

# ESTUDIO PILOTO DE MARCADORES INFLAMATORIOS EN EL SINDROME DE APNEA OBSTRUCTIVA DEL SUEÑO.

Dolores Moreno<sup>1</sup>, Nancy Elizabeth Larocca<sup>2</sup>, Gur Levy<sup>3</sup>, Juan Bautista De Sanctis<sup>4</sup>

## CORRESPONDENCIA:

Dra. Dolores Moreno. Instituto de Inmunología. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.  
Dirección postal: Universidad Central de Venezuela, Instituto de Medicina Experimental, Los Chaguaramos.  
Caracas, Venezuela. Código Postal: 1053.  
Fax: (0212)6932815/2734.  
Teléfono: 0212-6052734. E-mail: moreno.d1@gmail.com,

**Trabajo financiado por:** Proyecto CDCH PG 090060192005

1 Especialista en Neumonología. Profesor Asistente. Cátedra de Patología General y Fisiopatología. Escuela de Medicina "Luis Razetti". Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

2 MSc. en Inmunología Clínica. Instructor contratado. Cátedra de Patología General y Fisiopatología. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

3 Especialista en Neumonología. Profesor instructor. Cátedra de Neumonología y Cirugía de Tórax. Hospital Universitario de Caracas. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

4 Doctor en Ciencias Fisiológicas, mención Bioquímica. Coordinación de Investigación y docencia. Instituto de Inmunología. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Recibido:15-05-10  
Aceptado:11-07-10.

## RESUMEN

El Síndrome de Apnea Obstructiva del Sueño (SAOS), consiste en la aparición repetida de episodios de obstrucción faríngea durante el sueño como consecuencia de un colapso de la vía respiratoria. La respuesta fisiológica a la hipoxia intermitente crónica es la generación de una respuesta inflamatoria local y sistémica. Se han evidenciado cambios importantes a nivel cardiovascular en pacientes con SAOS; sin embargo, se desconocen cuáles marcadores séricos y genéticos pudieran ser de utilidad. En el presente estudio, se presentan 15 marcadores séricos y 3 genéticos (IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ) en un grupo de cinco pacientes para determinar cuáles pu-

den ser los marcadores de interés en la aparición y en el desarrollo de esta patología respiratoria. Se proponen como marcadores los niveles séricos: proteína C reactiva, TNF $\alpha$ , IL-6, el receptor soluble de TNF I, sCD62, sCD154, nitrotirosina y anti-oxLDL. Los niveles de IL-1 $\beta$ , el receptor de TNF soluble II, sCD25, sCD54, nitritos y nitratos no parecieran ser buenos marcadores en SAOS. Los estudios genéticos no fueron concluyentes.

**Palabras claves:** Apnea Obstructiva, Sueño, Síndrome, Citocinas, Proinflamatorias, Moléculas Adhesión, Activación leucocitaria, Proteína C Reactiva.

## ABSTRACT

Obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) is a repeated sequences of pharynx obstruction during sleep as a consequence of airway collapse. The physiological response to the desaturation is the generation of a local and systemic inflammatory immune response. Important changes at cardiovascular levels in patients with OSAS have been observed; however, it is not known which serum or genetic parameters could be useful. In the present study, we present 15 serum and 3 genetic (IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ) markers in a group of five patients in order to determine which marker could be useful to study the genesis and progression of this respiratory pathology. The proposed serum markers are C reactive protein, TNF $\alpha$ , IL-6, soluble TNF receptor I, sCD62, sCD154, nitrotyrosine and anti-oxLDL. The levels of IL-1 $\beta$ , soluble TNF receptor II, sCD25, sCD54, nitrite y nitrate do not seem to be good markers for OSAS. The genetic studies were not conclusive.

**Key words:** Obstructive Apnea, Sleep, Syndrome; Proinflammatory, Cytokines; Adhesion, Molecules, Leukocyte activation, C-Reactive protein.

## INTRODUCCIÓN

El síndrome de apnea obstructiva del sueño (SAOS) consiste en la aparición repetida de episodios de obstrucción faríngea completa (apneas) o parcial (hipopneas) durante el sueño, que se producen como consecuencia de un mayor o menor grado de colapso de la vía respiratoria.(1,2) Se estima que alrededor del 2 al 4% de la población americana entre 30 y 60 años padece de apnea obstructiva del sueño.(3,4)

El colapso de la faringe ocasiona episodios intermitentes de hipoxemia (Hipoxia Intermitente Crónica), hipercapnia y cambios en la presión intratorácica; todos estos elementos en conjunto producen disfunción endotelial con liberación de endotelina, radicales libres de oxígeno, citocinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- $\alpha$  y activación de la cascada de coagulación y del sistema simpático con liberación de aminas vasoactivas y cambios en la función cardiovascular.(5-7) El propósito del presente estudio es determinar, en un grupo de pacientes, cuál pueden ser los marcadores más resaltantes, tanto genéticos como séricos, para estudios a mayor escala en los pacientes.

## MÉTODOS

Se estudiaron cinco pacientes venezolanos procedentes de la consulta de Neumonología del Hospital Universitario de Caracas con diagnóstico polisomnográfico de SAOS: 3 individuos del sexo masculino y 2 individuos del sexo femenino, con edades comprendidas entre 31 y 58 años. A los pacientes se les extrajo una muestra de sangre al finalizar el estudio de sueño a las 6 am. La muestra se dividió en dos partes, una para separar el suero y otro con EDTA para obtener la capa de blancos por centrifugación ("Buffy coat").

Como controles del estudio se tomó un grupo de 100 controles, no fumadores, 60 % femenino, con rango de edades entre 28 y 65 años sin patologías respiratorias, infecciosas o auto inmunes y parámetros hematológicos normales.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética y Bioética del Instituto de Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

Con las muestras de suero se determinaron los siguientes marcadores con los estuches diagnósticos comerciales por ELISA tipo sándwich: proteína C reactiva ultrasensible (Virgo® C-Reactive Protein Kit, Hemagen Diagnostics, USA), IgE total (DRG®), interleucinas IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF  $\alpha$  (R & D systems), moléculas de adhesión soluble CD54, CD62 (R & D systems), moléculas de activación soluble CD154, receptores solubles CD25, receptor de TNF I y II (R & D systems), anticuerpos contra LDL oxidada (Imco diagnostic) y nitrotyrosina (según protocolo de Zabaleta y colaboradores)8. También se determinaron los niveles de nitritos y nitratos según protocolo descrito anteriormente (Garmendia y col)9.

De la capa de blancos se extrajo el ADN genómico (Qiagen® DNA minikits) a partir de leucocitos de sangre periférica y se realizó la tipificación molecular por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de los siguientes polimorfismos en genes que codifican para citocinas proinflamatorias: IL-6 -174 G/C (Olomaiye et al)(10), TNF- $\alpha$  +489 G/A (Fabris et al)(11) e IL-1 $\beta$  +3954 (Bioque et al)(12) De igual forma se hicieron determinaciones en muestras de suero de IgE total y de Proteína C Reactiva por la técnica de ELISA tipo indirecto.

## RESULTADOS

Los valores séricos se ilustran en la tabla 1. La ausencia de diferencias en los niveles de IgE denota que los pacientes no presentan características de atopia. Se observaron diferencias significativas en 8 de los 14 parámetros evaluados (tabla 1). Hubo diferencias importantes en los nive-

les de proteína C reactiva, TNF $\alpha$ , IL-6, el receptor soluble de TNF I, sCD62, sCD154, nitrotirosina y anti-oxLDL. No hubo incremento en los niveles de IL-1  $\beta$ , el receptor de TNF soluble II, sCD25, sCD54, nitritos y nitratos.

Con relación a la tipificación de los genes que codifican para citocinas proinflamatorias se observó en la muestra de pacientes analizadas un predominio de los genotipos heterocigotos para la IL-6 y TNF- $\alpha$  y el predominio del genotipo homocigoto para el alelo 1 de la IL-1 $\beta$  (tabla 2). No se encontró relación entre los valores séricos y el genotipo.

## DISCUSION

El SAOS ha demostrado cursar con elevación de marcadores de inflamación, como la proteína C reactiva y de citocinas implicadas en dicho proceso como IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), lo cual trae como consecuencia la inhibición de la óxido nítrico sintasa endotelial y aumento de la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1, VCAM-1 y selectina (13-18). Otras moléculas inflamatorias elevadas en pacientes con SAOS son la IL-8, la proteína quimiotáctica de granulocitos (GCP-2), la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1), las cuales estimulan la migración y la acumulación de células inflamatorias en la vía aérea superior.(17) En el presente estudio, corroboramos el incremento en varios de los parámetros IL-6, TNF $\alpha$ , el receptor soluble I de TNF y la selectina. Otras moléculas relacionadas, como CD154, se encuentran incrementadas; no así el ICAM-1 y el CD25 soluble. Los marcadores CD154 y CD25 son marcadores inflamatorios de enfermedades crónicas y vasculares(19) y llamativamente no habían sido reportados en los pacientes con OSAS.

Los episodios de hipoxemia intermitente crónica inducen la activación de factores proinflamatorios de transcripción nuclear como el NF $\kappa$ B, activando el Factor-1 inductor de Hipoxia (HIF-1), el cual es un elemento importante en la homeostasis de la oxigenación ya que produce la estimulación directa de más de 50 moléculas, entre las que se encuentra la eritropoyetina. El HIF-1 también participa en la respuesta simpática, incrementando la presión arterial y los niveles de triglicéridos en modelos animales y en seres humanos.(17,18) En el presente estudio se observó un incremento en los niveles de anti-LDL oxidada, marcador de inflamación vascular y autoinmunidad(19-20), que sugiere un incremento de los niveles de oxidación de la lipoproteína que pueden estar asociados al incremento de los eventos vasculares normalmente descritos en los pacientes con éste síndrome (17, 18).

En los pacientes estudiados, los resultados sugieren que

existe activación linfocitaria y que la secuencia de activación es IL-6 y TNF dependiente la cual induce más migración celular al tejido vía selectina y activación celular vía CD154 (19). La ausencia en el incremento de CD25 se compagina con el mantenimiento de un proceso inflamatorio agudo y no crónico (21). Es posible sugerir que la respuesta inmune en SAOS tiene dos partes la oxidativa esencialmente enzimática y otra que involucra activación leucocitaria que pudiera desencadenar los eventos vasculares antes mencionados.

Con relación a los niveles séricos de proteína C reactiva, la media de los niveles séricos en nuestros pacientes se ubicó por encima de los valores de referencia normales del estuche comercial utilizado para su cuantificación. Estos resultados concuerdan con los reportados por otros autores, en los cuales se observa un incremento de esta proteína de fase aguda como marcador de inflamación en esta patología(17). Drummond y cols(27) encontraron aumento significativo en los valores de proteína C reactiva y de IL-6 en el suero de pacientes con AOS, sin descenso significativo después de la terapia a corto y a mediano plazo con dispositivos de presión positiva. Lui y cols(28) encontraron asociación entre los niveles elevados de proteína C reactiva y SAOS, independientemente de la obesidad visceral. Ye y cols(29) encontraron asociación de niveles elevados de proteína C reactiva y metaloproteína 9 (MMP-9) en pacientes con SAOS. Es importante aclarar que los incrementos en proteína C reactiva dependen, gran parte, de los niveles de IL-6 circulante que se encuentra elevado en los pacientes.

Existen pocos estudios genéticos de asociación con SAOS y con excepción del gen de TNF  $\alpha$  son poco concluyentes (22-26). Liu y cols (23) y Riha y cols(24) estudiando la región promotora de TNF- $\alpha$  posición -308 (A>G) concluyen que existe una mayor frecuencia del alelo A en pacientes con SAOS con respecto a individuos sanos. Los pacientes con genotipos AA/AG mostraron niveles más altos de TNF- $\alpha$  y los niveles se correlacionan con mayor circunferencia de cuello, mayor índice cintura/cadera y mayor índice de apnea-hipopnea(23). En contrapartida, los estudios de los polimorfismo de IL-6 han generado resultados contradictorios. Imagawa y cols(25) no encontraron niveles elevados de TNF- $\alpha$  e IL-6 en pacientes con SAOS mientras que Zhang y cols(26) al estudiar el polimorfismo de IL-6 572 G>C encontraron que el alelo menor G disminuye el riesgo de SAOS en relación al alelo mayor C (en individuos no obesos); igualmente observaron que individuos portadores del alelo C incrementan la severidad de desórdenes del sueño. No se encontraron estudios de asociación de IL-1 $\beta$  con SAOS.

En relación a los resultados presentados en éste

estudio sobre los polimorfismos de genes que codifican para citocinas proinflamatorias, observamos que la mayoría de los genotipos de los pacientes estudiados son heterocigotos y consecuencia difíciles de analizar. A pesar de los esfuerzos que se realicen en el área de diversos polimorfismos, no es posible entender el mecanismo por el cual se incrementa sólo un número de marcadores inflamatorios a nivel sérico. Se propone que los mecanismos de activación celular de éste síndrome son independientes de genotipo y en consecuencia, se sugiere estudiar los mecanismos de control a nivel transcripcional que podrían ser más relevantes inclusive en la respuesta óptima al tratamiento farmacológico.

TABLA 1  
VALORES SÉRICOS DE MARCADORES INFLAMATORIOS.

MARCADOR	PACIENTES	CONTROLES (n=100)	P
IgE UI/ml	47,92 ± 30,46	95,5 ± 37,8	0,8
Proteína C reactiva µg/ml	3,13 ± 1,18	1,2 ± 0,3	0,04
TNF α pg/ml	25,9 ± 8,6	4,1 ± 2,6	0,001
IL-1 β pg/ml	6,6 ± 2,8	5,5 ± 1,3	0,8
IL-6 pg/ml	7,8 ± 4,5	3,3 ± 2,6	0,01
sCD25 pg/ml	56,6 ± 8,5	45,5 ± 9,0	0,2
sCD54 pg/ml	37,5 ± 10,2	35,8 ± 8,1	0,9
sCD62 pg/ml	45,5 ± 3,3	25,3 ± 8,5	0,001
sCD154 pg/ml	8,8 ± 4,1	3,5 ± 1,1	0,01
sTNF RI pg/ml	79,5 ± 19,6	45,5 ± 9,5	0,01
sTNF RII pg/ml	215,6 ± 29,8	199 ± 12,5	0,4
Anti ox LDL IU/ml	72,0 ± 26,6	19,6 ± 3,2	0,001
Nitrotirosina ng/ml	9,9 ± 3,3	3,9 ± 2,2	0,01
Nitritos µM	6,3 ± 1,5	6,6 ± 0,9	0,9
Nitratos µM	20,5 ± 3,4	24,1 ± 2,9	0,2

TABLA 2  
POLIMORFISMOS DE IL-6,  
TNF- $\alpha$  E IL-1 $\beta$   
EN PACIENTES CON SAOS

Gen Estudiado	Genotipo	Pacientes (N=5)
IL-6 -174	GG	1
	GC	4
	CC	0
TNF- $\alpha$ +489	GG	0
	GA	5
	AA	0
IL-1 $\beta$	11	3
	12	1
	22	1

## REFERENCIAS

1. Consenso Nacional sobre el síndrome de apneas-hipopneas del sueño. Definición y concepto, fisiopatología, clínica y exploración del SAHS. Arch Bronconeumol. 2005;41(Supl 4):S12-S29.
2. Salvador J, Iriarte J, Silva C, Gómez Ambrosi J, Díez Caballero A, Frühbeck G. El síndrome de apneas obstructivas del sueño en la obesidad: un conspirador en la sombra. Rev Med Univ Navarra. 2004;48(2):55-62.
3. Patil S, Schneider H, Schwartz A, Smith P. Adult Obstructive Sleep Apnea. Chest. 2007;132:325-337.
4. Arnardottir ES, Mackiewicz M, Gislason T, Teff KL, Pack A. Molecular Signatures of Obstructive Sleep Apnea in Adults: A Review and Perspective. Sleep. 2009; 32(4):447-470.
5. Pataka A, Riha RL. The obstructive sleep apnoea/hypopnoea syndrome: An overview. Respiratory Medicine CME. 2009; 2:111-117.
6. McNicholas WT, Ryan S. Obstructive sleep apnoea syndrome: Translating science to clinical practice. Respirology. 2006;11:136-144.
7. Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Systemic inflammation: a key factor in the pathogenesis of cardiovascular complications in obstructive sleep apnoea syndrome?. Thorax. 2009;64:631-636.
8. Zabaleta M, Marino R, Borges J, Camargo B, Ordaz P, De Sanctis JB, Bianco NE. Activity profile in multiple sclerosis: an integrative approach. A preliminary report. Mult Scler. 2002; 8(4):343-349.
9. Garmendia JV, Gutiérrez Y, Blanca I, Bianco NE, De Sanctis JB. Nitric oxide in different types of hypertension during pregnancy. Clin Sci. 1997; 93(5):413-421.
10. Olomolaiye O, Wood NA, Bidwell JL. A novel NlaIII polymorphism in the human IL-6 promoter. Eur J Immunogenet. 1998;25:(2-3):267.
11. Fabris M, Di Poi E, Sacco S, Damante G, Sinigaglia L, Ferraccioli G. Polimorfismi del gene del TNF- $\alpha$  in pazienti con artrite reumatoide trattati con biologici anti-TNF- $\alpha$ : risultati preliminary. Reumatismo. 2009; 60(1):1-6.
12. Bioque G, Crusius JB, Koutroubakis I, Bouma G, Kostense PJ, Meuwissen SG et al. Allelic polymorphism in IL-1 beta and IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) genes in inflammatory bowel disease. Clin Exp Immunol. 1995;102(2):379-383.
13. Lavie L. Cellular and plasma markers of oxidative stress and inflammation in sleep apnea. Sleep Med. 2006; 7:120-127.
14. Álvarez-Sala WJ, Calle RM, Fernández Sánchez-Alarcos JM, Martínez CR, Rodríguez JL. Apnea obstructiva del sueño. Inf Ter Sist Nac Salud. 1999; 23: 121-131.
15. Patel SR, Zhu X, Storfer-Isser A, Mehra R, Jenny NS, Tracy R, Redline S. Sleep Duration and Biomarkers of Inflammation. Sleep. 2009;32(2):200-204.
16. McNicholas WT. Diagnosis of Obstructive Sleep Apnea in Adults. Proc Am Thorac Soc. 2008; 5:154-160.
17. Jelic S, Le Jemtel TH. Inflammation, Oxidative Stress, and the Vascular Endothelium in Obstructive Sleep Apnea. Trends Cardiovasc Med 2008;18:253-60.
18. Eckert DJ, Malhotra A. Pathophysiology of Adult Obstructive Sleep Apnea. Proc Am Thorac Soc. 2008; 5:144-153.
19. Packard RR, Libby P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. Clin Chem. 2008;54(1):24-38.
20. Matsuura E, Kobayashi K, Matsunami Y, Shen L, Quan N, Makarova M, Suchkov SV, Ayada K, Oguma K, Lopez LR. Autoimmunity, infectious immunity, and atherosclerosis. J Clin Immunol. 2009; 29(6):714-721.
21. Brusko TM, Wasserfall CH, Hulme MA, Cabrera R, Schatz D, Atkinson MA. Influence of membrane CD25 stability on T lymphocyte activity: implications for immunoregulation. PLoS One. 2009;24:(11):7980.
22. Sanjay R. Patel. Shared genetic risk factors for obstructive sleep apnea and obesity. J Appl Physiol. 2005; 99: 1600-1606.
23. Liu HG, Guan P, Lin M, Xu YJ, Zhang ZX. The relationship between tumor necrosis factor-alpha gene promoter polymorphism and obstructive

- sleep apnea-hypopnea syndrome. *J Chin Tub Resp Diseases*. 2006; 29(9):596-599.
24. Riha RL, Brander P, Vennelle M, McArdle N, Kerr SM, Anderson NH, Douglas NJ. Tumour necrosis factor-alpha (-308) gene polymorphism in obstructive sleep apnoea-hypopnoea syndrome. *Eur Respir J*. 2005; 26(4):673-678.
25. Imagawa S, Yamaguchi Y, Ogawa K, Obara N, Suzuki N, Yamamoto M, Nagasawa T. Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in patients with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *Respiration*. 2004; 71(1):24-29.
26. Zhang X, Liu RY, Lei Z, Zhu Y, Huang JA, Jiang X, Liu Z et al. Genetic variants in interleukin-6 modified risk of obstructive sleep apnea syndrome. *Int J Mol Med*. 2009; 23(4):485-493.
27. Drummond M, Winck J, Guimarães J, Santos AC, Almeida J, Marques J. Long term effect of autoadjusting positive airway pressure on C-reactive protein and interleukin-6 in men with obstructive sleep apnoea syndrome. *Arch Bronconeumol*. 2009; 45(12):577-584.
28. Lui MM, Lam JC, Mak HK, Xu A, Ooi C, Lam DC, Mak JC, Khong PL et al. C-reactive protein is associated with obstructive sleepapneaindependent of visceralobesity. *Chest*. 2009; 135(4):950-956.
29. Ye J, Liu H, Li Y, Liu X, Zhu JM. Increased serum levels of C-reactive protein and matrix metalloproteinase-9 in obstructive sleep apnea syndrome. *Chin Med J*. 2007; 120(17):1482-1486.