

Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Bioquímica

Estudio de la Inmunidad Innata en pacientes con Apnea Obstructiva del Sueño: Un microambiente favorable para el progreso tumoral.

TESIS DOCTORAL

Enrique Hernández Jiménez

Madrid, 2016



Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid

# Estudio de la Inmunidad Innata en pacientes con Apnea Obstructiva del Sueño: Un microambiente favorable para el progreso tumoral.

Enrique Hernández Jiménez  
Licenciado en Biotecnología

Directores de Tesis:

Dr. Eduardo Manuel López-Collazo

Dr. Francisco García Río

Instituto de Investigación Sanitaria, IdiPAZ

Hospital Universitario de la Paz



EDUARDO MANUEL LÓPEZ COLLAZO, DOCTOR EN FARMACIA E INVESTIGADOR DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ Y FRANCISCO GARCÍA RIO, PROFESOR TITULAR DE MEDICINA Y JEFE DE SECCIÓN DE NEUMOLOGÍA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ,

CERTIFICAN

Que el trabajo que presenta don, ENRIQUE HERNÁNDEZ JIMÉNEZ, titulado “Estudio de la Inmunidad innata en pacientes con Apnea Obstructiva del Sueño: Un microambiente favorable para el progreso tumoral”, ha sido realizado bajo nuestra dirección y consideramos que reúne los requisitos de originalidad y rigor metodológico necesarios para ser presentado como Memoria de Tesis Doctoral.

Madrid 11 de abril de 2016

Eduardo López-Collazo

Francisco García Rio



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directores de tesis Eduardo y Fran, ya que sin ellos este trabajo no había sido posible. Quiero agradecer a Eduardo la oportunidad que me brinda para trabajar en su laboratorio, y a pesar de que las primeras impresiones no siempre son buenas, nos han dado buenas carcajadas a posteriori. Gracias por todo lo que he aprendido tanto en ciencia como fuera de ella.

Gracias a mis compañeros de laboratorio, de los que me han enseñado y a los que he enseñado, los que están y los que hace tiempo se fueron; los días de trabajo no serían lo mismo sin ellos. En especial a Víctor y Aurora que han puesto orden en mi caótica cabeza y se han hecho cargo de buena carga experimental de este trabajo y de otros muchos. También a mi compañera Carolina por soportar todas mis absurdos, en este caso el caos aumentaba pero siempre con buenos resultados. También agradecer a las últimas adquisiciones del laboratorio: Enrique, Marta, Anibal, Jose G, Jose J y Cristina por apoyarme y confiar en mí.

Gracias a mi familia por todo; mis logros son vuestros logros. En especial a mis padres, que me han dejado de herencia lo que más aprecio en esta vida, la posibilidad de estudiar y aprender sin restricciones.

Gracias a mis compañeros de piso por hacerme sentir Madrid como si estuviera en casa cada vez que volvía de trabajar.

Por último gracias a todos aquellos que me han marcado en la vida por sus enseñanzas, por sus consejos, por su gran tolerancia y afinidad. Personas que simplemente las quieres tener en tu vida, que hacen un día cualquiera en un plan perfecto; gracias a mis amigos.





*"Ahí va... Uno de los prototipos de Dios. Un mutante ni siquiera considerado para su producción en masa. Raro para vivir, y escaso para morir."*

*Fear and Loathing in Las Vegas.*



## RESUMEN

La Apnea Obstructiva del Sueño (OSA, del inglés *obstructive sleep apnea*) es un síndrome caracterizado por pausas repetitivas en la respiración, inducidas por un colapso parcial o completo de las vías respiratorias superiores durante el sueño. El seguimiento de varias cohortes de pacientes con OSA ha sugerido una alta incidencia de tumores. En este sentido, la hipoxia intermitente, principal característica de OSA, se ha propuesto como el principal factor desencadenante de tumores en estos pacientes. Curiosamente, a pesar del papel crucial que juega el sistema inmune en la génesis y evolución de los procesos tumorales, esto no ha sido explorado en profundidad en esta patología.

En este proyecto hemos estudiado diferentes poblaciones del sistema inmune en los pacientes con OSA, así como su interacción. Los monocitos aislados de estos pacientes expresan un conjunto de genes asociados a un fenotipo alternativo también conocido como TAM (del inglés *tumor associated macrophages*). Estas células exhiben una marcada actividad pro-tumoral siendo capaces de controlar la actividad citotóxica de las células *Natural Killer*. Esta regulación de la citotoxicidad se da a través de la liberación de la forma activa del Factor de Crecimiento Tumoral  $\beta$  por parte de los monocitos en condiciones de hipoxia intermitente.

En el momento que se realiza este estudio, pocos son los reportes que existen sobre los mecanismos celulares y moleculares que explican la incidencia de tumores en pacientes con OSA. Los datos aquí presentados indagan nuevas vías fisiopatológicas en las que la respuesta inmune innata, influenciada por la hipoxia intermitente, cobra gran relevancia en la aparición de un ambiente favorable a la aparición de tumores dentro del contexto OSA. Por otra parte, hemos confirmado que la restauración de la oxigenación adecuada revierte los efectos observados en el sistema inmune, evitando el deterioro de la respuesta inmune anti-tumoral.



## ABSTRACT

Obstructive sleep apnea (OSA) is a syndrome characterized by repetitive pauses of breathing induced by a partial or complete collapse of upper airways during sleep. Intermittent hypoxia (IH), a hallmark characteristic of OSA, has been proposed to be a major determinant of cancer development, and patients with OSA are at a higher risk of tumors; however, the relevance of the innate immune system remains undetermined.

Herein, we have demonstrated that Monocytes from patients with OSA exhibited tumor-promoting activity and regulated NK cell maturation. The latter's suppressive capacity was due to the monocyte surface expression of glycoprotein-A repetitions predominant protein, its interaction with the surrounding TGF $\beta$ -latency-associated-peptide and subsequently, the release of the active form of TGF $\beta$  during IH. In contrast, monocytes isolated from patients treated with continuous positive airway pressure for more than 6 months lacked the tumor-promoting and suppressive capacity of their OSA counterparts. IH modulates the immune response against tumor growth through crosstalk between monocytes and NK cells via TGF $\beta$ . The suppression of sleep apneas with restoration of an adequate oxygenation leads to recovery of the normal immune response in patients with OSA, demonstrating the plasticity of innate immune system.

The mechanisms linking OSA and cancer have scarcely been explored and, in our knowledge, this is the first study performed on humans to address the pathophysiological pathways that might explain the association between both entities.



# CONTENIDO

Resumen.....	11
Abstract .....	13
ÍNDICE DE TABLAS .....	17
ÍNDICE DE FIGURAS .....	17
ABREVIATURAS.....	19
1. INTRODUCCIÓN.....	23
1.1 Apnea Obstructiva del Sueño.....	23
1.1.1 Prevalencia .....	23
1.1.2 Manifestaciones clínicas .....	23
1.1.3 Diagnóstico y variables clínicas .....	24
1.1.4 Tratamiento.....	25
1.1.5 Asociación entre Cáncer y OSA .....	26
1.2 Sistema Inmune.....	28
1.2.1 Monocitos/Macrófagos Asociados a Tumores.....	29
1.2.2 Células Natural Killer .....	31
1.3 Factor de Crecimiento Tumoral $\beta$ .....	33
1.3.1. Señalización.....	34
1.3.2. Actividad biológica sobre el Sistema Inmune .....	34
2. OBJETIVOS .....	39
2.1 Objetivo general:.....	39
2.3 Objetivos específicos:.....	39
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
3.1 Reactivos .....	43
3.2 Sujetos reclutados.....	43
3.3 Recogida, aislamiento y cultivo de células mononucleares de sangre periférica.....	44

3.4 Cultivo celular.....	44
3.5 Análisis por citometría de flujo. ....	45
3.6 Formación de esferas tumorales y ensayo de viabilidad celular .....	46
3.7 Ensayo de citotoxicidad.....	46
3.8 Aislamiento de RNA y síntesis de cDNA .....	46
3.9 PCR cuantitativa a tiempo real.....	46
3.10 Determinación de TGFβ1 .....	48
3.11 Estudios de sobreexpresión .....	48
3.12 Análisis estadístico .....	48
4. RESULTADOS .....	51
4.1 Características clínicas de los participantes incluidos en el estudio.....	51
4.2 Marcadores moleculares asociados a hipoxia en células circulantes de la sangre de los participantes. ....	51
4.3 Correlaciones entre los parámetros clínicos y los marcadores moleculares asociados a hipoxia.....	53
4.4 Perfil transcripcional y funcionalidad de Monocitos aislados de pacientes OSA, CPAP y HV.....	54
4.5 Simulación <i>in vitro</i> de hipoxia intermitente en Monocitos CD14 <sup>+</sup> aislados de VS. ....	57
4.6 Distribución de los diferentes subtipos celulares con conocida actividad anti-tumoral. .	59
4.6.1 Análisis fenotípico de las células Natural Killer.....	60
4.9 Análisis de TGFβ en pacientes OSA, CPAP y HV. ....	64
4.10 Correlación entre el parámetro clínico CT90 y el análisis inmunológico de las células de la sangre de los pacientes OSA.....	65
4.11 Exposición bajo condiciones de normoxia <i>ex vivo</i> a las células circulantes de los pacientes OSA. ....	66
4.11 Comunicación celular entre monocitos y células NK mediada por la activación de TGFβ. ....	67
5. DISCUSIÓN .....	73



6. CONCLUSIONES .....	81
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	85
ANEXO I .....	93

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los pacientes que sufren OSA .....	25
Tabla 2. Anticuerpos de citometría usados en este trabajo. ....	45
Tabla 3. Listado de cebadores.....	47
Tabla 4. Características clínicas de los sujetos estudiados. ....	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución de la incidencia acumulada de nuevos casos de cáncer en función de la CT90 en pacientes que sufren OSA (modificada de Campos-Rodriguez, <i>et al</i> , 2013).....	26
Figura 2. Modelo de hipoxia intermitente en ratones (modificada de Almendros, <i>et al</i> , 2013).27	
Figura 3. Distribución poblacional de células Treg circulantes en sujetos sanos ( <i>control</i> ), pacientes con OSA leve-moderada ( <i>Mild to moderate</i> ) y con OSA grave ( <i>Severe</i> ) (modificada de Lu, <i>et al</i> , 2012).....	28
Figura 4. Características fenotípicas de M $\phi$ .....	31
Figura 5. Esquema de receptores y actividad en los diferentes subtipos de NKs en circulación (modificado de Cooper, <i>et al</i> , 2001). ....	32
Figura 6. Representación esquemática de la secreción y activación del TGF $\beta$ (modificado de Massague, <i>et al</i> , 2005). ....	34
Figura 7. Efectos del TGF $\beta$ sobre las distintas poblaciones del sistema inmune (modificado de Massague, <i>et al</i> , 2003). ....	35
Figura 8. Esquema de aislamiento de PBMCs antes y después de la centrifugación por gradiente de Ficoll.....	44
Figura 9. Perfil clínico y molecular de los participantes incluidos en el estudio.....	53

Figura 10. Correlación entre los parámetros clínicos (AHI y CT90) y los marcadores moleculares asociados a hipoxia. ....	54
Figura 11. Perfil de expresión transcripcional en monocitos CD14 <sup>+</sup> aislados de los participantes. ....	55
Figura 12. Actividad anti-tumoral de monocitos CD14 <sup>+</sup> aislados de los participantes. ....	56
Figura 13. Perfil de expresión transcripcional en monocitos CD14 <sup>+</sup> sometidos a hipoxia intermitente. ....	57
Figura 14. Perfil de expresión de genes asociados a TAM en monocitos CD14 <sup>+</sup> en los que se sobre-expresa HIF1 $\alpha$ . ....	58
Figura 15. Actividad pro-tumoral de monocitos CD14 <sup>+</sup> sometidos a hipoxia intermitente. ....	59
Figura 16. Distribución de las poblaciones linfocitarias con reconocida actividad citotóxica. ...	60
Figura 17. Fenotipo y funcionalidad de las células NK aisladas de los participantes. ....	61
Figura 18. Estado de madurez del subtipo CD3 <sup>-</sup> CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup> en NK aisladas de pacientes OSA. ....	62
Figura 19. Fenotipo y citotoxicidad de células NK sometidas a hipoxia intermitente. ....	63
Figura 20. Análisis y actividad biológica del TGF $\beta$ en el suero de pacientes OSA, CPAP y VS. ....	64
Figura 21. Análisis de las poblaciones inmunes asociadas al TGF $\beta$ en pacientes OSA, CPAP y VS. ....	65
Figura 22. Correlación entre el parámetro clínico CT90 y la distribución de los fenotipos inmunes. ....	66
Figura 23. PBMCs de pacientes OSA graves tratados de forma <i>ex vivo</i> a condiciones de normoxia. ....	67
Figura 24. Expresión de TGF $\beta$ -LAP por monocitos CD14 <sup>+</sup> sometidos a hipoxia intermitente. ....	68
Figura 25. Regulación de la población de NK citotóxicas por monocitos CD14 <sup>+</sup> GARP <sup>+</sup> TGF $\beta$ -LAP <sup>high</sup> sometidos a hipoxia intermitente a través de la activación del TGF $\beta$ 1. ....	69
Figura 26. Esquema representativo del mecanismo de interacción entre el monocito y la célula NK en pacientes con OSA, favoreciendo el crecimiento tumoral. ....	76

## ABREVIATURAS

(Para conseguir más fluidez en el manuscrito, hemos optado por mantener las abreviaturas inglesas de la mayoría de los factores, moléculas, índice, etcétera que hacemos referencia)

**AHI:** Apnea-Hypopnea Index

**APC:** Antigen Processing Cells

**CPAP:** Continuous Positive Airway Pressure

**CT90:** Cumulative time spent below an oxygen saturation of 90%.

**DCs:** Dendritic Cells.

**DE:** Desviación Estándar

**DMEN:** Dulbecco's Modified Eagle's medium

**ESS:** Epworth Sleepiness Scale

**EOMES:** Eomesodermin

**FBS:** Fetal Bovine Serum

**Foxp3:** Forkhead box P3

**GARP:** Glycoprotein A Repetitions Predominant

**HIF:** Hypoxia-Inducible Factor

**HLA:** Human Leukocyte Antigen

**IFN $\gamma$ :** Interferon gamma

**IL:** Interleukin

**KIR:** Killer Immunoglobulin Receptor

**LAP:** latency-associated peptide

**M $\pm$ SEM:** Mean  $\pm$  standard error of the mean

**MHC:** Major Histocompatibility Complex

**MIF:** Mean Intensity Fluorescence

**M $\phi$ :** Monocitos / Macrófagos

**NCR:** Natural Cytotoxicity Receptor

**NKs:** Natural Killer cells

**OSA:** Obstructive Sleep Apnea

**PBMCs:** Peripheral Blood Mononuclear Cells

**PBS:** Phosphate Buffered Saline

**qPCR:** quantitative PCR

**RORC:** RAR-related orphan receptor C

**RPMI:** Roswell Park Memorial Institute medium

**TAA:** Tumor Associated Antigens

**TAM:** Tumor associated Monocytes/Macrophages

**T-bet:** T-box transcription factor

**TGF $\beta$ :** Transforming Growth Factor beta

**Th17:** IL17 T helper Cells

**TLR:** Toll-Like Receptor

**TNF $\alpha$ :** Tumor Necrosis Factor alpha

**Tregs:** Regulatory T cells

**ULA:** Ultra Low Attachment

**VEGF:** Vascular and Endothelial Growth Factor

# **INTRODUCCIÓN**



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Apnea Obstructiva del Sueño

La Apnea obstructiva del sueño (OSA, del inglés *obstructive sleep apnea*) se define como un síndrome caracterizado por la aparición de episodios recurrentes de limitación al paso del aire a través de las vías aéreas durante el sueño. Estos episodios se dan como consecuencia de una alteración anatómico-funcional en la vía aérea superior, provocando descensos de la saturación de oxihemoglobina y microdespertares. Estos sucesos dan lugar a un sueño no reparador, somnolencia diurna excesiva, trastornos neuropsiquiátricos, respiratorios y cardíacos. Guilleminault *et al.* en 1976 introdujo el término “síndrome de apnea del sueño” para definir sujetos que sufrían apneas obstructivas y excesiva somnolencia durante el día. En el mismo trabajo se definió una apnea como el cese completo de la señal respiratoria de al menos 10 segundos de duración (Guilleminault *et al.*, 1976).

### 1.1.1 Prevalencia

Diferentes estudios epidemiológicos llevados a cabo en Estados Unidos y Europa han observado que la OSA es una enfermedad muy prevalente, afectando entre un 4-6% de hombres y un 2-4% de mujeres de la población general de edad media (Duran *et al.*, 2001; Hegde *et al.*, 2014). En el caso de España existen entre 1.200.000 y 2.150.000 sujetos afectados por OSA, y por tanto, susceptibles a ser tratados. No obstante, sólo se ha diagnosticado y tratado entre el 5-9% de esta población (Barron *et al.*, 2014).

### 1.1.2 Manifestaciones clínicas

La fisiopatología de esta enfermedad incluye el estrechamiento de la vía aérea superior (factor anatómico), una pérdida excesiva del tono muscular (factor muscular) y el defecto en los reflejos protectores (factor neurológico).

Los hallazgos clínicos más importantes se encuentran a dos niveles. Por un lado, las apneas-hipopneas condicionan la hipoxia intermitente ocasionando en algunos casos la aparición de problemas cardiovasculares; mientras que por otro, la distorsión en la arquitectura del sueño conduce a una hipersomnolia diurna con alteraciones cognitivas y psiquiátricas.

### 1.1.3 Diagnóstico y variables clínicas

El diagnóstico de la OSA se basa en combinación entre la historia del paciente y diversas pruebas de sueño.

La evaluación clínica se centra en la identificación diversos síntomas y signos sugestivos de OSA, destacando principalmente la cuantificación de la somnolencia diurna excesiva. Aunque existe procedimientos más sofisticados como la prueba de Osler, el test de latencia múltiple o el test de mantenimiento de la vigilia, en la práctica clínica habitual la magnitud de la somnolencia se valora mediante la escala de somnolencia de Epworth (ESS, del inglés *epworth sleepiness scale*), que consiste en un cuestionario de 8 preguntas. En nuestro medio, una puntuación igual o superior a 10 indica somnolencia diurna excesiva (Lloberes et al., 2011).

Las pruebas diagnósticas más habitualmente utilizadas son la polisomnografía y la poligrafía respiratoria.

1. La polisomnografía convencional analiza simultáneamente las variables neurofisiológicas y las cardiorrespiratorias, con una vigilancia continua del enfermo durante toda la noche. Se trata de una técnica que permite evaluar la repercusión de las apneas y de las hipopneas sobre la función cardio-respiratoria y la estructura del sueño (Berry et al., 2012). Aunque constituye la prueba de referencia, su coste y accesibilidad no permite ser utilizada en toda la población.
2. La poligrafía respiratoria monitoriza el flujo aéreo oronasal, los movimientos respiratorios toraco-abdominales, la saturación de oxihemoglobina, la posición corporal, el electrocardiograma y, en ocasiones, el ronquido (Collop et al., 2007). Al no registrarse las variables neurofisiológicas, no es posible estudiar la arquitectura del sueño, la duración de sus distintas fases ni el tiempo durante el cual el enfermo ha estado dormido (Masa et al., 2011). En ambos estudios, los eventos respiratorios incluyen tanto a las apneas como a las hipopneas. Se define apnea como el cese de al menos un 90% del flujo aéreo durante al menos 10 segundos, mientras que las hipopneas se consideran como una disminución del flujo aéreo del 30 al 90%, durante al menos 10 segundos asociada a una desaturación  $\geq 4\%$ . A su vez, los eventos respiratorios se clasifican como obstructivos si se acompañan de esfuerzo respiratorio, como centrales si éste está ausente o como mixtos cuando muestran características combinadas (Lloberes et al., 2011).

Para clasificar la gravedad de la apnea del sueño, se utiliza el término AHI (del inglés *apnea-hypopnea index*) que corresponde al número de apneas-hipopneas por hora.



Los pacientes con OSA se clasifican en función de este parámetro (Tabla 1) (Masa et al., 2011).

AHI (eventos/h)	<5	5-15	15-30	>30
Gravedad	Normal	OSA leve	OSA moderada	OSA grave

Tabla 1. Clasificación de los pacientes que sufren OSA

La oximetría forma parte tanto de la polisomnografía como de la poligrafía respiratoria y supone un método no invasivo para monitorizar el perfil de oxigenación nocturna. Permite determinar la saturación de oxihemoglobina media y mínima nocturna, así como el tiempo durante la cual el paciente permanece en hipoxemia, con una saturación de oxihemoglobina por debajo del 90% (CT90, del inglés *cumulative time spent below an oxygen saturation of 90%*). Sin embargo, no mide los eventos respiratorios ni la estructura del sueño, por lo que no puede ser utilizada de forma aislada como procedimiento diagnóstico (Masa et al., 2011).

#### 1.1.4 Tratamiento

El tratamiento más efectivo para los casos graves de OSA consiste en la aplicación de presión positiva continua en la vía aérea (CPAP, del inglés *continuous positive air pressure*) para evitar su colapso durante la inspiración. Este tratamiento, que puede ser administrado mediante una mascarilla nasal, una máscara facial u olivas nasales, es seguido por millones de personas en todo el mundo. En general, la CPAP es muy bien aceptada por la mayoría de los pacientes, dado que origina una mejoría inmediata de la calidad del sueño y de los síntomas diurnos. Sin embargo, no está exenta de incomodidades. El 50% de los pacientes tratados presenta algún tipo de efecto secundario, generalmente leve y transitorio. Un buen aprendizaje en el uso de la CPAP durante el inicio del tratamiento y la supervisión por personal cualificado se ha mostrado muy eficaz para mejorar la adherencia al tratamiento. Es imprescindible la formación y la colaboración entre todas las partes implicadas en el proceso. En este sentido, se considera esencial una mayor participación de los médicos de atención primaria en el control y seguimiento de los pacientes en tratamiento con CPAP (Masa et al., 2004).

### 1.1.5 Asociación entre Cáncer y OSA

Cáncer y OSA son dos patologías que *a priori* no tendrían que tener ninguna conexión. No obstante, fueron por primera vez relacionadas en un estudio prospectivo realizado en España (Campos-Rodriguez et al., 2013). En este trabajo se analizó una cohorte de personas con sospecha de OSA entre 2003 y 2007, con un seguimiento medio de 4,5 años. Al finalizar el periodo, de los 4.910 pacientes incluidos en el estudio, 261 de ellos (un 5,3%) habían desarrollado un cáncer durante el seguimiento. El marcador de gravedad del síndrome de apnea del sueño que mejor se relacionó con el riesgo de cáncer fue la hipoxia nocturna. Como se muestra la Figura 1, los pacientes que pasaban más de un 12% de la noche con una saturación de oxígeno por debajo de 90% tenían un riesgo casi dos veces y medio superior de desarrollar cáncer respecto a aquellos pacientes que no presentaban hipoxia nocturna. Estos resultados, según los autores, "sugieren que la hipoxia intermitente asociada a los episodios de apnea podría ser el enlace entre apnea del sueño y cáncer" (Campos-Rodriguez et al., 2013; Martinez-Garcia et al., 2014b).

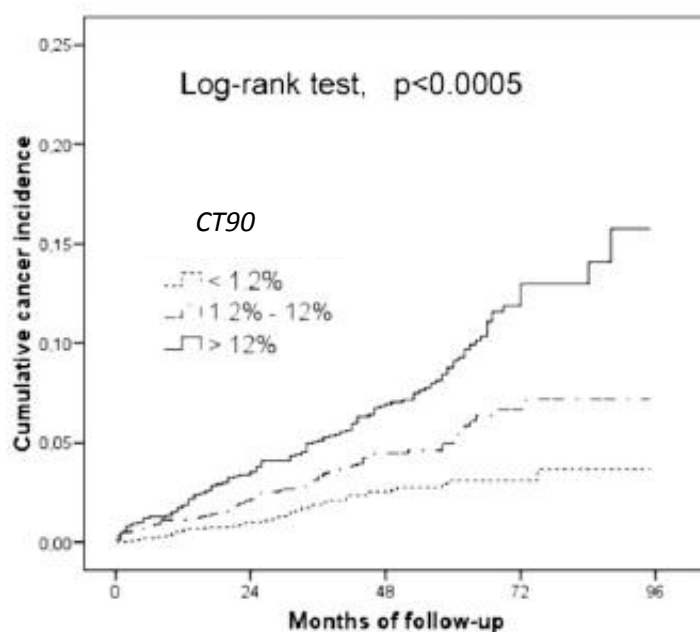


Figura 1. Evolución de la incidencia acumulada de nuevos casos de cáncer en función de la CT90 en pacientes que sufren OSA (modificada de Campos-Rodriguez, et al, 2013).

Además de los estudios de seguimiento en cohortes de pacientes, el doctor Issac Almendros, miembro del grupo Español de Sueño, realizó modelos oncológicos en ratones sometidos a hipoxia intermitente de forma artificial (Figura 2). Estos trabajos muestran un mayor crecimiento y progresión del tumor en ratones que estaban sometidos a hipoxia

intermitente (Almendros et al., 2012a; Almendros et al., 2012b). Por otra parte, también observó que estos ratones aumentaban el número y el área de metástasis en modelos inducidos y espontáneos (Almendros et al., 2013).

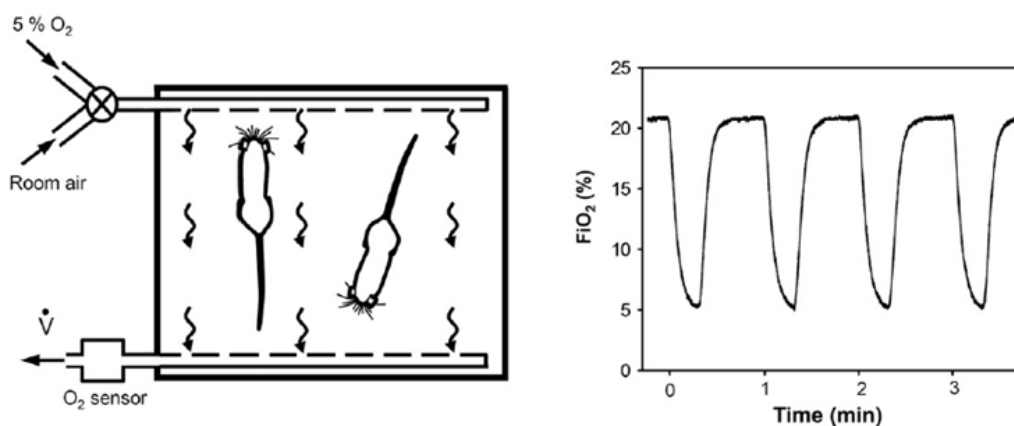


Figura 2. Modelo de hipoxia intermitente en ratones (modificada de Almendros, *et al*, 2013).

### 1.1.6 Alteraciones en el Sistema Inmune de pacientes con OSA

La alteraciones del sistema inmune en pacientes con OSA ha sido estudiada por varios autores aunque, a día de hoy, los análisis publicados no son concluyentes (Dyugovskaya et al., 2002, 2003, 2005; Dyugovskaya et al., 2008). Posiblemente el estudio más revelador ha sido un trabajo que demostró que pacientes que sufren OSA tenían una menor proporción de linfocitos T reguladores (Tregs) (Figura 3). Llama la atención que estos valores correlacionaban con el parámetro clínico AHI, remarcando la posible relación con la enfermedad (Ye et al., 2012). En modelos animales el único estudio que relaciona la aparición de tumores con el sistema inmune está realizado en el modelo de hipoxia intermitente artificial ya mencionado. En este modelo se describe como la hipoxia altera el fenotipo de los macrófagos asociados a tumores, favoreciendo crecimiento del tumor (Almendros et al., 2014). La estrecha relación existente entre el sistema inmune y el desarrollo tumoral, demostrada en muchos otros contextos, nos llevan a plantearnos si estas alteraciones inmunológicas en los pacientes OSA podrían estar causando el aumento en la incidencia de cáncer observado en los estudios prospectivos (Campos-Rodriguez et al., 2013).

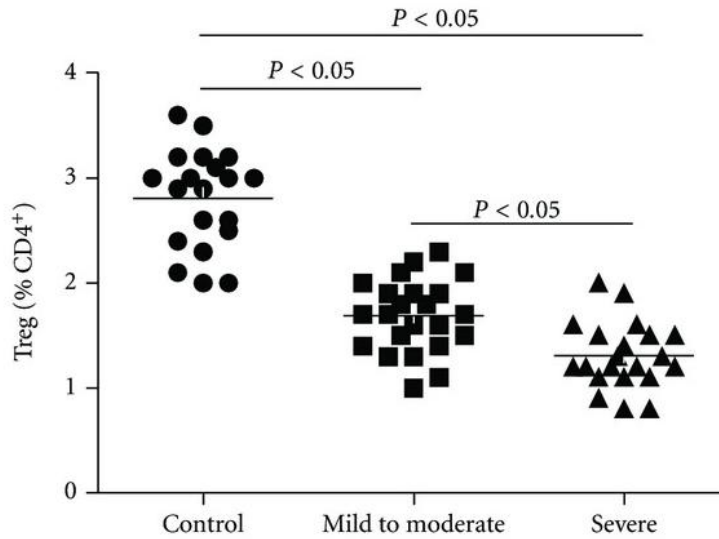


Figura 3. Distribución poblacional de células Treg circulantes en sujetos sanos (*control*), pacientes con OSA leve-moderada (*Mild to moderate*) y con OSA grave (*Severe*) (modificada de Lu, *et al*, 2012).

## 1.2 Sistema Inmune

El papel del sistema inmune en la prevención y erradicación de tumores fue descrito por primera vez por Paul Ehrlich en 1909, quién sugirió que el cáncer sería más frecuente si el sistema inmune no controlara la constante aparición de células transformadas (Ehrlich, 1909). Medio siglo más tarde, Burnet en 1957 reactivó esta hipótesis, acuñando el término de vigilancia inmunológica o inmunovigilancia; definido como la habilidad del sistema inmune de detectar y destruir a las células tumorales (Burnet, 1957). Este proceso está mediado por el reconocimiento de antígenos que expresan las células transformadas (Stagg *et al.*, 2007). Estudios punteros en la materia abrieron las puertas a tres importantes áreas de investigación: las poblaciones celulares infiltradas en tumores, la generación de la inmunidad endógena contra antígenos tumorales y la relación entre inmunodeficiencia y cáncer. Este último sector proviene de la observación en pacientes inmunodeficientes, que tenían un mayor riesgo de desarrollar cáncer (Reiman *et al.*, 2007). Algunos autores que estudiaron tumores espontáneos o utilizaron modelos de tumores inducidos en ratones, demostraron que el sistema inmune ataca a las células tumorales, ejerciendo un papel prioritario controlando su expansión (Shankaran *et al.*, 2001; Torre-Amione *et al.*, 1990). Por ejemplo Shankaran *et al.* en 2001 demostraron que ratones *knock-out* para el receptor del Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) desarrollaron sarcomas más rápidamente que los animales *wild type* (Shankaran *et al.*, 2001). Las tres principales fases de interacción entre el sistema inmune y el tumor son: eliminación, equilibrio y escape. En la fase de eliminación las células tumorales son reconocidas y destruidas por la infiltración de células del sistema inmune. Sin embargo, ocasionalmente puede quedar

remanente una población de células menos inmunogénicas y, por tanto, invisibles al control inmune. La segunda fase es la de equilibrio durante la cual el crecimiento del tumor y su eliminación son equiparables. En algunos casos este proceso incrementa la vida del individuo. La tercera fase es la de escape, la cual resulta de la reducción en la inmunogenicidad y en la activación de mecanismos inmunosupresores (Dunn et al., 2002) La identificación y caracterización de nuevos mecanismos de escape tumoral constituye uno de los desafíos más importantes para diseñar nuevas estrategias terapéuticas y potenciar las existentes (van der Burg et al., 2016). El sistema inmune puede reconocer diversas proteínas que las células tumorales expresan, de ahí la importancia de estudiar los distintos mecanismos involucrados. Por otro lado, los tumores desarrollan mecanismos de evasión del sistema inmune que pueden ser consecuencia de alteraciones que se manifiestan en la fase de vigilancia inmunológica (Lamagna et al., 2006). Se ha observado que las células tumorales pueden presentar deficiencias en la vía de procesamiento y presentación de antígenos, pudiendo esquivar la respuesta adaptativa (Shankaran et al., 2001). A su vez, también pueden suprimir la inducción de señales inflamatorias, provocando un fallo en la maduración de células dendríticas (Gabrilovich, 2004), lo que imposibilitaría la activación de la respuesta adaptativa (Lamagna et al., 2006).

Existen multitud de evidencias que demuestran la gran plasticidad de las células del sistema inmune en el control del crecimiento tumoral. Un ejemplo lo constituyen los Monocitos/Macrófagos (M $\emptyset$ ). Inicialmente estas células se encuentran implicadas en la destrucción de las células cancerígenas, pero también son las responsables de colaborar en la angiogénesis y las metástasis en estadios más tardíos (Dirkx et al., 2006; Mantovani et al., 2004; Nguyen and Massague, 2007). Un número importante de autores afirman que en el microambiente tumoral se genera un equilibrio entre las células tumorales y los M $\emptyset$  que da lugar a procesos de colaboración y evasión del propio tumor (Mytar et al., 2003; Pollard, 2008). Por ello, se afirma que el desarrollo tumoral es un reflejo de las interacciones entre la célula tumoral y el sistema inmune (Reiman et al., 2007).

### **1.2.1 Monocitos/Macrófagos Asociados a Tumores**

Los M $\emptyset$  son considerados la primera línea de defensa y son la población celular mayoritaria infiltrada en los tumores (Mantovani et al., 2004; Pollard, 2008). Estas células se pueden encontrar en el tumor en estadios muy tempranos y pueden ser indicadores de un mal pronóstico para el huésped. Es bien conocido que debido a los gradientes de quimioquinas, los M $\emptyset$  son reclutados al tumor, además son capaces de fagocitar fragmentos celulares. A su vez,

estas células tienen la capacidad de atraer a otros tipos celulares con gran capacidad citotóxica contra las células tumorales (Lamagna et al., 2006). En el caso de que la velocidad de crecimiento tumoral supere a la de su destrucción por estas células, el tumor será capaz de prosperar y establecerse en el tejido (Dunn et al., 2002). Posteriormente, las células del sistema inmune, principalmente los macrófagos, se transforman en cooperadoras de la progresión tumoral (Mantovani et al., 2004).

Se han publicado diversos estudios sobre los mecanismos moleculares por los cuales el microambiente tumoral es capaz de activar a los MØ asociados a tumores (TAM, del inglés *tumor associated macrophages*) (Almendros et al., 2014; Colegio et al., 2014; Corzo et al., 2010; Feng et al., 2014; Mantovani et al., 2004). En contraste con los MØ que generan una respuesta citotóxica contra células malignas (Mytar et al., 2003), los TAM presentan una reprogramación en su actividad inmunológica que les hace perder la eficiencia contra los tumores. Cabe destacar que los MØ que tienen una respuesta citotóxica contra patógenos o tumores son llamados M1 (activación clásica), mientras que aquellos que presentan una respuesta inflamatoria disminuida, son llamados M2 (activación alternativa) (Figura 4). En esta línea, los TAM presentarían características similares a los M2, caracterizados por la alta expresión de citoquinas antiinflamatorias y factores de crecimiento y la baja expresión de citoquinas inflamatorias (Colegio et al., 2014). Las características de los M2, así como de los TAM todavía están siendo analizadas, ya que pueden presentar perfiles variables dependiendo de la situación, tipo de cáncer y/o microambiente. Por otra parte, queda patente que los MØ que inicialmente son efectivos contra tumores, cuando entran en contacto con el microambiente tumoral modifican progresivamente su perfil, volviéndose incapaces de generar una respuesta antitumoral clásica (Mytar et al., 2003). Los MØ residentes en el tejido son reclutados a través de chemokinas y factores de crecimiento secretados por el tumor, como TGFβ, CCL2 o MCSF-1 (Reiman et al., 2007). Al infiltrarse en el tumor, los MØ desarrollan algunas de las características M2, cooperando con la progresión tumoral al secretar factores que inducen la proliferación e invasión, propiciando la angiogénesis y las metástasis (Colegio et al., 2014).

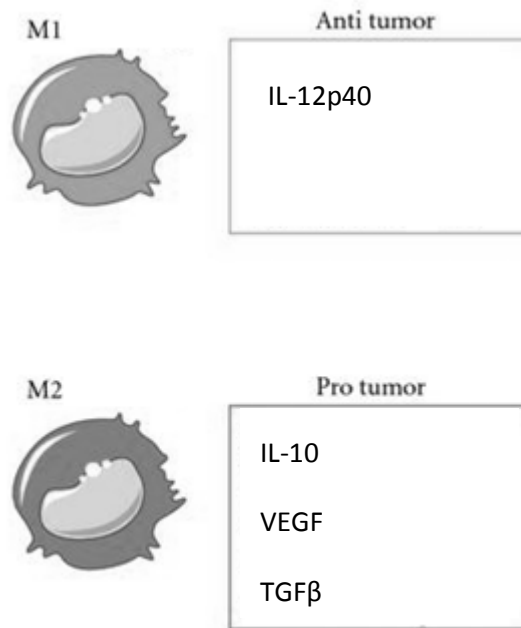
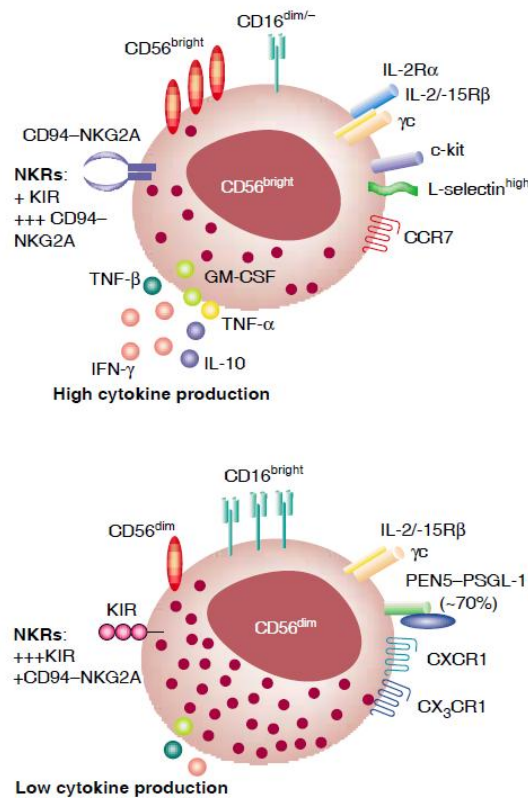


Figura 4. Características fenotípicas de Mφ.

### 1.2.2 Células Natural Killer

Desde finales del siglo pasado, el conocimiento de la biología de las células Natural Killer (NKs) y su función nos ha llevado a destacar la importancia de estas células en la actividad anti-tumoral. Las NKs se desarrollan en la médula ósea a partir de las células progenitoras linfoides comunes (Jiang et al., 2012); sin embargo, los precursores de las NKs todavía no están bien caracterizados en humanos (Di Santo, 2006; Hughes et al., 2014). Tras su desarrollo, las NKs se distribuyen ampliamente en todos los tejidos linfoides y no linfoides, incluyendo la médula ósea, los ganglios linfáticos, el bazo, la sangre periférica, el pulmón y el hígado (Gregoire et al., 2007). Las NKs, definidas como linfocitos  $CD3^+CD56^+$ , a su vez se clasifican en las sub-poblaciones:  $CD56^{bright}$  y  $CD56^{dim}$ , en función de la intensidad del marcaje CD56. Aproximadamente el 90% de las NKs de sangre periférica pertenecen al sub-población  $CD56^{dim}CD16^+$ ; células caracterizadas por su marcada función citotóxica (Anfossi et al., 2006; Cooper et al., 2001). Por otra parte, la mayoría de las NKs en los ganglios linfáticos y amígdalas son clasificadas como  $CD56^{bright}CD16^-$ ; estas células juegan un importante papel en la regulación del sistema inmune, produciendo citoquinas tales como  $IFN\gamma$ , IL12, IL15 e IL18 (Cooper et al., 2001; Ferlazzo and Munz, 2004) (Figura 5).



TRENDS in Immunology

Figura 5. Esquema de receptores y actividad en los diferentes subtipos de NKs en circulación (modificado de Cooper, et al, 2001).

La maduración se realiza principalmente en la médula, aunque se han identificados progenitores en variedad de tejidos adultos y fetales. También existen nichos extra-medulares como el hígado, nodos linfáticos y timo donde se ha visto madurar las NKs (Freud and Caligiuri, 2006; Freud et al., 2006). Los factores de transcripción que gobiernan la maduración de las NKs son la Eomesodermina (EOMES, del inglés *eomesodermin*) y el factor de transcripción T-box (Tbet, del inglés *T-box transcription factor*) (Gordon et al., 2012). Además de la ganancia de estos dos factores de transcripción, durante la maduración también se ha descrito la pérdida de RORC (del inglés *RAR-related orphan receptor C*) (Hughes et al., 2014). Una vez maduras, las NKs son capaces de eliminar rápidamente ciertas células diana sin inmunización previa (mecanismo independiente a la presentación antigénica), gracias al equilibrio entre señales de inhibidoras, como el complejo primario mayor de histocompatibilidad tipo I (MHC1, del inglés *major histocompatibility complex I*) y señales activadoras (Anfossi et al., 2006). Entre los receptores activadores descritos para las NKs se encuentran aquellos que pertenecen a la familia NCR (del inglés *natural cytotoxicity receptor*) tales como NKp46, NKp30 y NKp44. Por otra parte, como receptores inhibidores se han descrito los receptores de lectinas de tipo C (CD94/NKG2A/B) y



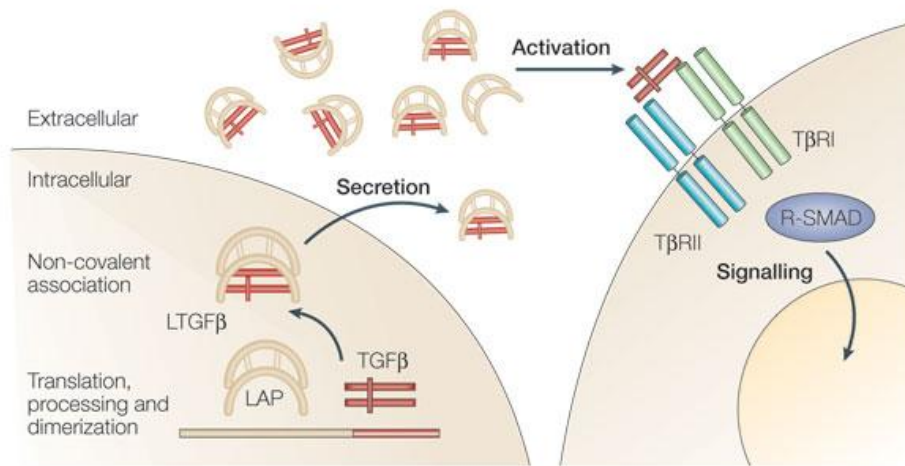
los KIR (del inglés *killer-cell immunoglobulin-like receptors*) (Vitale et al., 1996). En el estado estacionario, los receptores inhibitorios (KIR y CD94/NKG2A/B) se unen a diversas moléculas del MHC<sub>I</sub> que presentan todos los tipos de celulares, inhibiendo la activación de las NKs y previniendo la muerte celular (Anfossi et al., 2006).

A pesar de la gran complejidad de la respuesta inmune como hemos descrito anteriormente, las células malignas pueden desarrollar mecanismos para evadir la acción de las NKs (Wu and Lanier, 2003). Entre estos mecanismos se ha descrito el establecimiento de un entorno privilegiado rico en citoquinas con actividad inmunosupresora como el factor de crecimiento tumoral (TGF $\beta$ , del inglés *transforming growth factor  $\beta$* ), que es capaz de suprimir la respuesta citotóxica de estas células (do Nascimento et al., 2015).

### 1.3 Factor de Crecimiento Tumoral $\beta$

El TGF $\beta$  se descubrió en los años 70 y se aisló como un factor secretado a partir de células infectadas por virus de sarcoma (Hersh et al., 2014; Roberts et al., 1983). Inicialmente se demostró que podía conferir a fibroblastos normales propiedades fenotípicas de las células transformadas, por ejemplo crecer en agar blando de manera independiente (Hersh et al., 2014). Se identificaron tres isoformas, conocidas como TGF $\beta$ 1, 2 y 3, que comparten alrededor de 70% de homología en su secuencia y son codificadas por genes diferentes (Gaoatswe et al., 2015); de todas ellas, la TGF $\beta$ 1 ha sido la más estudiada.

Estructuralmente la molécula de TGF $\beta$  es un homodímero estabilizado por interacciones hidrófobas reforzadas por un enlace disulfuro. Cada monómero contiene hebras  $\beta$  entrelazados por enlaces disulfuro que forman el nudo de cisteína (Ryan et al., 2005). La forma activa de TGF $\beta$  se sintetiza a partir de una gran molécula de precursor inactivo, llamado TGF $\beta$  latente o TGF $\beta$ -LAP. Como se muestra en la Figura 6, el TGF $\beta$  latente se compone de un dímero de TGF $\beta$  unido de forma no covalente al péptido asociado a la latencia (LAP, del inglés *latency-associated peptide*), el cual permanece unido tras su secreción. En la matriz extracelular el TGF $\beta$  se encuentra siempre en su forma inactiva asociado a la proteína de unión a la forma latente del TGF $\beta$  por un enlaces disulfuros (Notarbartolo et al., 2002). Esta molécula precursora actúa como depósito o almacén del TGF $\beta$ . La activación del TGF $\beta$  latente se controla por diferentes procesos, como por actividad enzimática proteolítica, por proteólisis inducida por calor o por cambios de pH (Notarbartolo et al., 2002).



Copyright © 2005 Nature Publishing Group  
Nature Reviews | Cancer

**Figura 6. Representación esquemática de la secreción y activación del TGFβ (modificado de Massague, et al, 2005).**

### 1.3.1. Señalización

La escisión proteolítica, ya sea por la interacción con integrinas o por cambios de pH en el medio local, permite activar y liberar el TGFβ-LAP, siendo ahora capaz de unirse a los receptores de la membrana celular. Los receptores de TGFβ son complejos heterodiméricos de quinasas transmembrana tipo I y tipo II de serina / treonina. La activación del receptor conduce a la transducción de, al menos, dos rutas; la dependiente de la proteína SMAD o ruta canónica y la independiente de SMAD o ruta no canónica (Akhurst and Hata, 2012). En la ruta canónica, la activación del receptor TGFβ I lleva a la fosforilación de proteínas SMAD2 y/o SMAD3. Estas proteínas se traslocan al núcleo junto con SMAD4 donde participan en la regulación de la transcripción de un número importante de genes. (van der Burg et al., 2016).

### 1.3.2. Actividad biológica sobre el Sistema Inmune

La presencia de los receptores de TGFβ en la mayoría de las células del sistema inmune indica la importancia de esta citoquina en la regulación global del sistema. Entre estas células destacan los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>, los linfocitos T reguladores (Tregs), las NKs y los Mφ (Figura 7). El TGFβ es un potente supresor de actividad en un número importante de células del sistema inmune, inhibiendo la proliferación de células T e induciendo la apoptosis en células B. Además, está implicado en la generación de Tregs al inducir la expresión del factor de transcripción Foxp3 (del inglés *forkhead box P3*). Los Tregs son cruciales para el

mantenimiento de la tolerancia del sistema inmune y de la inmunidad tumoral. Durante la progresión tumoral, un exceso de TGF $\beta$  suprime la respuesta inmune atenuando las funciones citotóxicas de los linfocitos, lo que permite la supervivencia de las células tumorales.

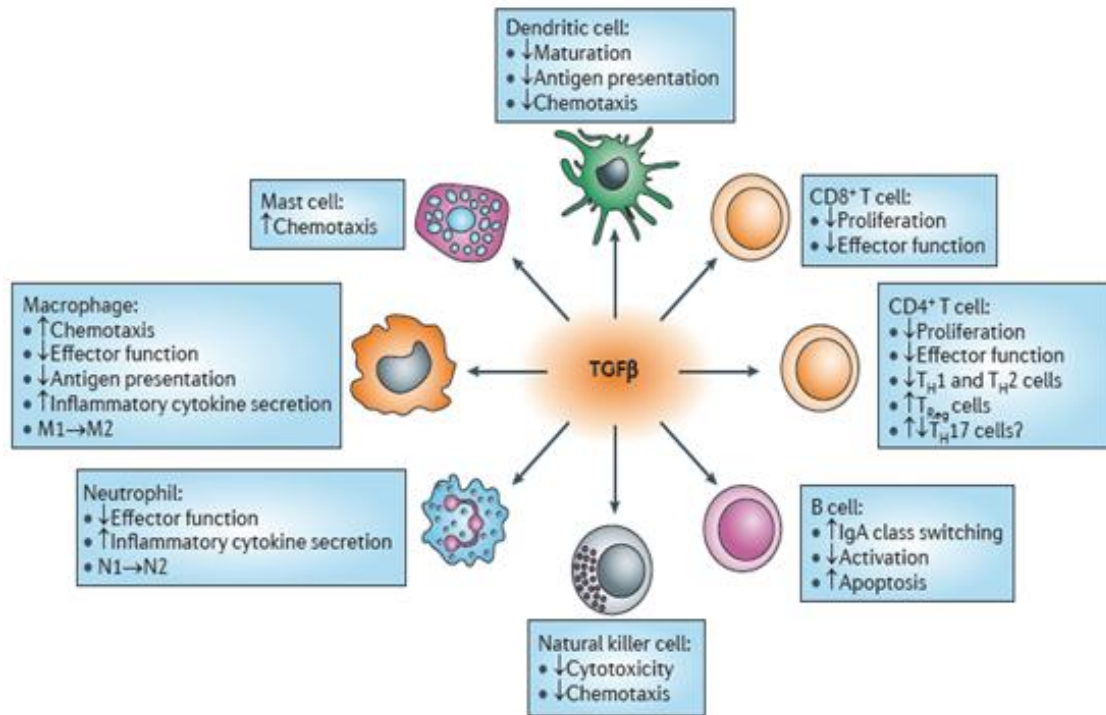


Figura 7. Efectos del TGF $\beta$  sobre las distintas poblaciones del sistema inmune (modificado de Massague, *et al*, 2003).

En el caso de las células del sistema inmune innato, el TGF $\beta$  suprime la producción de IFN $\gamma$  de las NKs, lo cual es requerido para su actividad antitumoral. De tal manera que el TGF $\beta$  puede exacerbar el estado de enfermedades locales, lo que resulta en la progresión del tumor sólido o una inflamación asociada con la fibrosis.



# **OBJETIVOS**



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general:

Estudiar el efecto de la hipoxia intermitente sobre la actividad anti-tumoral del sistema inmune, buscando una explicación factible para la elevada incidencia de cáncer que sufren los pacientes OSA.

### 2.3 Objetivos específicos:

Utilizando una cohorte de 92 pacientes que sufren OSA grave (AHI>30, con o sin tratamiento con CPAP) y 29 donantes sanos:

1. Estudiar los marcadores moleculares de expresión asociados a hipoxia en las células circulantes.
2. Analizar la distribución, el fenotipo y la actividad biológica de las distintas poblaciones del sistema inmune con actividad anti-tumoral descrita.
3. Buscar la correlación de los parámetros clínicos específicos de la OSA con marcadores moleculares y fenotipos del sistema inmune.
4. Estudiar el efecto del tratamiento con CPAP sobre las células circulantes de los pacientes.
5. Establecer un modelo *in vitro* de hipoxia intermitente con células humanas, y analizar el efecto sobre el fenotipo y la funcionalidad de las células del sistema inmune.
6. Estudiar el efecto de las condiciones de normoxia sobre el fenotipo y funcionalidad de las células de sistema inmune aisladas de pacientes no tratados.
7. Establecer un mecanismo celular que explique el fenómeno estudiado.





# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Reactivos

Todos los reactivos utilizados se compraron en las siguientes casas comerciales: Miltenyi, R&D, Sigma, BD Biosciences e Invitrogen. El medio de cultivo utilizado fue RPMI 1640 (Invitrogen) o DMEN (Invitrogen). El medio completo se suplemento con 100 U/ml de penicilina (Invitrogen), 100µg/ml de estreptomicina (Invitrogen) y 10% de suero fetal bovino (Invitrogen). Todas las soluciones y medios de cultivo estaban libres de LPS, según el test de limulus (Limulus Amebocyte Lysate kit de Cambrex).

### 3.2 Sujetos reclutados

Los pacientes con OSA fueron reclutados de forma consecutiva en la Unidad Multidisciplinaria de Sueño del Hospital Universitario La Paz-Cantoblanco (Madrid, España). Como criterios de inclusión se consideraron una edad comprendida entre 40 y 65 años y un índice de apnea-hipopnea (AHI) mayor de 30. El diagnóstico de OSA fue establecido por la poligrafía respiratoria (Embletta GOLD, ResMed) (Masa et al., 2011), que incluye el registro continuo de flujo oronasal, frecuencia cardíaca y movimientos respiratorios torácicos y abdominales, así como saturación de oxihemoglobina (SpO<sub>2</sub>). Cada registro fue leído manualmente por personal entrenado. La apnea fue definida como una interrupción casi completa (>90%) en el flujo de aire oronasal durante más de 10 segundos. La hipopnea se definió como una reducción del 30% al 90% en el flujo de aire oronasal durante más de 10 segundos, asociada con una desaturación de oxígeno mayor o igual a 4%. El AHI se define como el número de apneas más hipopneas por hora de grabación, y el CT90 se definió como el porcentaje de tiempo de grabación con una SpO<sub>2</sub> menor del 90% (Lloberes et al., 2011). Se excluyeron aquellos pacientes con tratamiento anterior o actual con oxígeno, CPAP o ventilación mecánica; bajo peso (índice de masa corporal [IMC] <18,5 kg/m<sup>2</sup>) u obesidad mórbida ([IMC]> 40 kg/m<sup>2</sup>); diagnóstico previo de otra enfermedad respiratoria o cardiovascular, incluyendo la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, insuficiencia respiratoria, hipertensión, insuficiencia cardíaca o enfermedad de la arteria coronaria; cualquier enfermedad infecciosa en los tres meses anteriores; diagnóstico de tumores malignos o enfermedades inflamatorias crónicas; y el uso de corticosteroides u otros fármacos anti-inflamatorios en los tres meses previos.

Se seleccionaron dos grupos de OSA de acuerdo con el uso del tratamiento de presión positiva continua en vía aérea (CPAP): pacientes no tratados (el grupo llamado "OSA") y los

pacientes que habían sido tratados con CPAP durante al menos 6 meses (llamado "CPAP", con una utilización media diaria de más de 4,5 horas por día). En este último grupo, la presión óptima de CPAP había sido valorada por un dispositivo automático (REMstar ProMSeries con C-Flex, Philips Respironics)(Masa et al., 2004) y verificada por la poligrafía respiratoria repetida en el momento de su inclusión en el estudio. Como grupo control, se estudiaron voluntarios sanos (VS) con distribución similar en cuanto a sexo, edad, hábito de fumar e IMC. Ninguno de ellos estaban recibiendo medicación y el diagnóstico de OSA se descartó mediante poligrafía respiratoria. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital de La Paz (PI-1857) y el consentimiento informado se obtuvo de todos los participantes.

### 3.3 Recogida, aislamiento y cultivo de células mononucleares de sangre periférica.

Las muestras de sangre se obtuvieron a primera hora de la mañana entre las 8 y las 9 de la mañana, después de una noche en ayuno. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, del inglés *peripheral blood mononuclear cells*) se aislaron por centrifugación en gradiente de Ficoll-Histopaque Plus (Biosciences) (Figura 8). Para los estudios de mecanismos moleculares, celulares y expresión de mRNA que implican monocitos o NKs, se utilizó un kit de aislamiento específico de Miltenyi Biotec. La pureza se verificó por citometría de flujo, mostrando siempre una pureza > 95%.

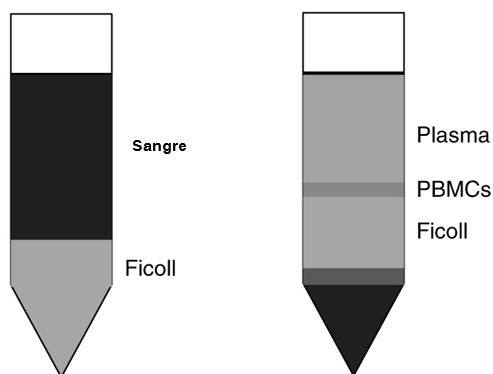


Figura 8. Esquema de aislamiento de PBMCs antes y después de la centrifugación por gradiente de Ficoll.

### 3.4 Cultivo celular

Los cultivos celulares bajo condiciones normóxicas fueron a concentraciones de oxígeno atmosférico en una incubadora para cultivos celulares (21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C). Los cultivos bajo condiciones de hipoxia intermitente se realizaron en la cámara de hipoxia (3% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C) durante 12 ciclos alternando medios pre-condicionados hipóxicos (5 minutos) y

medios normóxicos (10 minutos), según el protocolo descrito previamente por Ryan, *et al*, 2005 (Ryan et al., 2005). El uso de medios pre-condicionados (durante toda la noche) fue necesario para exponer los cultivos de forma instantánea a la hipoxia o a la normoxia. Los niveles de oxígeno intracelular fueron medidos utilizando una sonda específica comercial sensible al oxígeno intracelular (Abcam).

### 3.5 Análisis por citometría de flujo.

Para la tinción extracelular e intracelular se usaron los anticuerpos indicados en la Tabla 2 siguiendo un protocolo estándar. Se utilizaron controles de isotipo apropiados para cada experimento. Después de la tinción, las células fueron adquiridas por el citómetro de flujo BD FACS Calibur y los datos recogidos se analizaron usando CellQuest Pro (BD Bioscience).

Anticuerpo	Tipo de tinción	Casa Comercial
CD14	Extracelular	Inmunostep
CD3	Extracelular	Inmunostep
CD56	Extracelular	Miltenyi
CD16	Extracelular	Miltenyi
p30	Extracelular	Miltenyi
p44	Extracelular	Miltenyi
p46	Extracelular	Miltenyi
$\gamma\delta$	Extracelular	Miltenyi
CD8	Extracelular	Becton Dickinson
CD28	Extracelular	Miltenyi
CD25	Extracelular	Miltenyi
CD4	Extracelular	Becton Dickinson
TGF $\beta$ -LAP	Extracelular	Miltenyi
GARP	Extracelular	Becton Dickinson
FOXP3	Intracelular	Miltenyi
RORC	Intracelular	R&D
T-bet	Intracelular	R&D
EOMES	Intracelular	R&D

Tabla 2. Anticuerpos de citometría usados en este trabajo.

### **3.6 Formación de esferas tumorales y ensayo de viabilidad celular**

Para llevar a cabo el modelo tumoral *in vitro* en tres dimensiones (3D) sembramos quinientas células tumorales (líneas BxPC3 o LoVo) por pocillo junto con diferentes ratios de monocitos CD14<sup>+</sup> aislados a partir de los diferentes participantes. Los ensayos se realizaron en placas especiales de bajo anclaje de 96 pocillos con fondo redondo (Placas ULA, Cultek). Después de la siembra, las placas se centrifugaron 10 minutos a 1500 rpm y se incubaron en medio DMEM completo durante 7 días. El diámetro de los esferoides se evaluó usando un microscopio de intercambio de fases, así como el programa de análisis LAS AF lite (Leica). La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de la fosfatasa ácida. Este último método se basa en la cuantificación de la actividad de la fosfatasa ácida citosólica cuando hidroliza el p-nitrofenil fosfato a p-nitrofenol.

### **3.7 Ensayo de citotoxicidad**

La citotoxicidad de las NKs se midió usando un ensayo de liberación de europio-TDA convencional durante 2h (Perkin-Elmer). La línea celular K562 marcado con TDA se utilizó como células diana tumoral en proporciones Efector:Tumor (E:T) de 4:1, 2:1 y 1:1. El porcentaje de europio-TDA liberado se calculó utilizando la fórmula  $([\text{liberación experimental} - \text{liberación espontánea}] / [\text{liberación máxima} - \text{liberación espontánea}]) * 100\%$ . La liberación espontánea no excedió de 14% de la liberación máxima en todos los experimentos.

### **3.8 Aislamiento de RNA y síntesis de cDNA**

En cada uno de los tratamientos las células se lavaron con PBS y se aisló el RNA total utilizando el Kit High Pure RNA Isolation (Roche Diagnostics), el cual incluye tratamiento con DNAsa I, para eliminar al DNA contaminante. En todos los casos se tomaron las precauciones oportunas para evitar contaminaciones con Ribonucleasas (RNAsas). La concentración y pureza del RNA se determinó utilizando el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific). A continuación se realizó la transformación de 1µg del RNA a DNA complementario mediante retrotranscripción, utilizando para ello el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) en un volumen final de 20µl y siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **3.9 PCR cuantitativa a tiempo real**

Los niveles de expresión de cada uno de los genes estudiados en el presente trabajo se analizaron mediante PCR cuantitativa (qPCR) a tiempo real, utilizando el cDNA obtenido según se ha descrito en el apartado anterior. Para las reacciones de qPCR se utilizó el kit Quatimix Easy

(Biotools), el fluorocromo utilizado en estas qPCRs fue Syber Green de (Applied Biosystems) y el termociclador LightCycler (Roche Diagnostics). Los *primers*, o cebadores, específicos utilizados para cada gen se detallan en la Tabla 3. Todos fueron sintetizados y purificados por Bonsai Biotech. Para valorar la especificidad de los primers, se analizaron los perfiles de *melting* o desnaturalización. Estos perfiles se determinaron manteniendo la reacción a 80°C durante 10 segundos y después, calentando la reacción hasta 95°C en una tasa de calentamiento de 0,1°C/segundo. A lo largo de este proceso se midió la fluorescencia emitida. Con este análisis se verificó que cada par de cebadores producía un único producto de amplificación. Los productos de amplificación, se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%, con Bromuro de Etidio (0,5 ug/ml) y se analizaron por transiluminación ultravioleta. En todos los casos se comprobó que, para cada par de cebadores el producto de amplificación era una única banda del tamaño esperado.

La cuantificación del cDNA de cada uno de los genes de interés, se llevó a cabo utilizando una curva estándar de siete puntos específica para cada gen. Para ser aceptadas como válidas los coeficientes de correlación de cada curva fueron siempre >0.98. Además en cada reacción de qPCR se incluyó un punto de la curva estándar. El programa con el que se analizó cada uno de los genes, consistió en 45 ciclos con una temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ) específica para cada par de cebadores, precedida por un paso de desnaturalización y activación de la polimerasa de 5 minutos a 95°C. Los resultados obtenidos para cada uno de los genes analizados se normalizaron con respecto a la expresión de la  $\beta$ -Actina. Esta metodología ha sido usada por nuestro grupo en trabajos anteriores (Cubillos-Zapata et al., 2014; del Fresno et al., 2009; Fernandez-Ruiz et al., 2014; Gomez-Pina et al., 2007; Shalova et al., 2015; Soares-Schanoski et al., 2012).

<b>Genes</b>	<b>Primer 5'-3'</b>	<b>Primer 3'-5'</b>	<b>Tm</b>
HIF1 $\alpha$	AGTGTACCCTAACTAGCCGAGGAA	CTGAGGTTGGTACTGTTGGTATCA	62
HIF2 $\alpha$	GACCAGCAGATGGACAACCTG TAC	CAGAAAGATCATGTCGCCATCTT	62
VEGF	GCAGCTTGAGTTAAACGAACG	GCAGCGTGGTTTCTGTATC	60
IL12p40	GACATTCAGTGTCAAAGCAGCA	CCTTGTTGTCCCCTCTGACTCT	62
IL10	ATGCCCCAAGCTGAGAACCA	TCTCAAGGGGCTGGGTCAGC	58
TGF $\beta$	GGCCAGATCCTGTCCAAGC	GTGGGTTTCCACCATTAGCAC	62
$\beta$ -Actina	GTCCACCTTCCAGCAGATGT	CATCTTCACCGTTCCAGTTT	60

**Tabla 3. Listado de cebadores.**

### **3.10 Determinación de TGFβ1**

El suero se obtuvo tras la centrifugación a 600g durante 10 min de las muestras de sangre y se almacenó a -80°C. Para la determinación de TGFβ1, se utilizó un kit comercial Flex Set, siguiendo las instrucciones del fabricante (R&D).

### **3.11 Estudios de sobreexpresión**

La sobreexpresión de HIF1α ha sido realizada gracias a la tecnología de nucleofección de Amaxa Nucleofector system (Amaxa Biosystems, Lonza). Se añadieron un millón de monocitos junto con 0,5 μg del plásmido correspondiente (donado por el Dr. Luis del Peso) en un volumen de 100 μl de tampón de transfección, después fueron transferidos a una cubeta de electroporación y nucleofectados, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se transfirieron inmediatamente a una placa de cultivo de seis pocillos (Costar) que contiene 2 ml precalentado RPMI 1640 suplementado con 10% FBS (Invitrogen).

### **3.12 Análisis estadístico**

El número de experimentos analizados se indican en cada pie de figura. Los datos se expresan como diagrama de caja y bigotes o como  $M \pm SEM$  (del inglés *mean ± standard error of the mean*). La significación estadística fue calculada usando el test Mann-Whitney cuando se comparó OSA con VS u OSA con CPAP o usando el t-test pareado cuando se compararon los modelos *in vitro* o *ex vivo*. Para las comparaciones entre los tres grupos se utilizó el análisis de varianza con la prueba post-hoc de Bonferroni y la prueba de chi-cuadrado. Las correlaciones entre los parámetros clínicos y los marcadores moleculares se calcularon usando el análisis Spearman. Las diferencias se consideraron significativas con un valor de  $p < 0,05$  y los análisis fueron realizados usando el software Prism versión 5.0.



# **RESULTADOS**



## 4. RESULTADOS

### 4.1 Características clínicas de los participantes incluidos en el estudio.

En el estudio se incluyó un total de 92 pacientes diagnosticados con OSA grave (AHI >30) según el criterio establecido por la American Academy of Sleep Medicine y la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (Epstein et al., 2009; Lloberes et al., 2011). Sesenta de estos pacientes no estaban bajo tratamiento (denominados "OSA"), mientras que treintaidós seguían una pauta de tratamiento con CPAP (denominados "CPAP"). Además, se incluyeron veintinueve voluntarios sanos (grupo "VS") como controles. La Tabla 4 muestra la línea de base antropométrica y los datos clínicos de los tres grupos de estudio. Destaca que las características clínicas del sueño de los pacientes CPAP antes de ser tratados no difieren de las reportadas para el grupo OSA. En cambio, después de seis meses de tratamiento (con una utilización media de 4,5 horas por día), el grupo CPAP mostró valores análogos al grupo VS (Figura 9a).

### 4.2 Marcadores moleculares asociados a hipoxia en células circulantes de la sangre de los participantes.

El suministro adecuado de oxígeno a los tejidos es esencial para el mantenimiento de la función y fisiología de las células. La deficiencia de este suministro causado por las apneas-hipopneas en estos pacientes provoca una caída de la presión parcial de oxígeno en sangre. El medio hipóxico activa una cascada de señalización que induce la transcripción de una multitud de genes implicados en eventos tales como la angiogénesis, el metabolismo de la glucosa y la supervivencia celular, etc. Probablemente la clave de esta respuesta a la hipoxia se encuentra en el factor inducido por hipoxia (HIF, del inglés *hypoxia-inducible factor*), un factor de transcripción heterodimérico que regula la adaptación celular a la falta de oxígeno. De las dos subunidades que componen HIF, la alfa y la beta, sólo la primera es dependiente del oxígeno, siendo producida constitutivamente aunque degradada en condiciones de normoxia. A su vez, existen dos isoformas de esta subunidad, HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$ , con especificidades diferentes relativas a la activación de genes (Semenza, 2011).

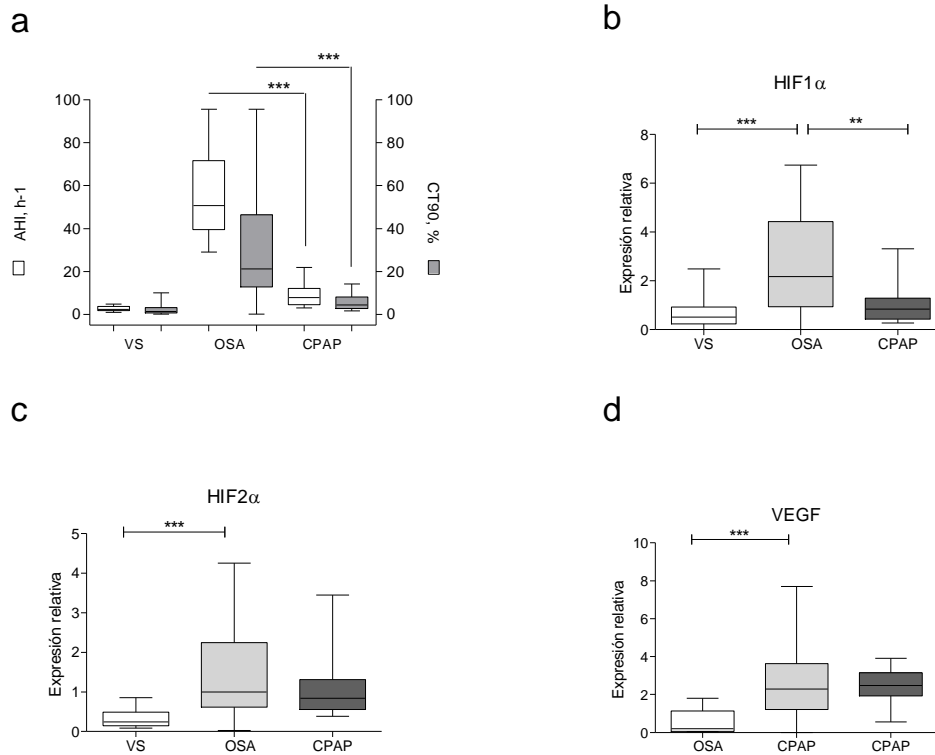
El análisis de los factores inducibles por hipoxia reveló un aumento significativo en los niveles de transcripción de HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  en PBMCs de los pacientes OSA en comparación con los pacientes CPAP y los VS, corroborando su estado hipóxico (Figura 9 b y c). Además el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, del inglés *vascular endothelial growth factor*), cuya expresión está directamente relacionada con la actividad de HIF en el núcleo, también se

encontró sobre-expresado en los pacientes OSA (Figura 9d). Sin embargo, la expresión de HIF2 $\alpha$  y VEGF no está significativamente disminuida en los pacientes CPAP (Figura 9 c y d).

	OSA (n=60)	CPAP* (antes del tratamiento) (n=32)	VS (n=29)	Valor p <sup>v</sup>
Edad - años	54 $\pm$ 8	55 $\pm$ 7	55 $\pm$ 6	0.865
Sexo Varón - no. (%)	50 (83.3)	26 (81.2)	24 (82.5)	0.969
Índice de masa corporal - Kg/m <sup>2</sup>	28.5 $\pm$ 4.6	27.4 $\pm$ 4.8	27.4 $\pm$ 5.0	0.463
<b>Fumadores - no. (%)</b>				
Habitual	21 (35.0)	12 (37.5)	10 (34.5)	0.987
Ocasional	21 (35.0)	12 (37.5)	10 (34.5)	
No fumador	18 (30.0)	8 (25.0)	9 (31.0)	
Escala Epworth <sup>†</sup>	10.8 $\pm$ 4.5	10.7 $\pm$ 4.4	4.1 $\pm$ 3.6	<0.001
Somnolencia diurna	33 (55.0)	20 (62.5)	1 (3.4)	<0.001
AHI - eventos/h <sup>‡</sup>	55.1 $\pm$ 18.2	54.3 $\pm$ 17.9	2.7 $\pm$ 1.2	<0.001
Índice de Saturación de oxígeno - eventos/h	49.6 $\pm$ 22.3	49.5 $\pm$ 19.9	1.9 $\pm$ 1.1	<0.001
CT90- %	33.1 $\pm$ 29.0	31.8 $\pm$ 29.1	2.3 $\pm$ 2.8	0.004
CT80- %	5.6 $\pm$ 9.6	6.1 $\pm$ 8.5	0	0.117
<b>Media de SpO<sub>2</sub> durante el sueño - %</b>				
Nadir	77.6 $\pm$ 6.9	77.2 $\pm$ 7.0	87.6 $\pm$ 2.3	<0.001
Media	89.9 $\pm$ 4.0	89.3 $\pm$ 4.3	92.3 $\pm$ 1.5	0.102
Eventos obstructivos - %	88.7 $\pm$ 6.6	87.2 $\pm$ 6.4	86.0 $\pm$ 6.4	0.343
<b>Presión arterial - mmHg</b>				
Sistólica	121.6 $\pm$ 10.5	123.0 $\pm$ 10.2	122.8 $\pm$ 11.5	0.807
Diastólica	74.6 $\pm$ 6.4	75.6 $\pm$ 6.5	75.7 $\pm$ 6.5	0.693
<b>Recuento leucocitario - por mm<sup>3</sup></b>				
Total	7.60 $\pm$ 1.27	7.63 $\pm$ 1.25	7.77 $\pm$ 1.33	0.834
Neutrófilos	5.02 $\pm$ 0.95	4.89 $\pm$ 0.91	5.03 $\pm$ 1.04	0.785
Linfocitos	1.93 $\pm$ 0.56	2.10 $\pm$ 0.63	2.09 $\pm$ 0.61	0.314
Monocitos	0.50 $\pm$ 0.14	0.51 $\pm$ 0.13	0.48 $\pm$ 0.09	0.690
Hemoglobina - g/dl	13.6 $\pm$ 1.2	13.7 $\pm$ 1.3	14.0 $\pm$ 1.2	0.392
<b>Colesterol - mg/dl</b>				
Total	186.6 $\pm$ 41.9	182.6 $\pm$ 52.7	183.9 $\pm$ 40.4	0.938
HDL	52.5 $\pm$ 7.0	50.6 $\pm$ 5.8	49.0 $\pm$ 4.4	0.089
LDL	122.7 $\pm$ 36.9	121.5 $\pm$ 47.9	122.6 $\pm$ 35.7	0.992
Triglicéridos - mg/dl	142.9 $\pm$ 40.8	138.4 $\pm$ 46.2	136.1 $\pm$ 18.4	0.789

\*Los valores basales de los pacientes con OSA grave tratados se refieren al tiempo de diagnóstico, antes de iniciar el tratamiento con CPAP. Los valores son medias  $\pm$  SD. SpO<sub>2</sub> denota el nivel de saturación de oxígeno medida por pulsioximetría. Para convertir los valores de lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de alta densidad (HDL) y el colesterol total a milimoles por litro, multiplicar por 0.02586. Para convertir los valores de triglicéridos a milimoles por litro, multiplicar por 0.01129. <sup>†</sup> Las puntuaciones en el rango de escala de Epworth están en el rango 0,0-24,0. Las puntuaciones  $\geq$  10 indican la somnolencia diurna. <sup>‡</sup> El índice de apnea - hipopnea (AHI) es el número de apneas e hipopneas por hora de tiempo de sueño. Tiempo de sueño con SpO<sub>2</sub> <90% (CT90) o Tiempo de sueño con SpO<sub>2</sub> <80% (CT80) es el porcentaje del registro en el que se encuentran con un presión parcial de oxígeno (SpO<sub>2</sub>) por debajo del 90% o 80%. <sup>§</sup> Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante ANOVA o la prueba de chi-cuadrado.

**Tabla 4. Características clínicas de los sujetos estudiados.**

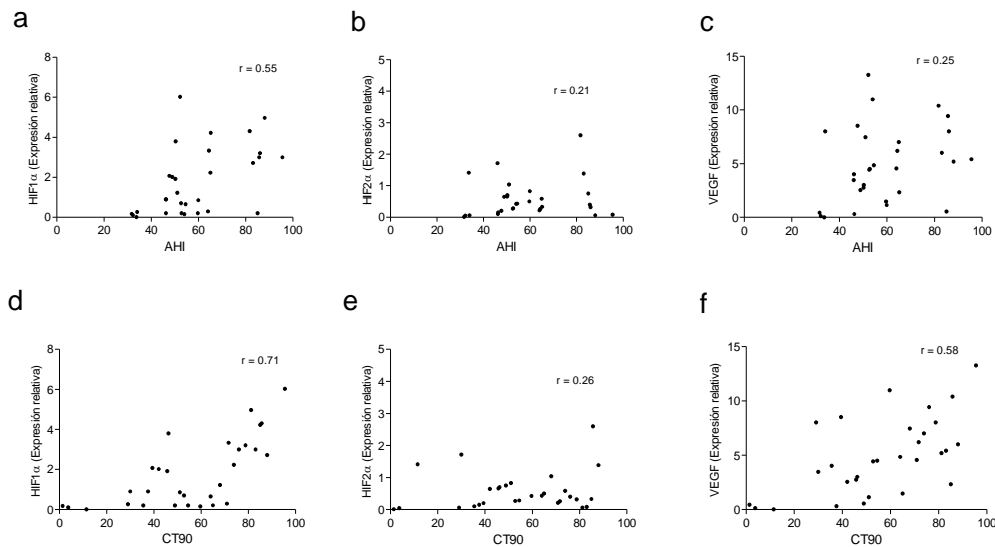


**Figura 9. Perfil clínico y molecular de los participantes incluidos en el estudio.**

Voluntarios sanos (VS, n = 29), pacientes no tratados (OSA, n = 60) y pacientes tratados (CPAP, n = 32) se monitorizaron previamente a la extracción de sangre. a) Parámetros clínicos AHI (cajas de color blanco) y CT90 (cajas de color gris). b-d) Análisis de la expresión de mRNA por qPCR de HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  y VEGF en PBMCs aisladas de VS (cajas de color blanco, n = 29), OSA (cajas de color gris claro, n = 30), CPAP (cajas de color gris oscuro, n = 32). Se muestra la expresión relativa respecto a los valores VS. \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001, mediante la prueba de Mann-Whitney.

### 4.3 Correlaciones entre los parámetros clínicos y los marcadores moleculares asociados a hipoxia.

Para validar como afecta la hipoxia intermitente sobre las células circulantes, se evaluó el grado de afectación de los pacientes OSA no tratados, correlacionando la expresión de HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  y VEGF en las PBMCs con los parámetros clínicos, AHI y CT90. Se observó un mayor valor en los coeficientes Spearman (r) cuando se correlacionan la expresión con el CT90 que cuando se correlacionaba con AHI (Figura 10). Asimismo, todas las correlaciones (con la excepción de HIF2 $\alpha$ ) eran directamente proporcionales a los valores clínicos. Las correlaciones con otros parámetros clínicos de la tabla 4 no arrojaron diferencias estadísticamente significativas (datos no mostrados).

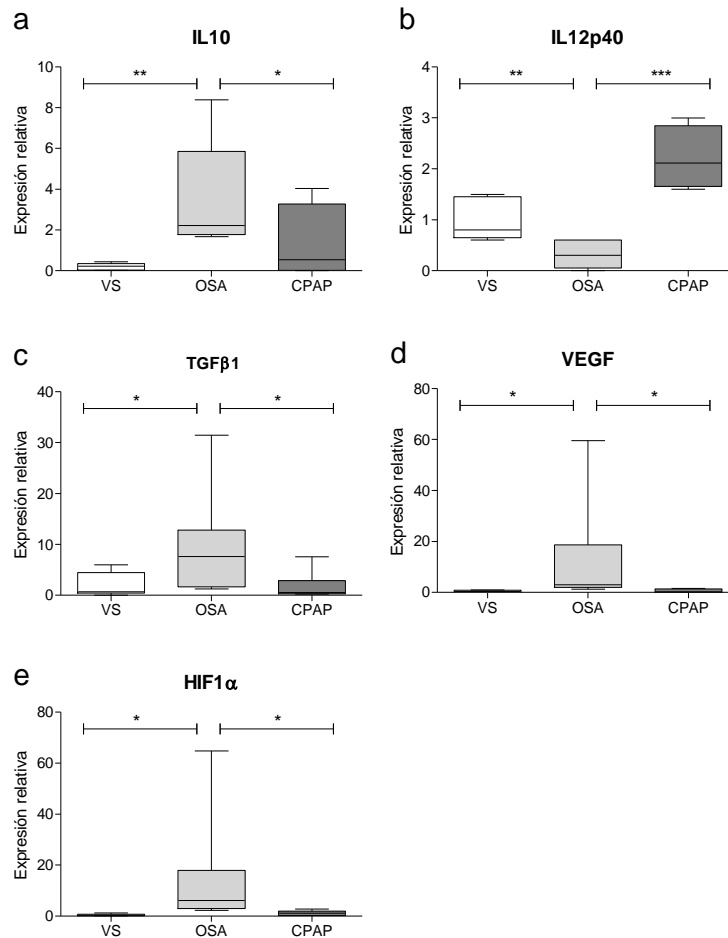


**Figura 10. Correlación entre los parámetros clínicos (AHI y CT90) y los marcadores moleculares asociados a hipoxia.**

a-c) Análisis de la expresión relativa de mRNA por qPCR de HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  y VEGF en PBMCs aisladas de pacientes OSA (n = 30) correlacionado con AHI. d-f) Análisis de la expresión relativa de mRNA por qPCR de HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  y VEGF en PBMCs aisladas de pacientes OSA (n = 30, seleccionados aleatoriamente) correlacionado con CT90. Se muestran los coeficientes de correlación Spearman (r) para cada gráfico.

#### 4.4 Perfil transcripcional y funcionalidad de Monocitos aislados de pacientes OSA, CPAP y HV.

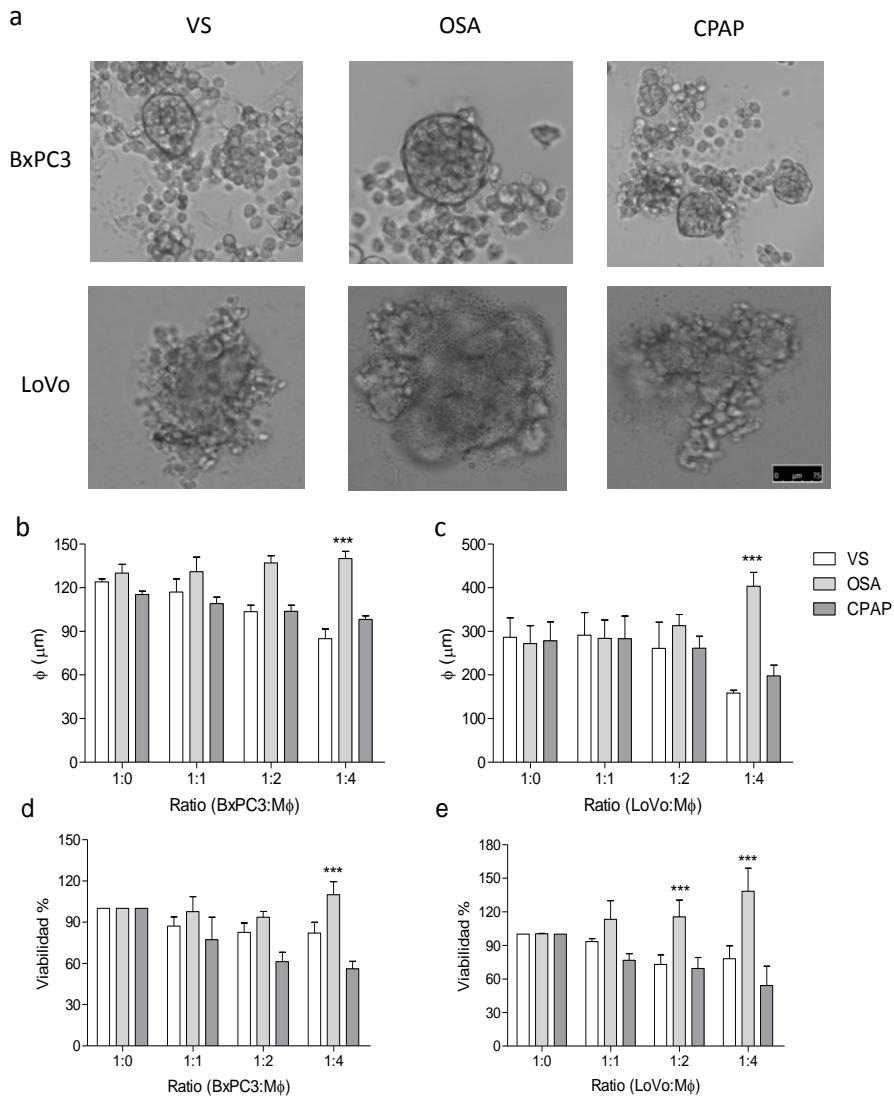
Una vez corroborado, con parámetros clínicos y marcadores moleculares específicos, las condiciones hipóxicas que sufren las células del sistema inmune en estos pacientes; nos propusimos identificar cómo estaba afectada la población de monocitos CD14<sup>+</sup>. Un primer análisis en la distribución poblacional no relevó ninguna diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de monocitos totales entre los grupos analizados (datos no mostrados). Sin embargo, al analizar el perfil transcripcional detectamos una clara polarización hacia un fenotipo alternativo, similar al observado en TAM, exclusivamente en monocitos aislados de los pacientes OSA (Figura 11 a-d). Este fenotipo está descrito como un aumento en la expresión de IL10, TGF $\beta$ 1 y VEGF, y una disminución de IL12p40 (Colegio et al., 2014; Mantovani et al., 2002). Al mismo tiempo, también observamos altos niveles de expresión de HIF1 $\alpha$  (Figura 11e), lo cual sugiere una actividad inmunosupresora de este factor para este tipo celular. Esta función se demostró en una publicación realizada por nuestro grupo (Anexo I), en la cual se describe cómo HIF1 $\alpha$  regula negativamente el potencial inflamatorio en monocitos de pacientes sépticos, y a su vez les confiere propiedades angiogénicas y reparadoras del tejido dañado (Shalova et al., 2015).



**Figura 11. Perfil de expresión transcripcional en monocitos CD14<sup>+</sup> aislados de los participantes.**

a-e) Análisis de la expresión de mRNA por qPCR de IL10, TGFβ1, VEGF, IL12p40 e HIF1α en monocitos CD14<sup>+</sup> aislados de VS (cajas de color blanco, n = 29), OSA (cajas de color gris claro, n = 30, seleccionados aleatoriamente), CPAP (cajas de color gris oscuro, n = 32). Se muestra la expresión relativa respecto a los valores VS. \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001, mediante la prueba de Mann-Whitney.

Para describir cómo este fenotipo alternativo podría intervenir en la progresión del cáncer, se estableció un modelo tumoral 3D, co-cultivando a diferentes ratios monocitos CD14<sup>+</sup> aislados de pacientes y donantes sanos junto con dos líneas celulares tumorales: una de páncreas (BXPC3) y otra de colon (LoVo) (Figura 12a). Después de 7 días se midió el tamaño de las esferas tumorales y se analizó su viabilidad. Los datos muestran que los monocitos CD14<sup>+</sup> aislados de VS y CPAP tienen una actividad anti-tumoral (menos tamaño y menos viabilidad de las esferas), mientras que los monocitos CD14<sup>+</sup> aislados de los pacientes OSA exhiben un papel pro-tumoral (mayor tamaño y mayor viabilidad de las esferas) para ambas líneas celulares analizadas (Figura 12 b-e). Estos resultados están en consonancia con el fenotipo y la función pro-tumoral a la cual se ha caracterizado a los TAM en diversos artículos (Mantovani et al., 2004; Mantovani et al., 2002).



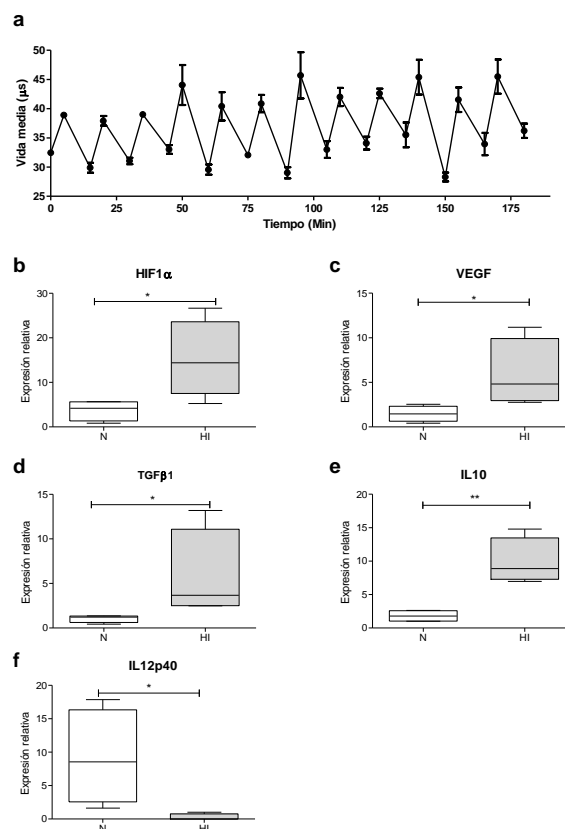
**Figura 12. Actividad anti-tumoral de monocitos CD14<sup>+</sup> aislados de los participantes.**

Monocitos CD14<sup>+</sup> se aislaron de VS (barras de color blanco, n = 20, seleccionados aleatoriamente), OSA (barras de color gris claro, n = 20, seleccionados aleatoriamente), CPAP (barras de color gris oscuro, n = 20, seleccionados aleatoriamente) y co-cultivados a diferentes ratios junto con dos líneas de células tumorales durante 7 días. a) Imágenes representativas del modelo 3D. b) Diámetro de la esfera tumoral de la línea BxPC3. c) Diámetro de la esfera célula tumoral de la línea LoVo. d) La viabilidad de la esfera tumoral de la línea BxPC3. e) Viabilidad de la esfera tumoral de la línea LoVo. La viabilidad se muestra normalizada respecto a la condición tumoral sin monocitos. M±SEM, \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001, mediante la prueba de Mann-Whitney.



## 4.5 Simulación *in vitro* de hipoxia intermitente en Monocitos CD14<sup>+</sup> aislados de VS.

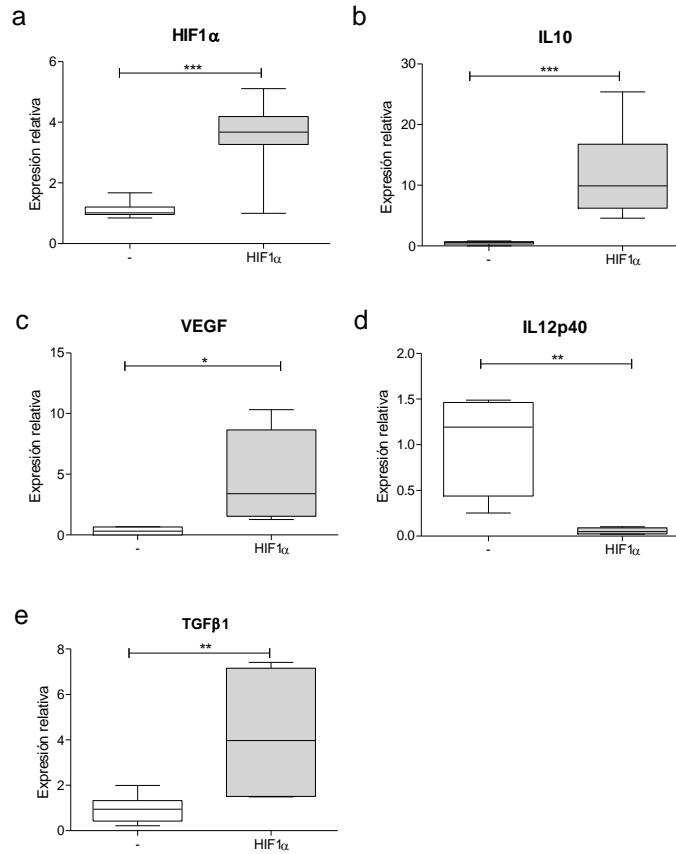
Los resultados obtenidos en los monocitos de pacientes OSA muestran un perfil transcripcional TAM. Por lo tanto, decidimos estudiar si los cambios fenotípicos eran principalmente inducidos por la hipoxia intermitente que sufren estos pacientes. Para ello se realizó un modelo *in vitro* de hipoxia intermitente (HI) establecido previamente por Ryan *et al* (Ryan *et al.*, 2005). En este modelo se cultivó monocitos CD14<sup>+</sup> aislados de VS con medios hipóxicos durante 5 min y con medios normóxicos durante 10 min durante 12 ciclos. Se midieron las fluctuaciones de oxígeno intracelular del modelo gracias a una sonda intracelular sensible al oxígeno (Figura 13a). A continuación, se analizó el mismo perfil de expresión transcripcional analizado para los monocitos de pacientes, observándose una clara polarización hacia un fenotipo TAM en los monocitos sometidos a HI (Figura 13 b-f). Estos datos revelan que el entorno hipóxico parece contribuir a la modulación hacia un fenotipo alternativo en monocitos.



**Figura 13. Perfil de expresión transcripcional en monocitos CD14<sup>+</sup> sometidos a hipoxia intermitente.**

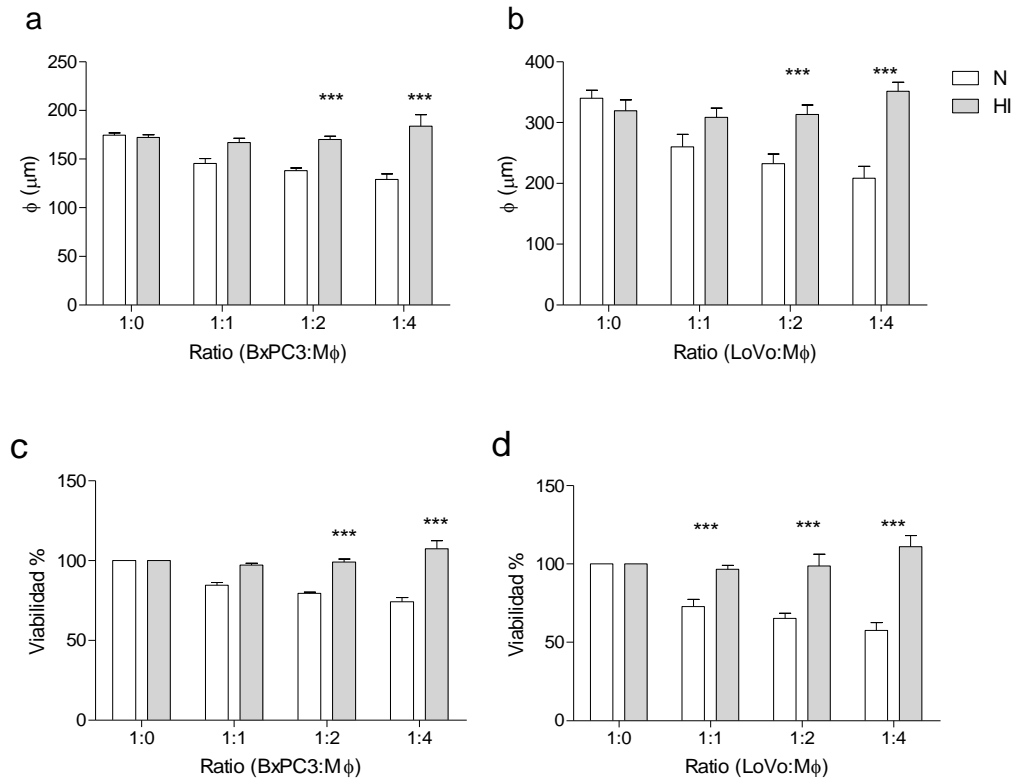
a) Efecto de la hipoxia intermitente sobre el oxígeno intracelular. Se muestra la vida media de la sonda fluorescente tras los cambios de medio. M±SEM, n=5. b-f) Análisis de la expresión de mRNA por qPCR de HIF1α, VEGF, TGFβ1, IL10 e IL12p40 y en monocitos CD14<sup>+</sup> aislados de VS cultivados en condiciones de normoxia (N, cajas de color blanco, n = 10) o en condiciones de hipoxia intermitente (HI, cajas de color gris claro, n = 10). Se muestra la expresión relativa respecto a los valores de N. \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001, mediante la prueba del t-test pareado.

Para confirmar el papel desencadenante de la hipoxia, se estudió la implicación del factor de transcripción HIF1 $\alpha$  en la polarización del fenotipo TAM, sobre-expresándolo con un vector constitutivo en monocitos aislados de VS (Figura 14).



**Figura 14. Perfil de expresión de genes asociados a TAM en monocitos CD14<sup>+</sup> en los que se sobre-expresa HIF1 $\alpha$ .** a-e) Análisis de la expresión de mRNA por qPCR de HIF1 $\alpha$ , VEGF, TGF $\beta$ 1, IL10 e IL12p40 y en monocitos CD14<sup>+</sup> aislados de VS nucleofectados con vector control (-, cajas de color blanco, n = 10) y vector de expresión constitutiva (HIF1 $\alpha$ , cajas de color gris claro, n = 10). Se muestra la expresión relativa respecto a los valores del vector control. \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001, mediante la prueba del t-test pareado.

Seguidamente, evaluamos si el modelo *in vitro* de HI era capaz de reproducir la actividad pro-tumoral en modelo de tumores en 3D descrito anteriormente para los monocitos de pacientes (figura 12). Mientras que los monocitos cultivados en normoxia reducían el tamaño y la viabilidad de las esferas para las líneas de celulares BxPC3 y LoVo, los monocitos bajo condiciones de HI no eran capaces de afectarlas (Figura 15).

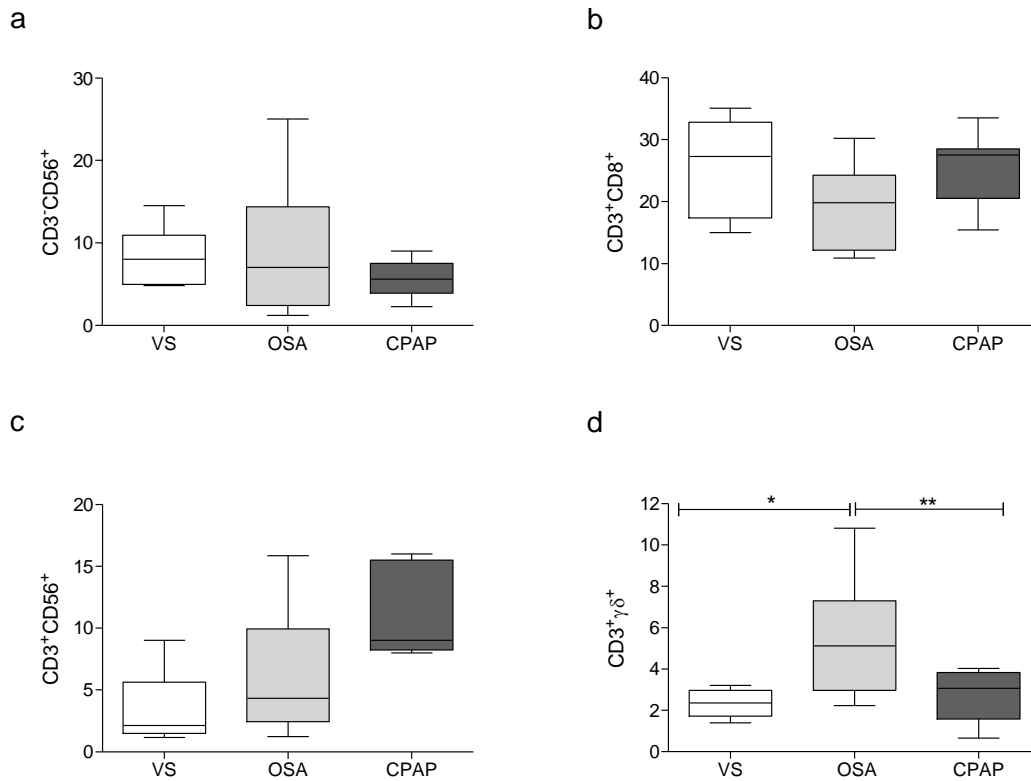


**Figura 15. Actividad pro-tumoral de monocitos CD14<sup>+</sup> sometidos a hipoxia intermitente.**

Monocitos CD14<sup>+</sup> aislados de VS fueron pre-condicionados bajo condiciones de normoxia (N, barras de color blanco, n=10) o hipoxia intermitente (HI, barras de color gris claro, n = 10) y posteriormente co-cultivados en condiciones normales a diferentes ratios junto con dos líneas de células tumorales durante 7 días. a) Diámetro de la esfera tumoral de la línea BxPC3. b) Diámetro de la esfera tumoral de la línea LoVo. c) La viabilidad de las esfera tumoral de la línea BxPC3. d) Viabilidad de las esfera tumoral de la línea LoVo. La viabilidad se muestra normalizada respecto a la línea tumoral sin monocitos. M±SEM, \*\*\* p <0,001, mediante la prueba del t-test pareado.

#### 4.6 Distribución de los diferentes subtipos celulares con conocida actividad anti-tumoral.

Debido a la gran importancia de las células linfocitarias en la erradicación de tumores, se analizó cómo afecta la hipoxia intermitente de pacientes OSA sobre otros subtipos celulares con reconocida actividad anti-tumoral (Figura 16). Al analizar la distribución de las NKs (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>), los linfocitos T citotóxicos (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), las células NKT (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) y los linfocitos T γδ (CD3<sup>+</sup>γδ<sup>+</sup>), sólo se encontraron diferencias en el porcentaje de la población de linfocitos T γδ (Figura 16), ratificando un artículo ya publicado (Dyugovskaya et al., 2003). Cabe destacar que la distribución de cada población celular obtenida en VS y CPAP coincidió con una distribución poblacional normal establecida para el mismo rango de edad (Sansoni et al., 1993).

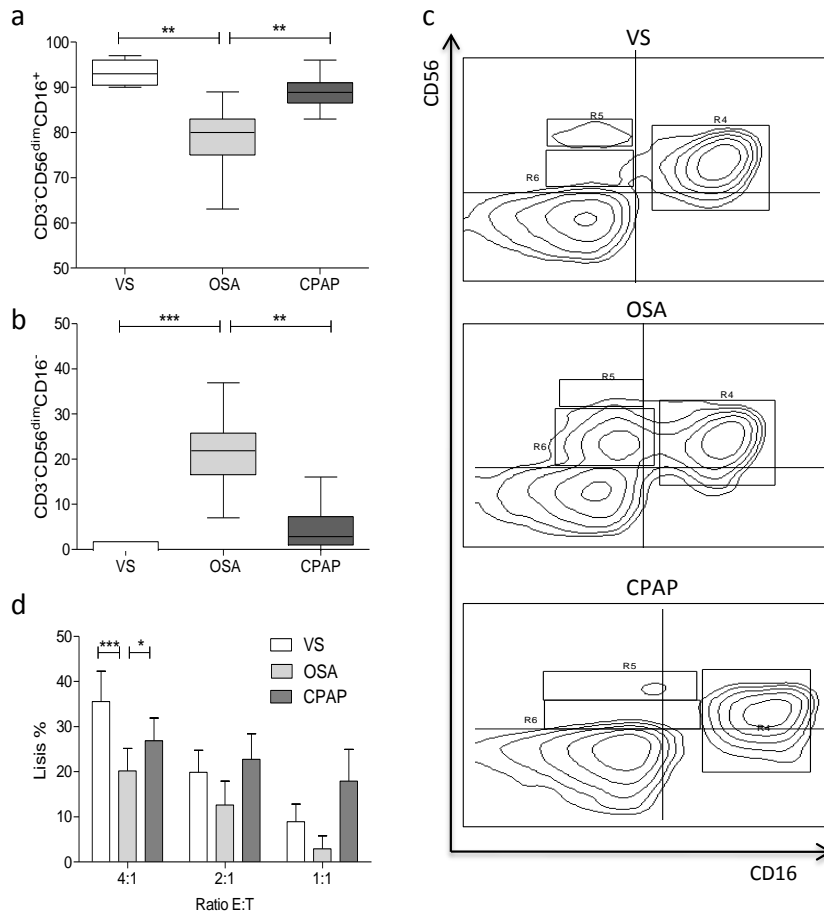


**Figura 16. Distribución de las poblaciones linfocitarias con reconocida actividad citotóxica.**

PBMCs aisladas de VS (cajas de color blanco, n = 20, seleccionados aleatoriamente), OSA (cajas de color gris claro, n = 20, seleccionados aleatoriamente), CPAP (cajas de color gris oscuro, n = 20, seleccionados aleatoriamente) se analizaron por citometría de flujo. a) Distribución porcentual de CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> sobre el total de linfocitos seleccionados. b) Distribución porcentual de CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> en el total de linfocitos seleccionados. c) Distribución porcentual de CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> en el total de linfocitos seleccionados. d) Distribución porcentual de CD3<sup>+</sup>γδ<sup>+</sup> sobre el total de linfocitos seleccionados. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01, utilizando una prueba de Mann-Whitney.

#### 4.6.1 Análisis fenotípico de las células Natural Killer.

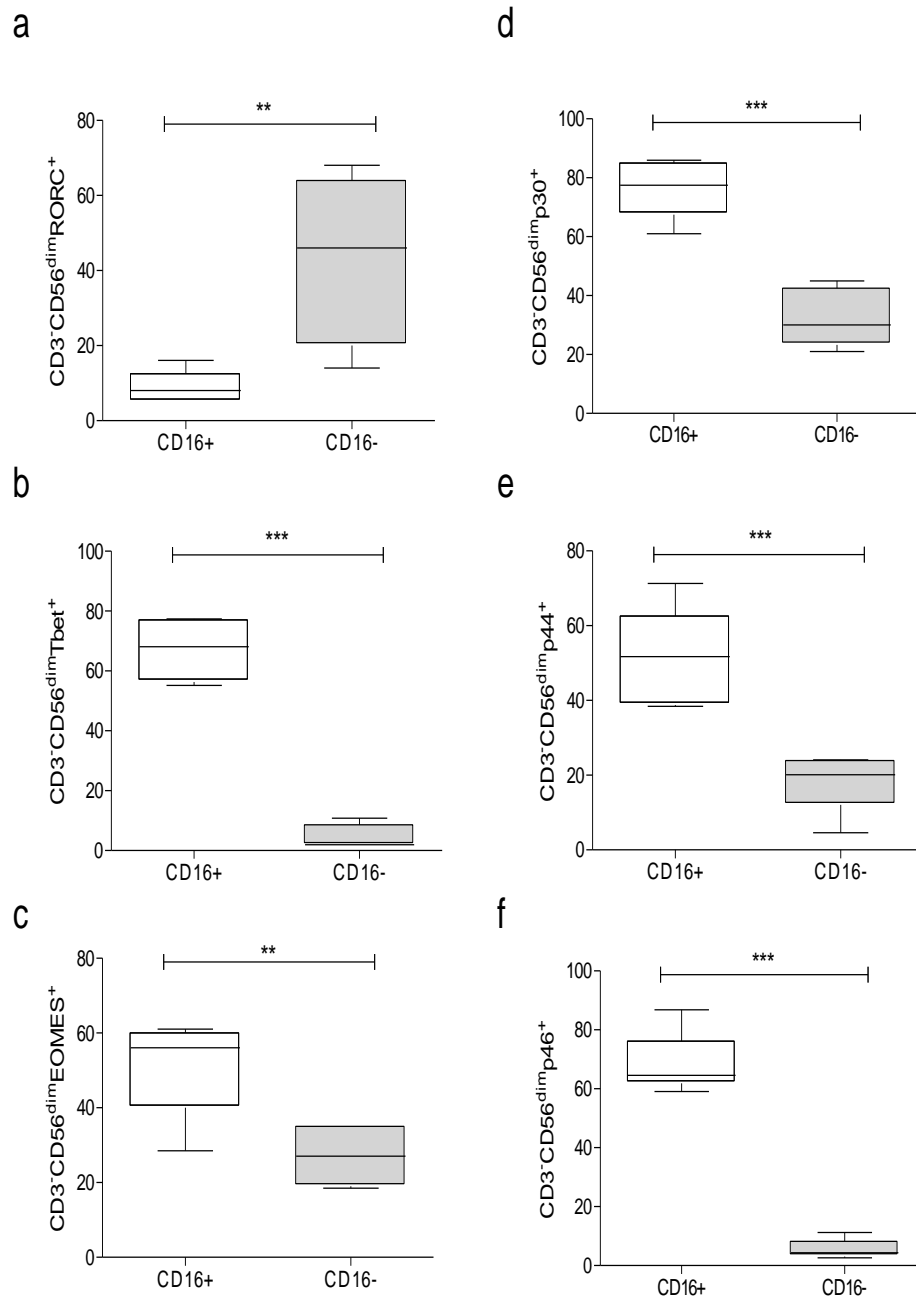
A pesar de no encontrar ninguna diferencia en el porcentaje total de NKs entre pacientes y donantes sanos (Figura 16a), el análisis del fenotipo indicó una reducción significativa del subconjunto de NK citotóxico CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> en pacientes OSA (Figura 17a), acompañada por un aumento en un nuevo subtipo de NK CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> (Figura 17 b y c). La actividad citotóxica se analizó utilizando un método estándar (ensayo de liberación de lisis-TDA europeo) con células K562 como objetivo tumoral. La citotoxicidad se observó significativamente afectada en pacientes no tratados (OSA: 20,1 ± 5,0%, CPAP: 26,8 ± 5,2%, HV: 35,5 ± 6,7%, en el ratio efector:tumor (E:T) 4: 1, Figura 17 d). Se trata de un dato muy relevante que podría explicar la mayor incidencia a tumores observada en estos pacientes.



**Figura 17. Fenotipo y funcionalidad de las células NK aisladas de los participantes.**

PBMCs aisladas de VS (cajas de color blanco, n = 20, seleccionados aleatoriamente), OSA (cajas de color gris claro, n = 20, seleccionados aleatoriamente), CPAP (cajas de color gris oscuro, n = 20, seleccionados aleatoriamente) se analizaron por citometría de flujo. a) Distribución porcentual de CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> sobre el total de NKs seleccionadas. b) Distribución porcentual de CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> sobre el total de NKs seleccionadas. c) Dot plot representativo de la expresión de CD56 y CD16 sobre el total de linfocitos seleccionados (R4, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>; R5, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>; R6, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>). d) Actividad citotóxica de las NKs aisladas de VS (barras de color blanco, n = 20, seleccionados aleatoriamente), OSA (barras de color gris claro, n = 20, seleccionados aleatoriamente), CPAP (barras de color gris oscuro, n = 20, seleccionados aleatoriamente) se analizaron por ensayo de liberación de europio-TDA después de 2 horas de incubación con K562 como células diana. Se muestran los porcentajes de lisis, M±SEM. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p > 0,005 utilizando una prueba de Mann-Whitney.

El subtipo de NK CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> que se observa (R6, Figura 17c) es probablemente el responsable de la baja citotoxicidad global de las NKs en los pacientes OSA sin tratar, por lo que nos planteamos caracterizarlo mejor. Una de las posibles hipótesis que proponemos para explicar la aparición de este nuevo subtipo de NK sería un defecto en la maduración provocado por el propio microambiente generado por los pacientes OSA. Para ello, se analizaron los factores de transcripción RORC, Tbet y EOMES que han sido descritos en la diferenciación de las NKs (Eissens et al., 2012; Freud and Caligiuri, 2006; Freud et al., 2006; Gordon et al., 2012; Hughes et al., 2014).



**Figura 18. Estado de madurez del subtipo CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> en NK aisladas de pacientes OSA.**

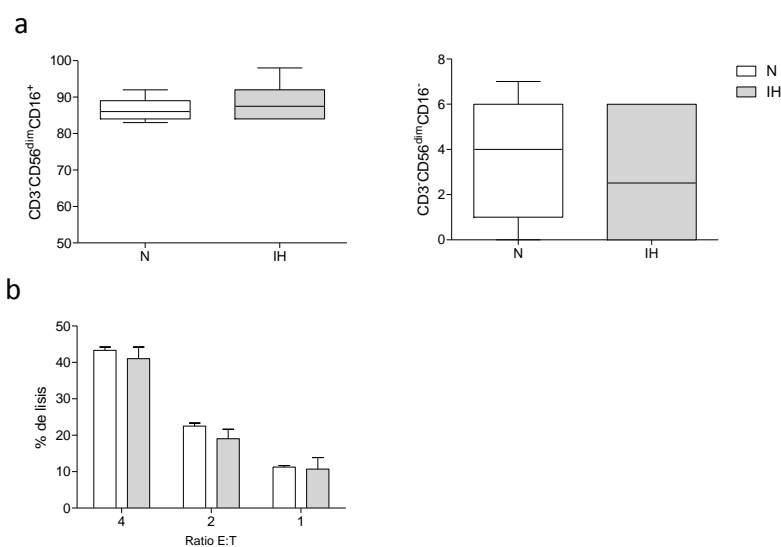
NKs CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> (cajas de color blanco) y CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> (cajas de color gris claro) de pacientes OSA (n=20, seleccionados aleatoriamente) fueron analizadas por citometría de flujo. a) Distribución porcentual CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup>RORC<sup>+</sup>. b) Distribución porcentual CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup>Tbet<sup>+</sup>. c) Distribución porcentual CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup>EOMES<sup>+</sup>. d) Distribución porcentual CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup>p30<sup>+</sup>. e) Distribución porcentual CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup>p44<sup>+</sup>. f) Distribución porcentual CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup>p46<sup>+</sup>. \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001, usando t-test pareado.

Nuestros datos muestran que el subtipo CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> presenta un aumento en RORC y una disminución Tbet y EOMES comparándolo con el subtipo CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> (Figura 18 a-c). En paralelo analizamos la expresión de tres NCR (p30, p44 y p46) caracterizados sobre la superficie de NKs maduras (Caldwell et al., 2001; Di Santo, 2006; Eissens et al., 2012; Freud and Caligiuri, 2006; Freud et al., 2006; Gregoire et al., 2007; Hughes et al., 2014; Trinchieri,

1989). De nuevo el subtipo  $CD3^+CD56^{dim}CD16^-$  mostraba una gran disminución de todos ellos (Figura 18 d-f). Estos resultados no sólo ratifican el estado inmaduro, sino que también explican la baja citotoxicidad contra las K562 observada anteriormente (Figura 17 d).

#### 4.8 Simulación *in vitro* de hipoxia intermitente en células NK aisladas de VS.

Se evaluó si los cambios, fenotípicos y funcionales observados en las NKs de los pacientes eran consecuencia de la hipoxia intermitente. Para ello desarrollamos un modelo *in vitro* de hipoxia intermitente similar al expuesto anteriormente en monocitos. Sin embargo, no fuimos capaces de reproducir el fenotipo inmaduro y tampoco se observó una disminución de la citotoxicidad contra K562 (Figura 19). Los resultados apuntan que únicamente las condiciones de hipoxia no son capaces de alterar las NKs, por lo que deben existir otros factores complementarios generados en el contexto de la OSA.

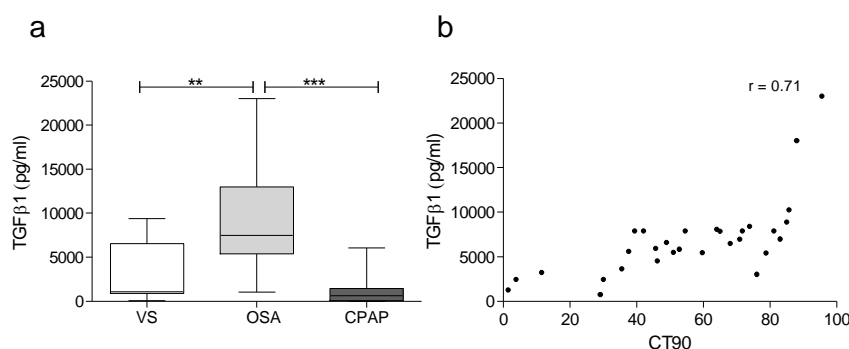


**Figura 19. Fenotipo y citotoxicidad de células NK sometidas a hipoxia intermitente.**

Células NK aisladas de VS fueron cultivadas bajo condiciones de normoxia (N, cajas de color blanco, n = 7) o hipoxia intermitente (IH, cajas de color gris claro, n = 7). a) Distribución porcentual de  $CD3^+CD56^{dim}CD16^+$  y  $CD3^+CD56^{dim}CD16^-$  el total de NKs seleccionadas. b) La actividad citotóxica de las NKs aisladas de VS bajo condiciones de normoxia (N, barras de color blanco, n = 7) o bajo condiciones de hipoxia intermitente (IH, barras de color gris claro, n = 7) se analizaron por ensayo de liberación de europio-TDA después de 2 horas de incubación con K562 como células diana; Se muestran los porcentajes de lisis, M ± SEM.

## 4.9 Análisis de TGFβ en pacientes OSA, CPAP y HV.

El TGFβ1 es uno de los factores que disminuye la citotoxicidad de las NKs (Cerqueira et al., 2013). A pesar de lo reportado previamente en otros trabajos realizados en pacientes OSA (Gordon et al., 2012; Ye et al., 2012), en nuestra cohorte los niveles de TGFβ1 eran significativamente altos en el suero de los pacientes OSA respecto a los VS y CPAP (Figura 20a). Este dato, junto a la correlación encontrada con el parámetro clínico CT90 (Figura 20b), nos indica que la magnitud de la hipoxia en los pacientes con OSA va en consonancia con un aumento de los niveles de proteína en suero.



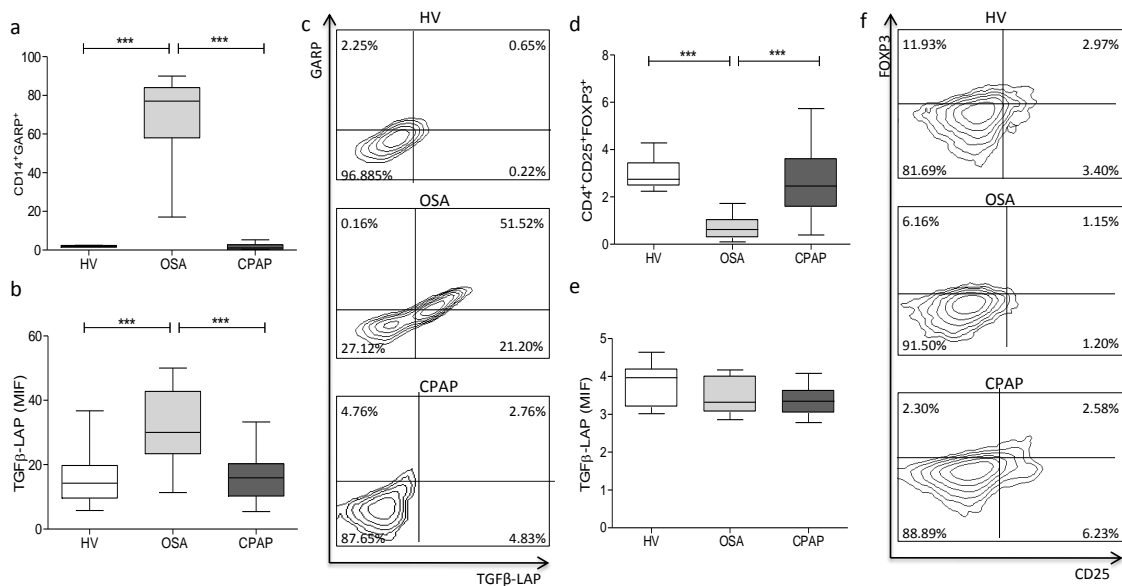
**Figura 20. Análisis y actividad biológica del TGFβ en el suero de pacientes OSA, CPAP y VS.**

a) TGFβ1 en suero de VS (cajas de color blanco, n = 20, seleccionados aleatoriamente), OSA (cajas de color gris claro, n = 30, seleccionados aleatoriamente), CPAP (cajas de color gris oscuro, n = 20, seleccionados aleatoriamente). \*\* p <0,01; \*\*\* p>0,005 utilizando una prueba de Mann-Whitney. b) TGFβ1 en suero de pacientes no tratados (OSA, n = 30) correlacionado con CT90. Se muestra el coeficiente de correlación de Spearman (r).

En paralelo a la medición del TGFβ1 en los sueros de los participantes, se buscó qué poblaciones celulares podrían estar alteradas en este contexto. Para ello analizamos el propio TGFβ-LAP y el marcador GARP (del inglés *glycoprotein-A repetitions predominant protein*) sobre la superficie de las distintas poblaciones celulares. Este último marcador es el responsable de adherir el TGFβ latente a la superficie de las células. Ambas proteínas se encontraron únicamente expresadas sobre la superficie de los monocitos provenientes de los



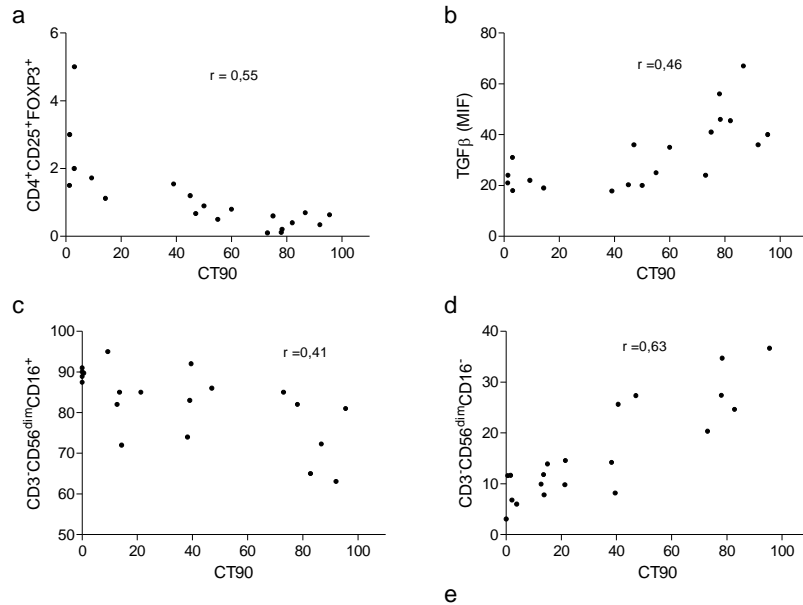
pacientes OSA sin tratar (Figura 21 a-c). El TGFβ está descrito como inductor de la población de Tregs (Chen et al., 2003; Yamagiwa et al., 2001). No obstante, observamos una disminución significativa de esta población en comparación con VS y CPAP (Figura 21 d y f). En consecuencia con este resultado, tampoco encontramos TGFβ-LAP sobre su superficie (Figura 21e).



**Figura 21. Análisis de las poblaciones inmunes asociadas al TGFβ en pacientes OSA, CPAP y VS.** PBMCs aisladas de HV (cajas de color blanco, n = 29), OSA (cajas de color gris claro, n = 20, seleccionados aleatoriamente), CPAP (cajas de color oscuro, n = 20, seleccionados aleatoriamente) se analizaron por citometría de flujo. a) Distribución porcentual de GARP<sup>+</sup> sobre monocitos CD14<sup>+</sup>. b) TGFβ-LAP sobre monocitos CD14<sup>+</sup>. Se muestra la media de la intensidad de fluorescencia (MIF). c) Dot plot representativo de la expresión de TGFβ-LAP y GARP sobre monocitos CD14<sup>+</sup>. d) Distribución porcentual de Células Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>) sobre el total de linfocitos T. e) TGFβ-LAP sobre Células Tregs. Se muestra la MIF. f) Dot plot representativo de la expresión de CD25 y FOXP3 sobre linfocitos CD4<sup>+</sup>. \*\*\*p<0,001, usando el test Mann-Whitney.

#### 4.10 Correlación entre el parámetro clínico CT90 y el análisis inmunológico de las células de la sangre de los pacientes OSA.

A pesar tratarse de una cohorte bien establecida de pacientes con OSA grave (AHI>30), encontramos una gran variabilidad en el parámetro clínico CT90. Por lo que nos propusimos correlacionar el CT90, no sólo con los marcadores moleculares asociados a la hipoxia, sino también con la distribución y fenotipos de las poblaciones inmunes descritas con anterioridad (Figura 22). Los coeficientes de Spearman (r) muestran una alta correlación entre los parámetros enfrentados indicándonos que la hipoxia que sufren los pacientes está directamente relacionada con los fenotipos observados.

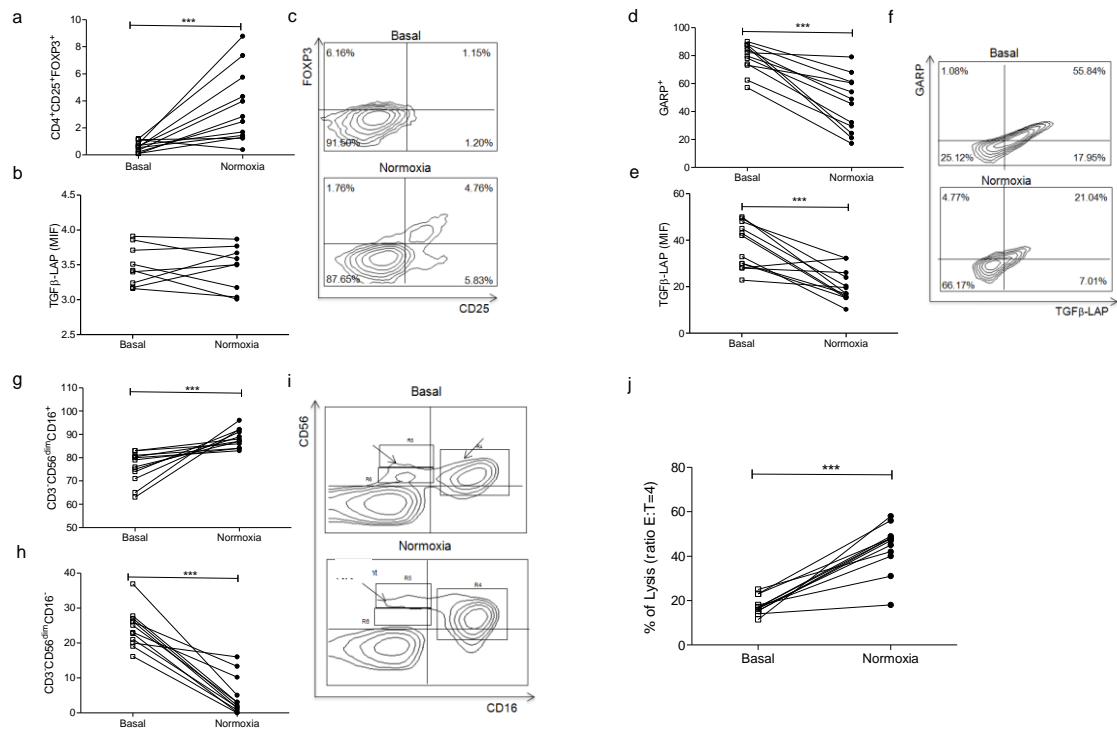


**Figura 22. Correlación entre el parámetro clínico CT90 y la distribución de los fenotipos inmunes.**

PBMCs aisladas de OSA (cajas grises claras, n = 20, seleccionados aleatoriamente) se analizaron por citometría de flujo. a) Distribución porcentual de Tregs ( $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ ) sobre el total de linfocitos T correlacionada con CT90. b)  $TGF\beta$ -LAP sobre monocitos  $CD14^+$ . Se muestra la media de la intensidad de fluorescencia (MIF) correlacionada con CT90. c) Distribución porcentual de  $CD3^+CD56^{dim}CD16^+$  sobre el total de NKs seleccionadas correlacionada con CT90. d) Distribución porcentual de  $CD3^+CD56^{dim}CD16^-$  sobre el total de NKs seleccionadas correlacionada con CT90.

#### 4.11 Exposición bajo condiciones de normoxia *ex vivo* a las células circulantes de los pacientes OSA.

Para entender mejor las implicaciones del tratamiento CPAP en esta patología, las PBMCs de pacientes con OSA que eran más hipoxémicos ( $CT90 > 60\%$ , n = 12) se cultivaron durante 16 horas en condiciones estándar (normoxia,  $37^\circ C$  al 5% de  $CO_2$ ). Seguidamente, analizamos el fenotipo de las principales poblaciones celulares comparándolas entre el tiempo basal y post-normoxia para cada paciente (Figura 23). La población de Tregs recuperó una distribución similar a las de los VS y CPAP, mientras que su expresión de  $TGF\beta$ -LAP en superficie no varió (Figura 23 a-c). A su vez, la expresión de GARP y  $TGF\beta$ -LAP sobre la superficie de los monocitos alcanzaron los niveles observados para el fenotipo sano (VS) (Figura 23 d-f). Como se esperaba, el porcentaje de NKs fue similar después del cultivo normoxia (datos no mostrados). Sin embargo, el subconjunto citotóxico de NKs ( $CD3^+CD56^{dim}CD16^+$ ) recuperó su distribución normal, acompañado de una gran reducción del subconjunto  $CD3^+CD56^{dim}CD16^-$  (Figura 23 g-i). Así mismo, la funcionalidad NK también se recuperó después del período de normoxia (Figura 23 j).

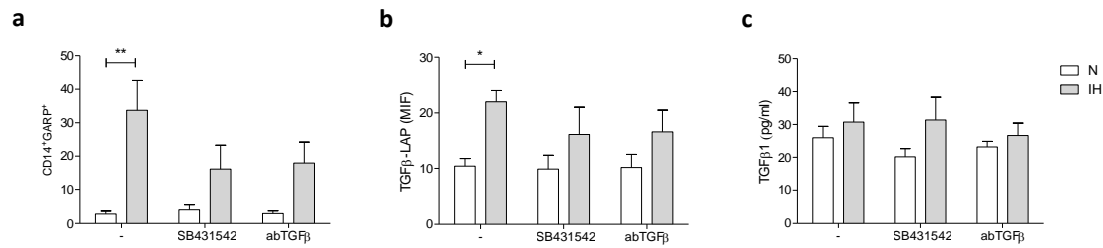


**Figura 23. PBMCs de pacientes OSA graves tratados de forma *ex vivo* a condiciones de normoxia.**

PBMCs aisladas de los pacientes OSA más hipoxémicos (CT90>60%, n=12) en condiciones basales (cuadrados blancos) y tras 16 horas de normoxia (puntos negros) se analizaron por citometría de flujo. a) Distribución porcentual de GARP<sup>+</sup> sobre monocitos CD14<sup>+</sup>. b) TGFβ-LAP sobre monocitos CD14<sup>+</sup>. Se muestra la media de la intensidad de fluorescencia (MIF). c) Dot plot representativo de la expresión de TGFβ-LAP y GARP sobre monocitos CD14<sup>+</sup>. d) Distribución porcentual de Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>) sobre el total de linfocitos T. e) TGFβ-LAP sobre Células Tregs. Se muestra la MIF. f) Dot plot representativo de la expresión de CD25 y FOXP3 sobre linfocitos CD4<sup>+</sup> seleccionados. g) Distribución porcentual de CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> sobre el total de NKs seleccionadas. h) Distribución porcentual de CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> sobre el total de NKs seleccionadas. i) Dot plot representativo de la expresión de CD56 y CD16 sobre el total de linfocitos seleccionados (R4, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>; R5, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>; R6, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>). j) Actividad citotóxica por ensayo de liberación de europio -TDA después de 2 horas de incubación con K562 como células diana; Se muestran los porcentajes de lisis. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p > 0,005 utilizando t-test pareado.

#### 4.11 Comunicación celular entre monocitos y células NK mediada por la activación de TGFβ.

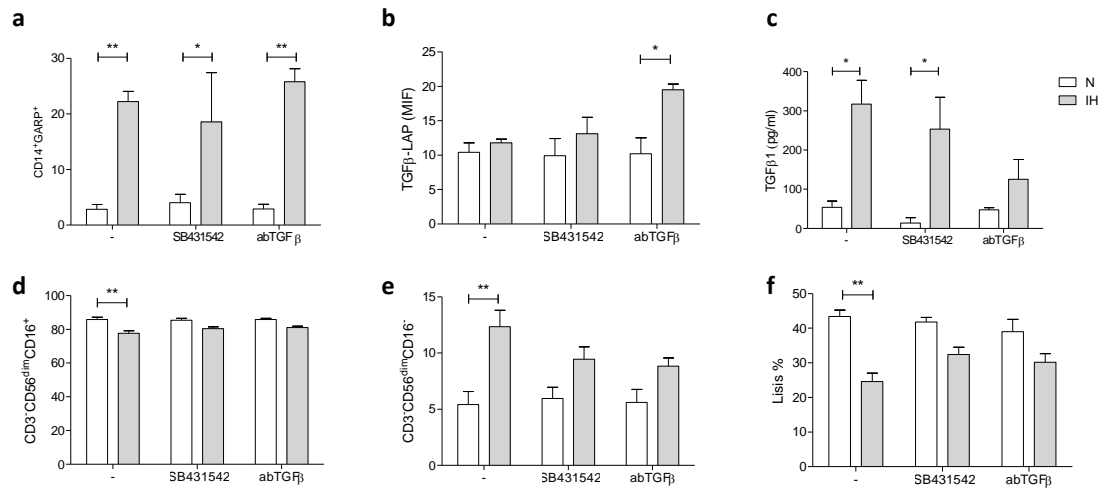
Para identificar el mecanismo responsable de la inmunosupresión observada en los pacientes con OSA, monocitos de VS se cultivaron bajo las condiciones del modelo *in vitro* de hipoxia intermitente (HI) anteriormente descrito (Figura 13) (Ryan et al., 2005). El porcentaje de GARP<sup>+</sup> y TGFβ-LAP en las membranas de los monocitos aumentó en condiciones de HI (Figura 24 a y b). Siendo este aumento levemente reducido por el inhibidor del receptor de TGFβ (SB431542) o por el anticuerpo contra TGFβ1 (abTGFβ) (Figura 24 a y b). Curiosamente, no se observó liberación de la forma activa de TGFβ1 en el sobrenadante (Figura 24c). De tal modo, que los monocitos bajo hipoxia intermitente, son capaces de expresar TGFβ-LAP en su membrana, pero no de liberar la forma activa al sobrenadante (Figura 24).



**Figura 24. Expresión de TGFβ-LAP por monocitos CD14<sup>+</sup> sometidos a hipoxia intermitente.**

Monocitos CD14<sup>+</sup> aislados de VS sometidos a condiciones de normoxia (N, barras de color blanco, n = 9) o hipoxia intermitente (IH, barras de color gris claro, n = 9). El medio se suplementó con el inhibidor del receptor del TGFβ (SB431542, 10μM) o con el anticuerpo anti-TGFβ<sub>1</sub> (abTGFβ<sub>1</sub>, 50ng/ml). a) Distribución porcentual de GARP<sup>+</sup> sobre monocitos CD14<sup>+</sup>. b) TGFβ-LAP sobre monocitos CD14<sup>+</sup>. Se muestra la media de la intensidad de fluorescencia (MIF). c) TGFβ<sub>1</sub> en el sobrenadante del medio. M±SEM \* p <0,05; \*\* p <0,01 utilizando t-test pareado.

Seguidamente analizamos la capacidad de los monocitos de liberar el TGFβ-LAP en un co-cultivo con NKs homólogas (ratio 1:1). Si comparamos los resultados con la Figura 24, la expresión de GARP no varía en el co-cultivo y es independiente a los inhibidores (Figura 25a), mientras que la expresión en la superficie de TGFβ-LAP disminuye en la superficie de los monocitos excepto cuando añadimos el abTGFβ (Figura 25b). Paralelamente, se observó la liberación de la forma activa de TGFβ<sub>1</sub> en el sobrenadante excepto cuando añadimos el abTGFβ (Figura 25c). Por tanto podemos concluir que los monocitos bajo hipoxia intermitente son capaces de liberar TGFβ<sub>1</sub> cuando se co-cultivan con NKs homólogas, y esta liberación se puede bloquear usando un anticuerpo específico para TGFβ<sub>1</sub> (Figura 25 a-c). Finalmente, estudiamos el fenotipo y capacidad citotóxica de las NKs del co-cultivo. Los datos muestran una clara reducción del subtipo citotóxico (Figura 25d), acompañado de un aumento del subtipo inmaduro (Figura 25e) y una baja capacidad citotóxica (Figura 25f). Además este efecto se inhibió de forma específica con el SB431542 y con el abTGFβ (Figura 25 d-f). Estos hallazgos demuestran que la supresión de la citotoxicidad de las NKs en pacientes con OSA está mediada por la activación de TGFβ por parte de los monocitos bajo condiciones de hipoxia intermitente. Estos resultados apoyan nuestra hipótesis que apuntaba de la necesidad de varios factores para que la condición de hipoxia intermitente genere una inmunosupresión completa del sistema inmune.



**Figura 25. Regulación de la población de NK citotóxicas por monocitos CD14<sup>+</sup> GARP<sup>+</sup> TGFβ-LAP<sup>high</sup> sometidos a hipoxia intermitente a través de la activación del TGFβ1.**

Monocitos CD14<sup>+</sup> aislados de VS sometidos a condiciones de normoxia (N, barras de color blanco, n = 9) o hipoxia intermitente (IH, barras de color gris claro, n = 9). A continuación NKs homólogas fueron co-cultivadas a ratios 1:1 junto con monocitos pre-condicionados durante 2h. El medio se suplementó con el inhibidor del receptor del TGFβ (SB431542, 10μM) o con el anticuerpo anti-TGFβ1 (abTGFβ, 50ng/ml). a) Distribución porcentual de GARP<sup>+</sup> sobre monocitos CD14<sup>+</sup>. b) TGFβ-LAP sobre monocitos CD14<sup>+</sup>. Se muestra la media de la intensidad de fluorescencia (MIF). c) TGFβ1 en el sobrenadante del medio. d) Distribución porcentual de CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> del total de células NK seleccionadas. e) Distribución porcentual de CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> del total de células NK seleccionadas. f) Actividad citotóxica por ensayo de liberación de europio-TDA después de 2 horas de incubación con K562 como células diana; se muestran los porcentajes de lisis. M±SEM \* p <0,05; \*\* p <0,01 utilizando t-test pareado.



# **DISCUSIÓN**





## 5. DISCUSIÓN

Este trabajo tiene por objetivo revelar la plasticidad del sistema inmune innato en pacientes que sufren de apnea obstructiva del sueño (OSA), y su implicación en la patogénesis cancerígena. Es bien conocido que el equilibrio entre la respuesta inmune y el microambiente pro-tumoral es esencial en la progresión del tumor (Nieto et al., 2012). Este equilibrio se encuentra alterado en pacientes que sufren hipoxia intermitente, condición que podría explicar el incremento en la incidencia de cáncer en los enfermos con OSA (Campos-Rodriguez et al., 2013; Martinez-Garcia et al., 2014a). Nuestros datos, generados con una cohorte de 92 pacientes que sufren OSA grave, describen por primera vez como afecta de forma sistémica la hipoxia intermitente y el microambiente generado sobre las distintas poblaciones del sistema inmune.

La hipoxia intermitente a la que están sometidos los pacientes con OSA produce un entorno favorable a la aparición de tumores que involucra la expresión de HIF1 $\alpha$ , VEGF y TGF $\beta$ 1. Estos factores se correlacionan con dos parámetros muy importantes en la caracterización clínica de la OSA, el AHI y el CT90; siendo este último el que obtiene el mayor coeficiente de correlación Spearman. Estos datos son consistentes con estudios previos que mostraron que el CT90 fue el único parámetro de sueño asociado de forma independiente con el aumento de la incidencia (Nieto et al., 2012) y mortalidad del cáncer (Martinez-Garcia et al., 2014a) en pacientes OSA. De hecho, en una cohorte multicéntrica, se describió cómo los pacientes con un CT90 > 12% tenían un riesgo mayor de incidencia de cáncer, de más de 2 veces, en comparación con aquellos pacientes con una CT90 < 1,2% (Campos-Rodriguez et al., 2013). Según nuestros resultados, las correlaciones de los parámetros clínicos (con marcadores moleculares o con fenotipos celulares) parecen indicar que el efecto de la hipoxia intermitente parece depender más de la magnitud de la hipoxia, que del número de secuencias de oxigenación-desaturación.

Los monocitos fueron la primera población del sistema inmune que caracterizamos, encontrando cambios fenotípicos y funcionales alterados en la cohorte de pacientes con OSA que no recibían tratamiento. Estos cambios observados se encuentran ampliamente descrito en M $\phi$  asociados a tumores, los denominados TAM, células con gran actividad pro-tumoral (Mantovani et al., 2002). En concreto, los monocitos aislados de pacientes con OSA sin tratar mostraron una alta expresión a nivel de mRNA de proteínas específicas, como VEGF, TGF $\beta$  e IL10, que contribuyen a generar un ambiente que favorece el crecimiento de células tumorales (Dirkx et al., 2006). Debido a las múltiples limitaciones de los estudios con células humanas, se

evaluó la funcionalidad de los monocitos de forma *ex vivo* en un modelo tumoral en 3D (Friedrich et al., 2007; Vinci et al., 2012). El ensayo mostró que, mientras los monocitos provenientes de voluntarios sanos y pacientes tratados reducían el tamaño y la viabilidad de las esferas, los monocitos OSA promovían su crecimiento. Además, simulando la hipoxia intermitente *in vitro* fuimos capaces de reproducir el fenotipo y la funcionalidad pro-tumoral en monocitos sanos. En paralelo demostramos que el fenotipo inmunosupresor característico de TAM se reproducía cuando sobre-expresábamos HIF1 $\alpha$  en monocitos sanos. En el Anexo I se muestra la gran capacidad de re-programación conferida por el factor de transcripción HIF1 $\alpha$  sobre monocitos humanos aislados de pacientes sépticos, datos publicados por nuestro grupo (Shalova et al., 2015). Existen otros trabajos que describen la participación de HIF1 $\alpha$  como principal factor pro-tumoral en M $\phi$  (Colegio et al., 2014; Corzo et al., 2010). El más reciente de estos demuestra que el microambiente tumoral y, más concretamente, el ácido láctico producido por los tumores es capaz de sobre-expresar HIF1 $\alpha$  y alterar fenotípicamente a los M $\phi$  cercanos (Colegio et al., 2014). Nuestro estudio parece indicar que la hipoxia intermitente que sufren los monocitos provenientes de pacientes con OSA es capaz de producir cambios fenotípicos y funcionales favorables al desarrollo tumoral.

La participación de otras muchas poblaciones inmunológicas en los distintos procesos de génesis tumoral, nos llevo a ampliar el estudio a otras células del sistema inmune con reconocida actividad anti-tumoral como las NKs, células NKT, células T citotóxicas y células T  $\gamma\delta$ . Entre todas ellas, únicamente las células T  $\gamma\delta$  de los pacientes OSA no tratados sufrieron un incremento poblacional estadísticamente superior. En humanos las células T  $\gamma\delta$  están muy poco caracterizadas debido al bajo porcentaje en circulación (Dyugovskaya et al., 2002), sin embargo este aumento en los pacientes OSA podría tratarse de un mecanismo citotóxico de compensación por la remarcada reducción de la población citotóxica de NKs en circulación (NKs con baja expresión de CD16). Cabe destacar que una baja citotoxicidad de las NKs se encuentra altamente asociado con un mayor riesgo de cáncer (Imai et al., 2000). Este fenotipo inmaduro encontrado en las NKs de los pacientes fue corroborado por factores de transcripción intracelulares (EOMES, T-bet y RORC) y también por una disminución de NKp30, NKp44 y NKp46 (Eissens et al., 2012). Esta reducción de los receptores citotóxicos naturales explican la baja citotoxicidad encontrada contra la línea tumoral K562, factores determinantes que podrían explicar la elevada tasa de aparición de cáncer en pacientes con OSA desde el punto de vista inmunológico (Campos-Rodriguez et al., 2013). A diferencia de los monocitos, el modelo de hipoxia intermitente no fue capaz de generar un fenotipo inmaduro sobre las NKs, por lo que debían existir otros factores solubles y celulares responsables. Existen numerosas

moléculas responsables de la maduración de las NKs, pero muy pocas son capaces de invertir este proceso, entre ellas el TGF $\beta$  ha sido ampliamente descrito en la literatura (Allan et al., 2010; Cerdeira et al., 2013; Fehniger et al., 2003; Keskin et al., 2007; Lee et al., 2004; Malygin et al., 1993; Nagler et al., 1989). El trabajo más revelador describe cómo al añadir TGF $\beta$ 1 se observa una disminución de la población de NKs citotóxicas (Keskin et al., 2007). Como esperábamos, el análisis de citoquinas presentes en suero mostró niveles significativamente altos del TGF $\beta$  en pacientes OSA que no eran tratados, confirmando el papel de esta citoquina como factor importante sobre el fenotipo observado. En este caso, la literatura existente sobre los niveles de TGF $\beta$  en circulación no coincide con nuestra observación (Ni et al., 2015; Ye et al., 2012). Los valores de TGF $\beta$  observados en los controles de ambos artículos son muy inferiores a los observados en nuestro ensayo, por lo que creemos que se debe tratar de un problema en el reconocimiento del propio TGF $\beta$ . Este reconocimiento requiere de un tratamiento previo de activación por acidificación muy agresivo que permite liberarlo para ser detectado por los kit comerciales.

Debido a la relación directa entre la señalización del TGF $\beta$  con la producción del factor de transcripción FOXP3 (Chen et al., 2003), se analizó la población de Tregs esperando observar un aumento de la misma. Sorprendentemente, esta población se encontraba prácticamente desaparecida en los pacientes no tratados, datos corroborados en otras cohortes de pacientes OSA (Gordon et al., 2012; Ye et al., 2012). Esta contradicción aparente se explica al conocer que el propio factor de transcripción HIF1 $\alpha$  es responsable de la degradación de FOXP3 vía proteosomal (Dang et al., 2011). En paralelo se analizaron dos proteínas (GARP y TGF $\beta$ -LAP) reportadas, hasta el momento, sólo sobre la superficie de Tregs activados por TGF $\beta$  (Tran et al., 2009). Sin embargo, estas proteínas sólo se encontraron sobre la superficie de los monocitos que provenían de los pacientes OSA sin tratar. En este caso el modelo *in vitro* de hipoxia intermitente fue capaz de elevar la expresión de GARP y TGF $\beta$ -LAP en monocitos sanos. Esta información reveló un nuevo papel del monocito en la expresión y liberación del TGF $\beta$  de su forma latente a su forma activa (Shi et al., 2011). Cabe destacar que previamente esta función había sido descrita únicamente en Tregs (Wang et al., 2012).

Finalmente, realizamos un experimento similar al publicado con Tregs (Ralinirina et al., 2007) en monocitos. La intención fue demostrar si los monocitos pre-condicionados bajo hipoxia intermitente eran capaces de controlar el fenotipo y la citotoxicidad de las NKs. En este ensayo, en el que se usaron ratios fisiológicos de monocitos y NKs (1:1), observamos una disminución del fenotipo maduro y de la citotoxicidad dependiente directamente de la liberación del TGF $\beta$ -LAP de la membrana de monocitos. Existe un estudio previo realizado *in*

*in vitro* en el que se describió la existencia de un *crossstalk* dependiente del TGF $\beta$ , entre monocitos, NKs y Tregs (Vacca et al., 2010); sin embargo esta es la primera vez que el monocito tiene el papel inmunosupresor principal, ya que se encuentra supliendo las funciones de los Tregs y controla la actividad citotóxica de las NKs (Ralainirina et al., 2007).

Otros datos a destacar del trabajo es la rápida recuperación de todos los marcadores moleculares y celulares analizados en los pacientes OSA tras 6 meses de tratamiento con CPAP. Además se comprobó que la normoxia, en un ensayo *ex vivo* sobre las PBMCs de los pacientes más hipoxémicos (CT90>60%), era suficiente para restaurar todos los parámetros estudiados, de la misma forma que ocurre en los pacientes tratados con CPAP. No obstante, en la literatura consultada no hemos encontrado ningún estudio controlado que evalúe el efecto a largo plazo de la supresión de las apneas-hipopneas mediante CPAP sobre la incidencia y mortalidad de padecer cáncer. Esto se debe a dos factores: la dificultad en lograr una adecuada adherencia al tratamiento con CPAP y sobre todo a la posibilidad de que los pacientes hayan pasado mucho tiempo bajo condiciones de OSA antes de diagnosticarse la enfermedad. Es importante recalcar que en nuestro estudio, el seguimiento intensivo de los pacientes nos permitió garantizar que aquellos con tratamiento mantenían un buen cumplimiento, con un uso medio de la CPAP de 4,5 horas por noche.

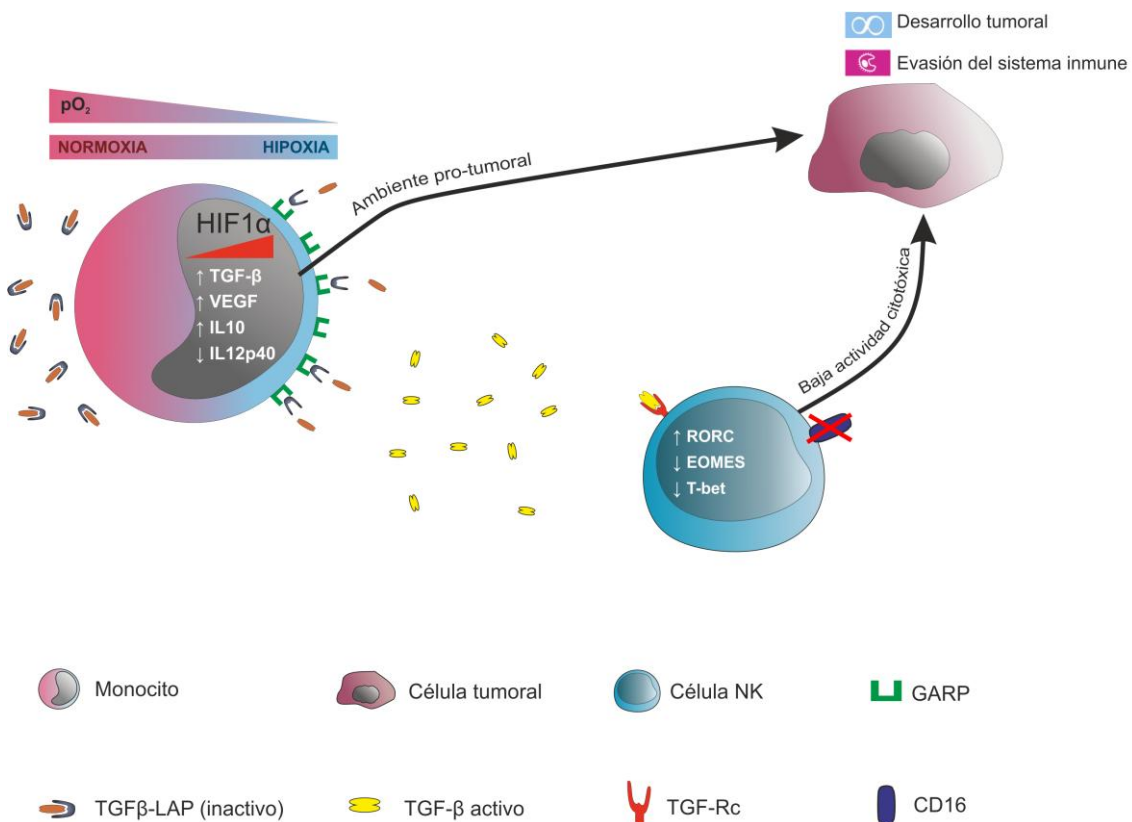


Figura 26. Esquema representativo del mecanismo de interacción entre el monocito y la célula NK en pacientes con OSA, favoreciendo el crecimiento tumoral.

Los mecanismos que vinculan los pacientes que sufren OSA con el cáncer apenas están siendo explorados (Almendros et al., 2012b; Almendros et al., 2013; Almendros et al., 2014; Arnardottir et al., 2009; Campos-Rodriguez et al., 2013; Dyugovskaya et al., 2003; Franco et al., 2012; Gaoatswe et al., 2015; Mancuso et al., 2012; Martinez-Garcia et al., 2014a). Este estudio es pionero al establecer en humanos una relación directa entre la hipoxia intermitente (característica principal de los pacientes con OSA), el sistema inmune innato y el cáncer. Cabe subrayar las nuevas incorporaciones en la reciente revisión de Hanahan y Weinberg de 2011 sobre los sellos distintivos del cáncer. Entre ellas destacan el microambiente tumoral y la contribución al mismo de los diferentes tipos celulares (las propias células tumorales, pero además las células inflamatorias, endoteliales, pericitos y células estromáticas acompañantes). Por otra parte, reconocen el impacto y la importancia de la evasión del sistema inmune por parte de las células tumorales (Hanahan and Weinberg, 2011).

Podemos concluir que la elevada aparición de cánceres espontáneos en esta patología podría tener su causa en los cambios reversibles de la respuesta inmune innata producidos por la hipoxia intermitente: polarizando los monocitos hacia un fenotipo TAM, elevando y liberando el TGF $\beta$  a su forma activa y reduciendo la población de NKs citotóxicas en circulación (Figura 26). Todo ello se traduce en una evasión de la respuesta inmune y en la generación de un ambiente celular propicio para el crecimiento tumoral (Figura 26). En último lugar, hemos confirmado que la restauración de la oxigenación adecuada previene el deterioro observado de la respuesta inmune en el contexto OSA, ofreciendo una gran relevancia clínica de estos hallazgos y mostrando la eficacia del tratamiento con CPAP en estos pacientes.



# **CONCLUSIONES**





## 6. CONCLUSIONES

**Primera:** Los pacientes que sufren apnea obstructiva del sueño (OSA) generan un microambiente favorable a la aparición de tumores.

**Segunda:** La hipoxia intermitente que sufren los pacientes con OSA es capaz de polarizar el sistema inmune hacia un fenotipo favorable a la progresión de tumores.

**Tercera:** La magnitud de la hipoxia esta correlacionada directamente con los fenotipos celulares y marcadores moleculares que se encuentran alterados en el sistema inmune innato de los pacientes con OSA.

**Cuarta:** El modelo *in vitro* de hipoxia intermitente es capaces de polarizar los monocitos hacia un fenotipo TAM, pero no es capaz de modificar el fenotipo maduro de las células NK.

**Quinta:** Los monocitos son capaces de suplir las funciones de Treg expresando y liberando el TGF $\beta$  bajo condiciones de hipoxia intermitente. El TGF $\beta$  afecta de manera directa al fenotipo y la citotoxicidad de las células NK, explicando desde el punto de vista inmunológico la elevada aparición de cánceres espontáneos en los pacientes con OSA.

**Sexta:** La restauración de una adecuada oxigenación celular, tanto en modelos *in vitro* como mediante la supresión de las apneas-hipopneas después de seis meses de tratamiento con CPAP, es capaz de revertir las alteraciones identificadas en las sub-poblaciones y funcionalidad del sistema inmune innato, recuperando su acción anti-tumoral.



# **REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**



## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Akhurst, R.J., and Hata, A. (2012). Targeting the TGFbeta signalling pathway in disease. *Nat Rev Drug Discov* 11, 790-811.
- Almendros, I., Montserrat, J.M., Ramirez, J., Torres, M., Duran-Cantolla, J., Navajas, D., and Farre, R. (2012a). Intermittent hypoxia enhances cancer progression in a mouse model of sleep apnoea. *Eur Respir J* 39, 215-217.
- Almendros, I., Montserrat, J.M., Torres, M., Bonsignore, M.R., Chimenti, L., Navajas, D., and Farre, R. (2012b). Obesity and intermittent hypoxia increase tumor growth in a mouse model of sleep apnea. *Sleep Med* 13, 1254-1260.
- Almendros, I., Montserrat, J.M., Torres, M., Dalmases, M., Cabanas, M.L., Campos-Rodriguez, F., Navajas, D., and Farre, R. (2013). Intermittent hypoxia increases melanoma metastasis to the lung in a mouse model of sleep apnea. *Respir Physiol Neurobiol* 186, 303-307.
- Almendros, I., Wang, Y., Becker, L., Lennon, F.E., Zheng, J., Coats, B.R., Schoenfelt, K.S., Carreras, A., Hakim, F., Zhang, S.X., *et al.* (2014). Intermittent hypoxia-induced changes in tumor-associated macrophages and tumor malignancy in a mouse model of sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 189, 593-601.
- Allan, D.S., Rybalov, B., Awong, G., Zuniga-Pflucker, J.C., Kopcow, H.D., Carlyle, J.R., and Strominger, J.L. (2010). TGF-beta affects development and differentiation of human natural killer cell subsets. *Eur J Immunol* 40, 2289-2295.
- Anfossi, N., Andre, P., Guia, S., Falk, C.S., Roetyncck, S., Stewart, C.A., Bresó, V., Frassati, C., Reviron, D., Middleton, D., *et al.* (2006). Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 25, 331-342.
- Arnardottir, E.S., Mackiewicz, M., Gislason, T., Teff, K.L., and Pack, A.I. (2009). Molecular signatures of obstructive sleep apnea in adults: a review and perspective. *Sleep* 32, 447-470.
- Barron, A., Dhutia, N., Mayet, J., Hughes, A.D., Francis, D.P., and Wensel, R. (2014). Test-retest repeatability of cardiopulmonary exercise test variables in patients with cardiac or respiratory disease. *European journal of preventive cardiology* 21, 445-453.
- Berry, R.B., Budhiraja, R., Gottlieb, D.J., Gozal, D., Iber, C., Kapur, V.K., Marcus, C.L., Mehra, R., Parthasarathy, S., Quan, S.F., *et al.* (2012). Rules for scoring respiratory events in sleep: update of the 2007 AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events. Deliberations of the Sleep Apnea Definitions Task Force of the American Academy of Sleep Medicine. *J Clin Sleep Med* 8, 597-619.
- Burnet, M. (1957). Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J* 1, 779-786.
- Caldwell, C.C., Kojima, H., Lukashev, D., Armstrong, J., Farber, M., Apasov, S.G., and Sitkovsky, M.V. (2001). Differential effects of physiologically relevant hypoxic conditions on T lymphocyte development and effector functions. *J Immunol* 167, 6140-6149.
- Campos-Rodriguez, F., Martinez-Garcia, M.A., Martinez, M., Duran-Cantolla, J., Pena Mde, L., Masdeu, M.J., Gonzalez, M., Campo, F., Gallego, I., Marin, J.M., *et al.* (2013). Association between obstructive sleep apnea and cancer incidence in a large multicenter Spanish cohort. *Am J Respir Crit Care Med* 187, 99-105.
- Cordeira, A.S., Rajakumar, A., Royle, C.M., Lo, A., Husain, Z., Thadhani, R.I., Sukhatme, V.P., Karumanchi, S.A., and Kopcow, H.D. (2013). Conversion of peripheral blood NK cells to a decidual NK-like phenotype by a cocktail of defined factors. *J Immunol* 190, 3939-3948.

- Colegio, O.R., Chu, N.Q., Szabo, A.L., Chu, T., Rhebergen, A.M., Jairam, V., Cyrus, N., Brokowski, C.E., Eisenbarth, S.C., Phillips, G.M., *et al.* (2014). Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature* *513*, 559-563.
- Collop, N.A., Anderson, W.M., Boehlecke, B., Claman, D., Goldberg, R., Gottlieb, D.J., Hudgel, D., Sateia, M., and Schwab, R. (2007). 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*, 737-747.
- Cooper, M.A., Fehniger, T.A., and Caligiuri, M.A. (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* *22*, 633-640.
- Corzo, C.A., Condamine, T., Lu, L., Cotter, M.J., Youn, J.I., Cheng, P., Cho, H.I., Celis, E., Quiceno, D.G., Padhya, T., *et al.* (2010). HIF-1 $\alpha$  regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *J Exp Med* *207*, 2439-2453.
- Cubillos-Zapata, C., Hernandez-Jimenez, E., Toledano, V., Esteban-Burgos, L., Fernandez-Ruiz, I., Gomez-Pina, V., Del Fresno, C., Siliceo, M., Prieto-Chinchina, P., Perez de Diego, R., *et al.* (2014). NF $\kappa$ B2/p100 is a key factor for endotoxin tolerance in human monocytes: a demonstration using primary human monocytes from patients with sepsis. *J Immunol* *193*, 4195-4202.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naive T cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by TGF- $\beta$  induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* *198*, 1875-1886.
- Dang, E.V., Barbi, J., Yang, H.Y., Jinasena, D., Yu, H., Zheng, Y., Bordman, Z., Fu, J., Kim, Y., Yen, H.R., *et al.* (2011). Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell* *146*, 772-784.
- del Fresno, C., Garcia-Rio, F., Gomez-Pina, V., Soares-Schanoski, A., Fernandez-Ruiz, I., Jurado, T., Kajiji, T., Shu, C., Marin, E., Gutierrez del Arroyo, A., *et al.* (2009). Potent phagocytic activity with impaired antigen presentation identifying lipopolysaccharide-tolerant human monocytes: demonstration in isolated monocytes from cystic fibrosis patients. *J Immunol* *182*, 6494-6507.
- Di Santo, J.P. (2006). Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. *Annu Rev Immunol* *24*, 257-286.
- Dirkx, A.E., Oude Egbrink, M.G., Wagstaff, J., and Griffioen, A.W. (2006). Monocyte/macrophage infiltration in tumors: modulators of angiogenesis. *J Leukoc Biol* *80*, 1183-1196.
- do Nascimento, E.S., Sampaio, L.M., Peixoto-Souza, F.S., Dias, F.D., Gomes, E.L., Greiffo, F.R., Ligeiro de Oliveira, A.P., Stirbulov, R., Vieira, R.P., and Costa, D. (2015). Home-based pulmonary rehabilitation improves clinical features and systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease patients. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease* *10*, 645-653.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* *3*, 991-998.
- Duran, J., Esnaola, S., Rubio, R., and Iztueta, A. (2001). 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.
- Dyugovskaya, L., Lavie, P., and Lavie, L. (2002). Increased adhesion molecules expression and production of reactive oxygen species in leukocytes of sleep apnea patients. *Am J Respir Crit Care Med* *165*, 934-939.

- Dyugovskaya, L., Lavie, P., and Lavie, L. (2003). Phenotypic and functional characterization of blood gammadelta T cells in sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 168, 242-249.
- Dyugovskaya, L., Lavie, P., and Lavie, L. (2005). Lymphocyte activation as a possible measure of atherosclerotic risk in patients with sleep apnea. *Ann N Y Acad Sci* 1051, 340-350.
- Dyugovskaya, L., Polyakov, A., Lavie, P., and Lavie, L. (2008). Delayed neutrophil apoptosis in patients with sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 177, 544-554.
- Ehrlich, P. (1909). Über den jetzigen stand der karzinomforschung. *Ned. Tijdschr. Geneesk* 5, 273-290.
- Eissens, D.N., Spanholtz, J., van der Meer, A., van Cranenbroek, B., Dolstra, H., Kwekkeboom, J., Preijers, F.W., and Joosten, I. (2012). Defining early human NK cell developmental stages in primary and secondary lymphoid tissues. *PLoS One* 7, e30930.
- Epstein, L.J., Kristo, D., Strollo, P.J., Jr., Friedman, N., Malhotra, A., Patil, S.P., Ramar, K., Rogers, R., Schwab, R.J., Weaver, E.M., and Weinstein, M.D. (2009). Clinical guideline for the evaluation, management and long-term care of obstructive sleep apnea in adults. *J Clin Sleep Med* 5, 263-276.
- Fehniger, T.A., Cooper, M.A., Nuovo, G.J., Cella, M., Facchetti, F., Colonna, M., and Caligiuri, M.A. (2003). CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* 101, 3052-3057.
- Feng, P.H., Yu, C.T., Wu, C.Y., Lee, M.J., Lee, W.H., Wang, L.S., Lin, S.M., Fu, J.F., Lee, K.Y., and Yen, T.H. (2014). Tumor-associated macrophages in stage IIIA pN2 non-small cell lung cancer after neoadjuvant chemotherapy and surgery. *Am J Transl Res* 6, 593-603.
- Ferlazzo, G., and Munz, C. (2004). NK cell compartments and their activation by dendritic cells. *J Immunol* 172, 1333-1339.
- Fernandez-Ruiz, I., Arnalich, F., Cubillos-Zapata, C., Hernandez-Jimenez, E., Moreno-Gonzalez, R., Toledano, V., Fernandez-Velasco, M., Vallejo-Cremades, M.T., Esteban-Burgos, L., de Diego, R.P., *et al.* (2014). Mitochondrial DAMPs induce endotoxin tolerance in human monocytes: an observation in patients with myocardial infarction. *PLoS One* 9, e95073.
- Franco, C.M., Lima, A.M., Ataide, L., Jr., Lins, O.G., Castro, C.M., Bezerra, A.A., de Oliveira, M.F., and Oliveira, J.R. (2012). Obstructive sleep apnea severity correlates with cellular and plasma oxidative stress parameters and affective symptoms. *J Mol Neurosci* 47, 300-310.
- Freud, A.G., and Caligiuri, M.A. (2006). Human natural killer cell development. *Immunol Rev* 214, 56-72.
- Freud, A.G., Yokohama, A., Becknell, B., Lee, M.T., Mao, H.C., Ferketich, A.K., and Caligiuri, M.A. (2006). Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *J Exp Med* 203, 1033-1043.
- Friedrich, J., Eder, W., Castaneda, J., Doss, M., Huber, E., Ebner, R., and Kunz-Schughart, L.A. (2007). A reliable tool to determine cell viability in complex 3-d culture: the acid phosphatase assay. *J Biomol Screen* 12, 925-937.
- Gabrilovich, D. (2004). Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol* 4, 941-952.
- Gaoatswe, G., Kent, B.D., Corrigan, M.A., Nolan, G., Hogan, A.E., McNicholas, W.T., and O'Shea, D. (2015). Invariant Natural Killer T Cell Deficiency and Functional Impairment in Sleep Apnea: Links to Cancer Comorbidity. *Sleep* 38, 1629-1634.

- Gomez-Pina, V., Soares-Schanoski, A., Rodriguez-Rojas, A., Del Fresno, C., Garcia, F., Vallejo-Cremades, M.T., Fernandez-Ruiz, I., Arnalich, F., Fuentes-Prior, P., and Lopez-Collazo, E. (2007). Metalloproteinases shed TREM-1 ectodomain from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes. *J Immunol* *179*, 4065-4073.
- Gordon, S.M., Chaix, J., Rupp, L.J., Wu, J., Madera, S., Sun, J.C., Lindsten, T., and Reiner, S.L. (2012). The transcription factors T-bet and Eomes control key checkpoints of natural killer cell maturation. *Immunity* *36*, 55-67.
- Gregoire, C., Chasson, L., Luci, C., Tomasello, E., Geissmann, F., Vivier, E., and Walzer, T. (2007). The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev* *220*, 169-182.
- Guilleminault, C., Tilkian, A., and Dement, W.C. (1976). The sleep apnea syndromes. *Annu Rev Med* *27*, 465-484.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646-674.
- Hegde, S.S., Hughes, A.D., Chen, Y., Steinfeld, T., Jasper, J.R., Lee, T.W., McNamara, A., Martin, W.J., Pulido-Rios, M.T., and Mammen, M. (2014). Pharmacologic characterization of GSK-961081 (TD-5959), a first-in-class inhaled bifunctional bronchodilator possessing muscarinic receptor antagonist and beta2-adrenoceptor agonist properties. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* *351*, 190-199.
- Hersh, C.P., Make, B.J., Lynch, D.A., Barr, R.G., Bowler, R.P., Calverley, P.M., Castaldi, P.J., Cho, M.H., Coxson, H.O., DeMeo, D.L., *et al.* (2014). Non-emphysematous chronic obstructive pulmonary disease is associated with diabetes mellitus. *BMC pulmonary medicine* *14*, 164.
- Hughes, T., Briercheck, E.L., Freud, A.G., Trotta, R., McClory, S., Scoville, S.D., Keller, K., Deng, Y., Cole, J., Harrison, N., *et al.* (2014). The transcription Factor AHR prevents the differentiation of a stage 3 innate lymphoid cell subset to natural killer cells. *Cell Rep* *8*, 150-162.
- Imai, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suga, K., and Nakachi, K. (2000). Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* *356*, 1795-1799.
- Jiang, X., Chen, Y., Peng, H., and Tian, Z. (2012). Single line or parallel lines: NK cell differentiation driven by T-bet and Eomes. *Cell Mol Immunol* *9*, 193-194.
- Keskin, D.B., Allan, D.S., Rybalov, B., Andzelm, M.M., Stern, J.N., Kopcow, H.D., Koopman, L.A., and Strominger, J.L. (2007). TGFbeta promotes conversion of CD16+ peripheral blood NK cells into CD16- NK cells with similarities to decidual NK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 3378-3383.
- Lamagna, C., Aurrand-Lions, M., and Imhof, B.A. (2006). Dual role of macrophages in tumor growth and angiogenesis. *J Leukoc Biol* *80*, 705-713.
- Lee, J.C., Lee, K.M., Kim, D.W., and Heo, D.S. (2004). Elevated TGF-beta1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients. *J Immunol* *172*, 7335-7340.
- Lloberes, P., Duran-Cantolla, J., Martinez-Garcia, M.A., Marin, J.M., Ferrer, A., Corral, J., Masa, J.F., Parra, O., Alonso-Alvarez, M.L., and Teran-Santos, J. (2011). Diagnosis and treatment of sleep apnea-hypopnea syndrome. Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery. *Arch Bronconeumol* *47*, 143-156.
- Malygin, A.M., Meri, S., and Timonen, T. (1993). Regulation of natural killer cell activity by transforming growth factor-beta and prostaglandin E2. *Scand J Immunol* *37*, 71-76.



- Mancuso, M., Bonanni, E., LoGerfo, A., Orsucci, D., Maestri, M., Chico, L., DiCoscio, E., Fabbrini, M., Siciliano, G., and Murri, L. (2012). Oxidative stress biomarkers in patients with untreated obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep Med* *13*, 632-636.
- Mantovani, A., Allavena, P., and Sica, A. (2004). Tumour-associated macrophages as a prototypic type II polarised phagocyte population: role in tumour progression. *Eur J Cancer* *40*, 1660-1667.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., and Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* *23*, 549-555.
- Martinez-Garcia, M.A., Campos-Rodriguez, F., Duran-Cantolla, J., de la Pena, M., Masdeu, M.J., Gonzalez, M., Del Campo, F., Serra, P.C., Valero-Sanchez, I., Ferrer, M.J., *et al.* (2014a). Obstructive sleep apnea is associated with cancer mortality in younger patients. *Sleep Med* *15*, 742-748.
- Martinez-Garcia, M.A., Martorell-Calatayud, A., Nagore, E., Valero, I., Selma, M.J., Chiner, E., Landete, P., Montserrat, J.M., Carrera, C., Perez-Gil, A., *et al.* (2014b). Association between sleep disordered breathing and aggressiveness markers of malignant cutaneous melanoma. *Eur Respir J* *43*, 1661-1668.
- Masa, J.F., Corral, J., Pereira, R., Duran-Cantolla, J., Cabello, M., Hernandez-Blasco, L., Monasterio, C., Alonso, A., Chiner, E., Rubio, M., *et al.* (2011). Effectiveness of home respiratory polygraphy for the diagnosis of sleep apnoea and hypopnoea syndrome. *Thorax* *66*, 567-573.
- Masa, J.F., Jimenez, A., Duran, J., Capote, F., Monasterio, C., Mayos, M., Teran, J., Hernandez, L., Barbe, F., Maimo, A., *et al.* (2004). Alternative methods of titrating continuous positive airway pressure: a large multicenter study. *Am J Respir Crit Care Med* *170*, 1218-1224.
- Mytar, B., Woloszyn, M., Szatanek, R., Baj-Krzyworzeka, M., Siedlar, M., Ruggiero, I., Wieckiewicz, J., and Zembala, M. (2003). Tumor cell-induced deactivation of human monocytes. *J Leukoc Biol* *74*, 1094-1101.
- Nagler, A., Lanier, L.L., Cwirla, S., and Phillips, J.H. (1989). Comparative studies of human FcR1111-positive and negative natural killer cells. *J Immunol* *143*, 3183-3191.
- Nguyen, D.X., and Massague, J. (2007). Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet* *8*, 341-352.
- Ni, K., Zhao, L., Wu, J., Chen, W., HongyaYang, and Li, X. (2015). Th17/Treg balance in children with obstructive sleep apnea syndrome and the relationship with allergic rhinitis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* *79*, 1448-1454.
- Nieto, F.J., Peppard, P.E., Young, T., Finn, L., Hla, K.M., and Farre, R. (2012). Sleep-disordered breathing and cancer mortality: results from the Wisconsin Sleep Cohort Study. *Am J Respir Crit Care Med* *186*, 190-194.
- Notarbartolo, M., Cervello, M., Dusonchet, L., Cusimano, A., and D'Alessandro, N. (2002). Resistance to diverse apoptotic triggers in multidrug resistant HL60 cells and its possible relationship to the expression of P-glycoprotein, Fas and of the novel anti-apoptosis factors IAP (inhibitory of apoptosis proteins). *Cancer Lett* *180*, 91-101.
- Pollard, J.W. (2008). Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer. *J Leukoc Biol* *84*, 623-630.
- Ralainirina, N., Poli, A., Michel, T., Poos, L., Andres, E., Hentges, F., and Zimmer, J. (2007). Control of NK cell functions by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Leukoc Biol* *81*, 144-153.

- Reiman, J.M., Kmiecik, M., Manjili, M.H., and Knutson, K.L. (2007). Tumor immunoeediting and immunosculpting pathways to cancer progression. *Semin Cancer Biol* 17, 275-287.
- Roberts, A.B., Anzano, M.A., Meyers, C.A., Wideman, J., Blacher, R., Pan, Y.C., Stein, S., Lehrman, S.R., Smith, J.M., Lamb, L.C., and et al. (1983). Purification and properties of a type beta transforming growth factor from bovine kidney. *Biochemistry* 22, 5692-5698.
- Ryan, S., Taylor, C.T., and McNicholas, W.T. (2005). Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation* 112, 2660-2667.
- Sansoni, P., Cossarizza, A., Brianti, V., Fagnoni, F., Snelli, G., Monti, D., Marcato, A., Passeri, G., Ortolani, C., Forti, E., and et al. (1993). Lymphocyte subsets and natural killer cell activity in healthy old people and centenarians. *Blood* 82, 2767-2773.
- Semenza, G.L. (2011). Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *N Engl J Med* 365, 537-547.
- Shalova, I.N., Lim, J.Y., Chittethath, M., Zinkernagel, A.S., Beasley, F., Hernandez-Jimenez, E., Toledano, V., Cubillos-Zapata, C., Rapisarda, A., Chen, J., et al. (2015). Human monocytes undergo functional re-programming during sepsis mediated by hypoxia-inducible factor-1alpha. *Immunity* 42, 484-498.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2001). IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107-1111.
- Shi, M., Zhu, J., Wang, R., Chen, X., Mi, L., Walz, T., and Springer, T.A. (2011). Latent TGF-beta structure and activation. *Nature* 474, 343-349.
- Soares-Schanoski, A., Jurado, T., Cordoba, R., Siliceo, M., Fresno, C.D., Gomez-Pina, V., Toledano, V., Vallejo-Cremades, M.T., Alfonso-Iniguez, S., Carballo-Palos, A., et al. (2012). Impaired antigen presentation and potent phagocytic activity identifying tumor-tolerant human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 423, 331-337.
- Stagg, J., Johnstone, R.W., and Smyth, M.J. (2007). From cancer immunosurveillance to cancer immunotherapy. *Immunol Rev* 220, 82-101.
- Torre-Amione, G., Beauchamp, R.D., Koeppen, H., Park, B.H., Schreiber, H., Moses, H.L., and Rowley, D.A. (1990). A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1486-1490.
- Tran, D.Q., Andersson, J., Wang, R., Ramsey, H., Unutmaz, D., and Shevach, E.M. (2009). GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF-beta on platelets and activated FOXP3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 13445-13450.
- Trinchieri, G. (1989). Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 47, 187-376.
- Vacca, P., Cantoni, C., Vitale, M., Prato, C., Canegallo, F., Fenoglio, D., Ragni, N., Moretta, L., and Mingari, M.C. (2010). Crosstalk between decidual NK and CD14+ myelomonocytic cells results in induction of Tregs and immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 11918-11923.
- van der Burg, S.H., Arens, R., Ossendorp, F., van Hall, T., and Melief, C.J. (2016). Vaccines for established cancer: overcoming the challenges posed by immune evasion. *Nat Rev Cancer* 16, 219-233.
- Vinci, M., Gowan, S., Boxall, F., Patterson, L., Zimmermann, M., Court, W., Lomas, C., Mendiola, M., Hardisson, D., and Eccles, S.A. (2012). Advances in establishment and analysis of three-

dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC Biol* 10, 29.

Vitale, M., Sivori, S., Pende, D., Augugliaro, R., Di Donato, C., Amoroso, A., Malnati, M., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A. (1996). Physical and functional independency of p70 and p58 natural killer (NK) cell receptors for HLA class I: their role in the definition of different groups of alloreactive NK cell clones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1453-1457.

Wang, R., Zhu, J., Dong, X., Shi, M., Lu, C., and Springer, T.A. (2012). GARP regulates the bioavailability and activation of TGFbeta. *Mol Biol Cell* 23, 1129-1139.

Wu, J., and Lanier, L.L. (2003). Natural killer cells and cancer. *Adv Cancer Res* 90, 127-156.

Yamagiwa, S., Gray, J.D., Hashimoto, S., and Horwitz, D.A. (2001). A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. *J Immunol* 166, 7282-7289.

Ye, J., Liu, H., Zhang, G., Li, P., Wang, Z., Huang, S., Yang, Q., and Li, Y. (2012). The treg/th17 imbalance in patients with obstructive sleep apnoea syndrome. *Mediators Inflamm* 2012, 815308.



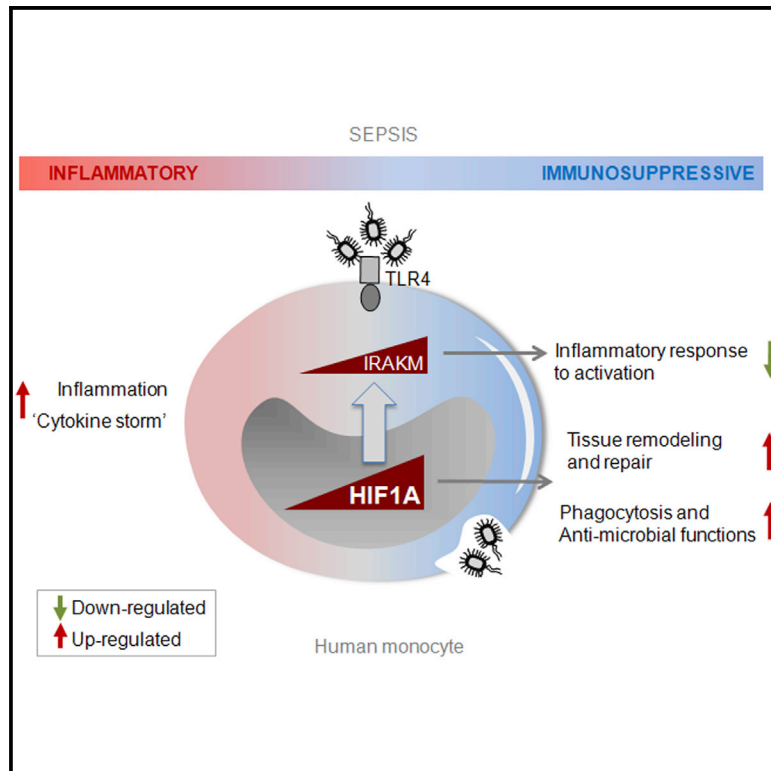
# **ANEXO I**



# Immunity

## Human Monocytes Undergo Functional Re-programming during Sepsis Mediated by Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$

### Graphical Abstract



### Authors

Irina N. Shalova, Jyue Yuan Lim, ..., Eduardo López-Collazo, Subhra K. Biswas

### Correspondence

subhra\_biswas@immunol.a-star.edu.sg

### In Brief

Sepsis is characterized by a dysregulated inflammatory response to infection, but the molecular and cellular basis is unclear. Biswas and colleagues find pro-inflammatory monocytes acquire an altered, immunosuppressive phenotype during human sepsis, mediated by hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ .

### Highlights

- Monocytes display a phenotypic and functional re-programming in human sepsis
- Monocytes transit from an inflammatory to an immunosuppressive state in sepsis
- HIF1 $\alpha$  is a regulator of monocyte functional re-programming in sepsis