66	84	81	203	83	104
C2	Mujer	25	22,00	80	74	213	50	148
C3	Mujer	34	21,36	82	75	165	43	107
C4	Mujer	29	20,80	83	62	200	73	115
C5	Hombre	61	25,31	89	145	176	50	97
C6	Hombre	35	27,16	90	69	177	56	107
C7	Mujer	47	23,66	87	55	137	56	70
Media		36,6±13	23±2,5	85±3,7	80,1±29,9	181,6±14,2	58,7±14,2	106,9±23,2

IMC: Índice de masa corporal; HDL: lipoproteínas de alta densidad (*High Density Lipoprotein*); LDL: lipoproteínas de baja densidad (*Low Density Lipoprotein*).

6.2.2. Aislamiento y caracterización

Debido a los resultados obtenidos en el Estudio I (apartado 6.1) y dado que nuestro interés era obtener una concentración adecuada de exosomas para poder cuantificar miRNAs, se decidió utilizar kits comerciales para su aislamiento en los siguientes trabajos. En este estudio se emplearon dos kits, *miRCURY Exosome Isolation Kit* (Exiqon, EX) y *Total Exosome Isolation Kit* (Thermo Fisher Scientific, TF).

La presencia de exosomas con una integridad adecuada fue comprobada por las tres metodologías descritas en el Estudio I. Como se observa en la Figura 19A, los ensayos de difracción dinámica de luz mostraron que las vesículas presentes en las muestras presentaban, para los diferentes métodos de extracción, un diámetro medio que oscilaba entre los 43 y los 64 nm. Los perfiles de DLS muestran que la principal población de exosomas tiene un diámetro de aproximadamente 30-50 nm (Figura 19A) y una segunda población minoritaria de en torno a 130-150 nm. La correcta morfología de los exosomas fue visualizada utilizando TEM. Se observó la presencia de pequeñas esferas de entre 30 y 120 nm en la dilución obtenida con ambos kits y con

ambos tipos de ciclo de congelación (Figura 19C), confirmando de este modo los resultados obtenidos en los ensayos de DLS. Por último, se utilizó Western Blot para evaluar la presencia de marcadores específicos de exosomas como CD63 y HSP70. Se confirmó la presencia de HSP70 por la doble banda que parece sobre los 65 kDa y la presencia de CD63 por la banda de alrededor de los 45-50 kDa en los aislados de exosomas (Figura 19B). La ausencia de marcadores negativos como GM130 y CytC se comprobó para descartar la presencia de impurezas.

6.2.3. Selección de un miRNA exosomal como normalizador

Al igual que en el Estudio I, la integridad de las muestras durante las fases de extracción del RNA, la retrotranscripción y la RT-qPCR se corroboró mediante el uso de los 4 controles internos, UniSp2, UniSp4, UniSp6 y cel-miR39.

La hemólisis puede afectar la estabilidad de los miRNAs que se encuentran en los fluidos biológicos¹⁸³. Para evaluar el correcto grado de hemólisis en las muestras, se analizaron dos miRNAs, miR-23a y miR-451^{183,184}. Todas las muestras cumplieron los estándares de calidad en cuanto a su grado de hemólisis.

Para analizar los resultados obtenidos, es necesario realizar la normalización de las muestras mediante el uso de un normalizador endógeno que presente niveles de intensidad de señal adecuados, señal por encima del umbral para la mayoría de las muestras analizadas y la mayor estabilidad entre las muestras. Para elegir el normalizador, se utilizó la herramienta online *RefFinder*²⁰¹, que combina distintos programas computacionales como *BestKeeper*¹⁸¹, *geNorm*¹⁸² o *Normfinder*¹⁸¹. De entre los miRNAs analizados, el let-7a fue el que presentó los mejores valores para ser considerado como nuestro miRNA de referencia para todas las muestras obtenidas con las diferentes variantes metodológicas.

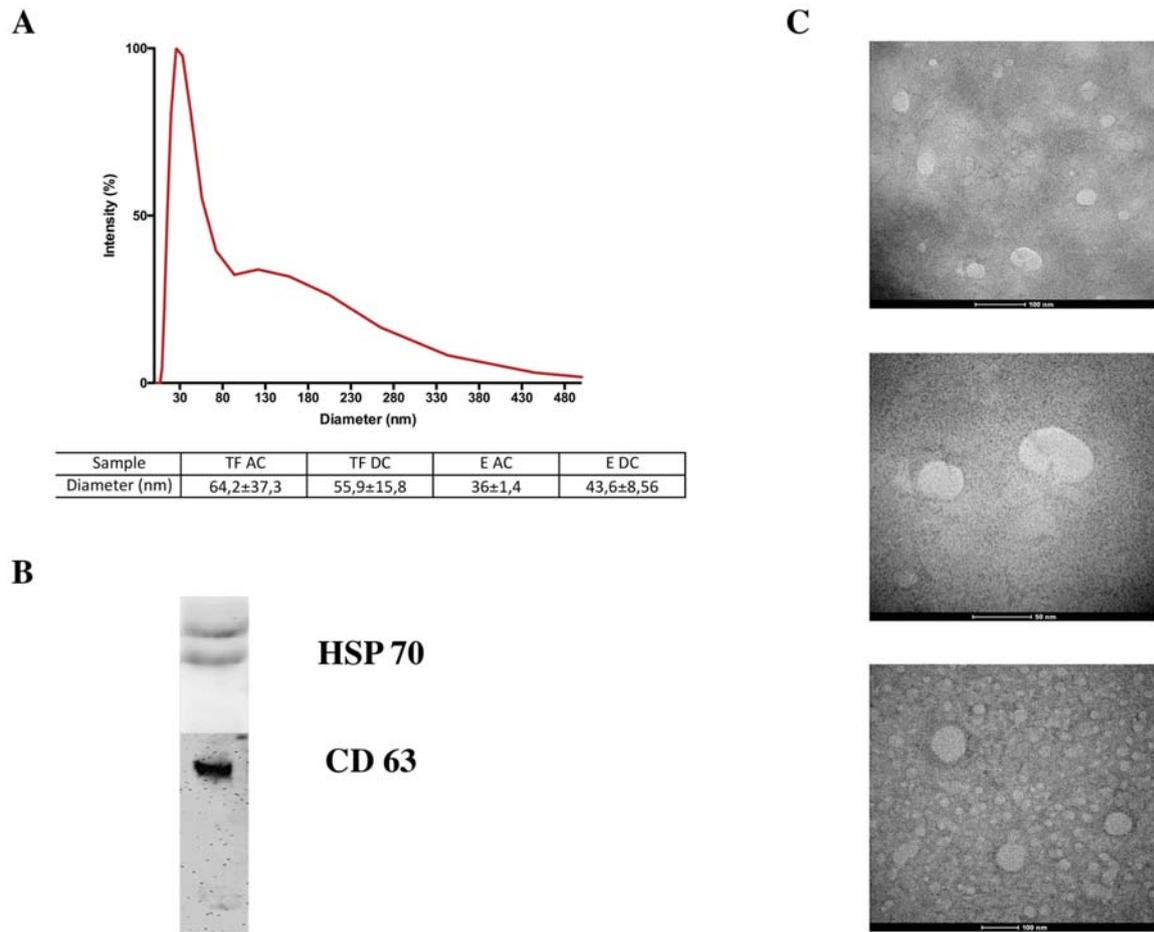


Figura 19. Caracterización de exosomas. A) Curvas representativas de los ensayos de DLS realizados para las 4 metodologías (I, TF-AF; II, TF-BF; III, EX-AF; IV EX-BF) y los diámetros medios obtenidos. B) Bandas de Western Blot representativas de los marcadores específicos de exosomas. C) Imágenes representativas recogidas por TEM de las 4 metodologías (I, TF-AF; II, TF-BF; III, EX-AF; IV EX-BF). TF (exosomas aislados con el kit de ThermoFisher), EX (exosomas aislados con el kit de Exiqon), AF (exosomas aislados tras la congelación del plasma), BF (exosomas aislados a partir de plasma fresco y congelados tras su aislamiento hasta su posterior uso).

6.2.4. Efecto de la congelación previa o tras el aislamiento de exosomas

Aunque la estabilidad morfológica de los exosomas ha sido descrita previamente ²⁰⁵, el efecto del ciclo de congelación y el momento en el que se produce dentro del proceso de aislamiento es todavía desconocido. En este estudio, los miRNAs fueron cuantificados en exosomas congelados durante varias semanas tras haber sido extraídos de plasma fresco (BF, *before freezing*) y en exosomas analizados tras su extracción a partir de plasma congelado durante varias semanas (AF, *after freezing*).

El proceso de caracterización de exosomas no mostró diferencias significativas. La visualización mediante el TEM, los análisis proteicos y los ensayos de DLS corroboraron la presencia de exosomas independientemente del momento de congelación. Tan solo se observan pequeñas diferencias como una mayor dispersión del tamaño en exosomas BF, o la presencia de mayor ruido de fondo en las imágenes del TEM de este mismo origen.

La cuantificación de miRNAs con ambos tiempos de congelación sí que mostraron diferencias. De manera general, el valor de Ct de los miRNAs fue mayor en muestras obtenidas a partir de exosomas congelados extraídos de plasma fresco y congelados posteriormente (Figura 21). Es decir, había una mayor cantidad de miRNAs en las muestras AF que en las muestras BF. Concretamente, usando el kit EX, los valores de Ct para los miRNAs let-7a, miR-16, miR-126, miR-145, miR-222 y miR-320 fueron significativamente mayores en el caso de las muestras BF que en las muestras AF (Figura 20). De manera similar, en los exosomas aislados con el kit TF, los niveles de let-7a, miR-16, miR-21, miR-126, miR-150 y miR-320 fueron significativamente menores para las muestras BF que para las AF. Además, en el caso de miR-143 y miR-145, su señal fue demasiado débil como para ser cuantificada en las muestras TF-BF. Por todo ello, debido a los bajos niveles de señal en las muestras TF-BF, en los siguientes análisis solo se incluyeron las otras tres metodologías de aislamiento (TF-AF, EX-BF y EX-AF).

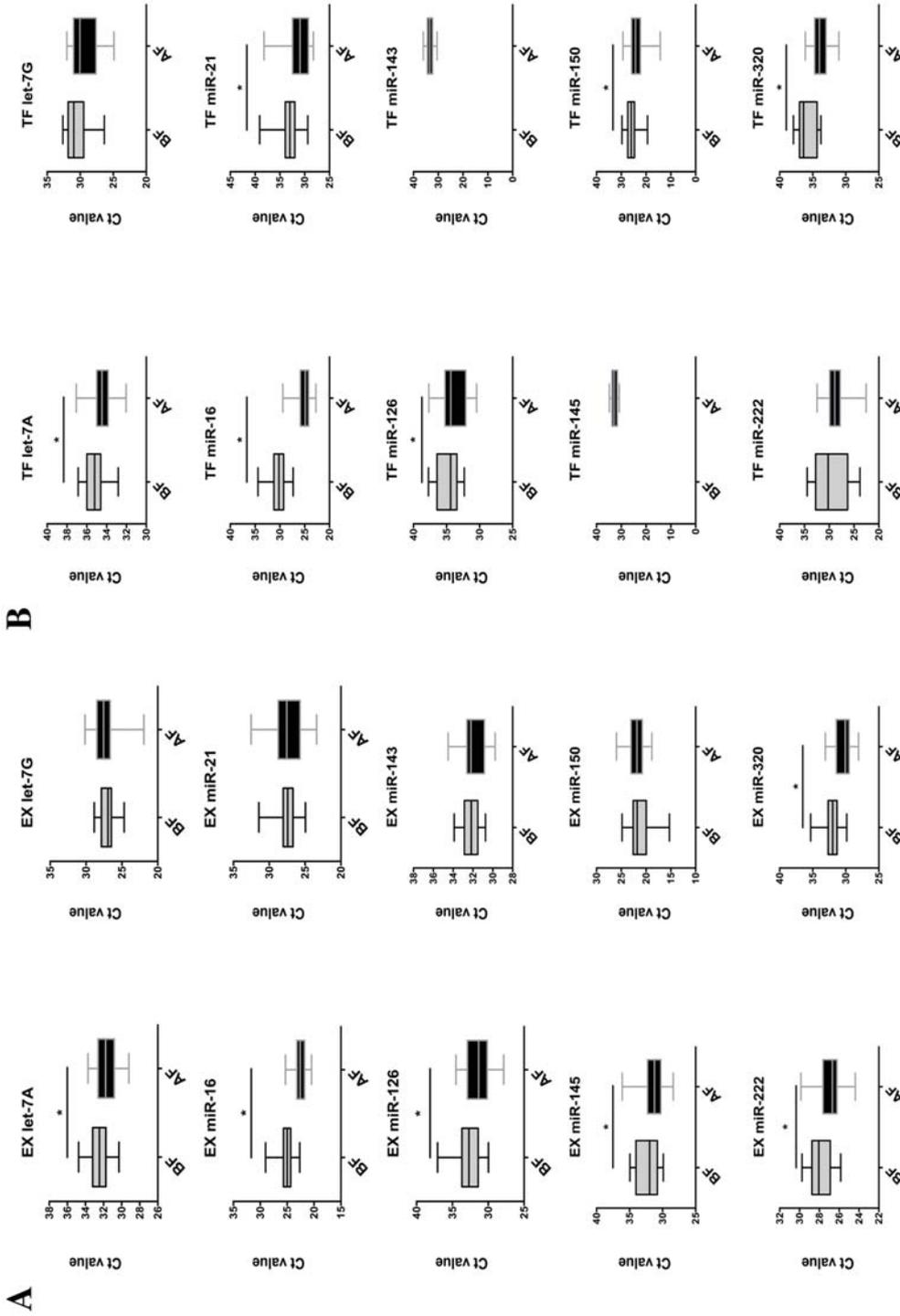


Figura 20. Valores de Ct en función del método de congelación. A) Comparación del nivel de Ct entre exosomas congelados aislados de plasma fresco (BF) y exosomas frescos aislado de plasma congelado utilizando el kit miRCURY Exosome Isolation Kit (EX). B) Comparación del nivel de Ct entre exosomas congelados aislados de plasma fresco (BF) y exosomas frescos aislado de plasma congelado utilizando el kit Total Exosome Isolation Kit (TF). Todos los datos se representan como la media (n=7) (las barras de error corresponden al valor de desviación estándar). * $p < 0,05$.

6.2.5. Dispersión inter-individuos

El kit de extracción EX mostró para ambos tipos de congelación una distribución de varianza baja, es decir valores de $CV < 1$, menor que las muestras TF-AF. Concretamente, mientras que TF-AF mostró una distribución de variación baja solo para 4 de los miRNAs analizados, let-7g, miR-150, miR-222 y miR-16, las muestras EX-AF presentaron distribuciones de variación baja para 6 de los miRNAs let-7g, miR-21, miR-150, miR-222, miR-320 y miR-16. Por último, las muestras EX-BF mostraron baja variación para 7 de los miRNAs, let-7g, miR-126, miR-143, miR-145, miR-150, miR-320 y miR-16,

6.2.6. Estabilidad de los miRNAs exosomales en el tiempo

En primer lugar, se comparó los valores de Ct normalizados (ΔCt) de los sujetos obtenidos a lo largo de las cuatro visitas consecutivas (Figura 21). En los exosomas TF-AF, se observaron diferencias significativas para los miRNAs let-7g, miR-126, miR-143 y miR-150. De manera específica, el ΔCt de let-7g fue significativamente menor en la visita 1 ($\Delta Ct = -7,82$) que en la visita 2 ($\Delta Ct = -3,55$) ($p = 0,043$) y que en la visita 4 ($\Delta Ct = -5,98$) ($p = 0,023$). Para el miR-126, este valor fue mayor en la visita 1 ($\Delta Ct = 1,34$) que en la visita 3 ($\Delta Ct = -2,31$) ($p = 0,006$). El ΔCt del miR-143 mostró valores mayores en la visita 4 ($\Delta Ct = 0,45$) que en la visita 1 ($\Delta Ct = -2,67$) ($p=0,012$) y para el miR-150, se observó un incremento significativo en la visita 2 ($\Delta Ct = -7,99$) respecto a la visita 1 ($\Delta Ct = -13,10$) ($p = 0,002$). En el caso de los exosomas aislados con el kit EX, para ambos tipos de congelación, solo se observaron cambios significativos en el miR-145. Los valores de ΔCt para este miRNA variaron en el caso de los exosomas EX-BF entre la visita 1 ($\Delta Ct = 1,21$) y la visita 2 ($\Delta Ct = -1,33$) ($p = 0,013$), mientras que en los exosomas EX-AF, los cambios se observaron entre la visita 4 ($\Delta Ct = -2,28$) y las visitas 1 ($\Delta Ct = 1,08$) ($p = 0,0021$) y 3 ($\Delta Ct = 1,227$) ($p = 0,022$) (Figura 21).

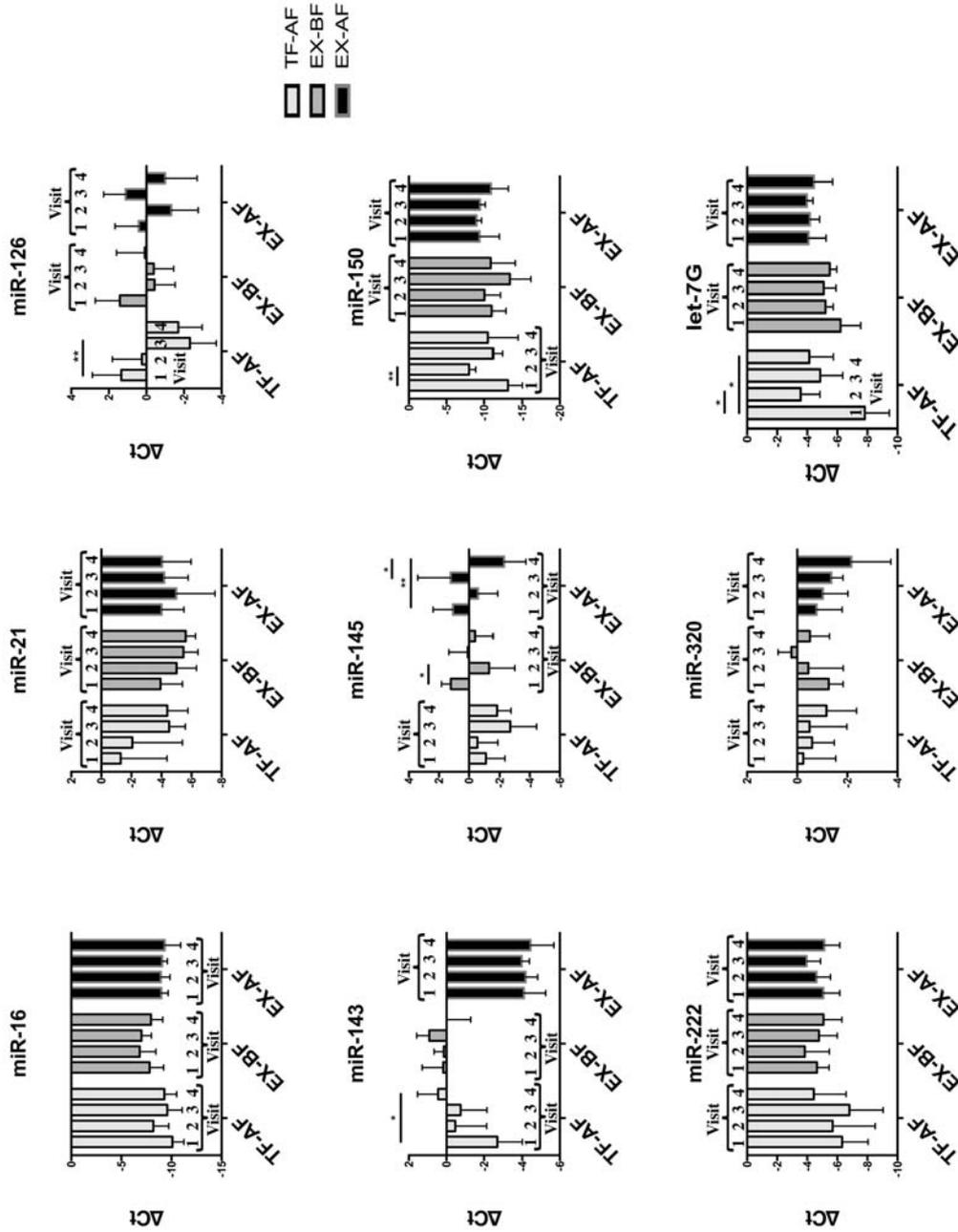


Figura 21. Evaluación del ΔC_t (valor de C_t del miRNA menos el C_t del miRNA normalizador, let-7a) a lo largo de las 4 visitas (V1-V4). Todos los datos se presentan como la media ($n = 7$) (las barras de error corresponden a los valores de desviación estándar). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Tras este análisis, se llevó a cabo la regresión lineal del valor de cada miRNA entre las 4 visitas, evaluando de esta manera desviación de la pendiente respecto a 0, es decir respecto a la pendiente de variación nula. Como se observa en la Figura 22, los exosomas TF-AF mostraron pendientes con una diferencia significativa respecto al 0 en cuatro de los miRNAs: let-7g ($p = 0,006$), miR-21 ($p = 0,0009$), miR-126 ($p = 0,0002$) y miR-143 ($p = 0,0008$). Para los exosomas aislados con el kit EX, solo se observó diferencia significativa para un miRNA en cada tipo de congelación. En las muestras EX-BF se observó una desviación en la pendiente para el miR-21 ($p = 0,008$) y en los exosomas EX-AF para el miR-145 ($p = 0,02$).

La robustez de las medidas realizadas para cada miRNA entre las sucesivas visitas fue analizada mediante el test de Bland-Altman. De esta manera, se representaron y compararon los niveles de los miRNAs exosomales obtenidos mediante las tres metodologías de estudio y se evaluó si las diferencias entre las visitas se encontraban dentro de los límites de confianza. En la Figura 22B se presentan, para cada metodología y miRNA, el porcentaje de diferencias entre visitas que se encuentra dentro de los límites de confianza. TF-AF fue el que mostró mayor variabilidad, siendo el miR-21 y el miR-143 los que mostraron menores porcentajes de concordancia, 83 % y 90 % respectivamente. En el caso de los exosomas extraídos con el kit miRCURY (EX), tanto BF como AF, mostraron porcentajes de concordancia por encima del 98% para todos los miRNAs excepto para el miR-145, que solo mostró concordancia para el 90% de las muestras en el caso de los exosomas EX-BF.

La concordancia de la cuantificación de los miRNAs mediante los dos kits comerciales utilizados en este estudio fue evaluada mediante la misma metodología. El porcentaje de las diferencias entre kits que se encuentran dentro de los límites de confianza fue superior al 90% para todos los miRNAs estudiados.

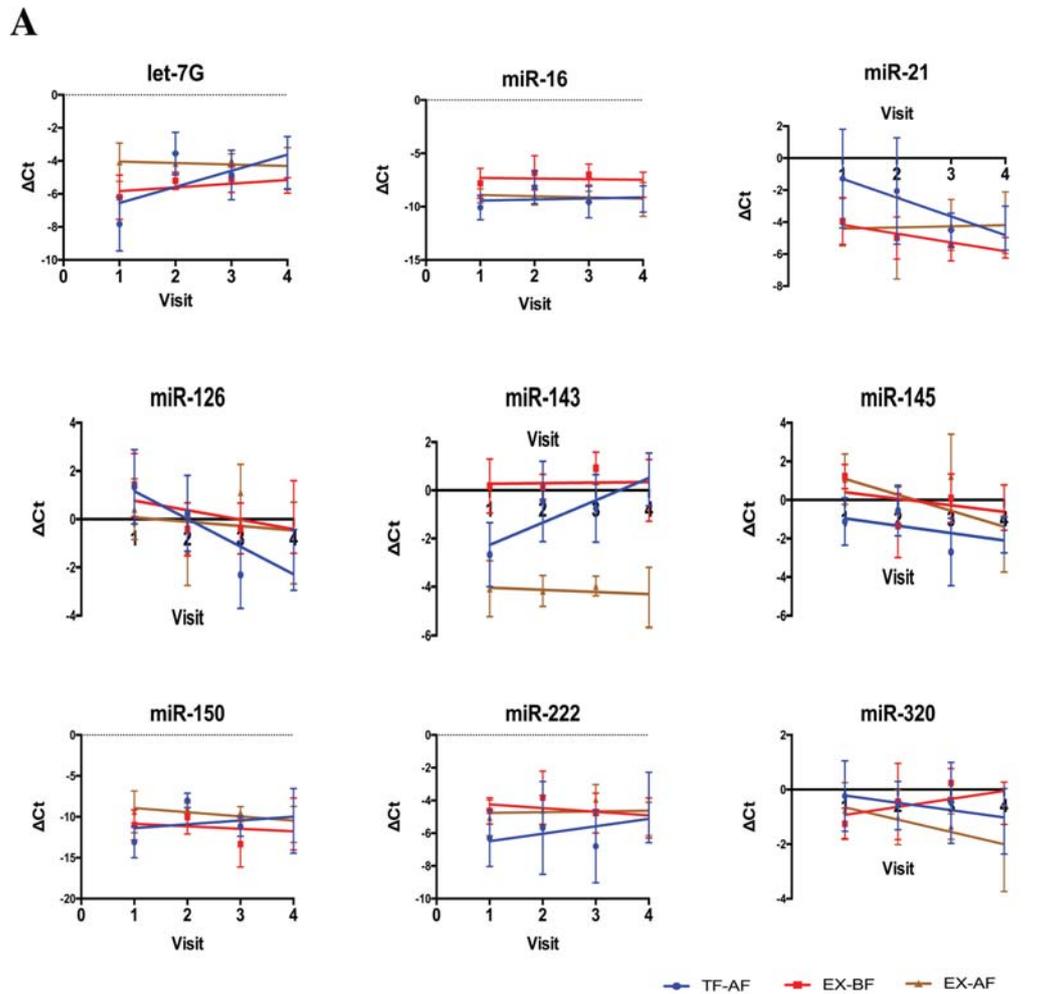


Figura 22. Evaluación de la variabilidad de los miRNAs a lo largo del tiempo. A) Regresión lineal de los valores de ΔCt a lo largo de las 4 visitas (V1-V4) para los 3 métodos de estudio (TF-AF, EX-BF, EX-AF). Los datos se representan como la media (las barras de error representan la desviación estándar). B) Porcentaje de diferencia entre visitas que se encuentran dentro de los límites de confianza para el test de Bland-Altman.

Para finalizar, se evaluaron los CV entre las 4 visitas para cada sujeto. En la Tabla 10 se muestra el valor medio del CV para cada miRNA y método de aislamiento. Los miRNAs analizados en exosomas TF-AF y EX-BF mostraron mayor variabilidad que los EX-AF, obteniéndose para los dos primeros CV por encima de 1 para 4 miRNAs. En el caso de TF-AF, los miRNAs que mostraron variabilidad fueron miR-21, miR-126, miR-143 y miR-320, mientras que para los exosomas EX-BF, los miRNAs que variaron fueron miR-126, miR-143, miR-145 y miR-145. Por último, los exosomas EX-AF mostraron menos valores de CV para la mayoría de miRNAs y tan solo mostraron un CV mayor que 1 para 2 de los miRNAs, miR-126 y miR-145.

Tabla 10. Coeficientes de variación entre las 4 visitas consecutivas.

	miR-16	miR-21	miR-126	miR-143	miR-145	miR-150	miR-222	miR-320	miR let 7 g
TF-AF	0,14±0,05	1,54±2,34	9,7±16	4,51±5,74	0,81±0,45	0,25±0,07	0,36±0,3	2,36±1,70	0,44±0,11
EX-BF	0,14±0,08	0,24±0,12	8,3±11	4,18±3,25	2,59±1,70	0,19±0,07	0,23±0,12	3,25±2,69	0,17±0,05
EX-AF	0,09±0,04	0,40±0,21	2±1,07	0,17±0,08	5,82±3,72	0,10±0,07	0,16±0,04	0,63±0,35	0,17±0,08

6.2.7. Discusión

Este estudio evalúa por primera vez la variabilidad intraindividual e interindividual de un conjunto de miRNAs exosomales, aspecto que es de gran importancia para su implementación como nuevos biomarcadores en la práctica clínica. Los kits comerciales utilizados, *miRCURY Exosome Isolation Kit* (Exiqon) y *Total Exosome Isolation Kit* (ThermoFisher Scientific), se basan en la precipitación de los exosomas mediante un polímero artificial. Este fue el método de elección debido a los hallazgos obtenidos en el Estudio I en el que se mostró la mayor eficacia de este tipo de kits para el posterior análisis de miRNAs respecto a los métodos basados en SEC. Otro de los aspectos sobre el que se trató de incidir en este estudio fue en la importancia de la posición temporal del ciclo de congelación para evaluar los miRNAs exosomales.

Los niveles de miRNAs obtenidos a partir de exosomas aislados de plasma fresco y que fueron congelados tras su aislamiento (BF) mostraron valores significativamente más altos, y por lo tanto menor expresión, para ambos kits. De hecho, algunos miRNAs no pudieron ser analizados en el caso del kit TF para este tipo de congelación. Estos resultados muestran la importancia del protocolo de congelación aplicado. El procedimiento más idóneo consistió en mantener la muestra original, es decir, el plasma, congelado a -80°C . A partir de esta muestra, se realizó la extracción de exosomas y se evitó un nuevo proceso de criopreservación hasta haber obtenido el RNA total. Aunque la congelación de los exosomas no alteró de manera significativa su morfología, sí que se pudo observar mediante el TEM la presencia de más impurezas y un mayor ruido de fondo, lo que podría dañar y afectar a sus aplicaciones posteriores. La presencia de estas impurezas puede llevar a la rotura de algunos exosomas, lo que podría explicar el descenso de los niveles de miRNAs observados en los exosomas congelados en este estudio. Además, el aumento del ruido de fondo también podría afectar a las distintas etapas necesarias para analizar los miRNAs como son el aislamiento del RNA total, la retrotranscripción o la RT-qPCR.

Cuando se llevó a cabo el aislamiento de exosomas a partir de plasma congelado, la señal obtenida fue mayor para el kit miRCURY. Aunque ambos kits permitieron una correcta cuantificación, las diferencias que se obtuvieron a lo largo del análisis se podrían explicar por la compatibilidad con los kits utilizados para el análisis de miRNAs. De hecho, la extracción de RNA total, retrotranscripción y análisis de miRNAs que utiliza la tecnología LNA de Exiqon, recomienda el kit miRCURY Exosome Isolation Kit para la extracción.

En cuanto a la evaluación de la estabilidad de los miRNAs exosomales, los resultados obtenidos mostraron que la mayoría de los miRNAs fueron estables cuando la señal de amplificación obtenida mediante qPCR fue suficiente ($Ct > 35$) y que la metodología que mostraba una mayor estabilidad en las sucesivas visitas era la EX-AF. Sin embargo, los valores eran también estables cuando se extrajeron mediante TF-AF y EX-BF. Por último, aunque este trabajo analiza un pequeño número de miRNAs, este es el primer paso para el uso de los miRNAs exosomales como futuros biomarcadores. Futuros estudios deberían incluir otros tipos de RNA, como RNA largo no codificante (lncRNAs), y otros miRNAs.

6.3. Estudio III. “Cambios en el perfil de miRNAs de exosomas circulantes de plasma en pacientes con AOS con y sin presencia de aterosclerosis subclínica”

En los estudios I y II se fijó la metodología para el aislamiento, caracterización y cuantificación más óptimos de los miRNAs exosomales. La metodología determinada se aplicó tanto a este estudio como a los sucesivos trabajos que implicaran el análisis de miRNAs exosomales y consistió en el siguiente protocolo: en primer lugar, obtención de plasma y criopreservación para su posterior uso; tras ello, aislamiento de exosomas mediante el kit *miRCURY Exosome Isolation Kit* (Exiqon); obtención de RNA total, retrotranscripción y análisis de los miRNAs seleccionados por RT-qPCR utilizando cebadores específicos para cada uno de ellos.

El objetivo del Estudio III fue determinar si existían diferencias en los niveles de una batería de miRNAs seleccionados entre sujetos control, pacientes con AOS sin aterosclerosis subclínica (AS) y pacientes con AOS con aterosclerosis subclínica.

6.3.1. Sujetos

La población seleccionada para este estudio se encuentra dentro del proyecto EPIOSA, un estudio longitudinal de cohorte que analiza los cambios epigenéticos en pacientes con AOS. Actualmente, se poseen muestras de alrededor de 400 sujetos en visita basal, entre los que se encuentran 121 sujetos control, 204 pacientes con AOS sin AS y 64 pacientes con AOS y AS. En el diagrama de la Figura 23, se muestra el esquema de trabajo de este estudio. La batería de miRNAs se analizó en un grupo de controles (n=16) y en otro de pacientes con AOS (n=50). Estos pacientes, a su vez, fueron dividido en dos grupos en función de la presencia (n=17) o ausencia (n=33) de AS.

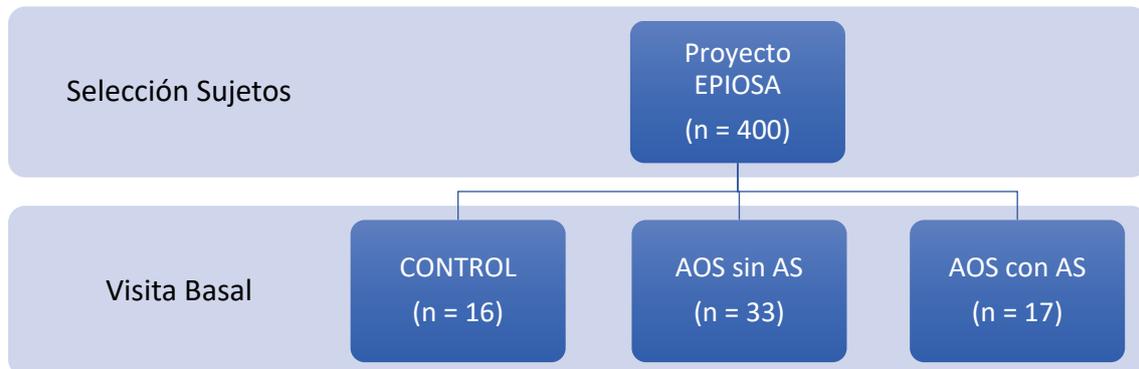


Figura 23. Diagrama de pacientes del Estudio III.

Las principales variables de estos pacientes se presentan en la Tabla 11. Como se observa en dicha tabla, la edad de los pacientes con AOS y AS es más elevada que en los otros grupos, especialmente respecto al grupo sin AS. La distribución de sexos, al igual que el IMC, es similar entre los 3 grupos. En cuanto a los valores de tensión arterial, tanto sistólica como diastólica, se encuentran elevados en los pacientes con AOS. Como era predecible, los valores relacionados con la presencia de apneas se encuentran alterados en los pacientes con AOS tanto cuando existe AS como cuando no la hay. Sin embargo, el índice EPWORTH, que evalúa la somnolencia diurna, no mostró cambios entre los grupos. En cuanto al resto de variables clínicas de análisis rutinario, solo se encontraron ligeras variaciones entre los grupos, siendo solo reseñable el aumento significativo de LDL en el grupo de pacientes con AOS y AS. Por último, como era de esperar, los valores de la IMT fueron significativamente mayores en los pacientes con AOS y AS.

Tabla 11. Variables en la visita basal de los distintos grupos incluido en el Estudio III.

Variables	Control (n = 16)	Pacientes con AOS	
		sin AS (n = 33)	con AS (n = 17)
Edad	47,8 ± 6,3	45,1 ± 9,3	51,9 ± 7,8 [¥]
Sexo (% hombres)	81	81	82
IMC (Kg/m ²)	28,9 ± 3,6	30,3 ± 3,7	29,15 ± 4,31
Tensión Arterial Sistólica (TAS)	119,7 ± 11,3	127,2 ± 13,6	136,2 ± 9,3 *
Tensión Arterial Diastólica (TAD)	72,7 ± 7,8	82,1 ± 12,2 *	82,9 ± 10,7 *
Índice EPWORTH	10,6 ± 3,8	11,2 ± 5	8,5 ± 4,5
IAH (Eventos/hora)	2 ± 2	38,2 ± 20,5 *	44,5 ± 14,8 *
Saturación de Oxígeno Media (%)	94,5 ± 1,2	92,8 ± 2,2 *	92,6 ± 2,3 *
Saturación de Oxígeno Mínima (%)	84,8 ± 3,1	76,8 ± 8,7 *	75,4 ± 7,3 *
CT90	2,9 ± 6,5	17,6 ± 17 *	16,8 ± 16 *
Hemoglobina (g/dl)	14,6 ± 1,5	14,9 ± 1,1	15,2 ± 1,1
Hematocrito (%)	44,2 ± 4,2	44,8 ± 3,1	44,4 ± 3,2
Glucosa (mg/dl)	91,5 ± 11,2	92,8 ± 11,9	94,2 ± 14,5
Colesterol Total (mg/dl)	205,6 ± 37,5	207,4 ± 38,9	234,2 ± 36,7
HDL (mg/dl)	53,8 ± 15,4	49 ± 11,9	52,3 ± 12,5
LDL (mg/dl)	129 ± 27,7	126,3 ± 33,2	154,9 ± 33,8 [¥]
Ácido Úrico (mg/dl)	5,39 ± 0,9	6,3 ± 1,3 *	5,3 ± 1 [¥]
Triglicéridos (mg/dl)	114,2 ± 41,3	150,1 ± 74,9	149,7 ± 71,8
Creatinina (mg/dl)	0,84 ± 0,15	0,86 ± 0,16	0,8 ± 0,15
Urea (mg/dl)	32,7 ± 7,3	32,6 ± 7,5	31,5 ± 7,7
Apolipoproteína A (mg/dl)	149,8 ± 24,8	147,5 ± 27,7	157,2 ± 29,8
Apolipoproteína B (mg/dl)	103,7 ± 23,4	108,6 ± 30,3	122,8 ± 18,8
PCR (mg/dl)	0,24 ± 0,19	0,43 ± 0,41	0,31 ± 0,29
IMT (mm)	0,64 ± 0,1	0,67 ± 0,18	0,81 ± 0,2 *

IMC: Índice de Masa Corporal; CT90: Porcentaje del tiempo por debajo del 90% de saturación de oxígeno; HDL: Lipoproteína de alta densidad; LDL: Lipoproteína de baja densidad; PCR: Proteína C Reactiva; IMT: Espesor medio de la carótida íntima media. * p < 0,05 frente al grupo control. [¥] p < 0,05 frente al grupo con AOS sin AS.

6.3.2. Caracterización exosomal

Al igual que se realizó en los Estudios I y II, se comprobó la presencia de exosomas en las muestras analizadas y se caracterizaron muestras pertenecientes a los 3 grupos de análisis. Sin embargo, en el proceso de caracterización no se observaron diferencias apreciables entre los grupos para ninguna de las técnicas utilizadas, *Western Blot*, TEM y DLS. En la Figura 24 se presenta una imagen representativa para cada una de las técnicas utilizadas en la caracterización.

6.3.3. Control de hemólisis y controles internos

En el estudio II, se indicó la importancia de controlar los posibles deterioros de la muestra debido al grado de hemólisis. Por ello, y al igual que en el trabajo anterior, se analizaron los niveles de miR-451a y miR-23a. De esta manera, se calculó el cociente del primero entre el segundo, valor que es considerado como el coeficiente de hemólisis. Cuando el coeficiente de hemólisis es menor que 5, la muestra se considera válida para la cuantificación de miRNAs^{183,184}. En nuestro caso, todas las muestras proporcionaron unos niveles de hemólisis adecuados para el análisis de miRNAs (Datos no mostrados).

Además de controlar el correcto estado de la muestra inicial, se comprobó que no había habido pérdida de material ni alteración de este durante la manipulación del RNA. Para ello, se utilizaron los controles internos UniSp2, UniSp5, UniSp6 y cel-miR-39. Los análisis de estos mediante RT-qPCR no indicaron la pérdida de muestra (Datos no mostrados).

6.3.4. Selección del miRNA normalizador

La selección de normalizador para la cuantificación de miRNAs es todavía un tema de controversia ya que no existe un conjunto de miRNAs que puedan ser considerados como estándar para esta función. Debido a esto, se seleccionaron 2 miRNAs que son considerados como candidatos habituales para la normalización, miR-16 y let-7a. La selección del miRNA más adecuado para la normalización se realizó teniendo en cuenta los Ct de todos los miRNAs analizados, por lo que cualquiera de ellos podía ser considerado como normalizador. Tras aplicar la herramienta on-line RefFinder²⁰¹, al igual que en el Estudio II, se obtuvo que el miRNA que proporcionaba unos valores más estables entre todas las muestras analizadas era let-7a.

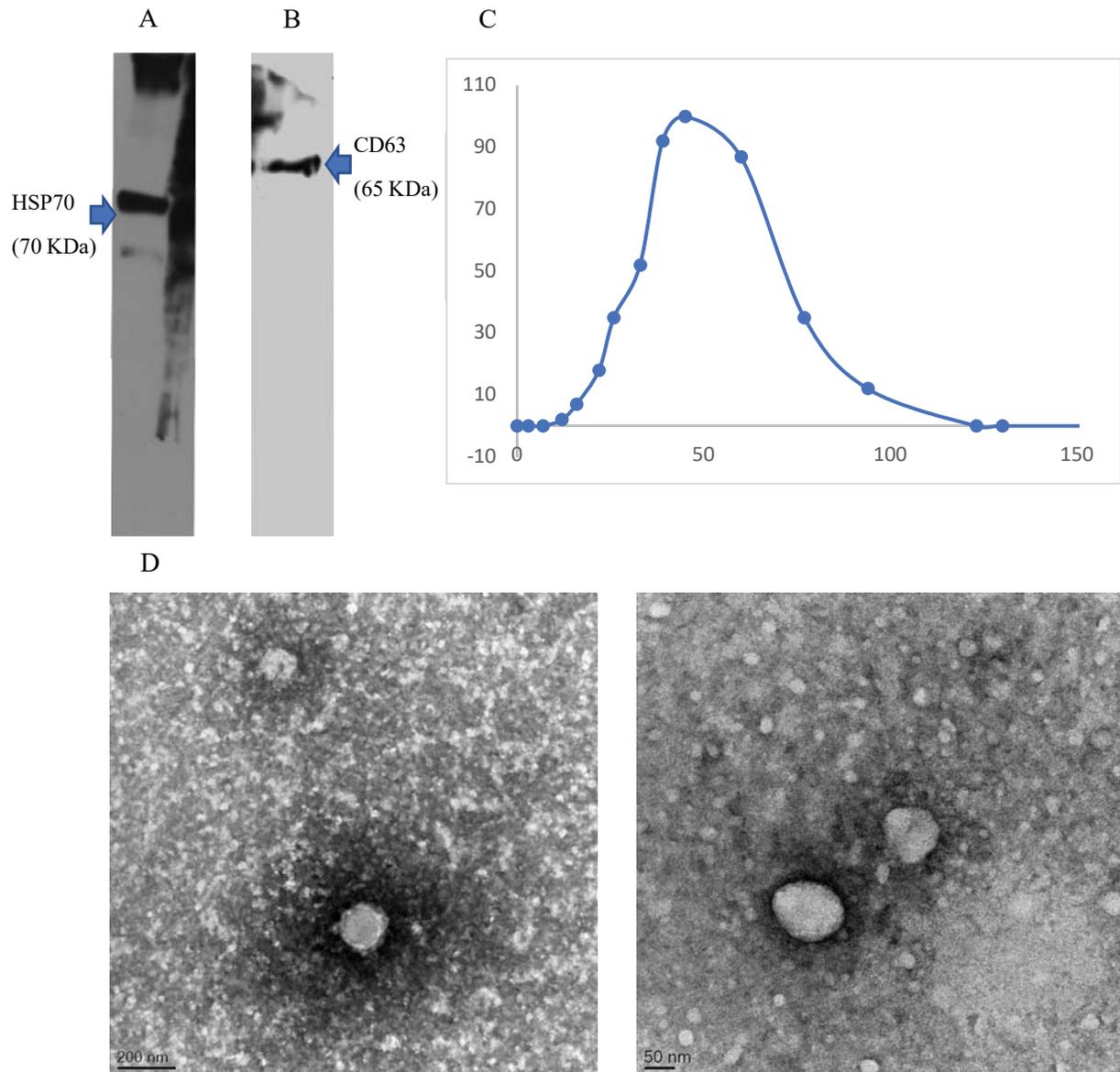


Figura 24. Caracterización de exosomas mediante *Western Blot* (A, HSP70; B, CD63), DLS (C) y TEM (D).

6.3.5. Cuantificación relativa del conjunto de miRNAs mediante RT-qPCR

El análisis de los miRNAs seleccionados para este estudio se llevó a cabo mediante el método de $\Delta\Delta Ct$. Como se ha descrito en el apartado interior, el miRNA let-7a fue el que mostró mayor estabilidad al ser analizado en RefFinder y por lo tanto el que fue seleccionado como

normalizador. Los análisis estadísticos fueron realizados sobre el valor de ΔCt . La tasa de cambio (*Fold Change*, FC) de cada grupo fue calculada como $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

En primer lugar, se analizaron los valores de los miRNAs en las todas las muestras del estudio. Entre los miRNAs analizados, la gran mayoría mostraron una intensidad de señal en la qPCR suficiente para una correcta cuantificación ($Ct < 36$). Tan solo 2 de estos, miR-155 y miR-630 no proporcionaron una señal adecuada. En el caso de miR-155 esta deficiencia se observó en varias muestras distribuidas de manera heterogénea en todos los grupos de sujetos, mientras que para miR-630, no se obtuvo señal para ninguna muestra. De los 9 miRNAs restantes que se seleccionaron bibliográficamente, 4 de ellos mostraron cambios significativos entre algunos de los grupos incluidos en el estudio. En la Figura 25 se muestran los gráficos de ΔCt para estos miRNAs, así como los grupos entre los que existe una variación de expresión. miR-21 se encontró incrementado en los pacientes con AOS y AS tanto respecto al grupo control ($FC = 2,17$; $p < 0,01$) como al grupo con AOS y sin AS ($FC = 1,59$; $p < 0,05$). miR-145 mostró unos niveles muy similares entre los exosomas obtenidos de controles y de pacientes con AOS sin AS, sin embargo, se encontró elevado en las muestras de pacientes con AOS y AS respecto a los que no tenían AS ($FC = 2,06$; $p < 0,01$). Este patrón se pudo observar también para miR-223, el cual estaba elevado en los pacientes con AOS y AS respecto a los pacientes que solo padecían AOS ($FC = 1,64$; $p < 0,05$). Finalmente, miR-320a mostró un aumento significativo en el grupo de pacientes con AOS y AS al compararlo al grupo control ($FC = 1,91$; $p < 0,01$) y al grupo de pacientes con AOS y sin AS ($FC = 1,53$; $p < 0,01$).

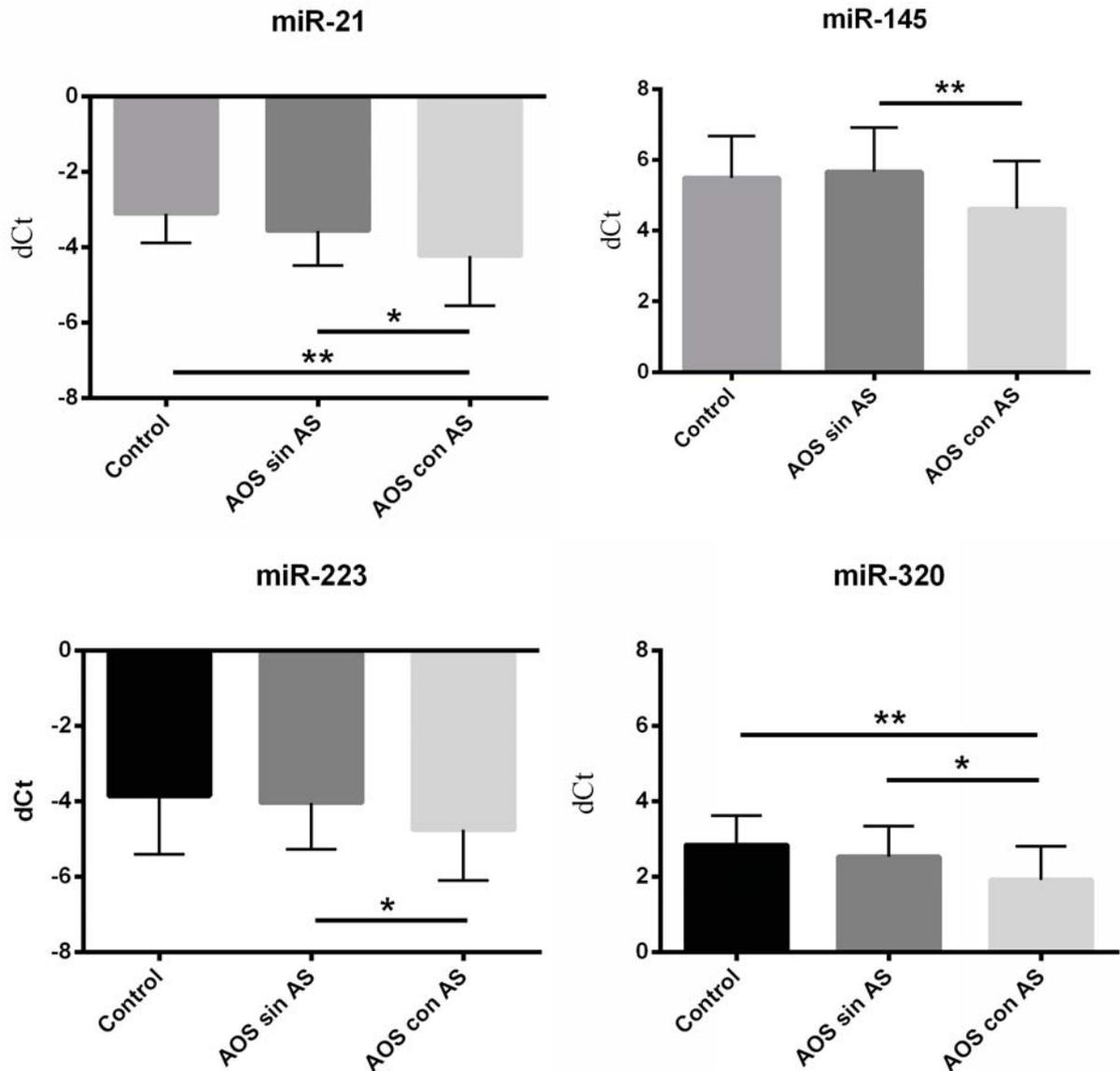


Figura 25. miRNAs que mostraron cambios significativos entre los grupos de estudio en la visita basal. Los valores de expresión de los miRNAs se evaluaron mediante el Δ Ct (valor de Ct del miRNA menos el Ct del miRNA normalizador, let-7a). Todos los datos se presentan como la media (control, n = 16; AOS sin AS, n = 33; AOS con AS, n = 17), las barras de error corresponden a los valores de desviación estándar. Diferencias estadísticas calculadas con el test t de Student (* p < 0,05; ** p < 0,01).

6.3.6. Discusión

Este estudio muestra por primera vez la existencia de cambios en algunos miRNAs exosomales en pacientes adultos con AOS y AS. A lo largo de la introducción de esta tesis, se han descrito las posibles funciones de los exosomas y su potencial participación en estados patológicos debido a los cambios que se producen en su carga al variar el estado fisiológico de

las células ²⁰⁶. En este trabajo, se ha estudiado un número reducido de miRNAs, la mayoría de ellos implicados principalmente, según la bibliografía, en procesos aterogénicos. Además, algunos de ellos también se relacionaron con los procesos inflamatorios, como el miR-21 ¹⁹⁰, o con la hipoxia, como el miR-150 ¹⁹¹. Los resultados obtenidos en la visita basal mostraron que el grupo de pacientes con una mayor variación en los niveles de algunos de los miRNAs era el de pacientes con AOS y AS. Estos cambios se observaban tanto respecto al grupo control como al grupo de AOS sin AS. La ausencia de cambios significativos entre el grupo de control y el de AOS sin AS posee cierta coherencia respecto a la selección de miRNAs realizada, ya que la mayoría de los miRNAs seleccionados se han relacionado con los procesos aterogénicos.

Los miRNAs que mostraron unos mayores cambios fueron miR-21 y miR-320a. El miRNA miR-21 se encuentra implicado en una gran cantidad de procesos biológicos. Un trabajo realizado por F. Sheedy ha propuesto su posible papel como regulador del proceso inflamatorio, aumentando sus niveles conforme se produce la situación proinflamatoria y teniendo un efecto anti-inflamatorio para recuperar el estado basal ²⁰⁷. Este miRNA también es capaz de responder frente a la hipoxia intermitente ²⁰⁸. El aumento del miR-21 en los pacientes con AOS y AS podría tratarse de un intento del organismo para reducir el estado inflamatorio que se asocia con los pacientes con AOS ²⁰⁹ y a la formación y crecimiento de placas de ateromas ^{210,211}. En cuanto a miR-320a, esta molécula parece tener un papel importante en el desarrollo de procesos aterogénicos ¹⁹⁸. Los resultados mostraron que, en nuestra población, este miRNA estaba elevado en los pacientes con AOS y AS, por lo que este miRNA podría estar contribuyendo al desarrollo de procesos aterogénicos en estos pacientes.

Otros dos miRNAs, miR-145 y miR-223, mostraron tan solo un aumento significativo en los pacientes con AOS y AS respecto a los que solo padecían AOS. El miR-145 está asociado con el desarrollo de aterosclerosis ^{212,213}. Este miRNA suele coordinarse con miR-143 y se ha observado como la subexpresión de estos dos miRNAs tiene un efecto ateroprotector ¹⁸⁸. Nuestro resultados no mostraron esta asociación entre ambos miRNAs, sin embargo, sí que se observó un aumento del miR-145 en los pacientes con AS, por lo que este miRNA exosomal podría estar participando en la progresión de la AS. Finalmente, miR-223 exosomal se ha descrito como

regulador de procesos inflamatorios, concretamente teniendo un papel anti-inflamatorio ²¹⁴. El aumento de este miRNA en las muestras de pacientes con AOS y AS podría deberse, al igual que en el caso del miR-21, a un intento del organismo por recuperar una correcta homeostasis que evite la evolución de la AS.

Los hallazgos obtenidos en el grupo con AOS y AS pueden tener una gran importancia en la práctica clínica y tratamiento de estos pacientes. En primer lugar, cuando los pacientes acuden a la consulta por sospecha de un trastorno del sueño, estos son estudiados y diagnosticados de AOS cuando cumplen las condiciones patológicas. Sin embargo, este grupo es muy extenso y se desconoce qué pacientes son más susceptible al desarrollo de las comorbilidades asociadas a la AOS ²¹⁵. La determinación de biomarcadores que permitan clasificar a la población que sufre AOS en subgrupos con mayor y menor riesgo cardiovascular ayudaría a aplicar un tratamiento más eficaz sobre los mismos y evitar consecuencias fatales. En segundo lugar, el conocimiento de estas alteraciones puede contribuir al desarrollo de terapias que permitan su corrección y aplicarlas junto al tratamiento mecánico con CPAP que evita los procesos de apnea.

6.4. Estudio IV, “Efectos del tratamiento con CPAP en el perfil de miRNAs exosomales en pacientes con AOS con y sin aterosclerosis subclínica”

El Estudio III mostró los cambios observados en los niveles de una batería de miRNAs seleccionados por su participación en procesos relacionados con la aterosclerosis, la inflamación y la hipoxia, en la visita basal. En esta visita y dentro del grupo de pacientes con AOS, algunos miRNAs presentaban niveles elevados cuando además de AOS los sujetos también padecían AS. En este Estudio IV, se pretendió evaluar la evolución de los niveles de la misma batería de miRNAs en los distintos grupos tras un año de seguimiento. Durante este año, una parte de los pacientes pertenecientes a los grupos con AOS, con y sin AS, fueron sometidos a tratamiento con CPAP. La terapia con CPAP permite corregir los procesos de apnea/hipoapnea nocturnos solventando de esta manera la AOS y reduciendo gran parte de su sintomatología. A pesar de que se observa una mejoría en el estado físico global de los pacientes que son tratados con CPAP, se desconoce desde el punto de vista molecular, qué efecto tiene esta terapia.

La metodología utilizada para realizar este estudio fue similar a la del Estudio III, analizándose los niveles de miRNAs mediante RT-qPCR.

El objetivo del Estudio IV fue determinar las variaciones de expresión de los miRNAs seleccionados en la visita tras un año de seguimiento para evaluar el efecto de la terapia con CPAP a nivel molecular. Además, se intentó determinar si la CPAP tenía las mismas consecuencias sobre el grupo de pacientes con AOS sin AS que sobre el grupo con AOS y AS.

6.4.1. Sujetos

Los sujetos seleccionados para este estudio fueron los mismos que en el caso del Estudio III. Como se especificó en el mismo, estos individuos pertenecen al proyecto EPIOSA, un estudio longitudinal de cohorte que analiza los cambios epigenéticos en pacientes con AOS. Dentro de este proyecto, se disponen de muestras de 228 sujetos seguidos clínicamente durante un año desde la visita basal. Entre ellos, se encuentran 98 sujetos control, 84 pacientes con AOS sin AS y 46 pacientes con AOS y AS. En el diagrama de la Figura 26, se muestra el esquema que se siguió

tanto en el Estudio III (Visita basal) como en el Estudio IV (Visita tras un año de seguimiento). Los pacientes se dividieron en 5 grupos: control, AOS sin AS con CPAP, AOS sin AS sin CPAP, AOS con AS con CPAP y AOS con AS sin CPAP. El grupo muestral de sujetos control se mantuvo idéntico al de la visita basal (n = 16). Los pacientes con AOS sin AS (n = 33) analizados en la visita basal se dividieron tras un año en dos grupos, aquel en el que los sujetos se adhirieron correctamente al tratamiento con CPAP (> 5 horas diarias) (n = 17) y otro en el que los pacientes no recibieron terapia con CPAP (n = 16). En los individuos que padecían AOS y AS se estableció la misma división. Por un lado, se seleccionaron aquellos que habían aceptado la terapia con CPAP (n = 12) y, por otro lado, los que no habían sido tratados (n = 5). Los miRNAs se analizaron en las muestras de los sujetos de los distintos grupos.

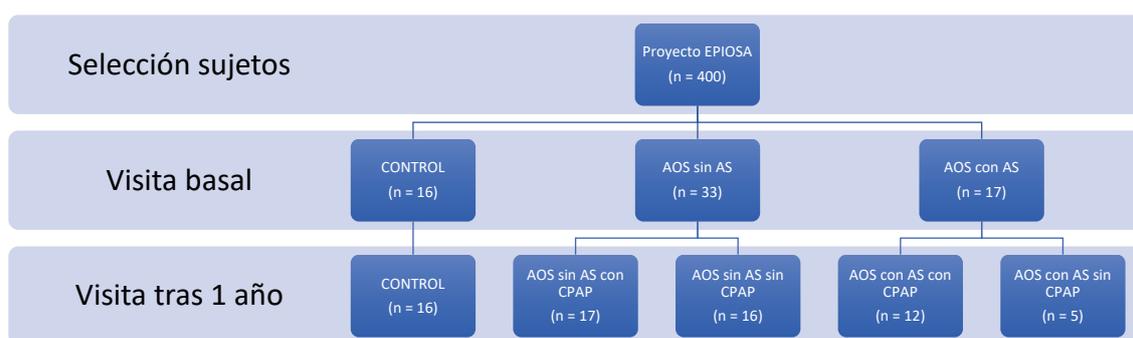


Figura 26. Diagrama de flujo de pacientes del Estudio IV.

Los datos clínicos de los pacientes se obtuvieron también en la visita tras un año de seguimiento. En la Tabla 12 se recogen los valores medios de los datos obtenidos para cada subgrupo de pacientes. Se compararon los resultados obtenidos entre las distintas clasificaciones de individuos observándose que en el grupo de AOS con AS y sin CPAP, el IMC era significativamente menor que el grupo control y el de AOS sin AS y sin CPAP. En cuanto a los valores relacionados con la AOS, tal y como era de esperar, el IAH se encontraba elevado respecto al resto de grupos únicamente en aquellos pacientes que no habían sido tratados con CPAP. La saturación de oxígeno mínima y el porcentaje de tiempo en el que los pacientes se encontraron por debajo del 90% de saturación (CT90) también siguieron este patrón. En cuanto al análisis del perfil bioquímico, solo se identificó una ligera elevación en los niveles de colesterol total y LDL

en los pacientes con AOS con AS y sin CPAP respecto al grupo control. Finalmente, las medidas de IMT se mostraron significativamente elevadas en el grupo de pacientes con AOS con AS y sin CPAP.

6.4.2. Control de hemólisis y controles internos

Al igual que se realizó en los estudios anteriores, se utilizaron una serie de controles internos para evaluar si se había perdido muestra durante las distintas etapas de manipulación del RNA. Tanto los valores obtenidos en la RT-qPCR para UniSp2 y UniSp5, añadidos en la extracción del RNA, como para UniSp6 y cel-miR-39, añadidos durante la retrotranscripción, mostraron unos niveles adecuados. Por lo tanto, se dedujo que la integridad de las muestras tras su manipulación era adecuada para continuar con el resto de los análisis (Datos no mostrados).

Además de estos controles, también se evaluó que las muestras presentasen un correcto nivel de hemólisis. Esto se llevó a cabo, al igual que en el Estudio II y III, mediante el análisis de miR-23a y miR-451a. Tras ello, se calculó el cociente entre los Ct de miR-23a y mir-451a, conocido como coeficiente de hemólisis, y se comprobó que el valor de este era menor a 5 para todas las muestras (Datos no mostrados).

Tabla 12. Datos clínicos en la visita tras un año de seguimiento.

Variables	Control	AOS sin AS	AOS sin AS	AOS con AS	AOS con AS
	(n = 16)	con CPAP (n = 16)	sin CPAP (n = 16)	con CPAP (n = 12)	sin CPAP (n = 5)
Edad	48,9 ± 6,3	44,9 ± 9,7	45,5 ± 8,4	52,1 ± 7,7	54,8 ± 9,5
Sexo (% hombres)	81	81	81	83	80
IMC (Kg/m ²)	29,2 ± 3,9	30,6 ± 4	28,9 ± 3,4	30,2 ± 3,7	25,2 ± 3,9 *, ¥
TAS	120,1 ± 14,6	125,2 ± 14,8	128,2 ± 13,2	131,8 ± 11,6 *	125,6 ± 15,8
TAD	73,9 ± 11,6	75,8 ± 8,3	82,1 ± 8,2	81,4 ± 6,9	75,2 ± 8,4
Índice EPWORTH	8,2 ± 4,6	8,9 ± 4,6	6,1 ± 3,3	4,3 ± 3	9 ± 9
IAH (Eventos/hora)	2 ± 2	0,1 ± 0,3	18,4 ± 15,7 *, £, §	0,1 ± 0,1	21,2 ± 14,2 *, £, §
Saturación de O ₂ Media (%)	94,45 ± 0,9	95,2 ± 1,2	91 ± 7,2	95 ± 0,8	94,7 ± 1,5
Saturación de O ₂ Mínima (%)	86,3 ± 2	85,4 ± 6,3	75,4 ± 8,3 *, £, §	88,5 ± 3,3	72,3 ± 13,3 *, £, §
CT90	2,3 ± 2,1	3,1 ± 3	7,8 ± 5,8 *, §	0,3 ± 0,5	14,3 ± 14 *, £, §
Hemoglobina (g/dl)	14,4 ± 1,4	15,2 ± 1	15,1 ± 0,8	14,9 ± 1,3	15,1 ± 1
Hematocrito (%)	43,6 ± 3,9	45,8 ± 2,6	45,3 ± 2,7	45,2 ± 3,6	45,4 ± 4
Glucosa (mg/dl)	92,8 ± 11,5	90,5 ± 9	94,2 ± 10,8	94,2 ± 11,5	93,8 ± 17,3
Colesterol Total (mg/dl)	199 ± 22,2	213,6 ± 41,1	211,7 ± 30,6	215,9 ± 42,2	229,2 ± 26,7 *
HDL (mg/dl)	50,1 ± 14,1	46,4 ± 12	49,3 ± 10,3	48,8 ± 13,3	59,2 ± 13,6
LDL (mg/dl)	116,6 ± 33,2	131,8 ± 31,5	132,6 ± 31,5	138,2 ± 31,1	151,8 ± 18 *
Ácido Úrico (mg/dl)	5,5 ± 1	6,5 ± 0,9	5,9 ± 1,1	6 ± 1,2	5 ± 1,2
Triglicéridos (mg/dl)	124,6 ± 55,5	151,8 ± 79,2	149,4 ± 60	144,2 ± 65,4	90 ± 31,3
Creatinina (mg/dl)	0,8 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,2	0,7 ± 0,1
Urea (mg/dl)	35 ± 9,5	33,9 ± 6,3	31,9 ± 4,7	35,4 ± 11,3	31,2 ± 10,6
Apo A (mg/dl)	139,6 ± 51,5	139,3 ± 79,2	147 ± 60	141,7 ± 65,4	156,8 ± 31,3
Apo B (mg/dl)	97,8 ± 26,6	116,8 ± 27,6	113,3 ± 26,5	116,8 ± 28,3	114 ± 9
PCR (mg/dl)	0,4 ± 0,7	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,3	0,4 ± 0,3	0,4 ± 0,3
IMT (mm)	0,64 ± 0,11	0,63 ± 0,15	0,64 ± 0,12	0,75 ± 0,22	0,87 ± 0,23 *, £, ¥

IMC: Índice de Masa Corporal; TAS: Tensión Arterial Sistólica; TAD: Tensión Arterial Diastólica; CT90: Porcentaje del tiempo por debajo del 90% de saturación de oxígeno; HDL: Lipoproteína de alta densidad; LDL: Lipoproteína de baja densidad; Apo A: Apolipoproteína A; Apo B: Apolipoproteína B; PCR: Proteína C Reactiva; IMT: Espesor medio de la carótida íntima media. * $p < 0,05$ frente al grupo control; [£] $p < 0,05$ frente al grupo AOS sin AS con CPAP; [¥] $p < 0,05$ frente al grupo AOS sin AS sin CPAP; [§] $p < 0,05$ frente al grupo AOS con AS con CPAP.

6.4.3. Selección de normalizador y miRNAs de estudio

Con el objetivo de evaluar el efecto del tratamiento con CPAP en los miRNAs estudiados en la visita basal, la batería de miRNAs seleccionada para su estudio en los mismos pacientes tras un año de seguimiento fue similar a la analizada en el Estudio III. En la Tabla 13 se presenta la lista completa de miRNAs estudiados. Como se puede observar, el único miRNA que se descartó para este estudio respecto al anterior fue miR-630, ya que este no mostró señal cuantificable para ninguna de las muestras de la visita basal.

Tabla 13. Lista de miRNAs analizados en el Estudio IV.

miRNA
hsa-miR-16-5p
hsa-miR-21-5p
hsa-miR-126-5p
hsa-miR-143-5p
hsa-miR-145-5p
hsa-miR-150-5p
hsa-miR-155-5p
hsa-miR-222-3p
hsa-miR-223-3p
hsa-miR-320a
hsa-let-7 g-5p
hsa-let-7a-5p

A pesar de que se planteó let-7a como el principal candidato normalizador para este trabajo, se incluyó también a miR-16 en el ensayo y se analizaron todos los datos de la cuantificación mediante la herramienta ReFFinder²⁰¹ para seleccionar el normalizador más idóneo. Este análisis mostró de nuevo que let-7a era el que proporcionaba unos valores más estables entre las muestras de los distintos grupos.

6.4.4. Cuantificación de miRNAs mediante RT-qPCR

Los resultados obtenidos mediante la qPCR siguieron el mismo tipo de procesamiento que en el Estudio III. Se empleó el valor del ΔCt (Ct del miRNA para la muestra – Ct de let-7a para la muestra) para llevar a cabo los análisis estadísticos, mientras que la tasa de cambio (FC) fue calculada mediante la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta\Delta Ct$ se calculó como la resta de la media de ΔCt del grupo menos la media del ΔCt del grupo frente al que se compara.

En primer lugar, se evaluó si existían diferencias significativas entre los 5 grupos en que se dividieron los pacientes en la visita tras un año de seguimiento (Figura 27). En este punto, se observó que 2 de los miRNAs que se habían encontrado alterados en la visita basal, miR-21 y miR-320a, se mostraron también alterados en esta visita. Concretamente, miR-21 mostró un aumento significativo en los pacientes con AOS sin AS y que no habían sido tratados con CPAP respecto a los controles (FC = 2,54, $p < 0,05$), no así entre los controles y los pacientes sin AS que sí que habían recibido tratamiento. En el caso de miR-320, su expresión se encontró elevada para todos los pacientes con AOS, independientemente de si presentaban también AS o de si se habían sometido o no al tratamiento con CPAP. El aumento respecto a los controles fue de 2,06 veces en el caso de los enfermos con AOS sin AS y sin tratamiento ($p < 0,001$), de 2,35 veces para los pacientes con AOS sin AS tratados con CPAP ($p < 0,001$), de 1,75 veces para aquellos que padecían AOS y AS pero no fueron tratados con CPAP ($p < 0,05$) y de 1,77 veces para aquellos pacientes con AOS y AS que sí que se adhirieron a la terapia con CPAP ($p < 0,01$). Además de estos 2 miRNAs, otros 2 se mostraron alterados en esta visita, fueron miR-126 y miR-143. Los niveles de miR-126 se encontraron más elevados en los individuos con AOS y sin AS que no habían recibido CPAP que en los que sí que lo habían hecho (FC = 2,32, $p < 0,05$). El valor de estos últimos fue más próximo al de los controles que el de aquellos que no fueron

tratados. Por último, miR-143 mostró un perfil similar que miR-126, encontrándose mayor cantidad de este miRNA en el grupo con AOS sin AS y sin CPAP que en el de AOS sin AS con CPAP (FC = 5,1, $p < 0,05$).

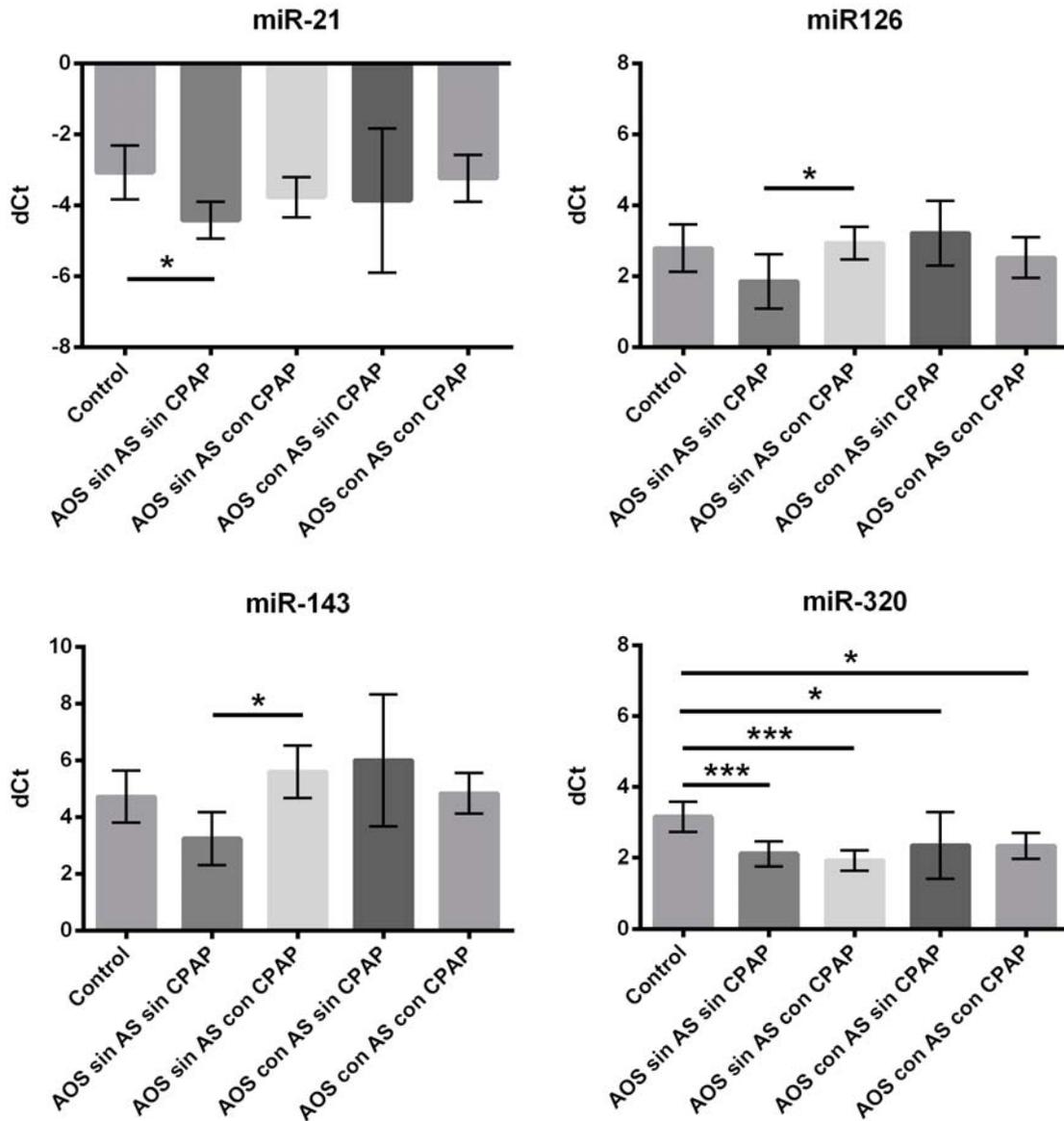


Figura 27. miRNAs que mostraron cambios significativos entre los grupos de estudio en la visita tras 1 año de seguimiento. Los valores de expresión de los miRNAs se evaluaron mediante el ΔCt (valor de Ct del miRNA menos el Ct del miRNA normalizador, let-7a). Todos los datos se presentan como la media (control, $n = 16$; AOS sin AS, $n = 33$; AOS con AS, $n = 17$) (las barras de error corresponden a los valores de desviación estándar). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Tras este análisis, se evaluó, para cada categoría de sujetos, el cambio del Δ Ct entre la visita basal analizada en el Estudio III y la visita tras 1 año de seguimiento (Figura 28). Dos de los miRNAs estudiados mostraron cambios significativos para alguno de los grupos respecto a la visita inicial. Como se muestra en la Figura 29, estas variaciones se produjeron en miR-21, y miR-320a. Para estos miRNAs, se observó que en el grupo control, los niveles se mantuvieron estables entre las dos visitas. miR-21 mostró un aumento en los pacientes con AOS sin AS que no recibieron tratamiento con CPAP. Esta tendencia se observó en la mayoría de los pacientes de este grupo, exceptuando 3 individuos que no mostraron esta tendencia. Por su parte, miR-320a aumentó en los individuos con AOS sin AS y tratados con CPAP. Al igual que sucedía en miR-21, ese perfil de cambio se observó para la mayoría de los sujetos de este grupo, exceptuando 3 de ellos.

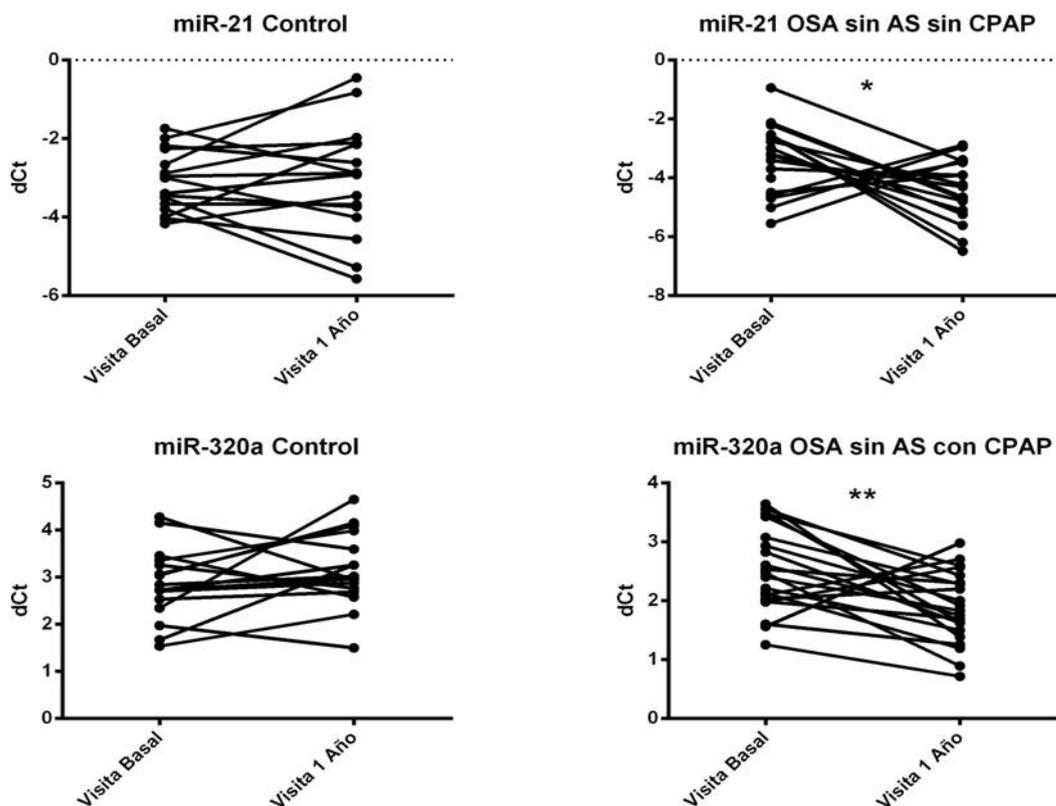


Figura 28. Cambio en el dCt de cada individuo entre la visita basal y tras un año. Se presentan los valores del Δ Ct pertenecientes a un mismo paciente en ambas visitas unidas con una línea. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

6.4.5. Discusión

Este estudio analizó por primera vez los cambios producidos en un conjunto de miRNAs exosomales de pacientes con AOS, con y sin AS, en función del tratamiento con CPAP. El tratamiento con CPAP es la terapia por excelencia aplicada a los sujetos que padecen AOS ²¹⁶, y a pesar de que se observa como mejora la sintomatología clínica de estos pacientes ²⁵ y previene el desarrollo de otras comorbilidades ²⁶, se desconocen todavía los mecanismos biológicos que se activan al utilizar de manera continua este tratamiento. Al comparar los valores de cuantificación relativa de la batería de miRNAs seleccionada por su potencial función biológica entre los distintos grupos de pacientes en la visita tras 1 año de seguimiento, se observaron variaciones en 4 de los miRNAs: miR-21, miR-126, miR-143 y miR-320a. En el Estudio III se observó que miR-21 estaba elevado en los pacientes con AOS que presentaban AS, sugiriendo que podría estar implicado en el desarrollo de procesos aterogénicos. Tras 1 año, este miRNA se mostró elevado en los pacientes con AOS sin AS que no habían sido tratados con CPAP respecto al grupo control. Esta alteración podría implicar que los individuos que no son tratados tendrían un mayor riesgo a desarrollar comorbilidades cardiovasculares, lo que concuerda con las manifestaciones clínicas asociadas a esta patología ^{24,26}. El aumento de miR-21 en este grupo de pacientes fue homogéneo, como se muestra en la Figura 28, mientras que los controles no variaban sus niveles a lo largo del tiempo. El incremento solo se observó en el grupo que no padecía AS, sin embargo, los pacientes que la padecían mostraron un perfil similar, encontrándose unos valores de ΔCt más similares al grupo control en aquellos sujetos con AOS y AS tratados con CPAP. La reducción de la inflamación debida a la AOS y la eliminación de los episodios de hipoxia intermitente podrían ser los causantes de estos cambios en miR-21, el cual se asocia con ambos procesos ^{207,208,217}. Este miRNA es, además, uno de los más abundantes en exosomas. Su variación podría no estar solo relacionada con un cambio en el empaquetamiento, sino con un cambio en el número de exosomas liberados al torrente sanguíneo ²¹⁸.

En el caso de miR-126 y miR-143, ambos mostraron un perfil similar. Estos dos miRNAs, libres en plasma, han sido propuestos como posibles biomarcadores de aterosclerosis cerebral ²¹⁹. En nuestro estudio, se comprobó que estos miRNAs se encontraban elevados en exosomas de

pacientes con AOS sin AS que no habían sido tratados con CPAP respecto a los sí que la utilizaron. miR-126 está relacionado con el aumento del estrés oxidativo ²²⁰, por lo que los pacientes no tratados se encontrarían en un estado que beneficiaría el desarrollo de aterosclerosis ²²¹. Este miRNA se ha relacionado también con las situaciones de hipoxia, encontrándose elevado en dicha condición ²²². Por su parte, miR-143 ha sido descrito en la bibliografía como pro-aterogénico, mediante su participación en la disfunción endotelial ¹⁸⁹ o coordinado con miR-145 ²¹², por lo que su aumento en estos pacientes podría suponer también un riesgo de AS acelerada. Además, los niveles menos elevados en los sujetos tratados con CPAP podrían deberse a la eliminación de la hipoxia intermitente, ya que se ha descrito que miR-143 se encuentra elevado en exosomas bajo condiciones de hipoxia ²²³.

Por último, miR-320a se mostró significativamente elevado para todos los pacientes con AOS, independientemente de la presencia de AS y del tratamiento con CPAP. Este miRNA se ha relacionado con el desarrollo de procesos aterogénicos mediante la regulación del factor de respuesta del suero ¹⁹⁸ y la respuesta al estrés electrofílico ²²⁴. Como se muestra en la Figura 28, la mayoría de los pacientes con AOS sin AS tratados con CPAP muestran un aumento para miR-320a. La imposibilidad de corregir los niveles de este miRNA en los exosomas mediante el tratamiento con CPAP confiere a miR-320a un gran interés. Estos hallazgos implicarían que, a pesar de que el CPAP corrige mecánicamente los episodios de hipoxia, existen procesos biológicos que se mantienen alterados en estos sujetos.

Los resultados obtenidos en los Estudios III y IV muestran a miR-21 y miR-320a como los miRNAs con más alteraciones entre el conjunto estudiado, tanto a nivel basal como en la visita tras 1 año. Por un lado, miR-21, se encontraba elevado en los pacientes con AOS y AS en la visita inicial, mientras que, tras un año de seguimiento, este miRNA parece responder al tratamiento con CPAP ya que solo se encuentra significativamente elevado en los pacientes con AOS sin AS y sin CPAP. Por otro lado, miR-320a se encontraba también elevado en la visita basal en el grupo con AOS y AS. Sin embargo, en la segunda visita los pacientes con AOS con y sin AS tratados o sin tratar con CPAP presentaron niveles elevados de este miRNA en sus exosomas. Esto podría implicar un aumento de este miRNA con el curso de la enfermedad que el tratamiento con CPAP

no es capaz de corregir. Este miRNA está implicado en la aterosclerosis y, por lo tanto, podría ser necesario utilizar tratamientos adicionales para reducir el riesgo de estos pacientes. Estos resultados muestran el gran potencial de estos dos miRNAs exosomales como posibles biomarcadores del pronóstico de la AOS y sus comorbilidades. Por ello, fue necesario comprobar la reproducibilidad de estos resultados en una nueva población (Estudio V).

6.5. Estudio V, “Validación los niveles de miR-21 y miR-320a en pacientes con AOS con y sin aterosclerosis subclínica y efecto del tratamiento con CPAP sobre estos miRNAs”

Los resultados obtenidos en los Estudios III y IV indicaron que miR-21 y miR-320a, procedentes de exosomas aislados a partir de plasma, podrían desempeñar un papel en el desarrollo de la patofisiología de la AOS y una de sus principales comorbilidades, la aterosclerosis subclínica. Los niveles de estos dos miRNAs se mostraron alterados en la visita inicial de los pacientes con AOS y reaccionaron de distinta manera al tratamiento con CPAP, presentando también distintas alteraciones en la visita tras 1 año de seguimiento. Por ello, en este estudio V, se pretendió corroborar la presencia de estos cambios en ambos miRNAs exosomales en una nueva población de estudio, evaluada tanto en su visita basal como tras 1 año. El procedimiento experimental siguió el mismo patrón que en los Estudios III y IV.

6.5.1. Sujetos

Todos los individuos incluidos en este Estudio V se seleccionaron a partir de la cohorte del estudio EPIOSA. En la Figura 29 se muestra el diagrama de flujo de pacientes utilizado en este trabajo. Al igual que en el Estudio III, los pacientes seleccionados se dividieron en 3 grupos en la visita basal: control (n = 24), AOS sin AS (n = 50) y AOS con AS (n = 38). Posteriormente, para analizar la visita tras 1 año, los pacientes con AOS, tanto con AS como sin ella, se desglosaron en función del uso o no del CPAP. De esta forma, como en el Estudio IV, los sujetos quedaron clasificados en: control (n = 24), AOS sin AS con CPAP (n = 28), AOS sin AS sin CPAP (n = 22), AOS con AS con CPAP (n = 25) y AOS con AS sin CPAP (n = 13).

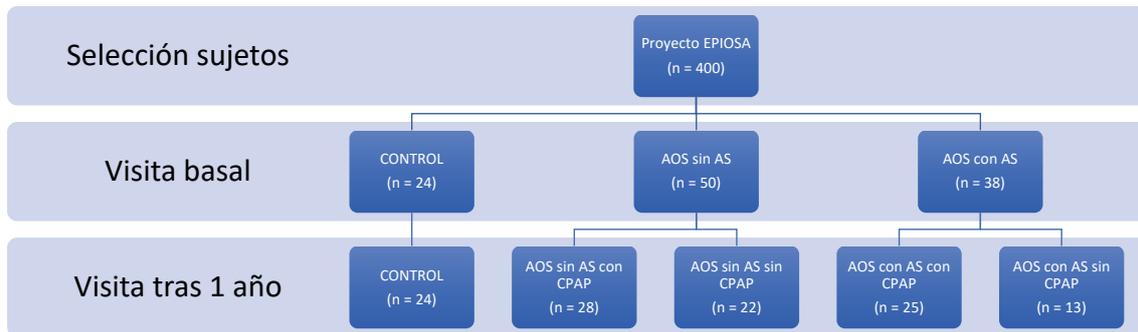


Figura 29. Diagrama de flujo de pacientes utilizado en el Estudio V.

Los datos clínicos de los pacientes en la visita basal se presentan en la Tabla 14. Estos sujetos mostraron un perfil similar a los incluidos en los estudios anteriores. Se observaron alteraciones significativas respecto a los controles en las variables asociadas a la AOS como el IAH, los niveles de saturación de oxígeno y el CT90. Además, los valores de triglicéridos, apolipoproteína B y proteína C reactiva se mostraron también alterados en ambos grupos de pacientes con AOS. Por último, en los individuos con AOS y AS, la medida de la IMT fue significativamente mayor que en los controles.

En cuanto al estado de los sujetos en la visita tras un año de seguimiento, los datos clínicos desglosados en los 5 grupos se presentan en la Tabla 15. Los valores de IAH y CT90 se mantuvieron elevados en aquellos pacientes que no recibieron tratamiento con CPAP. En esta visita, se observó un aumento respecto a los controles en la tensión arterial sistólica de los pacientes con AOS sin AS con CPAP, AOS sin AS sin CPAP y AOS con AS con CPAP. Los sujetos con AOS con AS sin CPAP mostraron un incremento en los valores de colesterol total, LDL y apolipoproteína B frente a los controles. Por último, las mediciones de la IMT de los pacientes con AOS y AS tanto tratados como sin tratar con CPAP se encontraron elevados respecto al resto de grupos.

Tabla 14. Datos clínicos de los pacientes en la visita basal.

Variables	Control (n = 24)	Pacientes con AOS	
		sin AS (n = 50)	con AS (n = 38)
Edad	44,3 ± 7,9	46,3 ± 8,7	47,3 ± 10,3
Sexo (% hombres)	75	76	79
IMC (Kg/m ²)	28,2 ± 3,9	31 ± 3,9	30,4 ± 5,6
Tensión Arterial Sistólica (TAS)	118,8 ± 12,6	128,8 ± 14,2	133,6 ± 9,5
Tensión Arterial Diastólica (TAD)	71,9 ± 9,3	81,9 ± 11,1	83,5 ± 9,5
Índice EPWORTH	10 ± 4	10,8 ± 4,9	9,5 ± 4,5
IAH (Eventos/hora)	2 ± 1,3	43,2 ± 23,2 *	43,1 ± 21,6 *
Saturación de Oxígeno Media (%)	94,8 ± 1,3	92,2 ± 2,3 *	93 ± 2,1 *
Saturación de Oxígeno Mínima (%)	86,1 ± 4	76 ± 7,9 *	74,2 ± 13,5 *
CT90	2,6 ± 1	25 ± 21,1 *	15,5 ± 14,9 *
Hemoglobina (g/dl)	14,5 ± 1,4	14,8 ± 1,2	15,3 ± 1,2
Hematocrito (%)	43,7 ± 3,9	44,6 ± 3,5	46,7 ± 3,4
Glucosa (mg/dl)	93,1 ± 14,1	95,6 ± 12,8	91,9 ± 14
Colesterol Total (mg/dl)	202,8 ± 35,3	211,8 ± 39,6	223,1 ± 41,2
HDL (mg/dl)	54,1 ± 14	48,5 ± 11,7	50,3 ± 11,5
LDL (mg/dl)	126,6 ± 25,8	128,6 ± 34	144,2 ± 37,6
Ácido Úrico (mg/dl)	5,1 ± 0,9	6,2 ± 1,5	5,8 ± 1,3
Triglicéridos (mg/dl)	110,3 ± 39,8	164 ± 85,9 *	150,3 ± 68,8 *
Creatinina (mg/dl)	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1
Urea (mg/dl)	33,4 ± 7,7	32,8 ± 6,8	33,3 ± 7,7
Apolipoproteína A (mg/dl)	149,6 ± 24	146,5 ± 28,4	153,1 ± 26,7
Apolipoproteína B (mg/dl)	100,1 ± 22,1	113,4 ± 34,5 *	118,3 ± 25,9 *
PCR (mg/dl)	0,19 ± 0,17	0,42 ± 0,4 *	0,35 ± 0,28
IMT (mm)	0,59 ± 0,11	0,68 ± 0,2	0,74 ± 0,18 *

IMC: Índice de Masa Corporal; CT90: Porcentaje del tiempo por debajo del 90% de saturación de oxígeno; HDL: Lipoproteína de alta densidad; LDL: Lipoproteína de baja densidad; PCR: Proteína C Recativa; IMT: Espesor medio de la carótida íntima media. * p < 0,05 frente al grupo control.

Tabla 15. Datos clínicos en los pacientes en la visita tras 1 año de seguimiento.

Variables	Control (n = 24)	AOS sin AS con CPAP (n = 28)	AOS sin AS sin CPAP (n = 22)	AOS con AS con CPAP (n = 25)	AOS con AS sin CPAP (n = 13)
Edad	45,3 ± 8,1	46,5 ± 8,6	46 ± 7,9	48,1 ± 9,9	50 ± 11,8
Sexo (% hombres)	75	75	77	82	76
IMC (Kg/m ²)	28,4 ± 4,1	30,6 ± 4,5	29,8 ± 4,5	31,4 ± 5,4	26,9 ± 3,7
TAS	117,1 ± 14,5	128,2 ± 13,7 *	128,1 ± 14,2 *	132,4 ± 12 *	124,7 ± 13,1
TAD	71,1 ± 10,9	77,1 ± 8,5	80,2 ± 9,3	81 ± 8	74,9 ± 6,8
Índice EPWORTH	6,8 ± 4,5	7,9 ± 4,3	7,3 ± 3,9	5,3 ± 3,4	7,6 ± 5,9
IAH (Eventos/hora)	3,4 ± 1,3	2,8 ± 1,8	18,3 ± 7,1 *, £, §	0,2 ± 0,1	16,6 ± 11,6 *, £, §
Saturación de O ₂ Media (%)	94,5 ± 0,9	94,8 ± 1,3	91,6 ± 6,6	94,9 ± 1,1	94,2 ± 1,5
Saturación de O ₂ Mínima (%)	85,2 ± 4,7	82,2 ± 10,5	78,4 ± 9,5	87,4 ± 3,4	75,5 ± 13,7
CT90	2,6 ± 1,6	4,7 ± 3	14,8 ± 12,6 *, £, §	1,1 ± 1	11,7 ± 9,7 *, £, §
Hemoglobina (g/dl)	14,4 ± 1,3	15,1 ± 0,9	14,9 ± 1,5	14,9 ± 1,5	14,9 ± 0,9
Hematocrito (%)	43,2 ± 3,7	45,5 ± 2,6	44,5 ± 4,1	45 ± 4,1	44,9 ± 3,4
Glucosa (mg/dl)	90,4 ± 11,6	88,9 ± 10,8	103,5 ± 20,3	92,2 ± 9,7	92,6 ± 13,5
Colesterol Total (mg/dl)	202 ± 27,5	213,9 ± 42	211 ± 33,1	205,7 ± 38,7	233,7 ± 32,6 *
HDL (mg/dl)	53,5 ± 13,9	48 ± 13,6	49,2 ± 9,9	47,9 ± 10,9	56,4 ± 12,3
LDL (mg/dl)	119,4 ± 32,9	128,3 ± 22,8	130,2 ± 31	130,6 ± 29,9	152,7 ± 18,3 *
Ácido Úrico (mg/dl)	5,3 ± 1	6,4 ± 1,2	5,7 ± 1,2	6,2 ± 1,2	5,1 ± 1
Triglicéridos (mg/dl)	119,1 ± 51,1	152,6 ± 84,6	161,4 ± 86,7	136,4 ± 55,8	121,9 ± 82
Creatinina (mg/dl)	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,2	0,7 ± 0,1
Urea (mg/dl)	34,9 ± 9	33,1 ± 5,6	32,3 ± 4,6	35,3 ± 8,8	34,1 ± 9,6
Apo A (mg/dl)	142,2 ± 45,6	140,5 ± 33,8	143,2 ± 37	141,5 ± 29,7	157,1 ± 22,3
Apo B (mg/dl)	97,5 ± 24,1	114,1 ± 29,5	109,7 ± 29,7	108,2 ± 26,5	129,3 ± 33,7 *
PCR (mg/dl)	0,34 ± 0,3	0,36 ± 0,25	0,39 ± 0,3	0,42 ± 0,41	0,26 ± 0,2
IMT (mm)	0,61 ± 0,11	0,7 ± 0,19	0,65 ± 0,13	0,74 ± 0,19 *, £, ¥	0,79 ± 0,23 *, £, ¥

IMC: Índice de Masa Corporal; TAS: Tensión Arterial Sistólica; TAD: Tensión Arterial Diastólica; CT90: Porcentaje del tiempo por debajo del 90% de saturación de oxígeno; HDL: Lipoproteína de alta densidad; LDL: Lipoproteína de baja densidad; Apo A: Apolipoproteína A; Apo B: Apolipoproteína B; PCR: Proteína C Recativa; IMT: Espesor medio de la carótida íntima media. * $p < 0,05$ frente al grupo control; [£] $p < 0,05$ frente al grupo AOS sin AS con CPAP; [¥] $p < 0,05$ frente al grupo AOS sin AS sin CPAP; [§] $p < 0,05$ frente al grupo AOS con AS con CPAP.

6.5.2. Controles internos, control de hemólisis y normalización

La degradación del material genético contenido en los exosomas de las muestras fue controlada mediante la adición de los controles internos UniSp2 y UniSp5, durante la extracción del RNA total, y UniSp6 y cel-miR-39, durante la retrotranscripción. Estos se analizaron posteriormente mediante qPCR y se confirmó que no se había producido degradación de la muestra.

Mediante qPCR se analizaron, de igual manera que en los estudios anteriores, miR-23a y miR-451a para evaluar el grado de hemólisis mediante el coeficiente de hemólisis ¹⁸⁴. Todas las muestras se encontraban dentro de los parámetros adecuados de este coeficiente (< 5), por lo que se pudo proceder a analizar el resto de miRNAs.

En los estudios anteriores, se pudo observar que entre la batería de miRNAs analizados, el que proporcionaba unos valores más estables entre todos los individuos y por lo tanto era el más indicado para actuar como normalizador, era let-7a. Por ello, este miRNA fue analizado también en este conjunto de muestras. Junto con los otros dos miRNAs de estudio, se sometieron al análisis mediante RefFinder ²⁰¹ y se corroboró que let-7a era el idóneo para actuar como normalizador de este estudio.

6.5.3. Cuantificación de miR-21 y miR-320a en visita basal

En primer lugar, se analizaron los perfiles de expresión de los dos miRNAs candidatos, miR-21 y miR-320a, en la visita inicial. Al igual que en los estudios anteriores, los análisis estadísticos se realizaron utilizando el valor de ΔCt , mientras que, los valores de FC se obtuvieron mediante $2^{-\Delta\Delta Ct}$. En la Figura 30 se muestran los resultados obtenidos para esta primera visita. miR-21 mostró un aumento significativo en los pacientes con AOS y AS respecto a los controles (FC = 1,85; $p < 0,05$). En el Estudio III, se mostró que, en la visita basal, este miRNA se

encontraba también más elevado en este grupo, a pesar de que la mayor diferencia la mostraba respecto a los sujetos con AOS y sin AS. Por su parte, miR-320a mostró un perfil similar a miR-21 en este estudio. Los pacientes con AOS y AS mostraron una elevación de los niveles de este miRNA respecto a los controles (FC = 1,59; $p < 0,05$). En el Estudio III, se mostró un perfil similar para los sujetos con AOS y AS, en el que también se observaban estas variaciones respecto al grupo control. Sin embargo, en esta nueva población, a pesar de que se aprecia un aumento en miR-320 en los pacientes con AOS y AS respecto a los que solo padecen AOS, esta alteración no es significativa como sucedía en el estudio previo.

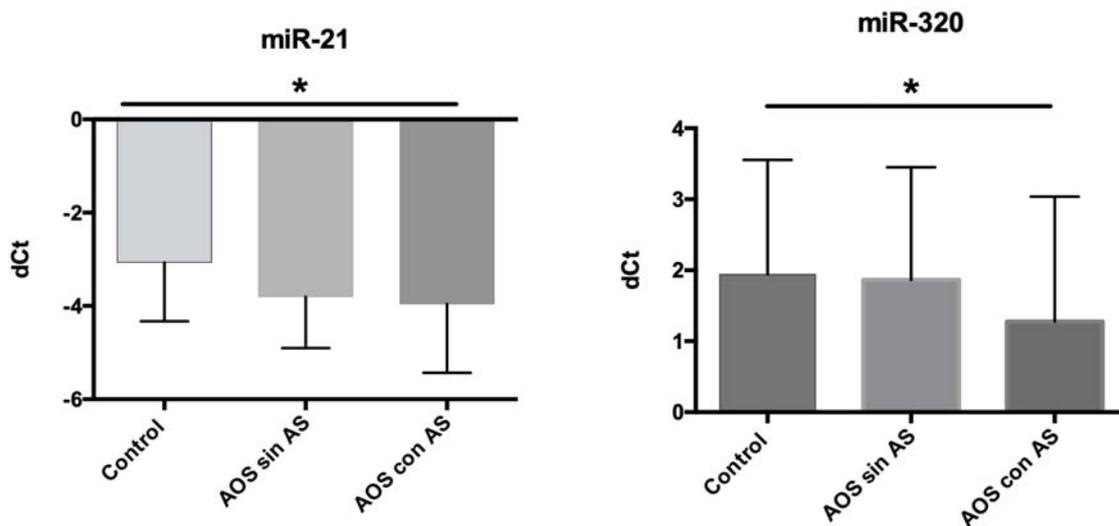


Figura 30. miRNAs analizados en la visita basal. Los valores de expresión de los miRNAs se evaluaron mediante el Δ Ct (valor de Ct del miRNA menos el Ct del miRNA normalizador, let-7a). Todos los datos se presentan como la media (control, $n = 24$; AOS sin AS, $n = 50$; AOS con AS, $n = 38$) (las barras de error corresponden a los valores de desviación estándar). * $p < 0,05$.

6.5.4. Cuantificación de miR-21 y miR-320a tras 1 año

Tras haber evaluado los cambios ocasionados por la presencia del AOS y la AS en los miRNAs propuestos, miR-21 y miR-320a fueron analizados en los mismos sujetos tras 1 año. De esta manera, se procedió de manera similar al Estudio IV. En este trabajo, como se muestra en la Figura 31, se observó que miR-21 mostraba un aumento significativo en los sujetos con AOS sin AS y que no habían sido tratados con CPAP respecto a los controles (FC = 2,51; $p < 0,05$). Este resultado concuerda con lo descrito en el Estudio IV. Los niveles de este miRNA eran inferiores

en aquellos grupos de pacientes de AOS, tanto con AS como sin ella, que eran sometidos a terapia con CPAP respecto a los que no eran tratados. De esta manera, se confirmó la hipótesis de que miR-21 era sensible al tratamiento con CPAP. miR-320a, por su parte, se encontró elevado respecto al grupo control en los pacientes con AOS sin AS que habían sido tratados con CPAP (FC = 1,48; $p < 0,05$) y en los sujetos con AOS y AS que no recibieron terapia con CPAP (FC = 1,88; $p < 0,05$). Estos resultados mostraron que, al revés de lo que ocurría para miR-21, miR-320a no respondía al tratamiento con CPAP ya que mostraba valores elevados independientemente de la aplicación de la terapia sobre los pacientes con AOS. Esta misma conclusión fue la obtenida en el Estudio IV en el que también se determinó que miR-320a no se corregía al utilizar CPAP.

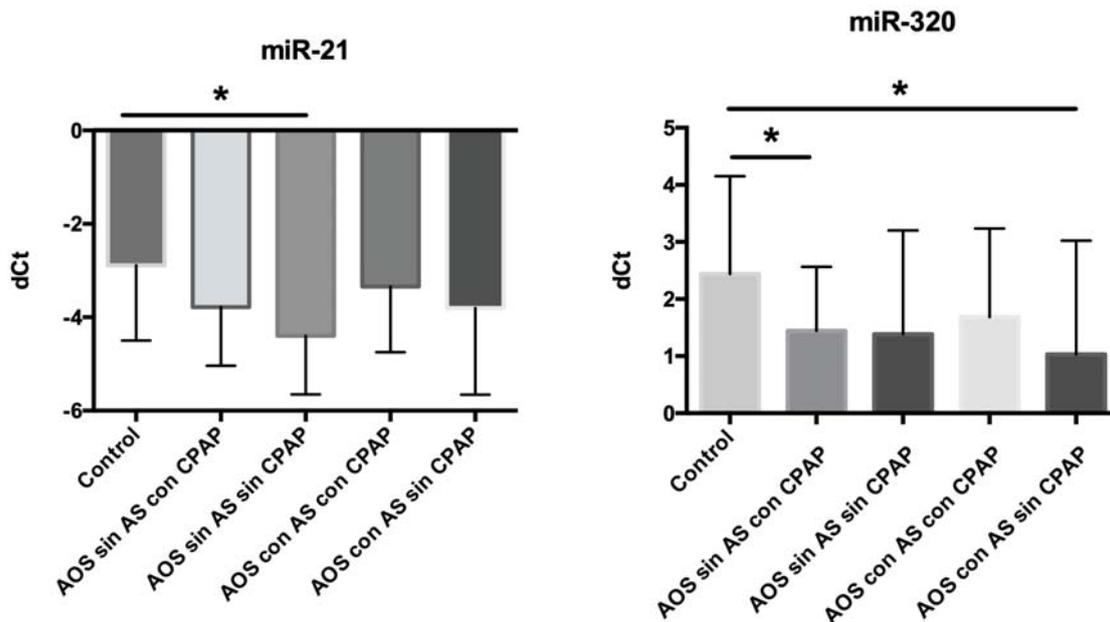


Figura 31. miRNAs analizados en la visita tras 1 año de seguimiento. Los valores de expresión de los miRNAs se evaluaron mediante el ΔC_t (valor de C_t del miRNA menos el C_t del miRNA normalizador, let-7a). Todos los datos se presentan como la media (control, $n = 16$; AOS sin AS con CPAP $n = 28$, $n = 33$; AOS con AS, $n = 17$) (las barras de error corresponden a los valores de desviación estándar). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

6.5.5. Discusión

El objetivo de este estudio fue validar los resultados obtenidos en los estudios III y IV para los miRNAs seleccionados, miR-21 y miR-320a, en una nueva población. De esta manera, se pretendía confirmar la implicación de estos miRNAs en la patología del AOS y el efecto sobre ellos de su principal tipo de tratamiento, el CPAP. Los cambios en los niveles de ΔCt siguieron un patrón similar a los estudios previos para ambos miRNAs, sin embargo, se observaron ligeras modificaciones. Por una parte, miR-21 presentó sus valores más elevados en el grupo con AOS y AS en la visita basal. Esto concuerda con el posible efecto pro-aterogénico del miRNA ¹⁸⁵. En este estudio, miR-21 mostró una alteración significativa respecto al grupo control, mientras que en el Estudio III, esta fue respecto a los pacientes con AOS sin AS. En el análisis del Estudio V, los valores del grupo con AOS sin AS fueron más similares a los de los sujetos con AOS y AS. Este hecho podría tener su origen en los datos clínicos de los pacientes, ya que, como se ha descrito, los pacientes con AOS y sin AS del estudio presentaron unos niveles significativamente elevados de colesterol total, LDL, apolipoproteína B y PCR. miR-21 se ha relacionado con el metabolismo del colesterol ^{225,226} y con la respuesta inflamatoria ²⁰⁷, por lo que la alteración de estos parámetros podría afectar a este miRNA. En la visita tras 1 año de seguimiento, en la que una parte de los pacientes fueron tratados con CPAP, se comprobó que el tratamiento estaba teniendo un efecto sobre los niveles de este miRNA en los exosomas circulantes. Los pacientes que no se sometieron a terapia con CPAP presentaron valores más elevados de miR-21, siendo significativamente elevados, al igual que en el Estudio IV, en los sujetos con AOS sin AS y sin CPAP respecto a los controles. La confirmación de estos hallazgos apoya la hipótesis de que miR-21 desempeña un papel importante en las rutas implicadas en el desarrollo de AS y que mediante el tratamiento con CPAP se pueden revertir parcialmente estas alteraciones.

En el caso de miR-320a, en la visita inicial, este miRNA se mostró más elevado en los sujetos con AOS y AS, siendo esta diferencia significativa respecto a los controles. La posible implicación de miR-320a en el desarrollo de AS se reforzó con los resultados obtenidos. Este miRNA se ha relacionado en otros trabajos con el desarrollo de aterosclerosis ^{224,227}, por lo que también podría mediar el desarrollo de placas de ateroma en los pacientes con AOS. En la visita

tras un año de seguimiento, todos los pacientes con AOS mostraron un mayor nivel de miR-320a en sus exosomas circulantes respecto a los de los sujetos control. En este estudio, solo las diferencias respecto a los controles de los pacientes con AOS sin AS con CPAP y de los individuos con AOS y AS sin CPAP fueron significativas. Estos resultados apoyaron la hipótesis de que el tratamiento con CPAP no corrige los niveles de este miRNA. Por ello, es necesario evaluar las posibles implicaciones biológicas que puede conllevar la alteración de este miRNA en los exosomas circulantes y utilizar si fuese necesario algún tratamiento adicional al CPAP para corregirlo.

7. Discusión general

La investigación sobre distintos aspectos de los exosomas ha aumentado durante los últimos 10 años ²²⁸. Actualmente, se conoce su implicación en funciones biológicas como la comunicación célula-célula o la respuesta inmune ²²⁹. Sin embargo, aunque participan en la progresión de distintas patologías, como cáncer ²³⁰⁻²³² o enfermedades cardiovasculares ²³³, su papel y los mecanismos intermedios por los que actúan no están todavía claros. Numerosas investigaciones se han centrado en estudio de su carga, describiendo la presencia de distintas proteínas, lípidos y RNAs en su interior ^{228,234}. Sin embargo, según se avanza en el conocimiento de los exosomas, se continúan describiendo nuevas moléculas presentes en ellos, por lo que todavía se desconoce la totalidad de su contenido. Se ha demostrado la especificidad del contenido exosomal en función del estado biológico o patológico o del tipo celular que los produce ^{75,235,236}. Esta especificidad en su carga, junto a su presencia en fluidos biológicos fácilmente accesibles, los convierte a ellos y su contenido en potenciales biomarcadores. De hecho, las investigaciones realizadas en cáncer y enfermedades cardiovasculares han propuesto que el estudio del contenido exosomal puede ser una oportunidad única para el descubrimiento de biomarcadores y el desarrollo de herramientas de diagnóstico no invasivo ²³⁷⁻²³⁹. A pesar de ello, su uso clínico todavía no ha sido desarrollado.

Una de las mayores barreras en el estudio de los exosomas y su aplicación al diagnóstico clínico es su método de aislamiento. Actualmente, no existe una técnica estándar que proporcione unas características adecuadas para todas las aplicaciones posteriores de los exosomas ^{240,241}. El primer método que se propuso como referencia para el aislamiento de exosomas fue la ultracentrifugación. Esta técnica parecía proporcionar una reproducibilidad y un rendimiento de aislamiento adecuados ^{114,242}. Sin embargo, otros trabajos han mostrado que la ultracentrifugación presenta importantes desventajas como la posibilidad de daño mecánico sobre los exosomas, la ausencia de especificidad en la precipitación, los altos tiempos de trabajo, el coste de los instrumentos y la baja reproducibilidad entre laboratorios ²⁰³. El Estudio I desarrollado en la presente tesis pretendió esclarecer qué metodología era más idónea para el posterior análisis de miRNAs. Para ello, se evaluaron la cromatografía de exclusión molecular (SEC) y un kit comercial basado en la precipitación mediante polímero. La SEC, a pesar de proporcionar

exosomas con un grado de pureza más elevado, presenta una mayor dilución de estos en la muestra final ¹¹⁷. De acuerdo con nuestro trabajo, un estudio recientemente publicado ha mostrado que la técnica de elección para el estudio de miRNAs exosomales es la precipitación mediante kits comerciales ²⁴³. Por ello, y observando los resultados que se obtuvieron en el Estudio I, se concluyó que, cuando se parte de un volumen de muestra reducido, es necesario el uso de kits comerciales que proporcionen una mayor concentración final de exosomas para el posterior análisis de sus miRNAs.

Tras la elección del método de extracción de exosomas más indicado para el análisis del contenido de miRNAs, se realizó el Estudio II en el que se analizaron los niveles de un conjunto de miRNAs a lo largo del tiempo en sujetos control. Los resultados de este trabajo mostraron por primera vez la estabilidad de los miRNAs exosomales obtenidos a partir de muestras extraídas en distintos puntos temporales. Esta característica es de gran importancia para su posible uso como futuros biomarcadores ya que los posibles cambios en estos miRNAs serán consecuencia de un cambio en el estado fisiológico del individuo y no de la propia variabilidad de sus medidas. Este estudio permitió, además, definir la metodología más eficaz para el análisis de estos biomarcadores, seleccionando el kit de precipitación más adecuado y el momento donde se congelaba la muestra para evitar la menor pérdida de señal posible. El efecto de la congelación ha sido estudiado por otros autores en exosomas procedentes de distintos orígenes como la orina o el líquido cefalorraquídeo. En el caso de este último, se observó que distintos ciclos de congelación de los exosomas obtenidos del líquido provocaban la degradación de los miRNAs ²⁴⁴. Estos datos son coherentes con los obtenidos en nuestro estudio, en el que se observó que los miRNAs que se obtenían y analizaban a partir de exosomas sin congelar, aislados de plasma que sí que había sido congelado, mostraban mayores niveles que los que habían sido obtenidos de exosomas sometidos a congelación una vez aislados de plasma sin congelar. Estas mismas conclusiones fueron obtenidas en el caso de los exosomas de orina, en los que se observó que la forma más eficiente para su conservación era mantener criopreservada la muestra de origen ²⁴⁵.

Una vez optimizada la metodología de estudio, el objetivo de los trabajos III y IV fue evaluar los cambios en una batería de miRNAs producidos en pacientes con AOS con y sin AS y

el efecto del tratamiento con CPAP sobre estos. Los miRNA estudiados fueron seleccionados en función a su implicación en procesos aterogénicos, de inflamación o de hipoxia. Este es el primer estudio en el que se evalúan los cambios en los miRNAs exosomales en pacientes adultos con AOS. En el equipo del Dr. Gozal demostraron la importancia de la carga exosomal de miRNAs en relación con el daño endotelial en niños con AOS ¹⁷². En posteriores estudios, el mismo equipo describió la alteración de los miRNAs exosomales en sujetos control sometidos a hipoxia intermitente, provocando además que dichos exosomas promuevan el daño endotelial *in vitro* ¹⁷³, sugiriendo su participación en las comorbilidades cardiovasculares asociadas a la AOS. Estas premisas concuerdan con los resultados que se obtuvieron en el estudio III y IV de esta tesis, en los que se observó cómo alguno de los miRNAs se encontraba alterado en los pacientes con AOS y AS. Concretamente, los que presentaron una mayor variación fueron miR-21 y miR-320a. miR-21 es un miRNA implicado en procesos inflamatorios ^{207,217} e hipoxia ²⁰⁸ y se asocia con el desarrollo de daño endotelial ¹⁸⁵. Por su parte, miR-320a se ha asociado también a procesos aterogénicos ^{224,227}. Por ello, la alteración de ambos miRNAs podría estar implicada en el desarrollo de comorbilidades cardiovasculares en estos pacientes. Al evaluar el efecto de la terapia con CPAP sobre estos miRNAs, se observaron efectos contrarios. Por un lado, miR-21 se corrigió en aquellos pacientes tratados con CPAP, mientras que se encontró elevado en los que no recibieron tratamiento, especialmente en los sujetos que no presentaban AS. Por otro lado, miR-320a no mostró ningún efecto relacionado con el tratamiento con CPAP, ya que, en la visita tras un año de seguimiento, tanto los pacientes con AOS y AS como los pacientes con AOS sin AS, tratados y sin tratar, mostraron niveles elevados para este miRNA. La falta de efecto en los niveles de este miRNA relacionado con la generación de daño endotelial, a pesar de estar recibiendo el tratamiento con CPAP, sugiere la necesidad de utilizar un tratamiento adicional para evitar el riesgo de desarrollar comorbilidades cardiovasculares. Otra hipótesis alternativa es que, la AOS desencadenó procesos relacionados con AS acelerada que se están autoperpetuando pese al tratamiento con CPAP. Esto indicaría la necesidad de llevar a cabo un diagnóstico precoz de la AOS.

La fiabilidad de estos resultados fue comprobada en el Estudio V, en el que se analizaron los 2 miRNAs candidatos en una nueva población. Durante la visita basal, ambos miRNAs volvieron a mostrar unos niveles significativamente elevados en los pacientes con AOS y AS respecto a los controles, lo que refuerza la hipótesis de que estos miRNAs podrían estar implicados en el desarrollo de aterogénesis. En la visita tras un año de seguimiento, miR-21 volvió a mostrarse elevado en aquellos sujetos con AOS sin AS que no recibieron CPAP, lo que confirma la sensibilidad de este miRNA al tratamiento. Por su parte, miR-320a, aunque no mostró unos perfiles tan alterados en los pacientes con AOS con y sin AS, tratados y sin tratar, sí que estaba elevado de manera general en todos ellos, siendo significativo este aumento en el caso de los individuos con AOS sin AS y con CPAP y en aquellos con AOS y AS sin CPAP. Por ello, se confirmó que la terapia con CPAP no controlaba los valores alterados de este miRNA que se encuentra relacionado con el desarrollo de aterosclerosis ^{224,227}.

En resumen, mediante el desarrollo de los cinco estudios de este trabajo de tesis doctoral, hemos optimizado la metodología necesaria para el aislamiento y cuantificación de miRNAs a partir de exosomas circulantes en plasma para su uso como biomarcadores. Hemos demostrado la estabilidad de una batería de miRNAs en sujetos control, paso previo al estudio de los posibles cambios de los mismos asociados a AOS y el riesgo cardiovascular asociado a la misma. De los 11 miRNAs, el incremento de los niveles de miR21 en exosomas de pacientes con AOS y AS, así como la recuperación de los niveles tras el tratamiento con CPAP lo propone como un buen candidato para evaluar el curso de la enfermedad y el efecto del tratamiento. Finalmente, los cambios observados en miR-320a, un miRNA asociado al desarrollo de aterosclerosis, en pacientes con AOS y la falta de respuesta al tratamiento con CPAP sugiere la necesidad de ampliar las terapias en estos pacientes para evitar el daño cardiovascular.

8. Conclusiones

1. La técnica de aislamiento exosomal más eficaz para el posterior análisis de miRNAs es la precipitación mediante el uso de polímeros artificiales.
2. La batería de miRNAs estudiada presentó unos niveles de estabilidad adecuados a lo largo del tiempo en sujetos control, característica fundamental para su posterior uso como biomarcadores.
3. La metodología más eficaz de criopreservación de muestra para evitar la degradación de los miRNAs exosomales es la congelación de la muestra inicial, es decir, el plasma, evitando así los ciclos de congelación de los exosomas ya aislados.
4. Los cambios en los niveles en la visita basal de 4 de los miRNAs (miR-21, miR-145, miR-223 y miR-320a) en los pacientes con AOS en función de la presencia o no de AS asociada, indican que estos marcadores pueden estar implicados en el desarrollo de esta comorbilidad.
5. En la visita tras un año de seguimiento, 3 de los miRNAs (miR-21, miR-126 y miR-143) restituyeron sus valores normales al recibir tratamiento con CPAP, pero miR-320a se mantuvo elevado para todos los grupos de pacientes independientemente del tratamiento con CPAP.
6. La confirmación de los cambios de miR-21 en un grupo distinto de pacientes, así como de su evolución tras un año de tratamiento con CPAP lo propone como biomarcador del riesgo de AS en pacientes con AOS.
7. La confirmación de las alteraciones del miRNA proaterogénico miR320a en dos grupos distintos de pacientes con AOS y AS lo postula como potencial biomarcador de riesgo aterogénico. Sin embargo, sus niveles no se corrigen con el tratamiento con CPAP.

9. Bibliografía

1. Young, T., Peppard, P. E. & Gottlieb, D. J. Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population health perspective. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165, 1217–39 (2002).
2. Javier, F. *et al.* DOCUMENTO DE CONSENSO NACIONAL SOBRE EL SÍNDROME DE APNEAS-HIPOPNEAS DEL SUEÑO (SAHS) REALIZADO POR EL GRUPO ESPAÑOL DE SUEÑO (GES) COMITÉ DE REDACCIÓN Asociación ibérica de Patología del Sueño (AIPS) Asociación Española de Pediatría (AEP) Sociedad Española de Neurología (SEN) COORDINADOR Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR).
3. Young, T. *et al.* The Occurrence of Sleep-Disordered Breathing among Middle-Aged Adults. *N. Engl. J. Med.* 328, 1230–1235 (1993).
4. Young, T., Evans, L., Finn, L. & Palta, M. Estimation of the clinically diagnosed proportion of sleep apnea syndrome in middle-aged men and women. *Sleep* 20, 705–6 (1997).
5. DURÁN, J., ESNAOLA, S., RUBIO, R. & IZTUETA, Á. Obstructive Sleep Apnea–Hypopnea and Related Clinical Features in a Population-based Sample of Subjects Aged 30 to 70 Yr. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163, 685–689 (2001).
6. Wickwire, E. M. & Collop, N. A. Insomnia and Sleep-Related Breathing Disorders. *Chest* 137, 1449–1463 (2010).
7. Ye, L., Pien, G. W. & Weaver, T. E. Gender differences in the clinical manifestation of obstructive sleep apnea. *Sleep Med.* 10, 1075–1084 (2009).
8. Heinzer, R. *et al.* Prevalence of sleep-disordered breathing in the general population: the HypnoLaus study. *Lancet Respir. Med.* 3, 310–318 (2015).
9. Peppard, P. E. *et al.* Increased Prevalence of Sleep-Disordered Breathing in Adults. *Am. J. Epidemiol.* 177, 1006–1014 (2013).
10. Hnin, K. *et al.* The impact of ethnicity on the prevalence and severity of obstructive sleep apnea. *Sleep Med. Rev.* 41, 78–86 (2018).

11. Kapur, V. K. Obstructive sleep apnea: diagnosis, epidemiology, and economics. *Respir. Care* 55, 1155–67 (2010).
12. Young, T., Peppard, P. E. & Taheri, S. Excess weight and sleep-disordered breathing. *J. Appl. Physiol.* 99, 1592–1599 (2005).
13. Durán-Cantolla, J., Mar, J., de La Torre Muñecas, G., Rubio Aramendi, R. & Guerra, L. El síndrome de apneas-hipopneas durante el sueño en España. Disponibilidad de recursos para su diagnóstico y tratamiento en los hospitales del Estado español. *Arch. Bronconeumol.* 40, 259–267 (2004).
14. Marin, J. M., Gascon, J. M., Carrizo, S. & Gispert, J. Prevalence of sleep apnoea syndrome in the Spanish adult population. *Int. J. Epidemiol.* 26, 381–6 (1997).
15. Young, T. *et al.* Burden of sleep apnea: rationale, design, and major findings of the Wisconsin Sleep Cohort study. *WMJ* 108, 246–9 (2009).
16. Fuhrman, C., Fleury, B., Nguyễn, X.-L. & Delmas, M.-C. Symptoms of sleep apnea syndrome: High prevalence and underdiagnosis in the French population. *Sleep Med.* 13, 852–858 (2012).
17. Johns, M. W. Daytime sleepiness, snoring, and obstructive sleep apnea. The Epworth Sleepiness Scale. *Chest* 103, 30–6 (1993).
18. Ysabel Izquierdo-Vicario, Maria-Jose Ramos-Platón, Dolores Conesa-Peraleja, A. B. L.-P. Letter to the Editor Epworth Sleepiness Scale in a Sample of the Spanish Population. 20, (1997).
19. Collop, N. A. *et al.* Clinical guidelines for the use of unattended portable monitors in the diagnosis of obstructive sleep apnea in adult patients. Portable Monitoring Task Force of the American Academy of Sleep Medicine. *J. Clin. Sleep Med.* 3, 737–47 (2007).
20. Lloberes, P. *et al.* Diagnóstico y tratamiento del síndrome de apneas-hipopneas del sueño. *Arch. Bronconeumol.* 47, 143–156 (2011).

21. Shinohara, E. *et al.* Visceral fat accumulation as an important risk factor for obstructive sleep apnoea syndrome in obese subjects. *J. Intern. Med.* 241, 11–8 (1997).
22. Taveira, K. V. M. *et al.* Association between obstructive sleep apnea and alcohol, caffeine and tobacco: A meta-analysis. *J. Oral Rehabil.* 45, 890–902 (2018).
23. Cistulli, P. A. Craniofacial abnormalities in obstructive sleep apnoea: implications for treatment. *Respirology* 1, 167–74 (1996).
24. Weaver, T. E. & Chasens, E. R. Continuous positive airway pressure treatment for sleep apnea in older adults. *Sleep Med. Rev.* 11, 99–111 (2007).
25. MONTSERRAT, J. M. *et al.* Effectiveness of CPAP Treatment in Daytime Function in Sleep Apnea Syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164, 608–613 (2001).
26. Marin, J. M., Carrizo, S. J., Vicente, E., Agusti, A. G. & Marin JM, C. S. *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* 365, 1046–1053 (2005).
27. Punjabi, N. M. *et al.* Sleep-Disordered Breathing and Mortality: A Prospective Cohort Study. *PLoS Med.* 6, e1000132 (2009).
28. Terán-Santos, J., Jimenez-Gomez, A. & Cordero-Guevara, J. The Association between Sleep Apnea and the Risk of Traffic Accidents. *N. Engl. J. Med.* 340, 847–851 (1999).
29. West, S. D., Nicoll, D. J. & Stradling, J. R. Prevalence of obstructive sleep apnoea in men with type 2 diabetes. *Thorax* 61, 945–950 (2006).
30. KAPUR, V. K. *et al.* Association of Hypothyroidism and Obstructive Sleep Apnea. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 158, 1379–1383 (1998).
31. Davi', M. V. *et al.* Sleep apnoea syndrome is highly prevalent in acromegaly and only partially reversible after biochemical control of the disease. *Eur. J. Endocrinol.* 159, 533–540 (2008).

32. Shipley, J. E., Schteingart, D. E., Tandon, R. & Starkman, M. N. Sleep architecture and sleep apnea in patients with Cushing's disease. *Sleep* 15, 514–8 (1992).
33. Kostoglou-Athanassiou, I. & Athanassiou, P. Metabolic syndrome and sleep apnea. *Hippokratia* 12, 81–6 (2008).
34. Bonsignore, M. R. *et al.* Metabolic syndrome, insulin resistance and sleepiness in real-life obstructive sleep apnoea. *Eur. Respir. J.* 39, 1136–1143 (2012).
35. Yaggi, H. K. *et al.* Obstructive Sleep Apnea as a Risk Factor for Stroke and Death. *N. Engl. J. Med.* 353, 2034–2041 (2005).
36. Young, T. *et al.* Sleep disordered breathing and mortality: eighteen-year follow-up of the Wisconsin sleep cohort. *Sleep* 31, 1071–8 (2008).
37. Martínez-García, M. Á. *et al.* Continuous Positive Airway Pressure Treatment Reduces Mortality in Patients with Ischemic Stroke and Obstructive Sleep Apnea. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 180, 36–41 (2009).
38. Campos-Rodriguez, F. *et al.* Cardiovascular Mortality in Women With Obstructive Sleep Apnea With or Without Continuous Positive Airway Pressure Treatment. *Ann. Intern. Med.* 156, 115 (2012).
39. Hla, K. M. *et al.* Sleep apnea and hypertension. A population-based study. *Ann. Intern. Med.* 120, 382–8 (1994).
40. Kendzerska, T., Gershon, A. S., Hawker, G., Tomlinson, G. & Leung, R. S. Obstructive Sleep Apnea and Incident Diabetes. A Historical Cohort Study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 190, 218–225 (2014).
41. Coughlin, S., Mawdsley, L., Mugarza, J. A., Calverley, P. M. A. & Wilding, J. P. H. Obstructive sleep apnoea is independently associated with an increased prevalence of metabolic syndrome. *Eur. Heart J.* 25, 735–741 (2004).
42. Phillips, C. L. & O'Driscoll, D. M. Hypertension and obstructive sleep apnea. *Nat. Sci.*

- Sleep* 5, 43–52 (2013).
43. Nieto, F. J. *et al.* Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea, and hypertension in a large community-based study. Sleep Heart Health Study. *JAMA* 283, 1829–36 (2000).
 44. Peppard, P. E., Young, T., Palta, M. & Skatrud, J. Prospective Study of the Association between Sleep-Disordered Breathing and Hypertension. *N. Engl. J. Med.* 342, 1378–1384 (2000).
 45. Pedrosa, R. P. *et al.* Obstructive Sleep Apnea. *Hypertension* 58, 811–817 (2011).
 46. Drager, L. F., Polotsky, V. Y. & Lorenzi-Filho, G. Obstructive Sleep Apnea. *Chest* 140, 534–542 (2011).
 47. Théry, C., Ostrowski, M. & Segura, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 581–593 (2009).
 48. Simons, M. & Raposo, G. Exosomes – vesicular carriers for intercellular communication. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 575–581 (2009).
 49. Tetta, C., Ghigo, E., Silengo, L., Deregibus, M. C. & Camussi, G. Extracellular vesicles as an emerging mechanism of cell-to-cell communication. *Endocrine* 44, 11–19 (2013).
 50. Mathivanan, S., Ji, H. & Simpson, R. J. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *J. Proteomics* 73, 1907–1920 (2010).
 51. Cocucci, E. & Meldolesi, J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends Cell Biol.* 25, 364–372 (2015).
 52. Harding, C., Heuser, J. & Stahl, P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J. Cell Biol.* 97, 329–39 (1983).
 53. Johnstone, R. M. Revisiting the road to the discovery of exosomes. *Blood Cells, Mol. Dis.* 34, 214–219 (2005).
 54. Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L. & Turbide, C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released

- vesicles (exosomes). *J. Biol. Chem.* 262, 9412–20 (1987).
55. Raposo, G. *et al.* B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* 183, 1161–72 (1996).
 56. Zitvogel, L. *et al.* Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell derived exosomes. *Nat. Med.* 4, 594–600 (1998).
 57. Peters, P. J. *et al.* Molecules relevant for T cell-target cell interaction are present in cytolytic granules of human T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 19, 1469–1475 (1989).
 58. Heijnen, H. F., Schiel, A. E., Fijnheer, R., Geuze, H. J. & Sixma, J. J. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* 94, 3791–9 (1999).
 59. Wolfers, J. *et al.* Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat. Med.* 7, 297–303 (2001).
 60. Caby, M.-P., Lankar, D., Vincendeau-Scherrer, C., Raposo, G. & Bonnerot, C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int. Immunol.* 17, 879–887 (2005).
 61. Lässer, C. *et al.* Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *J. Transl. Med.* 9, 9 (2011).
 62. HOORN, E. J. *et al.* Prospects for urinary proteomics: Exosomes as a source of urinary biomarkers (Review Article). *Nephrology* 10, 283–290 (2005).
 63. Pisitkun, T., Shen, R.-F. & Knepper, M. A. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 13368–13373 (2004).
 64. Witwer, K. W. *et al.* Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J. Extracell. Vesicles* 2, 20360 (2013).
 65. Saman, S. *et al.* Exosome-associated Tau Is Secreted in Tauopathy Models and Is Selectively Phosphorylated in Cerebrospinal Fluid in Early Alzheimer Disease. *J. Biol.*

- Chem.* 287, 3842–3849 (2012).
66. Pan, B. T. & Johnstone, R. M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* 33, 967–78 (1983).
 67. Lakkaraju, A. & Rodriguez-Boulan, E. Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity. *Trends Cell Biol.* 18, 199–209 (2008).
 68. Schorey, J. S. & Bhatnagar, S. Exosome Function: From Tumor Immunology to Pathogen Biology. *Traffic* 9, 871–881 (2008).
 69. van Niel, G., Porto-Carreiro, I., Simoes, S. & Raposo, G. Exosomes: A Common Pathway for a Specialized Function. *J. Biochem.* 140, 13–21 (2006).
 70. Li, P., Kaslan, M., Lee, S. H., Yao, J. & Gao, Z. Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics* 7, 789–804 (2017).
 71. Raposo, G. & Stoorvogel, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* 200, 373–383 (2013).
 72. Li, X.-B., Zhang, Z.-R., Schluesener, H. J. & Xu, S.-Q. Role of exosomes in immune regulation. *J. Cell. Mol. Med.* 10, 364–75
 73. Kadota, T. *et al.* Emerging role of extracellular vesicles as a senescence-associated secretory phenotype: Insights into the pathophysiology of lung diseases. *Mol. Aspects Med.* 60, 92–103 (2018).
 74. Benedikter, B. J. *et al.* Cigarette smoke extract induced exosome release is mediated by depletion of exofacial thiols and can be inhibited by thiol-antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* 108, 334–344 (2017).
 75. Mitsuhashi, M. *et al.* Aging enhances release of exosomal cytokine mRNAs by A β 1-42-stimulated macrophages. *FASEB J.* 27, 5141–50 (2013).
 76. Takasugi, M. *et al.* Small extracellular vesicles secreted from senescent cells promote cancer cell proliferation through EphA2. *Nat. Commun.* 8, 15729 (2017).

77. Eitan, E. *et al.* Age-Related Changes in Plasma Extracellular Vesicle Characteristics and Internalization by Leukocytes. *Sci. Rep.* 7, 1342 (2017).
78. Machida, T. *et al.* MicroRNAs in Salivary Exosome as Potential Biomarkers of Aging. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 21294–21309 (2015).
79. Pienimaeki-Roemer, A. *et al.* Transcriptomic profiling of platelet senescence and platelet extracellular vesicles. *Transfusion* 57, 144–156 (2017).
80. Lambertz, U. *et al.* Small RNAs derived from tRNAs and rRNAs are highly enriched in exosomes from both old and new world *Leishmania* providing evidence for conserved exosomal RNA Packaging. *BMC Genomics* 16, 151 (2015).
81. Pan, J.-H. *et al.* Role of exosomes and exosomal microRNAs in hepatocellular carcinoma: Potential in diagnosis and antitumour treatments (Review). *Int. J. Mol. Med.* 41, 1809–1816 (2018).
82. Kanemoto, S. *et al.* Multivesicular body formation enhancement and exosome release during endoplasmic reticulum stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 480, 166–172 (2016).
83. King, H. W., Michael, M. Z. & Gleadle, J. M. Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. *BMC Cancer* 12, 421 (2012).
84. Wang, X. *et al.* Unique molecular profile of exosomes derived from primary human proximal tubular epithelial cells under diseased conditions. *J. Extracell. Vesicles* 6, 1314073 (2017).
85. van Niel, G., D'Angelo, G. & Raposo, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 213–228 (2018).
86. Hessvik, N. P. & Llorente, A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 193–208 (2018).
87. Kowal, J., Tkach, M. & Théry, C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr. Opin. Cell*

- Biol.* 29, 116–125 (2014).
88. Huotari, J. & Helenius, A. Endosome maturation. *EMBO J.* 30, 3481–3500 (2011).
 89. Henne, W. M., Stenmark, H. & Emr, S. D. Molecular mechanisms of the membrane sculpting ESCRT pathway. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a016766–a016766 (2013).
 90. Colombo, M. *et al.* Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J. Cell Sci.* 126, 5553–5565 (2013).
 91. Tamai, K. *et al.* Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-0 protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 399, 384–90 (2010).
 92. Baietti, M. F. *et al.* Syndecan–syntenin–ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat. Cell Biol.* 14, 677–685 (2012).
 93. Chairoungdua, A., Smith, D. L., Pochard, P., Hull, M. & Caplan, M. J. Exosome release of β -catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *J. Cell Biol.* 190, 1079–91 (2010).
 94. Hurwitz, S. N., Conlon, M. M., Rider, M. A., Brownstein, N. C. & Meckes, D. G. Nanoparticle analysis sheds budding insights into genetic drivers of extracellular vesicle biogenesis. *J. Extracell. Vesicles* 5, 31295 (2016).
 95. Brügger, B. & Bankaitis, V. A. Lipids and vesicular transport. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1821, 1039 (2012).
 96. Mittelbrunn, M. *et al.* Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat. Commun.* 2, 282 (2011).
 97. Phuyal, S., Hessvik, N. P., Skotland, T., Sandvig, K. & Llorente, A. Regulation of exosome release by glycosphingolipids and flotillins. *FEBS J.* 281, 2214–27 (2014).
 98. Yuyama, K., Sun, H., Mitsutake, S. & Igarashi, Y. Sphingolipid-modulated Exosome

- Secretion Promotes Clearance of Amyloid- β by Microglia. *J. Biol. Chem.* 287, 10977–10989 (2012).
99. <http://www.exocarta.org/>.
100. Kourembanas, S. Exosomes: Vehicles of Intercellular Signaling, Biomarkers, and Vectors of Cell Therapy. *Annu. Rev. Physiol.* 77, 13–27 (2015).
101. Zhang, J. *et al.* Exosome and Exosomal MicroRNA: Trafficking, Sorting, and Function. *Genomics. Proteomics Bioinformatics* 13, 17–24 (2015).
102. McKenzie, A. J. *et al.* KRAS-MEK Signaling Controls Ago2 Sorting into Exosomes. *Cell Rep.* 15, 978–987 (2016).
103. Zhang, J. *et al.* Exosome and Exosomal MicroRNA: Trafficking, Sorting, and Function. *Genomics. Proteomics Bioinformatics* 13, 17–24 (2015).
104. Villarroya-Beltri, C. *et al.* Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat. Commun.* 4, 2980 (2013).
105. Shurtleff, M. J., Temoche-Diaz, M. M., Karfilis, K. V, Ri, S. & Schekman, R. Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction. *Elife* 5, (2016).
106. Batagov, A. O. & Kurochkin, I. V. Exosomes secreted by human cells transport largely mRNA fragments that are enriched in the 3'-untranslated regions. *Biol. Direct* 8, 12 (2013).
107. Smith, V. L., Jackson, L. & Schorey, J. S. Ubiquitination as a Mechanism To Transport Soluble Mycobacterial and Eukaryotic Proteins to Exosomes. *J. Immunol.* 195, 2722–2730 (2015).
108. Buschow, S. I., Liefhebber, J. M. P., Wubbolts, R. & Stoorvogel, W. Exosomes contain ubiquitinated proteins. *Blood Cells, Mol. Dis.* 35, 398–403 (2005).
109. Skotland, T., Sandvig, K. & Llorente, A. Lipids in exosomes: Current knowledge and the

- way forward. *Prog. Lipid Res.* 66, 30–41 (2017).
110. Boriachek, K. *et al.* Biological Functions and Current Advances in Isolation and Detection Strategies for Exosome Nanovesicles. *Small* 14, 1702153 (2018).
 111. Carpintero-Fernández, P., Fafián-Labora, J. & O’Loghlen, A. Technical Advances to Study Extracellular Vesicles. *Front. Mol. Biosci.* 4, 79 (2017).
 112. Muller, L., Hong, C.-S., Stolz, D. B., Watkins, S. C. & Whiteside, T. L. Isolation of biologically-active exosomes from human plasma. *J. Immunol. Methods* 411, 55–65 (2014).
 113. Salehi, M. & Sharifi, M. Exosomal miRNAs as novel cancer biomarkers: Challenges and opportunities. *J. Cell. Physiol.* 233, 6370–6380 (2018).
 114. Mathias, R. A., Lim, J. W., Ji, H. & Simpson, R. J. Isolation of Extracellular Membranous Vesicles for Proteomic Analysis. in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 528, 227–242 (2009).
 115. Contreras-Naranjo, J. C., Wu, H.-J. & Ugaz, V. M. Microfluidics for exosome isolation and analysis: enabling liquid biopsy for personalized medicine. *Lab Chip* 17, 3558–3577 (2017).
 116. Jeppesen, D. K. *et al.* Comparative analysis of discrete exosome fractions obtained by differential centrifugation. *J. Extracell. vesicles* 3, 25011 (2014).
 117. Mol, E. A., Goumans, M.-J., Doevendans, P. A., Sluijter, J. P. G. & Vader, P. Higher functionality of extracellular vesicles isolated using size-exclusion chromatography compared to ultracentrifugation. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 13, 2061–2065 (2017).
 118. Lötvall, J. *et al.* Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J. Extracell. vesicles* 3, 26913 (2014).

119. De Toro, J., Herschlik, L., Waldner, C. & Mongini, C. Emerging Roles of Exosomes in Normal and Pathological Conditions: New Insights for Diagnosis and Therapeutic Applications. *Front. Immunol.* 6, 203 (2015).
120. Robbins, P. D. & Morelli, A. E. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 195–208 (2014).
121. Lancaster, G. I. & Febbraio, M. A. Exosome-dependent Trafficking of HSP70. *J. Biol. Chem.* 280, 23349–23355 (2005).
122. Escudier, B. *et al.* Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *J. Transl. Med.* 3, 10 (2005).
123. Andre, F., Escudier, B., Angevin, E., Tursz, T. & Zitvogel, L. Exosomes for cancer immunotherapy. *Ann. Oncol.* 15, iv141-iv144 (2004).
124. Rana, S., Malinowska, K. & Zöller, M. Exosomal tumor microRNA modulates premetastatic organ cells. *Neoplasia* 15, 281–95 (2013).
125. Peinado, H. *et al.* Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat. Med.* 18, 883–891 (2012).
126. Frühbeis, C. *et al.* Neurotransmitter-Triggered Transfer of Exosomes Mediates Oligodendrocyte–Neuron Communication. *PLoS Biol.* 11, e1001604 (2013).
127. Ghidoni, R., Benussi, L. & Binetti, G. Exosomes: The Trojan horses of neurodegeneration. *Med. Hypotheses* 70, 1226–1227 (2008).
128. Chen, L. *et al.* Cardiac progenitor-derived exosomes protect ischemic myocardium from acute ischemia/reperfusion injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 431, 566–571 (2013).
129. Yu, X. *et al.* Mechanism of TNF- α autocrine effects in hypoxic cardiomyocytes: Initiated by hypoxia inducible factor 1 α , presented by exosomes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 53, 848–

- 857 (2012).
130. Sabapatha, A., Gercel-Taylor, C. & Taylor, D. D. Specific Isolation of Placenta-Derived Exosomes from the Circulation of Pregnant Women and Their Immunoregulatory Consequences. *Am. J. Reprod. Immunol.* 56, 345–355 (2006).
 131. Mincheva-Nilsson, L. & Baranov, V. The Role of Placental Exosomes in Reproduction. *Am. J. Reprod. Immunol.* 63, 520–533 (2010).
 132. Esteller, M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat. Rev. Genet.* 12, 861–874 (2011).
 133. Vienberg, S., Geiger, J., Madsen, S. & Dalgaard, L. T. MicroRNAs in metabolism. *Acta Physiol.* 219, 346–361 (2017).
 134. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. & Tuschl, T. Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science (80-.).* 294, 853–858 (2001).
 135. Lee, R. C. & Ambros, V. An Extensive Class of Small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science (80-.).* 294, 862–864 (2001).
 136. Kozomara, A. & Griffiths-Jones, S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 42, D68–D73 (2014).
 137. Vienberg, S., Geiger, J., Madsen, S. & Dalgaard, L. T. MicroRNAs in metabolism. *Acta Physiol.* 219, 346–361 (2017).
 138. Halban, P. A. *et al.* β -cell failure in type 2 diabetes: postulated mechanisms and prospects for prevention and treatment. *Diabetes Care* 37, 1751–8 (2014).
 139. Krützfeldt, J. *et al.* Silencing of microRNAs in vivo with ‘antagomirs’. *Nature* 438, 685–689 (2005).
 140. Min, P.-K. & Chan, S. Y. The biology of circulating microRNAs in cardiovascular disease. *Eur. J. Clin. Invest.* 45, 860–874 (2015).
 141. Provost, P. MicroRNAs as a molecular basis for mental retardation, Alzheimer’s and prion diseases. *Brain Res.* 1338, 58–66 (2010).

142. Saugstad, J. A. MicroRNAs as Effectors of Brain Function with Roles in Ischemia and Injury, Neuroprotection, and Neurodegeneration. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 30, 1564–1576 (2010).
143. Toivonen, J. M. *et al.* MicroRNA-206: A Potential Circulating Biomarker Candidate for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS One* 9, e89065 (2014).
144. Hayes, J., Peruzzi, P. P. & Lawler, S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol. Med.* 20, 460–469 (2014).
145. Chen, Y., Gao, D.-Y. & Huang, L. In vivo delivery of miRNAs for cancer therapy: challenges and strategies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 81, 128–41 (2015).
146. Provost, P. MicroRNAs as a molecular basis for mental retardation, Alzheimer's and prion diseases. *Brain Res.* 1338, 58–66 (2010).
147. Kondkar, A. A. & Abu-Amero, K. K. Utility of Circulating MicroRNAs as Clinical Biomarkers for Cardiovascular Diseases. *Biomed Res. Int.* 2015, 1–10 (2015).
148. Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I. & Diederichs, S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat. Cell Biol.* 11, 228–234 (2009).
149. Weber, J. A. *et al.* The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Clin. Chem.* 56, 1733–1741 (2010).
150. Cuk, K. *et al.* Circulating microRNAs in plasma as early detection markers for breast cancer. *Int. J. Cancer* 132, 1602–1612 (2013).
151. Hunter, M. P. *et al.* Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One* 3, e3694 (2008).
152. Arroyo, J. D. *et al.* Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 5003–5008 (2011).
153. Vickers, K. C., Palmisano, B. T., Shoucri, B. M., Shamburek, R. D. & Remaley, A. T. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density

- lipoproteins. *Nat. Cell Biol.* 13, 423–433 (2011).
154. Kondkar, A. A. & Abu-Amero, K. K. Utility of Circulating MicroRNAs as Clinical Biomarkers for Cardiovascular Diseases. *Biomed Res. Int.* 2015, 1–10 (2015).
 155. Chen, J., Zhao, B., Zhao, J. & Li, S. Potential Roles of Exosomal MicroRNAs as Diagnostic Biomarkers and Therapeutic Application in Alzheimer's Disease. *Neural Plast.* 2017, 1–12 (2017).
 156. Silverman, J. M. *et al.* An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. *J. Cell Sci.* 123, 842–852 (2010).
 157. Bell, E. & Taylor, M. A. Functional Roles for Exosomal MicroRNAs in the Tumour Microenvironment. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 15, 8–13 (2017).
 158. Tomasetti, M., Lee, W., Santarelli, L. & Neuzil, J. Exosome-derived microRNAs in cancer metabolism: possible implications in cancer diagnostics and therapy. *Exp. Mol. Med.* 49, e285–e285 (2017).
 159. Rahman, M. A. *et al.* Lung cancer exosomes as drivers of epithelial mesenchymal transition. *Oncotarget* 7, 54852–54866 (2016).
 160. Chen, J., Zhao, B., Zhao, J. & Li, S. Potential Roles of Exosomal MicroRNAs as Diagnostic Biomarkers and Therapeutic Application in Alzheimer's Disease. *Neural Plast.* 2017, 1–12 (2017).
 161. Hannafon, B. N. & Ding, W.-Q. Intercellular communication by exosome-derived microRNAs in cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 14240–69 (2013).
 162. Tomasetti, M., Lee, W., Santarelli, L. & Neuzil, J. Exosome-derived microRNAs in cancer metabolism: possible implications in cancer diagnostics and therapy. *Exp. Mol. Med.* 49, e285–e285 (2017).
 163. Bell, E. & Taylor, M. A. Functional Roles for Exosomal MicroRNAs in the Tumour

- Microenvironment. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 15, 8–13 (2017).
164. Alipoor, S. D. *et al.* Exosomes and Exosomal miRNA in Respiratory Diseases. *Mediators Inflamm.* 2016, 5628404 (2016).
 165. Khalyfa, A. & Gozal, D. Exosomal miRNAs as potential biomarkers of cardiovascular risk in children. *J. Transl. Med.* 12, 162 (2014).
 166. Sun, Z. *et al.* Effect of exosomal miRNA on cancer biology and clinical applications. *Mol. Cancer* 17, 147 (2018).
 167. Ailawadi, S., Wang, X., Gu, H. & Fan, G.-C. Pathologic function and therapeutic potential of exosomes in cardiovascular disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1852, 1–11 (2015).
 168. Gao, H. *et al.* Intermittent hypoxia caused cognitive dysfunction relate to miRNAs dysregulation in hippocampus. *Behav. Brain Res.* 335, 80–87 (2017).
 169. Li, K., Wei, P., Qin, Y. & Wei, Y. MicroRNA expression profiling and bioinformatics analysis of dysregulated microRNAs in obstructive sleep apnea patients. *Medicine (Baltimore)*. 96, e7917 (2017).
 170. Li, K., Chen, Z., Qin, Y. & Wei, Y. MiR-664a-3p expression in patients with obstructive sleep apnea. *Medicine (Baltimore)*. 97, e9813 (2018).
 171. Sánchez-de-la-Torre, M. *et al.* Precision Medicine in Patients With Resistant Hypertension and Obstructive Sleep Apnea. *J. Am. Coll. Cardiol.* 66, 1023–1032 (2015).
 172. Khalyfa, A. *et al.* Circulating Plasma Extracellular Microvesicle MicroRNA Cargo and Endothelial Dysfunction in Children with Obstructive Sleep Apnea. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 194, 1116–1126 (2016).
 173. Khalyfa, A. *et al.* Effect on Intermittent Hypoxia on Plasma Exosomal Micro RNA Signature and Endothelial Function in Healthy Adults. *Sleep* 39, 2077–2090 (2016).
 174. Almendros, I. *et al.* Tumor Cell Malignant Properties Are Enhanced by Circulating

- Exosomes in Sleep Apnea. *Chest* 150, 1030–1041 (2016).
175. Khalyfa, A. *et al.* Circulating exosomes potentiate tumor malignant properties in a mouse model of chronic sleep fragmentation. *Oncotarget* 7, 54676–54690 (2016).
 176. Khalyfa, A. *et al.* Sleep-disordered breathing, circulating exosomes, and insulin sensitivity in adipocytes. *Int. J. Obes.* 42, 1127–1139 (2018).
 177. Bhattacharjee, R. *et al.* Exosomal Cargo Properties, Endothelial Function and Treatment of Obesity Hypoventilation Syndrome: A Proof of Concept Study. *J. Clin. Sleep Med.* 14, 797–807 (2018).
 178. Marin, J. M. *et al.* Epigenetics modifications and Subclinical Atherosclerosis in Obstructive Sleep Apnea: The EPIOSA study. *BMC Pulm. Med.* 14, 114 (2014).
 179. Muntendam, P. *et al.* The BioImage Study: Novel approaches to risk assessment in the primary prevention of atherosclerotic cardiovascular disease—study design and objectives. *Am. Heart J.* 160, 49–57.e1 (2010).
 180. Lässer, C., Eldh, M. & Lötvall, J. Isolation and Characterization of RNA-Containing Exosomes. *J. Vis. Exp.* (2012). doi:10.3791/3037
 181. Lange, T. *et al.* Identification of miR-16 as an endogenous reference gene for the normalization of urinary exosomal miRNA expression data from CKD patients. *PLoS One* 12, e0183435 (2017).
 182. Stamova, B. S. *et al.* Identification and validation of suitable endogenous reference genes for gene expression studies in human peripheral blood. *BMC Med. Genomics* 2, 49 (2009).
 183. Kirschner, M. B. *et al.* The Impact of Hemolysis on Cell-Free microRNA Biomarkers. *Front. Genet.* 4, 94 (2013).
 184. Shah, J. S., Soon, P. S. & Marsh, D. J. Comparison of Methodologies to Detect Low Levels of Hemolysis in Serum for Accurate Assessment of Serum microRNAs. *PLoS One* 11, e0153200 (2016).

185. Cengiz, M. *et al.* Circulating miR-21 and eNOS in subclinical atherosclerosis in patients with hypertension. *Clin. Exp. Hypertens.* 37, 643–649 (2015).
186. Zuo, K. *et al.* MiR-21 suppresses endothelial progenitor cell proliferation by activating the TGF β signaling pathway via downregulation of WWP1. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 414–22 (2015).
187. Schober, A. *et al.* MicroRNA-126-5p promotes endothelial proliferation and limits atherosclerosis by suppressing Dlk1. *Nat. Med.* 20, 368–376 (2014).
188. Sala, F. *et al.* MiR-143/145 deficiency attenuates the progression of atherosclerosis in Ldlr $^{-/-}$ mice. *Thromb. Haemost.* 112, 796–802 (2014).
189. Xu, R.-H., Liu, B., Wu, J.-D., Yan, Y.-Y. & Wang, J.-N. miR-143 is involved in endothelial cell dysfunction through suppression of glycolysis and correlated with atherosclerotic plaques formation. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 20, 4063–4071 (2016).
190. Li, J. & Zhang, S. microRNA-150 inhibits the formation of macrophage foam cells through targeting adiponectin receptor 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 476, 218–224 (2016).
191. Chen, M., Shen, C., Zhang, Y. & Shu, H. MicroRNA-150 attenuates hypoxia-induced excessive proliferation and migration of pulmonary arterial smooth muscle cells through reducing HIF-1 α expression. *Biomed. Pharmacother.* 93, 861–868 (2017).
192. Yang, D., Wang, J., Xiao, M., Zhou, T. & Shi, X. Role of Mir-155 in Controlling HIF-1 α Level and Promoting Endothelial Cell Maturation. *Sci. Rep.* 6, 35316 (2016).
193. Robertson, E. D., Wasylyk, C., Ye, T., Jung, A. C. & Wasylyk, B. The Oncogenic MicroRNA Hsa-miR-155-5p Targets the Transcription Factor ELK3 and Links It to the Hypoxia Response. *PLoS One* 9, e113050 (2014).
194. Camps, C. *et al.* Integrated analysis of microRNA and mRNA expression and association with HIF binding reveals the complexity of microRNA expression regulation under hypoxia. *Mol. Cancer* 13, 28 (2014).

195. Xue, Y. *et al.* MicroRNA-19b/221/222 induces endothelial cell dysfunction via suppression of PGC-1 α in the progression of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 241, 671–681 (2015).
196. Dai, G.-H. *et al.* MicroRNA-223-3p Inhibits the Angiogenesis of Ischemic Cardiac Microvascular Endothelial Cells via Affecting RPS6KB1/hif-1a Signal Pathway. *PLoS One* 9, e108468 (2014).
197. Zeng, Y. *et al.* MicroRNA-223 Attenuates Hypoxia-induced Vascular Remodeling by Targeting RhoB/MLC2 in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells. *Sci. Rep.* 6, 24900 (2016).
198. Chen, C. *et al.* MiR-320a contributes to atherogenesis by augmenting multiple risk factors and down-regulating SRF. *J. Cell. Mol. Med.* 19, 970–985 (2015).
199. Wang, Y.-S. *et al.* Let-7g suppresses both canonical and non-canonical NF- κ B pathways in macrophages leading to anti-atherosclerosis. *Oncotarget* 8, 101026–101041 (2017).
200. Bhattacharjee, R. *et al.* Exosomal Cargo Properties, Endothelial Function and Treatment of Obesity Hypoventilation Syndrome: A Proof of Concept Study. *J. Clin. Sleep Med.* 14, 797–807 (2018).
201. Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L. & Zhang, B. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol. Biol.* 80, 75–84 (2012).
202. Schmittgen, T. D. & Livak, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–8 (2008).
203. Li, P., Kaslan, M., Lee, S. H., Yao, J. & Gao, Z. Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics* 7, 789–804 (2017).
204. Alvarez, M. L., Khosroheidari, M., Kanchi Ravi, R. & DiStefano, J. K. Comparison of protein, microRNA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers. *Kidney Int.* 82, 1024–1032

- (2012).
205. Laulagnier, K. *et al.* Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *Biochem. J.* 380, 161–71 (2004).
 206. Ailawadi, S., Wang, X., Gu, H. & Fan, G.-C. Pathologic function and therapeutic potential of exosomes in cardiovascular disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1852, 1–11 (2015).
 207. Sheedy, F. J. Turning 21: Induction of miR-21 as a Key Switch in the Inflammatory Response. *Front. Immunol.* 6, 19 (2015).
 208. Lacedonia, D. *et al.* MicroRNA expression profile during different conditions of hypoxia. *Oncotarget* 9, 35114–35122 (2018).
 209. McNicholas, W. T. Obstructive Sleep Apnea and Inflammation. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 51, 392–399 (2009).
 210. Ryan, S., Taylor, C. T. & McNicholas, W. T. Systemic inflammation: a key factor in the pathogenesis of cardiovascular complications in obstructive sleep apnoea syndrome? *Postgrad. Med. J.* 85, 693–698 (2009).
 211. Du, W. *et al.* Age-associated vascular inflammation promotes monocytosis during atherogenesis. *Aging Cell* 15, 766–77 (2016).
 212. Liu, K. *et al.* Expression levels of atherosclerosis-associated miR-143 and miR-145 in the plasma of patients with hyperhomocysteinaemia. *BMC Cardiovasc. Disord.* 17, 163 (2017).
 213. Zhang, Y.-N. *et al.* Phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in the ‘normal region’ of aorta from atherosclerosis patients is regulated by miR-145. *J. Cell. Mol. Med.* 20, 1049–61 (2016).
 214. Poon, K.-S. *et al.* Plasma exosomal miR-223 expression regulates inflammatory responses during cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Sci. Rep.* 7, 10807 (2017).

215. Marin, J. M., Carrizo, S. J., Vicente, E. & Agustí, A. G. N. Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study. *Lancet (London, England)* 365, 1046–53 (2005).
216. Phillips, C. L. *et al.* Health Outcomes of Continuous Positive Airway Pressure versus Oral Appliance Treatment for Obstructive Sleep Apnea. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 187, 879–887 (2013).
217. Yang, L. *et al.* MicroRNA-21 prevents excessive inflammation and cardiac dysfunction after myocardial infarction through targeting KBTBD7. *Cell Death Dis.* 9, 769 (2018).
218. Ren, J. *et al.* Characterization of exosomal RNAs derived from human gastric cancer cells by deep sequencing. *Tumor Biol.* 39, 101042831769501 (2017).
219. Gao, J. *et al.* Plasma miR-126 and miR-143 as Potential Novel Biomarkers for Cerebral Atherosclerosis. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 28, 38–43 (2019).
220. Matsuzaki, J. & Ochiya, T. Extracellular microRNAs and oxidative stress in liver injury: a systematic mini review. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 63, 6–11 (2018).
221. Mury, P. *et al.* Oxidative Stress and Inflammation, Key Targets of Atherosclerotic Plaque Progression and Vulnerability: Potential Impact of Physical Activity. *Sport. Med.* 48, 2725–2741 (2018).
222. Eichhorn, L. *et al.* Sustained apnea induces endothelial activation. *Clin. Cardiol.* 40, 704–709 (2017).
223. Panigrahi, G. K. *et al.* Exosomal microRNA profiling to identify hypoxia-related biomarkers in prostate cancer. *Oncotarget* 9, 13894–13910 (2018).
224. Schrottmaier, W. C., Oskolkova, O. V., Schabbauer, G. & Afonyushkin, T. MicroRNA miR-320a modulates induction of HO-1, GCLM and OKL38 by oxidized phospholipids in endothelial cells. *Atherosclerosis* 235, 1–8 (2014).

225. Larsen, L. *et al.* Expression and Localization of microRNAs in Perinatal Rat Pancreas: Role of miR-21 in Regulation of Cholesterol Metabolism. *PLoS One* 6, e25997 (2011).
226. SUN, C. *et al.* miR-21 regulates triglyceride and cholesterol metabolism in non-alcoholic fatty liver disease by targeting HMGCR. *Int. J. Mol. Med.* 35, 847–853 (2015).
227. Chen, C. *et al.* MiR-320a contributes to atherogenesis by augmenting multiple risk factors and down-regulating SRF. *J. Cell. Mol. Med.* 19, 970–985 (2015).
228. Schey, K. L., Luther, J. M. & Rose, K. L. Proteomics characterization of exosome cargo. *Methods* 87, 75–82 (2015).
229. Admyre, C. *et al.* Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J. Immunol.* 179, 1969–78 (2007).
230. Boyiadzis, M. & Whiteside, T. L. The emerging roles of tumor-derived exosomes in hematological malignancies. *Leukemia* 31, 1259–1268 (2017).
231. Javeed, N. & Mukhopadhyay, D. Exosomes and their role in the micro-/macro-environment: a comprehensive review. *J. Biomed. Res.* 31, 386–394 (2017).
232. Steinbichler, T. B., Dudás, J., Riechelmann, H. & Skvortsova, I.-I. The role of exosomes in cancer metastasis. *Semin. Cancer Biol.* 44, 170–181 (2017).
233. Boulanger, C. M., Loyer, X., Rautou, P.-E. & Amabile, N. Extracellular vesicles in coronary artery disease. *Nat. Rev. Cardiol.* 14, 259–272 (2017).
234. Keerthikumar, S. *et al.* ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *J. Mol. Biol.* 428, 688–692 (2016).
235. Soung, Y. H., Ford, S., Zhang, V. & Chung, J. Exosomes in Cancer Diagnostics. *Cancers (Basel)*. 9, (2017).
236. Diaz-Hidalgo, L. *et al.* Transglutaminase type 2-dependent selective recruitment of proteins into exosomes under stressful cellular conditions. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1863, 2084–2092 (2016).

237. Thind, A. & Wilson, C. Exosomal miRNAs as cancer biomarkers and therapeutic targets. *J. Extracell. Vesicles* 5, 31292 (2016).
238. Nuzhat, Z. *et al.* Tumour-derived exosomes as a signature of pancreatic cancer - liquid biopsies as indicators of tumour progression. *Oncotarget* 8, 17279–17291 (2017).
239. Chistiakov, D., Orekhov, A. & Bobryshev, Y. Cardiac Extracellular Vesicles in Normal and Infarcted Heart. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 63 (2016).
240. Mateescu, B. *et al.* Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA - an ISEV position paper. *J. Extracell. vesicles* 6, 1286095 (2017).
241. Taylor, D. D. & Shah, S. Methods of isolating extracellular vesicles impact down-stream analyses of their cargoes. *Methods* 87, 3–10 (2015).
242. Fernández-Llama, P. *et al.* Tamm-Horsfall protein and urinary exosome isolation. *Kidney Int.* 77, 736–742 (2010).
243. Zhao, L. *et al.* Isolation and Identification of miRNAs in exosomes derived from serum of colon cancer patients. *J. Cancer* 8, 1145–1152 (2017).
244. Akers, J. C. *et al.* Optimizing preservation of extracellular vesicular miRNAs derived from clinical cerebrospinal fluid. *Cancer Biomarkers* 17, 125–132 (2016).
245. Channavajjhala, S. K. *et al.* Optimizing the purification and analysis of miRNAs from urinary exosomes. *Clin. Chem. Lab. Med.* 52, 345–54 (2014).

10. *Abreviaturas*

AF: Exosomas aislados tras la congelación del plasma

AGO2: Argonauta 2

Alix: *ALG-2-interacting protein X*

AOS: Apnea obstructiva del sueño

Apo A: Apolipoproteína A

Apo B: Apolipoproteína B

AS: Aterosclerosis subclínica

BCA: Ensayo del ácido bicinconánico

BF: Exosomas aislados a partir de plasma fresco y congelados tras su aislamiento hasta su posterior uso

CD63: *Tetraspanin 30*

CD81: *Tetraspanin 28*

CD82: *Tetraspanin 27*

CD9: *Tetraspanin 29*

cDNA: DNA complementario

CEICA: Comité de Ética de la Investigación de la Comunidad de Aragón

CMVs: Cuerpos multivesiculares

CPAP: Presión positiva continua de aire (*Continuous Positive Airway Pressure*)

CRP: Proteína C-reactiva de alta sensibilidad

Ct: Ciclo que cruza el umbral de fluorescencia (*Cycle Treshold*)

CT90: Porcentaje del tiempo por debajo del 90% de saturación de oxígeno

CV: Coeficiente de variabilidad

CVS: Cardiovasculares

CytC: *Cytocrome C*

DE, SD: Desviación estándar

DLS: Ensayo de difracción dinámica de la luz (*Dinamic Light Scattering*)

DNA: Ácido desoxiribonucleico

ECV: enfermedades cardiovasculares

EPIOSA: *Epigenetics modifications and Subclinical Atherosclerosis in Obstructive Sleep Apnea*

ESCRT: *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*

ESD: Excesiva somnolencia diurna

EX: Exosomas aislados con el kit de Exiqon

FC, TC: Tasa de cambio (*Fold Change*)

GM130: *Golgi Matrix Protein*

HDL: Lipoproteínas de alta densidad (*High Density Lipoprotein*)

HI: Hipoxia intermitente

HIF-1: *Hypoxia Inducible Factor 1*

hnRNPA2B1: Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A2/B1

HSP70: *Heat Shock Protein 70*

HTA: Hipertensión arterial

IAH: Índice de apnea hipoapnea

IMC: Índice de masa corporal

IMT: *Intima-Media Thickness*

INA: Instituto de Nanociencia de Aragón

ISEV: Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (*International Society for Extracellular Vesicles*)

kDa: Kilo Dalton

LDL: Lipoproteínas de baja densidad (*Low Density Lipoprotein*).

lncRNA: RNA largo no codificante

miRNA: MicroRNAs

NK: *Natural Killer*

NTA: *Nanoparticle Tracking Analysis*

PBS: Tampón fosfato salino

PR: Poligrafía respiratoria

PSG: Polisomnografía convencional

RISC: *RNA-induced silencing complex*

RNA: Ácido ribonucleico (*Ribonucleic Acid*)

ROX: Fluoróforo

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

SAHS: Síndrome de Apnea-Hipoapnea del Sueño

SaO₂: Saturación de oxígeno

SAOS: Síndrome de apnea-hipopnea del sueño

SD: Desviación estándar

SDS: Dodecil sulfato sodico

SEC: Cromatografía de exclusión molecular (*Size Exclusion Chromatography*)

SEPAR: Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica

SNS: Sistema nervioso simpático

SRF: Factor de respuesta del Suero

TA: Temperatura ambiente

TAS: Tensión Arterial Sistólica

TAD: Tensión Arterial Diastólica

TC1: Células tumorales de pulmón

TEM: Microscopia electrónica de transmisión (*Transmission Electron Microscopy*)

TF: Exosomas aislados con el kit de ThermoFisher

TNF- α : Tumor Necrosis Factor α

TRSP- *Tunable Resistive Pulse Sensing*

TSG101: *Tumor Susceptibility 101*

TTBS: *Tween 20, tris-buffered saline*

UIT: Unidad de Investigación Traslacional

VAS: Vía aérea superior

VE: Vesículas extracelulares

VILs: Vesículas intraluminales

YBX1: *Y-Box Binding Protein 1*