

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:
CARDIOLOGIA E CIÊNCIAS CARDIOVASCULARES
FACULDADE DE MEDICINA

**EXAMINANDO OS MECANISMOS DE PERDA DE PESO EM MODELO
ANIMAL DE APNEIA DO SONO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CINTIA ZAPPE FIORI

ORIENTADOR: PROF. DR. DENIS MARTINEZ

Porto Alegre/RS

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:
CARDIOLOGIA E CIÊNCIAS CARDIOVASCULARES
FACULDADE DE MEDICINA

**EXAMINANDO OS MECANISMOS DE PERDA DE PESO EM MODELO
ANIMAL DE APNEIA DO SONO**

CINTIA ZAPPE FIORI

ORIENTADOR: PROF. DR. DENIS MARTINEZ

*Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares
da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
para obtenção do título de Mestre*

Porto Alegre/RS

2011

CIP - Catalogação na Publicação

Zappe Fiori, Cintia

Examinando os mecanismos de perda de peso em
modelo animal de apneia do sono / Cintia Zappe
Fiori. -- 2011.

83 f.

Orientador: Denis Martinez.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e
Ciências Cardiovasculares, Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. Apneia do sono. 2. UCP-1. 3. Adiponectina. 4.
Leptina. 5. Cortisol. I. Martinez, Denis, orient.
II. Título.

Imaginar que um sono põe remate aos sofrimentos do coração e aos golpes infinitos que constituem a natural herança da carne, é solução para almejar-se. Morrer..., dormir... dormir... Talvez sonhar... É aí que bate o ponto. O não sabermos que sonhos poderá trazer o sono da morte, quando afim desenrolarmos toda a meada mortal, põe suspensos.

Willian Shakespeare, Hamlet, 1603

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Dr. Denis Martinez, obrigada pela constante presença em toda caminhada e por ser esta pessoa vocacionada para ensinar e orientar. Não poderia deixar de mencionar o exemplo de cientista que é sempre focado na autenticidade e qualidade dos estudos científicos.

Ao meu amor, Daniel, agradeço imensamente pela compreensão ao tempo despendido à pesquisa. Obrigada pelas palavras de tranquilidade e incontestável incentivo. Enfim, agradeço por fazer parte da minha vida e torná-la cada vez melhor.

À minha mãe (Lenara), irmãos (Leonaldo, Luiz Alfredo e Paulo Henrique), irmã (Karine), sobrinhas (Marine, Monique e Antonella), cunhado (Mardônio) e cunhada (Lidiane), agradeço, pelo apoio incondicional e entendimento pelos momentos familiares na qual não pude estar presente, em prol do meu crescimento intelectual. Esses dois anos longe de casa reforçaram, ainda mais, o quanto os amo! Essa vitória, eu comarto com vocês.

Ao meu pai, in memorian, saudade, mas conforto por ter sido exemplo de homem e profissional que tanto ajudou ao próximo.

À Inez, in memorian, exemplo de segunda mãe, que esteve presente em tempo integral na minha criação, exemplo de bondade.

À Sirlei Reis, pela competência, incentivo de pessoa que tornou muitas vezes as dificuldades mais amenas.

Aos meus colegas do grupo de pesquisa LIPES (Laboratório Interdisciplinar de Pesquisa em Sono) pelo companheirismo e ajuda mútua na coleta de dados e aperfeiçoamento na escrita de artigos científicos.

Em especial as colegas de Mestrado, Alicia Carissimi, Renata Schenkel Kaminski e Daniela Massierer pelo contato diário em que me transmitiram sua amizade, confiança e apoio. Aos acadêmicos e bolsistas de iniciação científica pela colaboração em diversas etapas das pesquisas.

À Marta Cioato, Fabíola Meyer e demais profissionais da equipe da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela organização e informações necessárias para a concretização dos trabalhos relacionados aos aspectos éticos da pesquisa com animais.

Ao Programa de Pós-Graduação das Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares/UFRGS. Às instituições de fomento à pesquisa: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por acreditarem incentivarem na concretização das pesquisas científicas.

Sumário

TABELAS E FIGURAS DA REVISÃO DE LITERATURA	8
TABELAS E FIGURAS DO ARTIGO EM INGLÊS.....	11
RESUMO	12
REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
SONO	14
TRANSTORNOS DO SONO.....	15
APNEIAS E HIOPNEIAS	15
SONO NOS MAMÍFEROS.....	19
EPIDEMOIOLOGIA DA APNEIA DO SONO.....	20
QUADRO CLÍNICO.....	22
SINTOMAS	22
EXAME FÍSICO	22
FISIOPATOLOGIA DA HIPÓXIA	25
MODELOS DE HIPÓXIA INTERMITENTE	26
SISTEMA ENDÓCRINO E HIPÓXIA	27
LEPTINA	27
ADIPONECTINA	31
CORTISOL	32
TECIDO ADIPOSO.....	34
TECIDO ADIPOSO MARROM.....	35
ASPECTOS ÉTICOS DO ESTUDO	44
JUSTIFICATIVA	44
HIPÓTESE	45
OBJETIVOS	45
Geral:.....	45
Específicos:	45
FINANCIAMENTO	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....	47
ARTIGO EM INGLÊS	64
TABELA 1 DO ARTIGO	75
FIGURA 1 DO ARTIGO	76
FIGURA 2 DO ARTIGO	73
REFERÊNCIAS DO ARTIGO	79

LISTA DE ABREVIATURAS

ACS – apneia central do sono

ACTH – hormônio adrenocorticotrófico pituitário

AH – apneia-hipopneias

AOS – apneia obstrutiva do sono

CPAP – *Continuous Positive Airway Pressure* (Pressão Aérea Positiva Contínua)

DEXA – *Dual-Energy X-Ray Absorptiometry* (Absortometria por Dupla Emissão de Raios-X)

DRER – Despertares Relacionados aos Esforços Respiratórios

FiO₂ – Fração inspiratória de oxigênio

¹⁸F-FDG – ¹⁸Fluorine-Fluorodeoxyglucose

Eixo HPA – Eixo Hipotálamico-Pituitária-Adrenal

IAH – Índice de apneia-hipopneia

mRNA – *messenger ribonucleic acid* (RNA mensageiro)

PET – *positron emission tomography* (tomografia por emissão de pósitrons)

RERAs – *respiratory effort-related arousals* (despertares relacionados ao esforço respiratório)

Sono NREM – *non-rapid eye movement* (sono sem movimentos rápido dos olhos)

Sono REM – *rapid eye movement* (sono com movimentos rápido dos olhos)

SaO₂ – dessaturação arterial de oxigênio

SAOS – síndrome da apneia obstrutiva do sono

TAM – tecido adiposo marrom

TC – tomografia computadorizada

UCP-1 – *uncoupling protein-1* (proteína desacopladora-1)

TABELAS E FIGURAS DA REVISÃO DE LITERATURA:

Figura 1 – Obstrução parcial e completa da via aérea superior durante o sono, resultando em hipopneia (A) e apneia (B) respectivamente. Adaptada referência 18.

Figura 2 – Ilustração do esforço ventilatório tóraco-abdominal e ausência de fluxo aéreo no traçado de polissonografia.

Figura 3 – Critérios diagnósticos para SAOS.

Figura 4 – Distribuição em 24 horas de sono de ondas lentas (SOL), vigília, sono NREM, sono REM em camundongos C57BL/6 e em ratos Sprague-Dawley avaliados em ciclo de 12hs de claro e 12hs de escuro. Registro do padrão polifásico sono-vigília (tipicamente para todos os primatas não humanos) e o curto ciclo de sono NREM-REM de 12 a 15 minutos que são típicos de pequenos roedores. Adaptada referência 30.

Figura 5 – Imagem sagital, de indivíduo normal e com AOS, analisada por ressonância magnética. A: indivíduo normal e destacadas as regiões da VAS. B: indivíduo com AOS grave com destaque para os tecidos moles. Observa-se que o paciente com AOS apresenta as regiões da VAS mais estreitas, como a retropalatal e retroglossal, assim como o palato mole, a língua e a gordura subcutânea são maiores. Adaptada referência 54.

Figura 6: Esquema do modelo mecânico do espaço aéreo faríngeo. P tecido = pressão tecidual em torno da via colapsável. Adaptada referência 55.

Figura 7: Evolução do peso corporal de camundongos obeso (ob/ob) e controle aos 21 dias (A) e aos 10 meses (B) de idade. Adaptada referência 100.

Figura 8 – Resumo dos fatores mais importantes e estados de doença que levam ao aumento ou a diminuição da regulação da adiponectina no tecido adiposo. Adaptada referência 132.

Figura 9 – Perspectiva termodinâmica do gasto energético (A); Termogênese adaptativa induzida pelo frio (B). Adaptada referência 171.

Figura 10 – Resultados do PET-TC em nove dos 24 indivíduos mostram variação fisiológica da captação e distribuição de ^{18}F -FDG no TAM. A: indivíduos magros, com os mais altos níveis de atividade do TAM ($>500\text{kBq}$); B: indivíduos magros, com níveis medianos de atividade; C: indivíduos obesos ou com sobre peso com níveis mais baixos de atividade do TAM ($<100\text{kBq}$). A região supraclavicular tem a maior quantidade de TAM. Adaptada referência 6.

Figura 11 – Associação de PET-TC revela os padrões de absorção de ^{18}F -FDG no mesmo indivíduo magro em exposição ao frio e em termoneutralidade. Adaptada referência 6.

Figura 12 – Amostra corada com hematoxilina e eosina (Painel A) identifica o citoplasma granular contendo mitocôndrias e várias vacúolos de gordura, que são características do TAM, e um único vacúolo lipídico grande em cada célula de gordura branca. Uso de imunofluorescência com anticorpo para a UCP-1 (Painel B) mostra imunomarcação positiva para UCP-1 (verde) em TAM, mas não no tecido adiposo branco. Adaptada referência 6.

Figura 13 – Quantidade e a atividade do tecido adiposo marrom em regiões de interesse, demarcadas com contorno vermelho nas imagens obtidas por PET (A), TC (B), e a combinação de PET-TC (C), que incluiu a região cervical, supraclavicular, e mediastino superior. Adaptada referência 184.

Figura 14 – Imagem dos 15 indivíduos com obesidade mórbida avaliada por PET. Três indivíduos do sexo feminino indicam aumento da atividade do TAM na área supraclavicular, marcados por retângulo vermelho. Adaptada referência 185.

Figura 15 – Combinação de PET-TC mostra a captação de ^{18}F -FDG no TAM supraclavicular. Indivíduo com obesidade mórbida com maior atividade do TAM. Adaptada referência 185.

Figura 16 – Distribuição do TAM e a relação com grau de adiposidade. Adaptada referência 186.

TABELAS E FIGURAS DO ARTIGO EM INGLÊS:

Table 1 – Means and standard deviations of body weight, food intake, and weight of tissues in the studied groups of mice.

Figure 1 – Histological features of BAT and WAT. Interescapular BAT (A) and epididymal WAT (B) of mice submitted to isocapnic intermittent hypoxia and sham intermittent hypoxia were stained with hematoxylin and eosin. BAT: brown adipose tissue; WAT: white adipose tissue.

Figure 2 – Means and one standard error mean of studied variables by groups: **A**- Leptin levels showed no significant difference between groups; **B**- Adiponectin levels were significantly lower on the hypoxia group, compared with sham group; **C**: Cortisol levels showed no significant difference between groups. Box-plot of UCP-1 mRNA expression, in which the horizontal lines illustrate the 25th, 50th, and 75th percentiles and the error bars represent the 10th and 90th percentiles: **D**- In the hypoxia group expression of UCP-1 was strongly suppressed. The P values for multiple comparisons were calculated by the Mann-Whitney test.

RESUMO

Objetivo: Testar a hipótese de que a perda de peso no modelo de hipóxia intermitente isocápnica (hipóxia) de apneia do sono altera a fisiologia do tecido adiposo branco e marrom, particularmente, leptina, adiponectina e proteína desacopladora 1 (UCP-1).

Desenho e Intervenção: Camundongos Balb/c foram expostos à hipóxia intermitente ou à hipóxia intermitente simulada. Durante oito horas por dia, o sistema de hipóxia alterna 30 segundos de inalação de O₂ a 9%±1, com 30 segundos de normoxia (O₂ a 21%).

Avaliações e Resultados: Após 37 dias, o tecido adiposo marrom (TAM) dissecado e imediatamente congelado. A expressão do mRNA da proteína desacopladora 1 (UCP-1) do TAM foi mensurada por PCR em tempo real. Os níveis séricos de adiponectina, leptina e cortisol foram quantificados por ELISA. O grupo hipóxia consumiu significativamente menos ração comparado ao grupo hipóxia simulada e ganhou significativamente menos peso corporal. Observação microscópica e mensuração do tamanho celular demonstraram diminuição significativa no tamanho dos adipócitos branco e marrom. Os níveis de leptina e cortisol não sofreram alterações significativas entre os grupos. No grupo hipóxia os níveis de adiponectina foram significativamente menores (84,33±6,2 pg/mL) comparado ao grupo simulada (116,85±12 pg/mL; P=0,02). Mediana da expressão do mRNA da UCP-1 nos grupos hipóxia e simulada foram respectivamente, 0,0007 [0,0002-0,66] e 1,33 [0,49-11,94] (P=0,006).

Conclusão: Modelo de hipóxia intermitente de apneia do sono reduz a ingestão alimentar, o ganho de peso, os níveis de adiponectina e as expressão do mRNA da UCP-1. Estes resultados originais estão em contraste com o aumento da propensão para a obesidade em pacientes com apneia e gera a hipótese do papel da hipóxia intermitente na supressão da atividade do BAT observado em indivíduos com obesidade.

INTRODUÇÃO

Estudos anteriores de nosso grupo investigaram em roedores a influência do modelo de apneia do sono por hipóxia intermitente, no peso corporal, no tecido adiposo marrom (TAM)¹, na concentração de proteína total do TAM² e no estresse oxidativo³.

Embora a apneia do sono esteja associada à obesidade, a hipóxia intermitente causa perda de peso nos roedores a ela submetidos. Esse comportamento paradoxal nunca foi investigado em suas causas.

Apneia do sono tem graves consequências e, por sua elevada prevalência⁴, representa problema de saúde pública.⁵ Ligar os mecanismos da hipóxia intermitente aos da obesidade pode auxiliar nos métodos de tratamento de ambos os problemas. O tratamento da obesidade não conta com estratégias eficazes. O entendimento da fisiologia do TAM foi considerado alvo para a abordagem da obesidade.⁶

A redução na expressão da principal proteína do TAM foi observada neste estudo. Isso pode representar passo adicional na compreensão do complexo obesidade-apneia-hipóxia.

REFERENCIAL TEÓRICO

SONO

O sono consiste num estado ativo e complexo. Sua ocorrência envolve diferentes fenômenos comportamentais, bioquímicos e eletrofisiológicos.^{7,8}

O sono humano normal é composto por dois estados.⁹ Segundo o Manual de Estagiamento do Sono publicado no ano de 2007 pela *American Academy of Sleep Medicine*¹⁰ estagia-se o sono como: sono REM (*rapid eye movement*), caracterizado pela presença de ondas dessincronizadas no eletroencefalograma, presença de movimentos oculares rápidos, os músculos estão atônicos e o sonho está presente; sono NREM (*non-rapid eye movement*) está associado com a presença de ondas sincronizadas corticais, com atividade psicológica mínima pelo eletroencefalograma e baixo tônus muscular. O sono NREM é subdividido em três estágios definidos que se situa desde o sono mais superficial até o mais profundo: estágio N1, N2 e N3.¹⁰ Os termos *sincronizados* e *dessincronizados* referem-se à presença ou à ausência de descargas conjuntas entre neurônios do córtex cerebral.¹¹

O ciclo completo do sono se repete de quatro a cinco vezes por noite com duração aproximada de 90 a 110 minutos e é alternado ciclicamente pelos três estágios do sono NREM (75 a 80% do sono) seguido do nosso REM (20 a 25% do sono).

O registro do sono através da polissonografia é considerado padrão áureo para diagnóstico de transtornos do sono. O exame consiste na monitorização contínua do sono do paciente no decorrer de uma noite inteira, realizado no horário habitual, em torno, das 23 horas às 7 horas, em ambiente assistido em laboratório do sono. Três parâmetros fisiológicos são utilizados para definir os estágios do sono pela polissonografia: o eletroencefalograma (atividade cerebral/estadiamento do sono), o eletrooculograma (movimentos oculares horizontais e verticais) e o eletromiograma (tônus muscular; movimento de pernas, braços e masseteres).¹² São utilizadas outras características como aspectos cardio-respiratórios (electrocardiograma, fluxo aéreo, esforço tóraco-abdominal e oximetria). Os dados de fluxo aéreo e movimentos torácicos e abdominais, junto com a saturação de oxigênio, revelam o desempenho respiratório e quantificam o número de apneias e hipopneias durante o sono.

A macroestrutura do sono pode ser avaliada pelo tempo total no leito, tempo total de sono, eficiência do sono, latência ao sono NREM e REM, troca de estágios e números de movimentos corpóreos.

Obter clara apreciação das características normais do sono fornece base sólida e padronizada para o entendimento das condições clínicas e na interpretação de certas consequências dos transtornos do sono, onde as características *normais* estão alteradas.

TRANSTORNOS DO SONO

A publicação da *Diagnostic Classification of Sleep and Arousal Disorder*¹³ pela *Association of Sleep Disorders*, em 1979, anunciou o surgimento da disciplina da medicina do sono. Isto foi seguido pela *The International Classification of Sleep Disorders* (ICSD), publicado em 1990. Em 1997 foi revista (ICSD-R)¹⁴, e em 2005 foi lançada a segunda edição (ICSD-2)¹⁵. Esta classificação é utilizada para diagnóstico primário, epidemiológico e de codificação para especialistas e pesquisadores da área do sono e da medicina do sono.

A ICDS-2 classifica os transtornos do sono em oito grandes categorias: insônia, transtornos respiratórios relacionados ao sono, hipersonias de origem central, transtornos do sono relacionados ao ritmo circadiano, parassonias, transtorno de movimento relacionado ao sono, sintomas isolados, variantes normais e outros transtornos do sono.

APNEIAS E HIPOPNEIAS

Dentro do espectro de possíveis perturbações do sono, as mais facilmente identificáveis são as apneias e hipopneias (AH) do sono que se enquadram nos transtornos respiratórios do sono. A apneia (Figura 1A) é definida como a interrupção completa do fluxo aéreo para os pulmões por pelo menos 10 segundos e hipopneia (Figura 1B) como a redução de 50% do fluxo, acompanhada de dessaturação da hemoglobina maior que 3% e/ou de evidência de despertares no eletroencefalograma.^{16,17} AH diferem quanto ao grau de obstrução da faringe, entretanto, apresentam fisiopatologia e impactos clínicos semelhantes.¹⁸

A gravidade da apneia do sono¹⁹ é classificada de acordo com o índice de apneia e hipopneia (IAH), que é determinado dividindo o número total de episódios de AH pelo número de horas de sono. Conforme a *American Academy*¹⁵, se considera o IAH normal até 5 AH/h. Se o IAH estiver entre 5 e 15 AH/h, o caso será considerado leve; IAH entre 16 e 30 AH/h, moderado; e acima de 30 AH/h, grave.

Os critérios para diagnóstico da apneia do sono mais recentes¹⁵ incluem os eventos respiratórios relacionados à resistência da via aérea superior, que não alteram a linha de base da saturação de oxigênio, mas provocam breves despertares e são classificados como despertares relacionados aos esforços respiratórios (DRER, em inglês, *Respiratory effort-related arousals*, RERAs). Como esses despertares são fatores de risco para sono não reparador, sonolência diurna e fadiga, pode ser presumido que sua fisiopatologia seja a mesma das AHs, devendo fazer parte dos eventos obstrutivos.

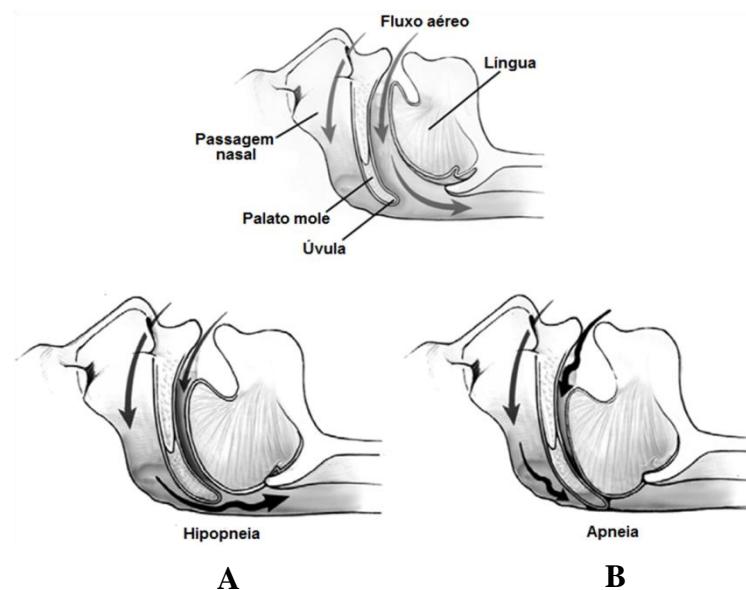
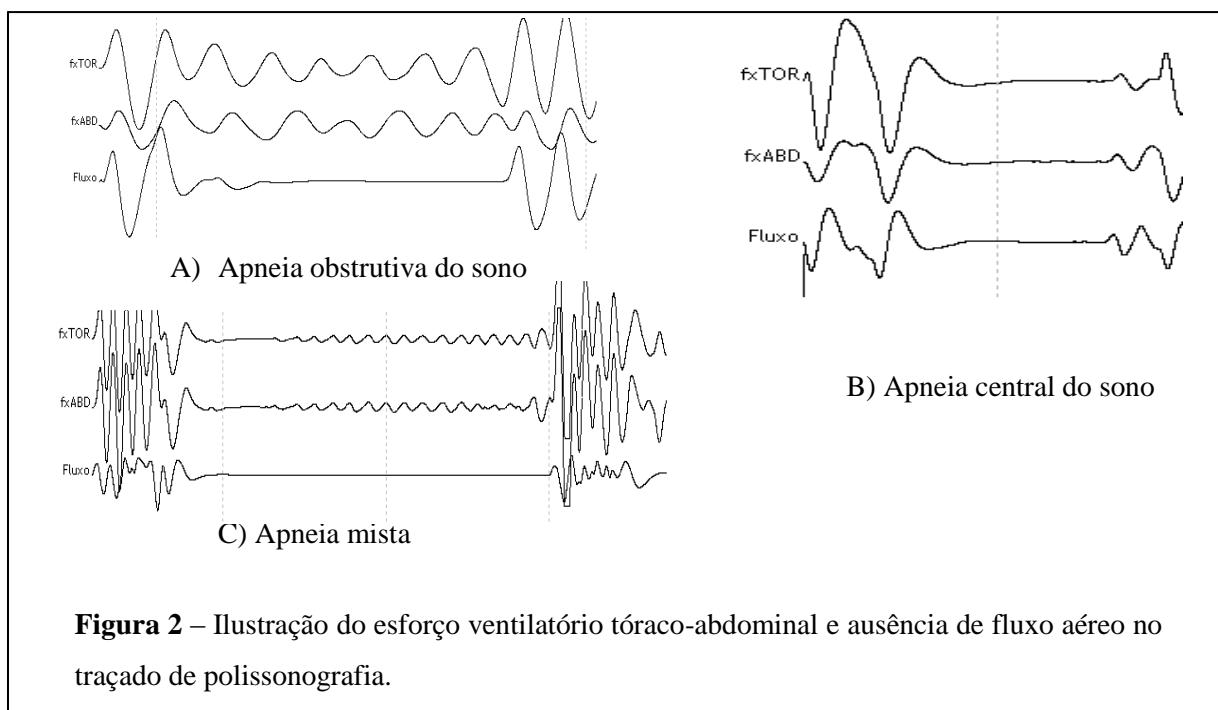


Figura 1 – Obstrução parcial e completa da via aérea superior durante o sono, resultando em hipopneia (A) e apneia (B) respectivamente. Adaptada referência 18.

Os episódios de apneia do sono podem ser classificados em três tipos: apneia obstrutiva do sono (AOS; Figura 2A), apneia central do sono (ACS; Figura 2B), e apneia mista (Figura 2C). A principal diferença entre AOS e ACS é a presença ou ausência de esforço respiratório, respectivamente.²⁰

O mecanismo fisiopatológico que promove a AOS é o colapso da faringe que pode ser causado por anormalidade anatômica ou por controle anormal dos músculos que mantêm a permeabilidade da via aérea superior.^{21,22} Ocorrem oclusões repetitivas da via aérea, apesar da manutenção dos esforços inspiratórios e se observa que a complacência da faringe está alterada nos pacientes com AOS. Essas alterações foram observadas em pacientes roncadores com e sem AOS²³ que possuem menor área transversal da faringe comparado aos não roncadores, e que os roncadores com AOS tem menor volume pulmonar.

Na ACS não ocorre obstrução da via aérea, e a cessação da ventilação é causada por ausência de impulsos dos centros neurais que regulam a respiração, ocorrendo principalmente em pacientes com insuficiência cardíaca.^{24,25,26,27,28} Quando a ACS, sem movimento respiratório, tornam-se obstrutiva, devido ao reinício dos movimentos de tórax e abdômen, é caracterizada de apneia do sono mista.²⁹



A síndrome da apneia obstrutiva do sono (SAOS) compreende o conjunto de sinais e sintomas relacionados à doença aliado à presença de número significante de eventos de apneia do sono. A figura 3 demonstra os critérios diagnósticos para a síndrome, conforme a *American Academy*.¹⁵

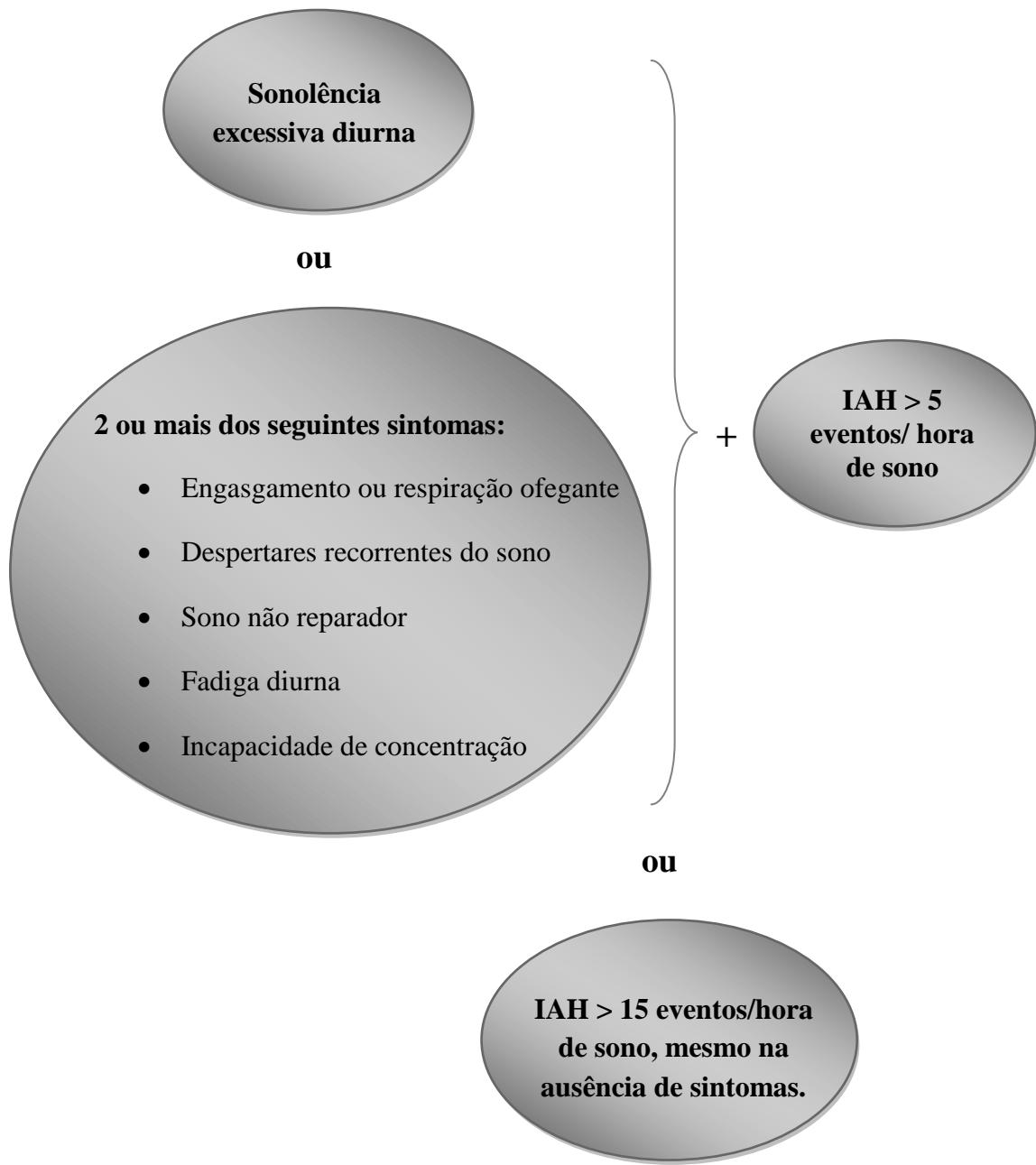


Figura 3 – Critérios diagnósticos para SAOS

SONO NOS MAMÍFEROS

A duração do ciclo do sono varia de espécie para espécie, bem como a percentagem de tempo ocupado pelo sono REM. A organização cíclica do sono é característica compartilhada por mamíferos e aves na qual também compartilha o comportamento e algumas mensurações dos critérios do sono pelo eletroencefalograma. Pássaros tem menor diferença no eletroencefalograma entre vigília e sono NREM do que mamíferos. O sono das aves dos mamíferos é distinguido por, 1) menor percentagem de sono REM em aves, 5% em aves e 10-15% em mamíferos, 2) ocorrência de sono REM em grupos, 3) períodos breves de sono REM, frequentemente menores que 10 segundos e 4) ciclos do sono correspondente curtos.³⁰

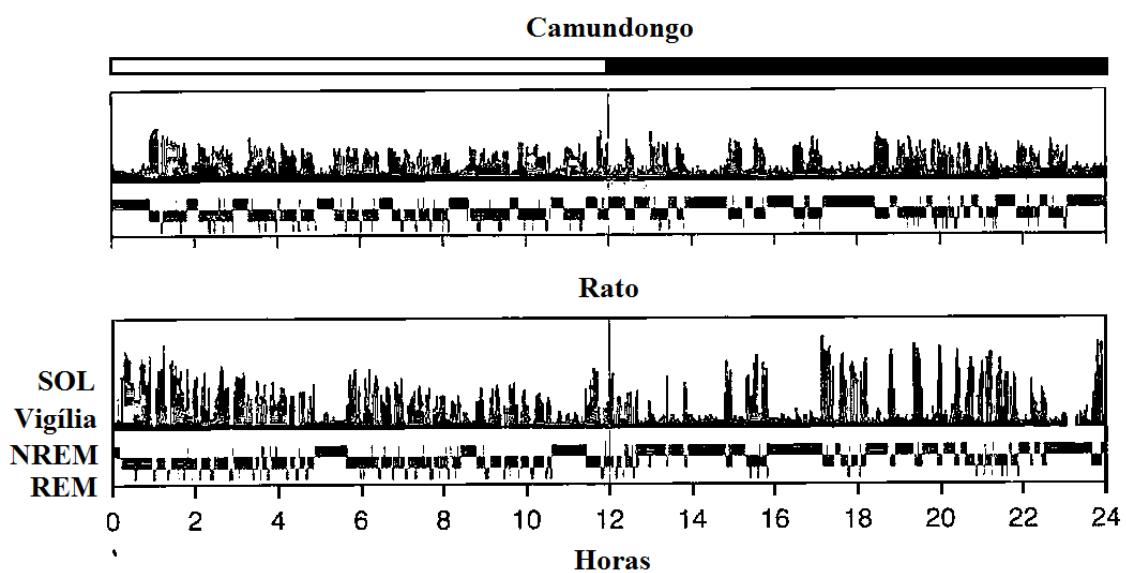


Figura 4 – Distribuição em 24 horas de ondas lentas (SOL), vigília, sono NREM, sono REM em camundongos C57BL/6 e em ratos Sprague-Dawley avaliados em ciclo de 12hs de claro e 12hs de escuro. Registro do padrão polifásico sono-vigília (tipicamente para todos os primatas não humanos) e o curto ciclo de sono NREM-REM de 12 a 15 minutos que são típicos de pequenos roedores. Adaptada referência 30.

EPIDEMIOLOGIA DA APNEIA DO SONO

Em Israel³¹, 78 trabalhadores foram selecionados de uma população de 1502 industriais presumivelmente saudáveis. Os indivíduos foram entrevistados sobre seus hábitos de sono e transtornos do sono, e submetidos a registros poligráficos pelo menos uma noite. A prevalência de apneia do sono foi de 1,2% e se identificou associação significativa entre a queixa de sonolência excessiva diurna e da incidência da apneia do sono. Trabalhadores com AH maiores que 10/hora queixaram-se mais de ronco alto e dores de cabeça frequentes.

Utilizando dados do *Wisconsin Sleep Cohort Study*³², estudo iniciado em 1988, estimou que 2% das mulheres e 4% dos homens da população de idade entre 30 a 60 anos preenchiam os critérios mínimos para diagnóstico de SAOS ($AH \geq 5/\text{hora}$ e sonolência excessiva diurna). Esse é o estudo mais citado de epidemiologia da apneia do sono, apesar de estar desatualizado.

Em primeiro lugar, para detectar os eventos respiratórios neste estudo foi utilizada tecnologia dos anos 80. Segundo, a presença de sonolência excessiva diurna foi avaliada por duas questões concebidas pelos autores e não por instrumentos validados. Em terceiro lugar, sabe-se que obesidade é o principal fator de risco para apneia do sono. Embora a epidemia de obesidade já começasse na década de 80, apenas em 1997 a Organização Mundial da Saúde a reconheceu como problema de saúde pública.

Projeções baseadas nos *National Health and Nutrition Examination Surveys* (NHANES) dos Estados Unidos³³, preveem que, se a tendência da obesidade continuar aumentando na taxa atual, 86% dos americanos adultos apresentarão sobrepeso e 51% serão obesos em 2030, e todos os indivíduos americanos adultos serão obesos em 2048.

Bixler et al.³⁴ apontaram, em 1741 indivíduos nos Estados Unidos, prevalência de apneia do sono de 3,9% em homens e 1,2% em mulheres, relação de 3,3:1 respectivamente. A prevalência de apneia do sono foi baixa em mulheres pré-menopausa (0,6%), assim como as mulheres pós-menopáusicas com terapia de reposição hormonal (0,5%). Além disso, a presença de apneia do sono nestas mulheres parece estar associada exclusivamente com obesidade ($IMC \geq 32,3 \text{ kg/m}^2$). Estes dados combinados indicam que a menopausa é fator de risco para a apneia do sono em mulheres e que a reposição hormonal parece estar associada com risco reduzido.

Na Índia, foi realizado estudo na população urbana do sexo masculino, com idade entre 35 a 65 anos que frequentaram o hospital de Bombay, local do estudo, para exames de rotina. Na primeira fase, 658 indivíduos (94%) retornaram os questionários preenchidos sobre seus hábitos de sono e condições médicas associadas. Na segunda fase, 250 destes foram submetidos à polissonografia domiciliar. Assim, do total de 700 indivíduos, 250 retornaram as duas fases do estudo, na qual se identificou a prevalência de 19,5% de transtornos respiratórios do sono ($AH \geq 5/\text{hora}$) e de SAOS ($AH \geq 5/\text{hora}$ ou sonolência excessiva diurna) de 7,5% em homens e 4,5% em mulheres.³⁵

O primeiro estudo com levantamento de dados de apneia do sono em grande área metropolitana da América do Sul foi realizado em São Paulo. Tufik et al.⁴ identificaram a maior prevalência de SAOS já encontrada entre todos estudos epidemiológicos. Eles detectaram a prevalência de SAOS em 32,8% na população adulta da cidade de São Paulo. Os autores avaliaram 1042 voluntários amostrados na população a partir de dados do censo do IBGE de 2000, que realizaram polissonografia. A alta prevalência de AOS neste estudo pode ser explicada pelo processo de amostragem probabilística, a baixa taxa de recusa para o exame de polissonografia, o uso de uma cânula nasal, a utilização dos critérios mais recente da *American Academy*¹⁵ para o diagnóstico da SAOS, a inclusão de grupos de pessoas mais idosas e a maior prevalência de obesidade na população estudada. O uso de cânula nasal detecta 16% mais eventos respiratórios e os recentes critérios da *American Academy*, inclui RERAs no IAH e não exige presença de sintomas para diagnóstico quando $IAH > 15/\text{hora}$.

Os dados do estudo anterior não estão fora do padrão mundial. Na Espanha, 26% dos homens e 28% das mulheres têm $IAH \geq 5/\text{h}$ e 14% dos homens e 7% das mulheres, $IAH \geq 15/\text{h}$ dentre a população com idade entre 30 e 70 anos.³⁶ A população australiana também tem alta prevalência de AOS. Bearpark et al.³⁷, utilizando método diagnóstico o monitor portátil tipo IV, relataram que 10% dos indivíduos apresentavam $IAH > 10/\text{h}$. Já, na população asiática, se estima que a prevalência de SAOS, definida por $IAH \geq 5/\text{h}$, em homens é de 4,5% e em mulheres de 3,2%.³⁸

Estes dados epidemiológicos sugerem que a apneia do sono está presente em diversos grupos raciais e étnicos. A doença pode sido descoberta pelos indivíduos no decorrer do estudo devida a apneia do sono ser assintomática.

QUADRO CLÍNICO

SINTOMAS

As principais manifestações da AOS são de dois tipos: durante o sono e/ou durante a vigília. Durante o sono são ronco, apneias e os despertares repetidos, enquanto durante a vigília é a sonolência excessiva diurna que aparece após algum tempo do início da doença, com intensidade habitualmente proporcional à gravidade da AOS.

Os pacientes se queixam que adormecem lendo, assistindo à televisão, viajando, em aulas ou palestras, no trabalho, conversando, escrevendo, durante as refeições e dirigindo. A sonolência ocorre em situações monótonas, e são avaliadas pela Escala de Sonolência de Epworth.³⁹ O adormecer pode atrapalhar o ambiente de trabalho, familiar e até mesmo conjugal.

EXAME FÍSICO

Distribuição da gordura corporal

Condições clínicas podem ser detectadas para determinar a gravidade da SAOS. Simpson et al.⁴⁰ evidenciaram em mulheres, a percentagem de gordura na região do pescoço e o IMC explicaram juntos 33% da variação no IAH. Já em homens, o percentual de gordura na região abdominal e a razão pescoço/cintura juntos responderam por 37%. Assim, a obesidade está associada regionalmente com a gravidade da SAOS, embora em diferentes locais entre os gêneros.

Embora a obesidade seja considerada fator predisponente, grande estudo epidemiológico mostrou que aproximadamente 60% dos pacientes com SAOS na comunidade não eram obesos.⁴¹

Estudos de casos-controle^{42,43} e transversais^{44,45} revelaram associação entre SAOS e hipertensão. Dados longitudinais do *Wisconsin Sleep Cohort*⁴⁶ forneceram a evidência convincente para a relação de causalidade. Esse estudo demonstrou relação dose-resposta entre a gravidade da SAOS e incidência de hipertensão, com elevados índices de chances para os indivíduos com IAH de 5 a 15/hora e aqueles com IAH>15/hora. Em contraste com estes achados, estudo prospectivo de maior incidência de hipertensão deixou de encontrar relação dose-resposta entre o IAH e a incidência de hipertensão independente da obesidade.⁴⁷

O apoio inicial para o nexo de causalidade SAOS-hipertensão veio de modelos animais. Exposição à hipóxia intermitente em ratos⁴⁸ ou oclusão intermitente da via aérea superior em cães⁴⁹ resultou em elevação da pressão arterial, evidente durante o período de exposição, e sustentada no período de normoxia.

Anatomia da via aérea superior

A obstrução da via aérea superior durante o sono é mais frequente nos humanos, em parte, porque o osso hioide, apoio para os músculos dilatadores da faringe, não está firmemente ligado a estruturas esqueléticas.⁵⁰ Em outros mamíferos, o osso hioide se fixa ao processo estiloide do crânio.^{51,52} Assim, a faringe humana não tem suporte rígido, exceto nos extremos superior e inferior, onde está ancorada à rinofaringe, e à laringe.

A região oral da faringe se divide em: nasofaringe, retropalatal, retroglossal e hipofaringe (Figura 5 A). Em indivíduos com AOS o bloqueio da passagem de ar pode ocorrer em uma ou mais regiões da faringe podendo apresentar estreitamento também na vigília.⁵³

Estudo de caso controle⁵⁴ demonstrou que a estrutura dos tecidos moles da via aérea superior incluindo língua, paredes laterais da faringe, palato mole e camada de gordura no espaço perifaríngeo, foram significativamente maiores em apneicos comparados aos controles (Figura 5 B). Esse resultado permaneceu entre os grupos mesmo ajustando para sexo, idade, etnia, tamanho craniofacial e quantidade de gordura ao redor da via aérea. Além disso, o aumento do volume destes tecidos ampliou significativamente o risco para AOS.

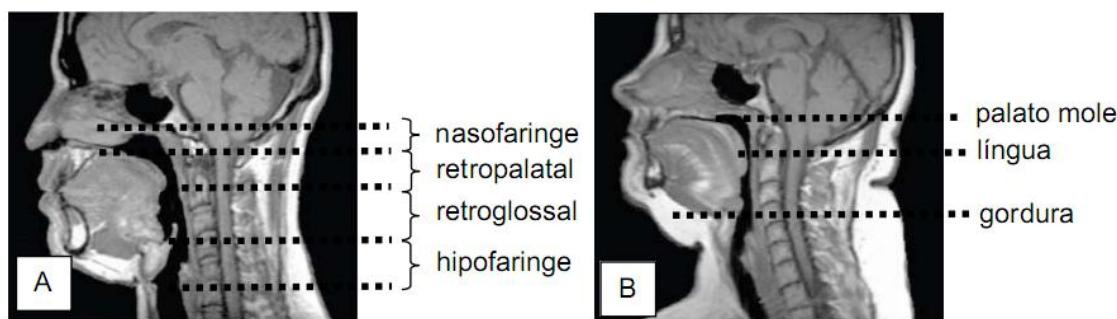


Figura 5 – Imagem sagital, de indivíduo normal e com AOS, analisada por ressonância magnética. A: indivíduo normal e destacadas as regiões da VAS. B: indivíduo com AOS grave com destaque para os tecidos moles. Observa-se que o paciente com AOS apresenta as regiões da VAS mais estreitas, como a retropalatal e retroglossal, assim como o palato mole, a língua e a gordura subcutânea são maiores. Adaptada referência 54.

Watanabe et al.⁵⁵ afirmam que anormalidades craniofaciais e obesidade podem contribuir sinergicamente no aumento da colapsabilidade da via aérea superior na AOS. Em obesos apneicos, o fechamento da via aérea superior ocorre principalmente na velofaringe e quando acompanhado de recuo na mandíbula, o colapso ocorre na velofaringe e orofaringe.

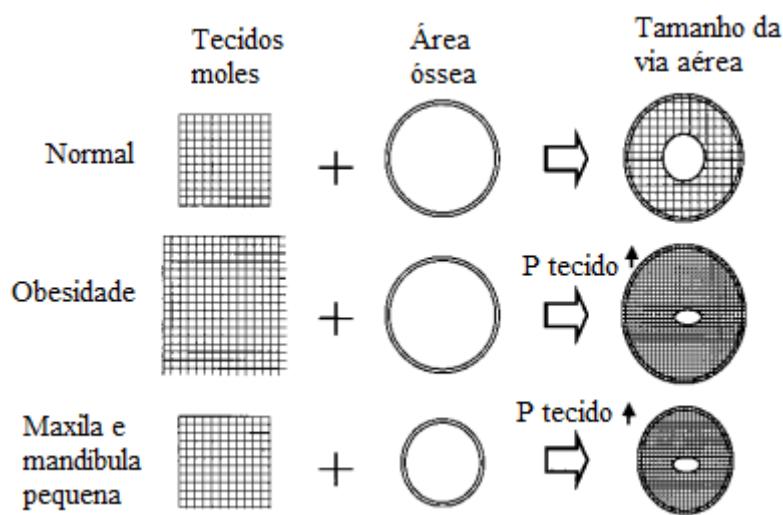


Figura 6 – Esquema do modelo mecânico do espaço aéreo faríngeo. P tecido = pressão tecidual em torno da via colapsável. Adaptada referência 55.

Obesidade é importante fator de risco para AOS.³² No entanto, a relação entre obesidade e AOS não é bem compreendida. A obesidade diminui o tamanho da via aérea faríngea aumentando sua colapsabilidade. Aumento da circunferência do pescoço, devido a maior distribuição de gordura ao redor da via aérea, é excelente preditor de AOS, melhor que o IMC.^{56,57,58}

Outras explicações para a relação entre obesidade e AOS incluem alterações da complacência da via aérea superior e alterações na relação biomecânica dos músculos da via aérea.⁵⁹ Embora a obesidade seja importante fator de risco para AOS, o efeito de ganho de peso nas estruturas dos tecidos moles especificamente na perifaringe permanece indefinido.

A redução de 5 a 10% do peso corporal diminui da colapsabilidade da via aérea.^{60,59,61,62} No entanto, permanece inexplorado como se altera o tamanho ou

configuração dos tecidos moles de cada uma das diferentes estruturas, como palato mole, língua, paredes laterais da faringe e camada de gordura no espaço perifaríngeo.

FISIOPATOLOGIA DA HIPÓXIA

Chama a atenção na apneia, os repetidos períodos de hipóxia a que o indivíduo é submetido. Esta hipóxia intermitente difere da hipóxia crônica. No caso de habitantes de altitude ou de pneumopatas, a hipóxia sustentada e crônica permite adaptação, envolvendo processos moleculares e genômicos.⁶³ No treinamento de atletas, se utilizam com sucesso os efeitos da altitude sobre a ventilação, o transporte de oxigênio e as alterações teciduais para melhorar a entrega e a utilização de oxigênio.⁶⁴ Os tecidos hipóxicos produzem o fator hipóxia-induzível 1 (*Hypoxia-inducible factor 1; HIF-1*) que desencadeia angiogênese. Esse fator comanda a expressão de genes controlando a sobrevivência das células e a neoformação vascular. Pesquisas sobre o controle desse fator estão no cerne de novas terapêuticas anticâncer e para revascularização. A hipóxia intermitente, entretanto, apesar de possíveis efeitos benéficos, pode ter consequências sobre vários tecidos, sem papel adaptativo aparente. As oscilações da concentração de oxigênio causadas pelas apneias expõem os pacientes com SAOS a processos semelhantes ao de isquemia/reperfusão, ensejando a produção de radicais livres e estresse oxidativo.⁶⁵ Em modelo animal, a hipóxia intermitente causa morte dos neurônios corticais por apoptose.⁶⁶

Hipóxia ativa outro fator de transcrição, o gene de resposta de crescimento precoce 1 (*early growth response gene 1; Egr1*). Hipóxia endovascular causa reações intensas, talvez fruto de adaptação evolutiva ao ambiente hipóxico, que podem ter graves consequências clínico-patológicas. Embora a população vivendo acima de 3.000 metros seja pequena, muito se viaja, a trabalho ou a passeio, criando exposição intermitente ou crônica à hipóxia. A síndrome mais comum, o mal de montanha agudo (*acute mountain sickness*), se caracteriza por cefaleia, náusea, anorexia e fadiga que ocorre em quem sobe rápido à altitude. Já se relacionou esses sintomas com aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica pela formação de radicais livres. Complicações menos frequentes, mas extremamente graves, os edemas pulmonar e cerebral da grande altitude causam a maioria das mortes nas escaladas.

As espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*; ROS) ou radicais livres envolvidas na sinalização que levará as células à adaptação à altitude, podem contribuir para os problemas agudos, pulmonares e neurológicos, bem como prejudicar a função muscular.

MODELOS DE HIPÓXIA INTERMITENTE

A literatura descreve modelos de hipóxia intermitente em cães, coelhos, ratos e camundongos ou mesmo em culturas de células para simular os danos potenciais a que estão expostos pacientes com SAOS. Estes experimentos, em sua totalidade, demonstraram alterações anatômicas e funcionais em: 1) reatividade simpática e vascular à hipóxia e hipercapnia⁶⁷, 2) upregulation do fator de crescimento endotelial vascular⁶⁸, 3) pressão arterial sistêmica⁶⁹, 4) pressão arterial pulmonar⁷⁰, 5) eritropoese e massa do ventrículo direito⁷¹, 6) crescimento fetal⁷² e 7) comportamento de crias de ratas expostas a hipóxia intermitente pré-natal.⁷³ Aspectos que indicam envolvimento do sistema nervoso central na fisiopatogenia das consequências das apneias são: 1) sonolência⁷⁴, 2) aprendizado espacial⁷⁵, 3) neurônios do hipocampo^{76,77} 4) metabolismo lipídico cerebral⁷⁸ e 5) serotonina.⁷⁹

Muitos dos modelos não reproduzem a real situação de uma apneia por usar tempos de exposição à hipóxia muito variados. Por exemplo, num estudo em que a pressão arterial sistêmica foi medida por telemetria, produzia hipóxia por 12 segundos, seguida de normoxia por 18 segundos.⁸⁰ Em outro trabalho, com outra metodologia, períodos de hipóxia de 3 minutos alternaram-se com períodos de normoxia de 3 minutos.⁸¹

A maioria dos modelos animais de apneia do sono não acrescentam CO₂ ao N₂ inalado na câmara de hipóxia intermitente. Com isso, os animais, ao hiperventilarem por causa da hipóxia, sofrem hipocapnia intermitente. Nas apneias obstrutivas do sono, ocorre hipercapnia e hipóxia, ou seja, asfixia. Modelos de hipóxia intermitente isocápnica ou hipóxia intermitente asfíctica, por acrescentar CO₂ à mistura, obtêm alterações mais rapidamente e reproduzem melhor uma das características da AOS.

Avanços importantes no conhecimento da genômica permitiram entender melhor os efeitos da hipóxia intermitente no ser humano adulto e em desenvolvimento, em curto e longo prazo. Não obstante, permanecem lacunas a serem preenchidas. Sem

dúvida, mesmo breves períodos de hipóxia desencadeiam respostas celulares. Identificar quais dessas respostas são protetoras e quais são prejudiciais, quais são permanentes e quais são reversíveis terá valor tanto para a compreensão das consequências da SAOS como para a prevenção das respostas indesejáveis.

SISTEMA ENDÓCRINO E HIPÓXIA

A obesidade, as alterações do ciclo sono-vigília, o estresse oxidativo e do eixo hipófise-pituitária-adrenal (HPA) remetem às consequências endócrinas da AOS. O sistema endócrino tem papel relevante na adaptação à hipóxia e ao estresse. O efeito da hipóxia sobre o sistema endócrino foi estudado em humanos em altitudes elevadas^{82,83,84,85} e em animais expostos à hipóxia.^{86,87,88,89,90} Esse efeito abrange às secreções hormonais, afetando a morfologia e histologia das glândulas endócrinas.⁹¹ O estresse hipóxico diminui o apetite e o ganho de peso em camundongos^{92,93} em crescimento e induz a perda de peso em humanos em altitude.^{94,95,96,97,98}

O tecido adiposo branco é um órgão endócrino que participa do controle do peso.⁹⁹ Entre os hormônios secretados por esse tecido, a leptina e a adiponectina são relevantes para a investigação em apneia do sono.

LEPTINA

A leptina começou a ser investigada em 1949 a partir de uma linhagem de camundongos geneticamente obesos (Figura 7).¹⁰⁰ Esse modelo animal é deficiente na produção de leptina, possui homozigose para a mutação do gene *ob*. Tais camundongos não possuem saciedade, com ingestão excessiva de alimentos e desenvolvimento de obesidade. Além disso, os animais apresentam diabete tipo 2, hiperinsulinemia, resistência à insulina e esterilidade.¹⁰¹ O tratamento desse camundongo com leptina exógena reverte o quadro de hiperfagia e obesidade.¹⁰²

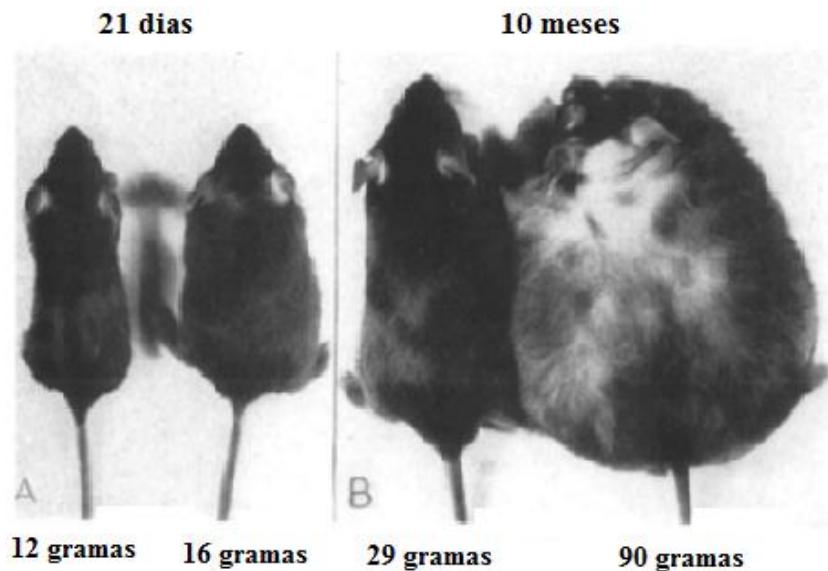


Figura 7 – Evolução do peso corporal de camundongos obeso (ob/ob) e controle aos 21 dias (A) e aos 10 meses (B) de idade. Adaptada referência 100.

Zhang et al.¹⁰³ publicaram a primeira descrição da leptina (de *leptos*, magro). Essa proteína é produzida e secretada pelos adipócitos brancos, placenta, ovários, células mamárias, fígado, músculo esquelético, medula óssea e pituitária.¹⁰⁴ A proteína de 16kDa é constituída por 167 aminoácidos. A leptina sinaliza a quantidade de tecido adiposo e reduz o apetite para regular o depósito de gordura corporal.¹⁰⁵ Existe correlação positiva entre os níveis de leptina circulantes e a percentagem de gordura corporal.^{106,107} Por não se observar, porém, redução de apetite em obesos, se evidenciou resistência à leptina endógena.¹⁰⁸ A hiperleptinemia da obesidade está associada a defeitos no receptor da leptina ou ao nível de transporte de leptina no sistema nervoso central.¹⁰⁹

Em 1950, parecia resolvido o problema da obesidade à medida que ganhou força a hipótese de a hipoleptinemia ser a determinante do acúmulo de gordura. Entretanto, estudos posteriores mostraram que as mutações no gene que determinante da síntese do receptor de leptina, também determinavam animais resistentes à insulina, hiperleptinêmicos e obesos.^{110,111}

Autores do *Beth Israel Deaconess Medical Center* e da *Harvard Medical School*¹¹² publicaram revisão intitulada *Leptin*, descrevendo a frustração da pesquisa da leptina como hormônio anti-obesidade. A leptina serve como mediador da adaptação ao jejum, e este papel pode ser a principal função para a qual a molécula evoluiu. Além dos

efeitos sobre a homeostase energética, a leptina tem outros importantes efeitos sistêmicos.

Na associação com a apneia do sono, o efeito inflamatório da leptina é destaque.^{113,114} A síntese de leptina é estimulada por endotoxinas¹¹⁵, infecção, fator de necrose tumoral¹¹⁶, fator inibitório da leucemia¹¹⁷ e interleucina 1.¹¹⁸ O aumento da leptina como resultado da elevação dos níveis de citocinas pode contribuir para anorexia e perda de peso nessas condições inflamatórias.¹¹⁹

A gravidade da hipoxemia no sono se associa com aumento de leptina, independente do grau de obesidade. Kapsimalis et al.¹²⁰ avaliaram pacientes com AOS e identificaram que a relação cintura-quadril e o percentual de tempo total de sono com hipoxemia ($\text{SaO}_2 < 90\%$) foram preditores significativos para os níveis de leptina.

Pacientes com AOS têm níveis de leptina 29% maiores comparados aos controles. Após tratamento com CPAP, durante seis meses, houve diminuição significativa deste hormônio.¹²¹

Em 25 pessoas saudáveis, expostas por 17hs a hipóxia normobárica, com inalação de O_2 a 12,5%, simulando de 4100 m de altitude, Snyder et al. mediram os níveis de leptina e glucagon plasmáticos. Os indivíduos ingeriram refeição antes e após a exposição à hipóxia. A leptina foi avaliada antes da refeição e o glucagon antes e após 20 e 40 minutos da refeição. A hipóxia causou elevação significativa de 37% nos níveis de leptina, mas nenhuma mudança nos níveis de glucagon.¹²²

Perda de peso sob hipóxia intermitente ocorre com diminuição da ingestão alimentar e elevação de níveis séricos de leptina.⁹² Quando camundongos C57Bl foram expostos a hipóxia intermitente grave com FiO_2 de 5%, a hipóxia intermitente moderada com FiO_2 de 10% ou a ar intermitente como grupo controle¹²³, o peso corporal do grupo hipóxia grave diminuiu 7% no sétimo dia e se manteve estável até o fim do experimento de quatro semanas. Na 1^a semana de exposição, o peso corporal os níveis séricos de leptina e a ingestão alimentar permaneceram inalterados no grupo hipóxia moderada. No final do experimento o peso corporal aumentou em 15% nos grupos hipóxia moderada e controle. Esse estudo demonstrou que apenas a hipóxia grave causa aumento nos níveis de leptina e está relacionada à menor ingestão alimentar com consequente perda de peso. Houve aumento de 14% nos níveis de colesterol total e aumento de 52% nos níveis de LDL-colesterol dos animais do grupo hipóxia grave

comparado ao grupo controle. Os autores salientam a ocorrência de hiperlipidemia mesmo em face da redução de peso corporal na hipóxia grave.

O efeito da hipóxia intermitente foi avaliado em diferentes tempos de exposição. Em cinco dias, *tempo curto*, e em 12 semanas, *tempo longo*. Camundongos magros em *tempo curto* apresentaram diminuição de 25% nos níveis de glicemia de jejum e aumento de 53% nos níveis séricos de leptina. Em obesos, o *tempo curto* levou à diminuição nos níveis de glicose e aumento de 136% nos níveis de insulina sérica. Este aumento na secreção de insulina foi completamente abolido pela infusão de leptina. Camundongos obesos a *tempo longo* pioraram a tolerância à glicose, consistente com aumento na resistência à insulina.

O mesmo grupo de pesquisadores, da *Johns Hopkins*⁹³, avaliaram o efeito da hipóxia intermitente no metabolismo lipídico de camundongos magros e obesos em cinco dias de exposição com inalação de O₂ de 5%. Para cada grupo de exposição havia o seu grupo controle exposto a ar intermitente. Camundongos magros da hipóxia tiveram níveis séricos de colesterol total, triglicerídeo sérico e hepático e fosfolipídeos aumentados. Adicionalmente, níveis de leptina foram 73% mais elevados comparados ao seu grupo controle. Em camundongos obesos da hipóxia, a hiperlipidemia pré-existente e os distúrbios metabólicos não foram agravados.

A hipóxia intermitente é aplicada no ar ambiente. Não se conhecia, porém, o grau de hipóxia tecidual, medido pela pressão parcial de O₂ nos tecidos (PtO₂).¹²⁴ O efeito da exposição à hipóxia contínua por 12 horas e hipóxia intermitente com 12 e 60 ciclos por hora foi estudado em camundongos magros e obesos. As medidas de PtO₂ foram realizadas no fígado, para refletir níveis sistêmicos de hipóxia e no músculo esquelético e na gordura epididimal, para refletir a hipóxia periférica. Em camundongos magros, hipóxia intermitente-60/h causou oscilações de oxigênio no fígado, mas as flutuações de PtO₂ foram atenuadas no músculo e abolidas na gordura. Hipóxia intermitente e contínua induziram resistência à insulina, mas a inflamação foi aumentada apenas em camundongos magros expostos à hipóxia intermitente-60/h. A inflamação da obesidade não é agravada pelo regime de hipóxia aguda.

ADIPONECTINA

A adiponectina foi descoberta em 1995 por Scherer et al.¹²⁵ É identificada como hormônio ou como adipocina. A proteína de 244 aminoácidos e 30KDa é produzida exclusivamente pelos adipócitos brancos e circula em níveis relativamente elevados na corrente sanguínea. Como a adiponectina é produzida exclusivamente pelo adipócitos, poderia se relacionar as concentrações séricas de adiponectina com mudanças na massa de tecido adiposo. No entanto, os níveis séricos de adiponectina estão diminuídos na obesidade.^{126,127}

Além da obesidade, a relação inversa entre adiponectina e peso corporal é sustentada em indivíduos extremamente magros. Delporte et al.¹²⁸, evidenciaram valor plasmático de adiponectina 30% mais elevado em sujeitos com anorexia nervosa comparados aos controles. Em outro estudo, Pannacciulli el at.¹²⁹ mostraram aumento de adiponectina sérica de 35% em indivíduos anoréticos comparados com controles. Em apoio a esses achados, estudos transversais mostram relação inversa entre a expressão de mRNA da adiponectina e níveis séricos com o IMC.^{130,131}

A diminuição nos níveis de adiponectina está associada com síndrome metabólica¹³², doenças cardiovasculares^{133,134}, apneia do sono¹³⁵, dislipidemia¹³⁶, resistência à insulina¹³⁷ e diabete tipo 2.^{138,139,140,141} Propriedades anti-inflamatórias¹⁴² e anti-aterogênicas^{143,144} têm sido descritas.

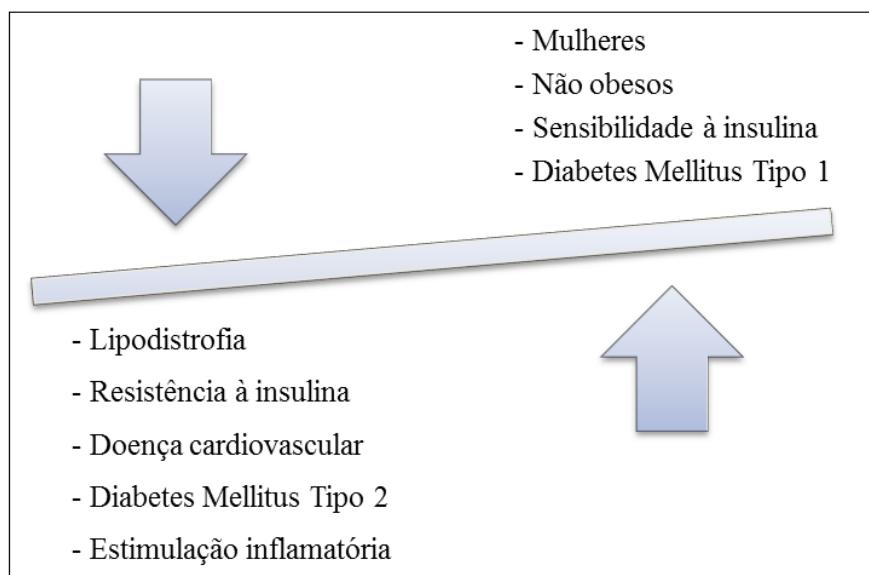


Figura 8: Resumo dos fatores mais importantes e estados de doença que levam ao aumento ou a diminuição da regulação da adiponectina no tecido adiposo.
Adaptada referência 132.

O papel da adiponectina no desenvolvimento da diabete foi avaliado em estudo longitudinal na população indígena Pima.¹⁴⁵ Indivíduos com concentrações séricas elevadas de adiponectina foram menos propensos a desenvolver diabete. Isso apoia a hipótese de que a adiponectina tem papel contra a progressão da obesidade e da diabete.

A redução de peso corporal normalizou a expressão de mRNA da adiponectina anteriormente reduzidos em ratos obesos.¹⁴⁶ Em humanos, a diminuição do peso corporal após ajuste para IMC, circunferência da cintura e quadril aumentou os níveis de adiponectina plasmáticos.¹⁴⁷

Suplementação de adiponectina foi investigada em ratos Wistar expostos à hipóxia intermitente com nadir de O₂ inalado de 5%.¹⁴⁸ Os animais foram divididos em três grupos: controle, hipóxia intermitente e hipóxia-adiponectina, que recebeu adiponectina por injeção intravenosa duas vezes/semana nas cinco semanas do estudo. O grupo hipóxia teve valores menores de adiponectina comparado ao grupo controle. Os desfechos incluíam a disfunção da membrana mitocondrial e a microscopia eletrônica dos miócitos do genioglosso. O grupo hipóxia apresentou alterações significantes nos miócitos, que foram impedidas pela suplementação de adiponectina.

Em resumo, pacientes com AOS e obesos, perdem a proteção da adiponectina para o principal músculo abdutor da faringe, o mais importante na manutenção da permeabilidade da via aérea. Os efeitos benéficos da adiponectina elevada para a doença cardiovascular podem incluir a proteção contra o dano hipóxico, em geral, e contra a apneia do sono, em particular.

CORTISOL

Sistema neuroendócrino, em particular o eixo HPA, é uma das respostas do organismo a algumas formas de estresse. O eixo é controlado por sinais circadianos, derivado de conexões entre o núcleo paraventricular e o núcleo supraquiasmático do hipotálamo.¹⁴⁹ Sua atividade pode ser mensurada pelos níveis plasmáticos do hormônio adrenocorticotrófico pituitário (ACTH) e pela medida do cortisol, hormônio adrenal controlado pela estimulação do ACTH.¹⁵⁰

A resposta do cortisol à doença é essencial para a sobrevivência. Níveis elevados e baixos de cortisol foram associados com aumento da mortalidade.¹⁵¹ Altos

níveis de cortisol refletem estresse grave.^{152,153,154} Baixos níveis apontam resposta insuficiente ao estresse, marcando insuficiência adrenal.^{155,156} Os efeitos do cortisol são direcionados para fornecimento de energia, proteção contra a inflamação e melhora do estado hemodinâmico.¹⁵⁷

A privação do sono tem efeito sobre o eixo HPA. Níveis de cortisol plasmáticos estão ligeiramente aumentados durante a privação total de sono.^{158,159,160,161} A regulação do eixo HPA foi comparada entre indivíduos controles saudáveis e indivíduos com distúrbios do sono. Dentre os distúrbios estão incluídos: AOS com IAH>15/h, síndrome das pernas inquietas e insônia. Nenhum grupo apresentou anormalidades nos níveis de ACTH ou cortisol.¹⁶²

Fator Inibidor de Migração dos Macrófagos participa no processo inflamatório da AOS e está relacionado com a gravidade da doença.¹⁶³ Adicionalmente, os níveis de cortisol foram mensurados, demonstrando nenhuma diferença significativa entre os indivíduos com AOS comparados aos controles.

Níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), cortisol e lipídios foram avaliados em 39 pacientes com AOS com IAH \geq 10/h e no grupo controle.¹⁶⁴ Níveis séricos de BDNF foram analisados por ELISA enquanto os de cortisol pelo método de quimioluminescência. BDNF, triglicerídeos, colesterol total e cortisol não apresentaram diferença entre os grupos.

Inexistem estudos provando os efeitos da hipóxia intermitente no metabolismo da glicose em humanos. Louis e Punjabi¹⁶⁵ submeteram 13 voluntários saudáveis a cinco horas de hipóxia intermitente e normoxia. O estudo ocorreu no período de vigília em dois dias separados. A hipóxia intermitente foi associada com diminuição na sensibilidade à insulina e na tolerância à glicose. Os níveis séricos de cortisol após hipóxia intermitente e normoxia foram semelhantes. Estresse hipóxico em AOS aumenta a predisposição para a disfunção metabólica, mesmo na ausência de outras alterações fisiopatológicas.

Subgrupo com 546 participantes do *Wisconsin Sleep Cohort Study*¹⁶⁶ foram avaliados para cortisol urinário, norepinefrina urinária e variabilidade da frequência cardíaca. AOS foi diagnosticada por polissonografia, síndrome metabólica pelo *National Cholesterol Education Program*¹⁶⁷ e resistência à insulina pelo modelo homeostástico de avaliação (HOMA).¹⁶⁸ O IAH se correlacionou apenas com HOMA e níveis de norepinefrina. As associações enfraqueceram após ajuste para IMC, mas se

mantiveram com diferença estatística. Essas associações parecem ser independentes de marcadores de ativação simpática e do eixo HPA.

TECIDO ADIPOSÓ

A gordura é armazenada principalmente em tecido adiposo branco. O adipócito branco possui diâmetro médio de 90-100 μm e armazena os triglicerídeos em uma grande gota lipídica que ocupa de 85 a 90% do citoplasma. O conteúdo de gordura empurra o núcleo e o citosol para a periferia da célula. A gordura contida nos adipócitos brancos é convertida em ácidos graxos para ser utilizada por outras células.⁹⁹

O tecido adiposo marrom (TAM) faz parte do sistema de termogênese. Apenas 50 gramas desse tecido, podem gerar gasto energético equivalente a 20% do custo energético metabólico de um adulto humano.¹⁶⁹ O adipócito marrom é menor que o branco, atingindo em média 60 μm de diâmetro. Caracteriza-se pela presença de pequenas e múltiplas gotas de lipídios. É rico em mitocôndrias, com citoplasma relativamente abundante, núcleo esférico e ligeiramente excêntrico. Os triglicerídeos hidrolisados resultam em ácidos graxos que são oxidados para produção de calor.¹⁷⁰

O gasto energético total pode ser dividido em: 1) obrigatório, exigido para o funcionamento normal das células e órgãos, 2) resultante da atividade física e 3) adaptativo, resultante da termogênese ou da dieta (Figura 9). Foi proposto que estimular a termogênese adaptativa, definida como produção de calor facultativa produzida em resposta à dieta e ao frio, pode ser alternativa de impedir ou tratar a obesidade.¹⁷¹

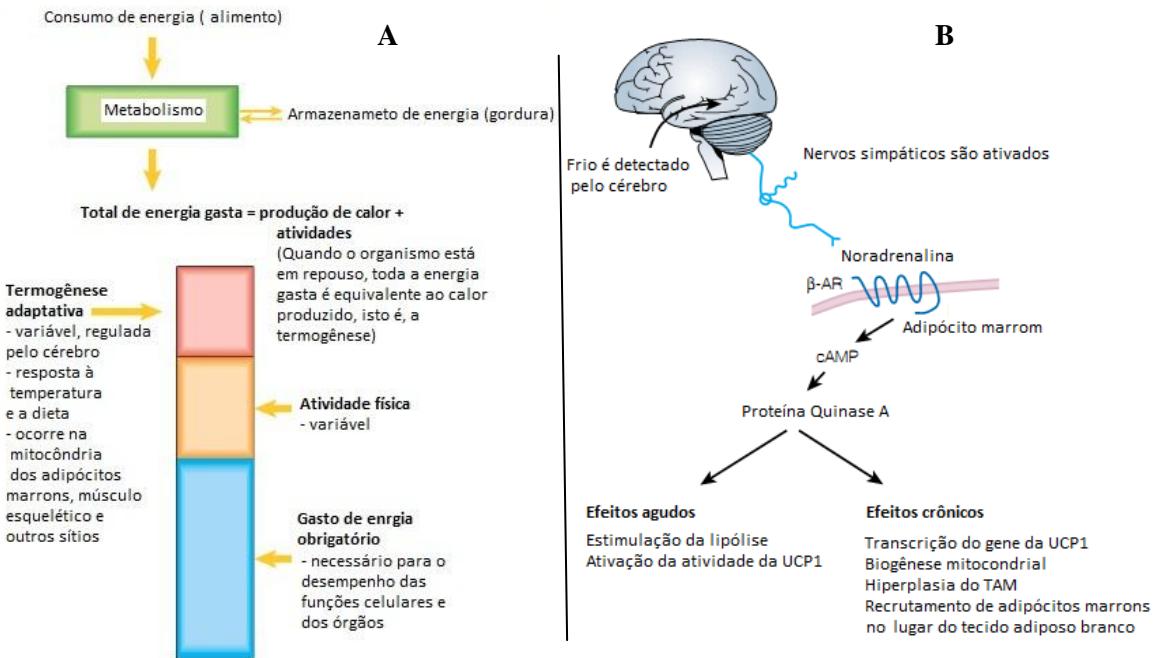


Figura 9 – Perspectiva termodinâmica do gasto energético (A); Termogênese adaptativa induzida pelo frio (B). Adaptada referência 171

TECIDO ADIPOSO MARROM

A proteína desacopladora 1 (UCP-1) foi identificada no TAM em meados de 1970¹⁷², e seu cDNA foi clonado em 1984.^{173,174} Sua localização é na membrana mitocondrial interna. Mitocôndrias são abundantes nos músculos esqueléticos, no coração e no cérebro, onde metabolizam açúcares e gorduras para a formação de ATP.

As mitocôndrias das células da gordura marrom são as únicas que contêm UCP-1. Essa proteína faz com que a membrana interna da mitocôndria vaze prótons durante a fosforilação oxidativa, impedindo a produção de ATP na cadeia respiratória. Assim, ocorre liberação de energia em forma de calor.¹⁷⁰ A alta concentração de citocromo oxidase nessas mitocôndrias bem como a elevada vascularização por capilares contribui para a coloração mais escura das células e do tecido.

A termogênese no TAM é desencadeada através de neurônios do simpático. Esse mecanismo é necessário em ocasiões que o organismo precisa de calor adicional como exposição ao frio, período pós-natal¹⁷⁵, estados febris ou durante a hibernação. Em

coelhos recém-nascidos, o TAM estimulado por exposição ao frio ou infusão de noradrenalina, aumenta o consumo de oxigênio e a produção de calor, sendo o principal local da produção do calor extra nestes animais.¹⁷⁶ A hipóxia induz diminuição na temperatura corporal de mamíferos mediada pelo sistema nervoso central. Esse mecanismo acarreta redução do consumo de oxigênio e aumento da afinidade da hemoglobina com o oxigênio. Esta adaptação parece ser vantajosa quando o mamífero é exposto à hipóxia.¹⁷⁰

Coelhos com um mês de idade foram expostos a condições de temperatura de 24°C e 13°C. Os animais foram distribuídos a grupos de normoxia, com ar ambiente, seguidos de hipóxia com inalação de O₂ de 10% e saturação de O₂ de 54%.¹⁷⁷ Conclui-se que o frio é mais importante que a hipóxia na determinação do TAM. Em condições de hipóxia, a resposta do consumo de O₂ ao frio é reduzida ou completamente abolida pela depressão hipóxica da termogênese.

Os mecanismos da depressão hipóxica da atividade do TAM ainda estão indefinidos. Embora se saiba que, mesmo em animais jovens, a inibição da termogênese não é efeito da limitação na fonte de O₂, mas da resposta regulada pela hipóxia.¹⁷⁸ A resposta termorregulatória à hipóxia provoca diminuição na temperatura corporal em ratos. Esse mecanismo é mediado pela inibição da vasoconstrição cutânea ou pela inibição da termogênese sem tremor durante a qual, mais da metade de todo o O₂ capturado é consumido pelo TAM.¹⁷⁹

Acreditava-se que o TAM diminui com o avançar da idade e está completamente ausente na idade adulta em humanos.¹⁸⁰ Porém, a capacidade de produzir TAM na idade adulta é demonstrada em pacientes com tumores secretores de catecolaminas como feocromocitomas e paragangliomas.^{181,182}

As evidências existentes até a primeira década deste século apontavam para a atividade da UCP-1 apenas em roedores e bebês humanos. No entanto, sua clara atividade foi detectada em adultos.

Três estudos independentes publicados em 2009^{183,6,184} na revista *The New England Journal of Medicine*, objetivaram identificar de forma conclusiva a presença e atividade do TAM em adultos humanos. Os estudos utilizaram a associação da tomografia por emissão de pósitrons e tomografia computadorizada com ¹⁸Fluorine-Fluorodeoxyglucose (PET-TC, ¹⁸F-FDG), fornecendo informações sobre a atividade

metabólica de cada tecido. Para a identificação do TAM, os autores realizaram análise histológica e bioquímica da UCP-1 em amostras de biópsia.

Virtanem et al.¹⁸³ submeteram os sujeitos do estudo, antes de serem posicionados no scanner, à exposição ao frio, por duas horas em sala à temperatura ambiente de 17 a 19°C. Enquanto o escaneamento estava sendo realizado, um dos pés dos sujeitos foi imerso em água à temperatura de 5 a 9°C, de cinco em cinco minutos. Indivíduos expostos ao frio aumentaram em 15 vezes a captação de ¹⁸F-FDG na região supraclavicular. A biópsia do tecido para confirmação de TAM foi realizada em três dos cinco voluntários.

Van Marken Lichtenbelt et al.⁶ examinaram a presença, a distribuição e a atividade do TAM em homens magros, com sobrepeso e com obesidade. A composição corporal e o metabolismo energético foram avaliados. Foi evidenciada atividade do TAM em 23 dos 24 indivíduos expostos a 16°C, e não a 22°C. Um indivíduo sem atividade do TAM tinha o maior percentual de gordura corporal. De fato, a atividade do TAM mostrou correlação negativa com percentual de gordura corporal e correlação positiva com a taxa metabólica de repouso.

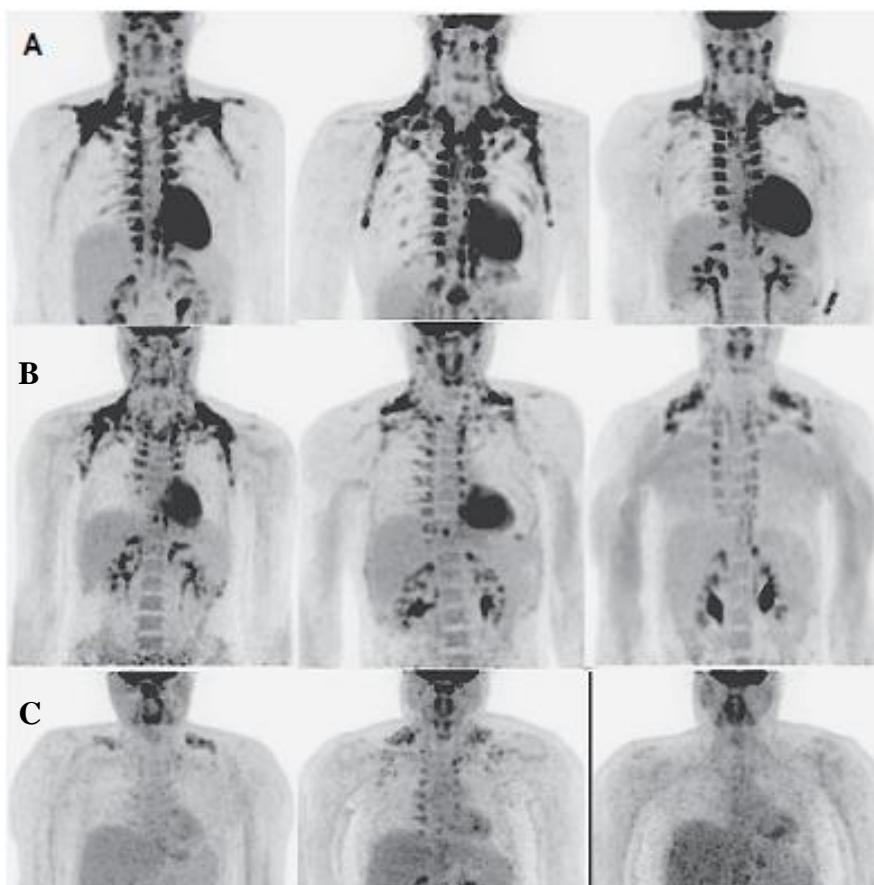


Figura 10 – Resultados do PET-TC em nove dos 24 indivíduos mostram variação fisiológica da captação e distribuição de ^{18}F -FDG no TAM. **A**: indivíduos magros, com os mais altos níveis de atividade do TAM ($>500\text{kBq}$); **B**: indivíduos magros, com níveis medianos de atividade; **C**: indivíduos obesos ou com sobrepeso com níveis mais baixos de atividade do TAM ($<100\text{kBq}$). A região supraclavicular tem a maior quantidade de TAM. Adaptada referência 6.



Figura 11 – Associação de PET-TC revela os padrões de absorção de ^{18}F -FDG no mesmo indivíduo magro em exposição ao frio e em termoneutralidade. Adaptada referência 6.

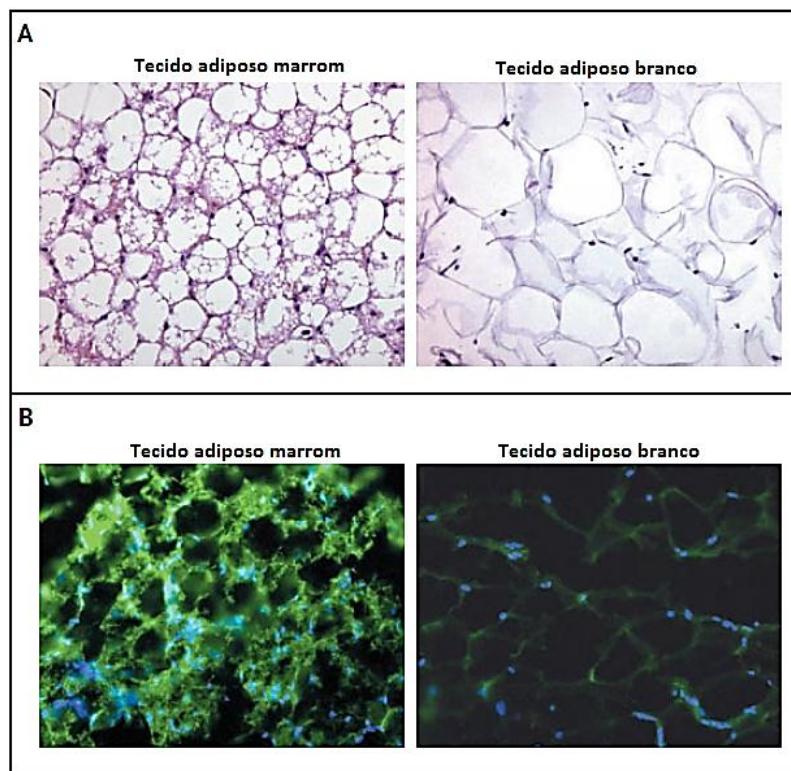


Figura 12 – Amostra corada com hematoxilina e eosina (Painel A) identifica o citoplasma granular contendo mitocôndrias e várias vacúolos de gordura, que são características do TAM, e um único vacúolo lipídico grande em cada célula de gordura branca. Uso de imunofluorescência com anticorpo para a UCP-1 (Painel B) mostra imunomarcação positiva para UCP-1 (verde) em TAM, sem marcação no tecido adiposo branco. Adaptada referência 6.

Cypess et al.¹⁸⁴, analisaram 3640 exames previamente gravados de 1972 pacientes de ambos os sexos que haviam sido submetidos à combinação de PET-TC com ¹⁸F-FDG. A atividade do TAM foi identificada em 8% das mulheres e 3% dos homens, com relação aproximada de 2:1. O TAM foi inversamente correlacionado com idade, temperatura ambiente no momento do mapeamento, uso de beta-bloqueadores e IMC. Os resultados foram observados principalmente em pessoas mais velhas, sugerindo papel do TAM no metabolismo humano adulto.



Figura 13 – Quantidade e a atividade do tecido adiposo marrom em regiões de interesse, demarcadas com contorno vermelho nas imagens obtidas por PET (A), TC (B), e a combinação de PET-TC (C), que incluiu a região cervical, supraclavicular, e mediastino superior. Adaptada referência 184.

Em seguimento aos estudos, Vijgen et al.¹⁸⁵ da *Maastricht University* da Holanda avaliaram a atividade do TAM e o papel na termogênese induzida pelo frio à 16°C em 15 indivíduos com obesidade mórbida. A média de peso corporal era de 124 ± 17 Kg, o IMC de 42 ± 4 Kg/m², a idade de 39 ± 8 anos e o percentual de gordura corporal de $49 \pm 5\%$. O método de densitometria por dupla emissão de raios-X (DEXA) para avaliação da composição corporal foi utilizado. Esse método permite mensuração da medida de massa óssea, massa de gordura e massa magra. Resultados indicaram que o TAM explica 64% da variação do IMC ($r=0,8$; $P<0,001$) e que a composição corporal explica 60% ($r=0,75$; $P<0,001$) da variação do IMC. Em indivíduos com obesidade mórbida, a termogênese induzida pelo frio combina com reduzida atividade do TAM. Três indivíduos dentre os 15 com obesidade mórbida apresentaram atividade do TAM

induzida pelo frio (Figura 14). Os autores concluíram que a atividade do TAM está altamente correlacionada com IMC e percentagem de gordura corporal.

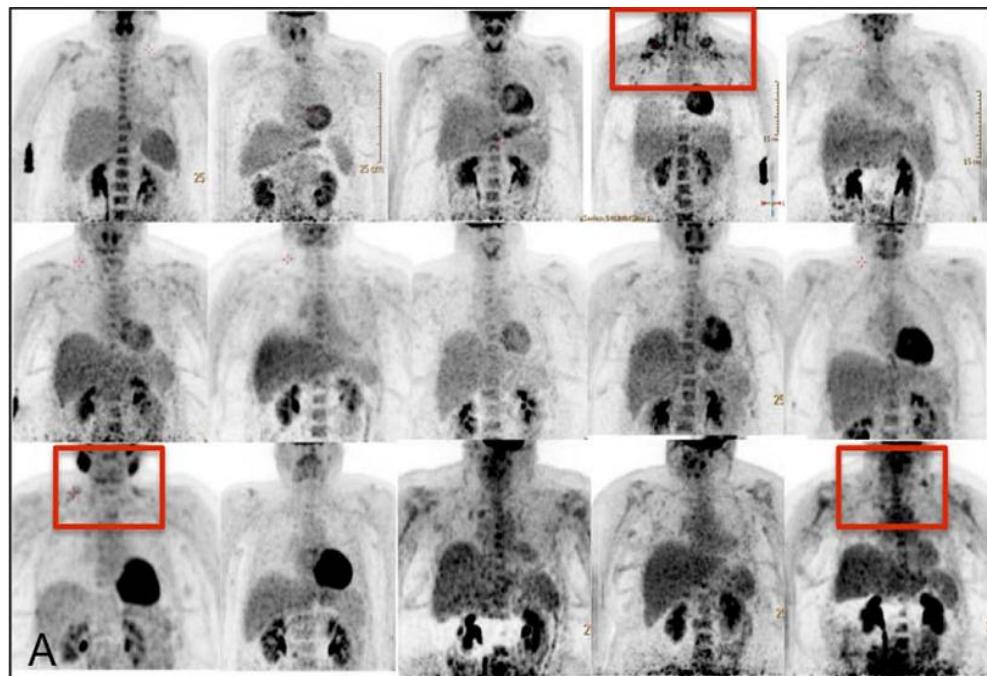


Figura 14 – Imagem dos 15 indivíduos com obesidade mórbida avaliada por PET. Três indivíduos do sexo feminino indicados por retângulo vermelho apresentam aumento da atividade do TAM na área supraclavicular. Adaptada referência 185.

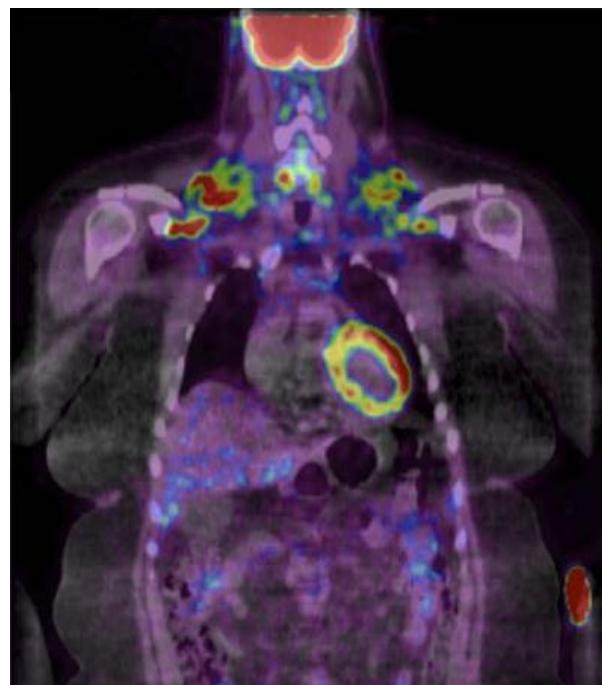


Figura 15 – Combinação de PET-TC mostra a captação de ^{18}F -FDG no TAM supraclavicular. Indivíduo com obesidade mórbida com maior atividade do TAM. Adaptada referência 185.

Comentário da *Nature*, de 2009¹⁸⁶, tem o subtítulo: Para perder peso, você preferiria dieta, exercício ou se sujeitar a baixas temperaturas? A última opção indica que humanos adultos tem TAM, queimador de calorias em resposta ao frio.

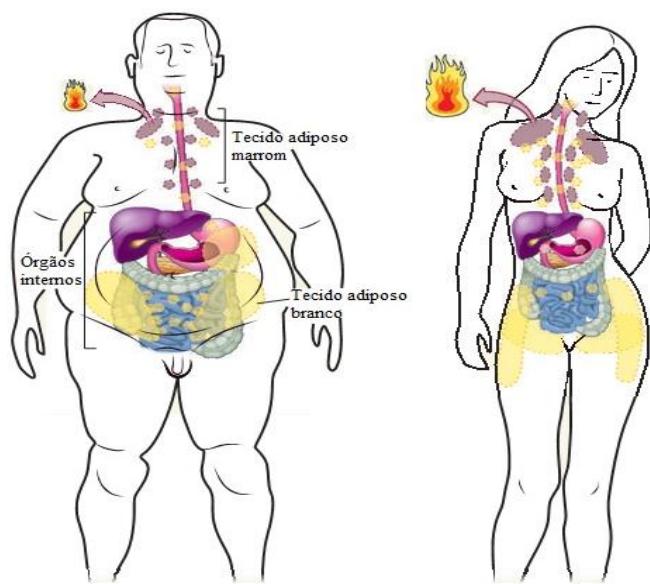


Figura 16 – Distribuição do TAM e a relação com grau de adiposidade. Adaptada referência 186.

Beaudry et al.¹⁸⁷ avaliaram em camundongos o efeito crônico de quatro semanas de exposição contínua à hipóxia hipobárica equivalente à 13,3% de O₂, ao frio de 5°C e a combinação dos dois fatores. Os grupos de animais foram comparados a animais controles normóxicos-termoneutros a 28°C. A expressão do mRNA da UCP-1 foi 49% menor nos animais do grupo hipóxia e 58% maior no grupo exposto ao frio quando comparados ao grupo controle. Os autores concluíram que o TAM em ambiente frio é vantajoso para a termorregulação, e desvantajoso em condições de hipóxia, pois leva a aumentos de despesas desnecessárias de energia.

ASPECTOS ÉTICOS DO ESTUDO

O projeto de pesquisa de número 09-356 foi submetido em 15-07-2009 e aprovado em 03-09-2009, pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEP – HCPA). Os animais utilizados neste estudo foram mantidos em conformidade com as diretrizes do Manual sobre Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do *National Research Council*.¹⁸⁸

JUSTIFICATIVA

Os mecanismos da associação AOS-obesidade ainda são desconhecidos. A obesidade pode participar como fator predisponente da AOS, como consequência, ou ambos.¹⁸⁹ A redução do peso corporal de animais expostos ao modelo de apneia do sono pode estar envolvida nesse mecanismo. Tecido adiposo marrom também pode ter papel no desenvolvimento da obesidade¹⁹⁰, assim como altos níveis de leptina^{191,192,193,194} e baixos níveis de adiponectina¹⁹⁵ encontrados em pacientes com AOS.

Há deficiência na literatura sobre a redução de peso corporal de animais expostos à hipóxia intermitente isocápnica, simulando apneia do sono. Dessa forma, o presente estudo examinou quatro fatores envolvidos na relação entre perda de peso e apneia do sono: 1) a expressão da proteína responsável pela termogênese corporal, níveis plasmáticos de 2) leptina, 3) adiponectina e 4) cortisol.

HIPÓTESE

Perda de peso corporal por exposição à hipóxia intermitente isocápnica pode ocorrer por diminuição da expressão do mRNA da UCP-1 do tecido adiposo marrom e dos níveis circulantes de adiponectina, bem como por aumento dos níveis de leptina e cortisol.

OBJETIVOS

Geral:

Avaliar, em camundongos, os mecanismos da perda de peso sob efeito de hipóxia intermitente isocápnica.

Específicos:

1. Avaliar o efeito da hipóxia intermitente isocápnica sobre os níveis séricos de leptina.
2. Avaliar o efeito da hipóxia intermitente isocápnica sobre os níveis séricos de adiponectina.
3. Avaliar o efeito da hipóxia intermitente isocápnica sobre os níveis séricos de cortisol.
4. Avaliar o efeito da hipóxia intermitente isocápnica sobre a expressão da proteína desacopladora 1.

FINANCIAMENTO

Projeto financiado pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE – HCPA). C. Z. F. recebeu bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA

1. Martinez D, Vasconcellos LF, de Oliveira PG, Konrad SP. Weight loss and brown adipose tissue reduction in rat model of sleep apnea. *Lipids Health Dis* 2008; 31;7:26
2. Martinez D, Fiori CZ, Baronio D, Carissimi A, Kaminski RS, Kim LJ, Rosa DP, Bos Á. Brown adipose tissue: is it affected by intermittent hypoxia? *Lipids Health Dis.* 2010;19;9:121
3. Rosa DP, Martinez D, Picada JN, Semedo JG, Marroni NP. Hepatic oxidative stress in an animal model of sleep apnoea: effects of different duration of exposure. *Comp Hepatol* 2011;10:1.
4. Tufik S, Santos-Silva R, Taddei JA, et al. Obstructive sleep apnea syndrome in the Sao Paulo Epidemiologic Sleep Study. *Sleep Med* 2010;11:441-6.
5. Phillipson EA. Sleep apnea--a major public health problem. *N Engl J Med* 1993;328:1271-3.
6. Van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommerig JW, Smulders NM, et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med* 2009;360:1500-8.
7. Tononi G, Cirelli C. Sleep function and synaptic homeostasis. *Sleep Med Rev* 2006;10:49-62.
8. Stenberg D. Neuroanatomy and neurochemistry of sleep. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64:1187-204.
9. Carkasdon MA, Dement, WC. Normal human sleep: an overview. In: *Principles and Practice of Sleep Medicine*, 4th Edition; edited by Meir H. Kryger, Thomas Roth, and William C. Dement, Elsevier Saunders; 2005.
10. Iber C, Ancoli-Israel S, Chesson A, Quan SF. for the American Academy of Sleep Medicine. *The AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events: Rules, Terminology and Technical Specifications*. Westchester: American Academy of Sleep Medicine; 2007.
11. Rechtschaffen A, Bergmann BM. Sleep deprivation in the rat: an update of the 1989 paper. *Sleep* 2002; 25:18-24.
12. Yilmaz B, Asyali MH, Arikan E, Yetkin S, Ozgen F. Sleep stage and obstructive apneic epoch classification using single-lead ECG. *Biomed Eng Online* 2010;9:39.
13. Diagnostic classification of sleep and arousal disorders, 1st ed. Association of Sleep Disorders Centers and the Association for the Psychophysiological Study of Sleep. *Sleep* 1979; 2:1–154.

14. American Academy of Sleep Medicine. The International Classification of Sleep Disorders, Revised. Diagnostic and Coding Manual. Rochester, Minn: American Academy of Sleep Medicine; 2001.
15. American Academy of Sleep Medicine: International classification of sleep disorders. 2nd ed.: Diagnostic and coding manual (ICSD-2). Westchester, Illinois: American Academy of Sleep Medicine, 2005.
16. Gupta RK, Chandra A, Verm AK, Kumar S. Obstructive sleep apnoea: a clinical review. *J Assoc Physicians India*. 2010;58:438-41.
17. Tsai W, Flemons W, Whitelaw W, Remmers J. A comparison of apnea hypopnea indices derived from different definitions of hypopnea. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:43-8.
18. Somers VK, White DP, Amin R, et al. American Heart Association Council for High Blood Pressure Research Professional Education Committee, Council on Clinical Cardiology; American Heart Association Stroke Council; American Heart Association Council on Cardiovascular Nursing; American College of Cardiology Foundation. Sleep apnea and cardiovascular disease: an American Heart Association/american College Of Cardiology Foundation Scientific Statement from the American Heart Association Council for High Blood Pressure Research Professional Education Committee, Council on Clinical Cardiology, Stroke Council, and Council On Cardiovascular Nursing. In collaboration with the National Heart, Lung, and Blood Institute National Center on Sleep Disorders Research (National Institutes of Health). *Circulation* 2008;118:1080-111.
19. Sleep-related breathing disorders in adults: recommendations for syndrome definition and measurement techniques in clinical research. The Report of an American Academy of Sleep Medicine Task Force. *Sleep* 1999;22:667-89.
20. Flemons WW. Obstructive sleep apnea. *N England J Med* 2002;347:498-504.
21. Drazen JM. Sleep apnea syndrome. *N England Med* 2002;346:390.
22. Shivalkar B, Van de Heyning C, Kerremans M, Rinkevich D, Verbraecken J, De Backer W, Vrints C. Obstructive sleep apnea syndrome: more insights on structural and functional cardiac alterations, and the effects of treatment with continuous positive airway pressure. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:1433-9.

23. Bradley TD, Brown I, Grossman R, Zamel N, Martinez, D, Phillipson EA, Hoffstein V. Pharyngeal Size In Snorers, Non-Snorers And Patients With Obstructive Sleep Apnea. *N England J Med* 1986;315:1327-31.
24. Bradley TD, Floras JS. Sleep apnea and heart failure: part II: central sleep apnea. *Circulation* 2003;107:1822-6.
25. Caples SM, Wolk R, Somers VK. Influence of cardiac function and failure on sleep-disordered breathing: evidence for a causative role. *J Appl Physiol* 2005;99:2433-9.
26. Eckert DJ, Jordan AS, Merchia P, et al. Central sleep apnea: Pathophysiology and treatment. *Chest* 2007;131:595-607.
27. Olson LJ, Somers VK. Sleep apnea: implications for heart failure. *Curr Heart Fail Rep* 2007;4:63-69.
28. Javaheri S. Heart failure and sleep apnea: emphasis on practical therapeutic options. *Clin Chest Med* 2003;24:207-22.
29. Khayat R, Patt B, Hayes D Jr. Obstructive sleep apnea: the new cardiovascular disease. Part I: Obstructive sleep apnea and the pathogenesis of vascular disease. *Heart Fail Rev* 2009;14:143-53.
30. Zepelin H, Siegel JM, Tobler I. Mammalian Sleep. In: *Principles and Practice of Sleep Medicine*, 4th Edition; edited by Meir H. Kryger, Thomas Roth, and William C. Dement, Elsevier Saunders; 2005.
31. Lavie P. Incidence of sleep apnea in a presumably healthy working population: a significant relationship with excessive daytime sleepiness. *Sleep* 1983;6:312-8.
32. Young T, Palta M, Dempsey J. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N England J Med* 1993;328:1230-5.
33. Wang Y, Beydoun MA, Liang L, Caballero B, Kumanyaka SK. Will all Americans become overweight or obese? Estimating the progression and cost of the US obesity epidemic. *Obesity (Silver Spring)* 2008;16:2323-30.
34. Bixler EO, Vgontzas AN, Lin HM, Ten Have T, Rein J, Vela-Bueno A, Kales A. Prevalence of sleep-disordered breathing in women: effects of gender. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:608-13.
35. Udwadia ZF, Doshi AV, Lonkar SG, Singh CI. Prevalence of sleep-disordered breathing and sleep apnea in middle-aged urban Indian men. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:168-73.

36. Duran J, Esnaola S, Rubio R, Iztueta A. Obstructive sleep apnea-hypopnea and related clinical features in a population-based sample of subjects aged 30 to 70 yr. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:685–9.
37. Bearpark H, Elliott L, Grunstein R, Cullen S, Schneider H, Althaus W, Sullivan C. Snoring and sleep apnea. A population study in Australian men. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:1459-65.
38. Kim J, In K, Kim J, You S, Kang K, Shim J, Lee S, Lee J, Lee S, Park C, Shin C. Prevalence of sleep-disordered breathing in middle-aged Korean men and women. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:1108-13.
39. Miletin MS, Hanly PJ. Measurement properties of the Epworth sleepiness scale. *Sleep Med* 2003;4:195-9.
40. Simpson L, Mukherjee S, Cooper MN, Ward KL, Lee JD, Fedson AC, Potter J, Hillman DR, Eastwood P, Palmer LJ, Kirkness J. Sex differences in the association of regional fat distribution with the severity of obstructive sleep apnea. *Sleep* 2010;33:467-74.
41. Young T, Shahar E, Nieto FJ, Redline S, Newman AB, Gottlieb DJ, Walsleben JA, Finn L, Enright P, Samet JM; Sleep Heart Health Study Research Group. Predictors of sleep-disordered breathing in community-dwelling adults: the Sleep Heart Health Study. *Arch Intern Med* 2002;162:893-900.
42. Fletcher EC, DeBehnke RD, Lovoi MS, Gorin AB. Undiagnosed sleep apnea in patients with essential hypertension. *Ann Intern Med* 1985;103:190–5.
43. Williams AJ, Houston D, Finberg S, Lam C, Kinney JL, Santiago S. Sleep apnea syndrome and essential hypertension. *Am J Cardiol* 1985;55:1019–22.
44. Bixler EO, Vgontzas AN, Lin HM, Ten HT, Leiby BE, Vela- Bueno A, Kales A. Association of hypertension and sleep-disordered breathing. *Arch Intern Med* 2000;160:2289–95.
45. Nieto FJ, Young TB, Lind BK, Shahar E, Samet JM, Redline S, D'Agostino RB, Newman AB, Lebowitz MD, Pickering TG. Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea, and hypertension in a large community-based study. *Sleep Heart Health Study. JAMA* 2000;283:1829–36.
46. Peppard PE, Young T, Palta M, Skatrud J. Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N Engl J Med* 2000;342:1378-84.

47. O'Connor GT, Caffo B, Newman AB, Quan SF, Rapoport DM, Redline S, Resnick HE, Samet J, Shahar E. Prospective study of sleep-disordered breathing and hypertension: the Sleep Heart Health Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179:1159–64.
48. Fletcher EC, Lesske J, Qian W, Miller CC, III, Unger T. Repetitive, episodic hypoxia causes diurnal elevation of blood pressure in rats. *Hypertension* 1992;19:555–61.
49. Brooks D, Horner RL, Kozar LF, Render-Teixeira CL, Phillipson EA. Obstructive sleep apnea as a cause of systemic hypertension. Evidence from a canine model. *J Clin Invest* 1997;99:106–9.
50. Dempsey JA, Veasey SC, Morgan B and O'Donnell C. Pathophysiology of sleep apnea. *Physiol Rev* 2010; 90:47-112.
51. Morgan TD, Remmers JE. Phylogeny and animal models: An Uninhibited Survey. In: Obstructive Sleep Apnea, edited by Kushida CA. New York: Informa Healthcare USA, 2007.
52. Young JW, McDonald JP. An investigation into the relationship between the severity of obstructive sleep apnoea/hypopnoea syndrome and the vertical position of the hyoid bone. *Surgeon* 2004;2:145–51.
53. Horner RL, Shea SA, McIvor J, Guz A. Pharyngeal size and shape during wakefulness and sleep in patients with obstructive sleep apnoea. *Q J Med* 1989;72:719-35.
54. Schwab RJ, Pasirstein M, Pierson R, Mackley A, Hachadoorian R, Arens R, Maislin G, Pack AI. Identification of upper airway anatomic risk factors for obstructive sleep apnea with volumetric magnetic resonance imaging. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:522-30.
55. Watanabe T, Isono S, Tanaka A, Tanzawa H, Nishino T. Contribution of body habitus and craniofacial characteristics to segmental closing pressures of the passive pharynx in patients with sleep-disordered breathing. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:260-5.
56. Davies RJ, Ali NJ, Stradling JR. Neck circumference and other clinical features in the diagnosis of the obstructive sleep apnoea syndrome. *Thorax* 1992;47:101-5.
57. Hoffstein V, Szalai JP. Predictive value of clinical features in diagnosing obstructive sleep apnea. *Sleep* 1993;16:118-22.

58. Dempsey JA, Skatrud JB, Jacques AJ, Ewanowski SJ, Woodson BT, Hanson PR, Goodman B. Anatomic determinants of sleep-disordered breathing across the spectrum of clinical and nonclinical male subjects. *Chest* 2002;122:840-51.
59. Strobel RJ, Rosen RC. Obesity and weight loss in obstructive sleep apnea: a critical review. *Sleep* 1996;19:104-15.
60. Schwartz AR, Gold AR, Schubert N, Stryzak A, Wise RA, Permutt S, Smith PL. Effect of weight loss on upper airway collapsibility in obstructive sleep apnea. *Am Rev Respir Dis* 1991;144:494-8.
61. Smith PL, Gold AR, Meyers DA, Haponik EF, Bleeker ER. Weight loss in mildly to moderately obese patients with obstructive sleep apnea. *Ann Intern Med* 1985;103:850-5.
62. Wittels EH, Thompson S. Obstructive sleep apnea and obesity. *Otolaryngol Clin North Am* 1990;23:751-60.
63. Kobayashi S, Zimmermann H, Millhorn DE. Chronic hypoxia enhances adenosine release in rat PC12 cells by altering adenosine metabolism and membrane transport. *J Neurochem* 2000;74:621-32.
64. Fulco CS, Rock PB, Cymerman A. Improving athletic performance: is altitude residence or altitude training helpful? *Aviat Space Environ Med* 2000;71:162-71.
65. Carpagnano GE, Kharitonov SA, Resta O, Foschino-Barbaro MP, Gramiccioni E, Barnes PJ. Increased 8-isoprostanate and interleukin-6 in breath condensate of obstructive sleep apnea patients. *Chest* 2002;122:1162-7.
66. Xu W, Chi L, Row BW, Xu R, Ke Y, Xu B, Luo C, Kheirandish L, Gozal D, Liu R. Increased oxidative stress is associated with chronic intermittent hypoxia-mediated brain cortical neuronal cell apoptosis in a mouse model of sleep apnea. *Neuroscience* 2004;126:313-23.
67. Greenberg HE, Sica A, Batson D, and Scharf SM. Chronic intermittent hypoxia increases sympathetic responsiveness to hypoxia and hypercapnia. *J Appl Physiol* 1999;86:298-305.
68. Patt S, Danner S, Theallier-Janko A, Breier G, Hottenrott G, Plate KH, Cervos-Navarro J. Upregulation of vascular endothelial growth factor in severe chronic brain hypoxia of the rat. *Neurosci Lett* 1998;252:199-202.
69. Kanagy NL, Walker BR, Nelin LD. Role of endothelin in intermittent hypoxia-induced hypertension. *Hypertension* 2001;37:511-5.

70. Fagan KA. Selected Contribution: Pulmonary hypertension in mice following intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* 2001;90:2502-7.
71. McGuire M, Bradford A. Chronic intermittent hypoxia increases haematocrit and causes right ventricular hypertrophy in the rat. *Respir Physiol* 1999;117:53-8.
72. Schwartz JE, Kovach A, Meyer J, McConnell C, Iwamoto HS. Brief, intermittent hypoxia restricts fetal growth in Sprague-Dawley rats. *Biol Neonate* 1998;73:313-9.
73. Hermans RH, Hunter DE, McGivern RF, Cain CD, Longo LD. Behavioral sequelae in young rats of acute intermittent antenatal hypoxia. *Neurotoxicol Teratol* 1992;14:119-9.
74. Veasey SC, Davis CW, Fenik P, Zhan G, Hsu YJ, Pratico D, Gow A. Long-term intermittent hypoxia in mice: protracted hypersomnolence with oxidative injury to sleep-wake brain regions. *Sleep* 2004;27:194-201.
75. Row BW, Liu R, Xu W, Kheirandish L, Gozal D. Intermittent hypoxia is associated with oxidative stress and spatial learning deficits in the rat. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:1548-53.
76. Goldbart A, Cheng ZJ, Brittian KR, Gozal D. Intermittent hypoxia induces time-dependent changes in the protein kinase B signaling pathway in the hippocampal CA1 region of the rat. *Neurobiol Dis* 2003;14:440-6.
77. Goldbart A, Row BW, Kheirandish L, Schurr A, Gozal E, Guo SZ, Payne RS, Cheng Z, Brittian KR, Gozal D. Intermittent hypoxic exposure during light phase induces changes in cAMP response element binding protein activity in the rat CA1 hippocampal region: water maze performance correlates. *Neuroscience* 2003;122:585-90.
78. Alberghina M, Giuffrida AM. Effect of hypoxia on the incorporation of [2-3H] glycerol and [1-14C]-palmitate into lipids of various brain regions. *J Neurosci Res* 1981;6:403-19.
79. McNamara MC, Gingras-Leatherman JL, and Lawson EE. Effect of hypoxia on brainstem concentration of biogenic amines in postnatal rabbits. *Brain Res* 1986;390:253-8.
80. Tahawi Z, Orolinova N, Joshua IG, Bader M, Fletcher EC. Altered vascular reactivity in arterioles of chronic intermittent hypoxic rats. *J Appl Physiol* 2001;90:2007-13

81. Hinojosa-Laborde C, Mifflin SW. Sex differences in blood pressure response to intermittent hypoxia in rats. *Hypertension* 2005;46:1016-21.
82. Braun B, Rock PB, Zamudio S, et al. Women at altitude: short-term exposure to hypoxia and/or α 1adrenergic blockade reduces insulin sensitivity. *J Appl Physiol* 2001;91:623-31.
83. Braun B. Some effects of altitude on thyroid function. *Endocrinology* 1972;91:1393-403.
84. Larsen JJ, Hansen JM, Olsen NV, et al. The effect of altitude hypoxia on glucosa homeostasis in men. *J Physiol* 1997;504:241-9.
85. Mordes JP, Blume FD, Boyer S, et al. High altitude pituitary thyroid dysfunction on Mount Everest. *N Engl J Med* 1983;308:1135-8.
86. Garvey D, Akana S, Weisman A, et al. Alterations in adrenal growth and corticosteroid content in foetal and neonatal rats developing at high altitude. *J Endocrinol* 1979;80:333-42.
87. Gosney JR. Morphological changes in the pituitary and thyroid of the rat in hypobaric hypoxia. *J Endocrinol* 1986;109:119-24.
88. Hermans RH, Longo LD. Altered catecholaminergic behavioral and hormonal responses in rats following early postnatal hypoxia. *Phys Behav* 1994;55:469-75.
89. Jacobs R, Robinson JS, Owens JA, et al. The effect of prolonged hypobaric hypoxia on growth of fetal sheep. *J Dev Physiol* 1988;10: 97-112.
90. Zayour D, Azar ST, Azar N, et al. Endocrine changes in a rat model of chronic hypoxia mimicking cyanotic heart disease. *Endocr Res* 2003; 29:91-200.
91. Gosney J, Health D, Williams D, et al. Morphological changes in the pituitary-adrenocortical axis in natives of La Paz. *Int J Biometeorol* 1991;35:1-5.
92. Polotsky VY, Li J, Punjabi NM, Rubin AE, Smith PL, Schwartz AR, O'Donnell CP. Intermittent hypoxia increases insulin resistance in genetically obese mice. *J Physiol* 2003;1:253-64.
93. Li J, Thorne LN, Punjabi NM, Sun CK, Schwartz AR, Smith PL, Marino RL, Rodriguez A, Hubbard WC, O'Donnell CP, Polotsky VY. Intermittent hypoxia induces hyperlipidemia in lean mice. *Circ Res* 2005;30:698-706.
94. Butterfield GE, Gates J, Fleming S, Brooks GA, Sutton JR, Reeves JT. Increased energy intake minimizes weight loss in men at high altitude. *J Appl Physiol* 1992;72:1741-8.

95. Westerterp KR. Energy and water balance at high altitude. *News Physiol Sci* 2001;16:134-7.
96. Tschöp M, Morrison KM. Weight loss at high altitude. *Adv Exp Med Biol* 2001;502:237-47.
97. Trayhurn P. The biology of obesity. *Proc Nutr Soc* 2005;64:31-8.
98. Ge RL, Wood H, Yang HH, Liu YN, Wang XJ, Babb T. The body weight loss during acute exposure to high-altitude hypoxia in sea level residents. *Sheng Li Xue Bao* 2010;62:541-6.
99. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2548-56.
100. Ingalls AM, Dickie MM, Snell GD; "Obese, a new mutation in the house mouse". *J. Hered* 1950;41:317-8.
101. Muoio DM, Lynis Dohm G. Peripheral metabolic actions of leptin. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2002;16:653-66.
102. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 1995;269:540-3.
103. Zhang YY, Proença R, Maffei M et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994;372:425-32.
104. Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;26:1407-33
105. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 2006;443:289-95.
106. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998;395:763-70.
107. Flier JS. Leptin expression and action: new experimental paradigms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:4242-5.
108. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996;334:292-5.

109. Igel M, Becker W, Herberg L, Joost HG. Hyperleptinemia, leptin resistance, and polymorphic leptin receptor in the New Zealand obese mouse. *Endocrinology* 1997;138:4234-9.
110. Campfield LA, Smith FJ, Burn P. The OB protein (leptin) pathway a link between adipose tissue mass and central neural networks. *Horm Metab Res* 1996;28:619-32.
111. Munzberg H, Myers Jr. MG. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat Neurosci* 2005;8:566-70.
112. Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol* 2000;62:413-37.
113. Schwartz AR, Patil SP, Laffan AM, Polotsky V, Schneider H, Smith PL. Obesity and obstructive sleep apnea: pathogenic mechanisms and therapeutic approaches. *Proc Am Thorac Soc* 2008;5:185-92.
114. Al Lawati N, Mulgrew A, Cheema R, vanEeden S, Butt A, Fleetham J, Ryan F, Ayas N. Pro-atherogenic cytokine profile of patients with suspected obstructive sleep apnea. *Sleep Breath* 2009;13:391-5.
115. Grunfeld C, Zhao C, Fuller J, Pollack A, Moser A, Friedman J, Feingold KR. Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters. *J Clin Invest* 1996;97:2152-7.
116. Sarraf P, Frederich RC, Turner EM, Ma G, Jaskowiak NT, Rivet DJ 3rd, Flier JS, Lowell BB, Fraker DL, Alexander HR. Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia. *J Exp Med* 1997;185:171-5.
117. Bornstein SR, Licinio J, Tauchnitz R, Engelmann L, Negrão AB, Gold P, Chrousos GP. Plasma leptin levels are increased in survivors of acute sepsis: associated loss of diurnal rhythm, in cortisol and leptin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:280-3.
118. Janik JE, Curti BD, Considine RV, Rager HC, Powers GC, Alvord WG, Smith JW 2nd, Gause BL, Kopp WC. Interleukin 1 alpha increases serum leptin concentrations in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3084-6.
119. Seeley RJ. Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Neuroendocrine responses to starvation and weight loss. *N Engl J Med* 1997;336:1802-11.
120. Kapsimalis F, Varouchakis G, Manousaki A, Daskas S, Ni- kita D, Kryger M, Gourgoulianis K. Association of sleep apnea severity and obesity with insulin

- resistance, C-reactive protein, and leptin levels in male patients with obstructive sleep apnea. *Lung* 2008; 186:209-17.
121. Ip MS, Lam KS, Ho C, Tsang KW, Lam W. Serum leptin and vascular risk factors in obstructive sleep apnea. *Chest* 2000;118:580-6.
 122. Snyder EM, Carr RD, Deacon CF, Johnson BD. Overnight hypoxic exposure and glucagon-like peptide-1 and leptin levels in humans. *Appl Physiol Nutr Metab* 2008; 33:929-35
 123. Li J, Savransky V, Nanayakkara A, Smith PL, O'Donnell CP, Polotsky VY. Hyperlipidemia and lipid peroxidation are dependent on the severity of chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* 2007;102:557-63.
 124. Reinke C, Bevans-Fonti S, Drager LF, Shin MK, Polotsky VY. Effects of different acute hypoxic regimens on tissue oxygen profiles and metabolic outcomes. *J Appl Physiol* 2011 Jul 7. [Epub ahead of print]
 125. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 1995;270:26746-9.
 126. Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 1996;271:10697-703.
 127. Recasens M, Ricart W, Fernández-Real JM. Obesity and inflammation. *Rev Med Univ Navarra* 2004;48:49-54.
 128. Delporte ML, Brichard SM, Hermans MP, Beguin C, Lambert M. Hyperadiponectinaemia in anorexia nervosa. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003;58:22-9.
 129. Pannacciulli N, Vettor R, Milan G, Granzotto M, Catucci A, Federspil G, De Giacomo P, Giorgino R, De Pergola G. Anorexia nervosa is characterized by increased adiponectin plasma levels and reduced nonoxidative glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1748-52.
 130. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;257:79-83.
 131. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:1930-5.

132. Trujillo ME, Scherer PE. Adiponectin--journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. *J Intern Med* 2005;257:167-75.
133. Pischedda T, Girman CJ, Hotamisligil GS, Rifai N, Hu FB, Rimm EB. Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *JAMA* 2004;291:1730-7.
134. Tan KC, Xu A, Chow WS, et al. Hypoadiponectinemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:765-9.
135. Masserini B, Morpurgo PS, Donadio F, et al. Reduced levels of adiponectin in sleep apnea syndrome. *J Endocrinol Invest* 2006;29:700-5.
136. Nawrocki AR, Rajala MW, Tomas E, et al. Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol. Chem* 2006;281:2654-60.
137. Shin MJ, Lee JH, Jang Y, et al. Insulin resistance, adipokines, and oxidative stress in nondiabetic, hypercholesterolemic patients: leptin as an 8-epi-prostaglandin F₂alpha determinant. *Metabolism* 2006;55:918-22
138. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1595-9.
139. Choi KM, Lee J, Lee KW, et al. Serum adiponectin concentrations predict the developments of type 2 diabetes and the metabolic syndrome in elderly Koreans. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;61:75-80.
140. Yildiz BO, Suchard MA, Wong ML, McCann SM, Licinio J. Alterations in the dynamics of circulating ghrelin, adiponectin, and leptin in human obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:10434-9.
141. Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AF. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet* 2003;361:226-8.
142. Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N et al. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood* 2000;96:1723-32.
143. Ouchi N, KIHara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 1999;100:2473-6.

144. Ouchi N, KIHara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H et al. Adiponectin, adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF- κ B signaling through cAMP-dependent pathway. *Circulation* 2000;102:1296-1301.
145. Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL, Matsuzawa Y, Tanaka S, Tataranni PA, Knowler WC, Krakoff J. Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet* 2002;360:57-58.
146. Milan G, Granzotto M, Scarda A, Calcagno A, Pagano C, Federspil G, Vettor R. Resistin and adiponectin expression in visceral fat of obese rats: effect of weight loss. *Obes Res*. 2002;10:1095-103.
147. Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao CL, Chen CL, Tai TY, Chuang LM. Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3815-9. Erratum in: *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1626.
148. Huang H, Zhang X, Ding N, Li Q, Min Y, Zhang X. Effects of chronic intermittent hypoxia on genioglossus in rats. *Sleep Breath* 2011. [Epub ahead of print].
149. Kudielka BM, Wüst S. Human models in acute and chronic stress: assessing determinants of individual hypothalamus-pituitary-adrenal axis activity and reactivity. *Stress* 2010;13:1 e14 .
150. Cauter EV. Endocrine Physiology. In: Principles and Practice of Sleep Medicine, 4th Edition; edited by Meir H. Kryger, Thomas Roth, and William C. Dement, Elsevier Saunders; 2005.
151. Sam S, Corbridge TC, Mokhlesi B, Comelias AP, Molitch ME. Cortisol levels and mortality in severe sepsis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;60:29-35.
152. Finlay WEI, McKee JI. Serum cortisol levels in severely stressed patients. *Lancet* 1982;1:1414-5.
153. Rothwell PM, Udwadia ZF, Lawler PG. Cortisol response to corticotrophin and survival in septic shock. *Lancet* 1991;337:582-3.
154. Annane D, Sebille V, Troche G, Raphael J-C, Gajdos P, Bellissant E. A 3-level prognostic classification in septic shock based on cortisol levels and cortisol response to corticotrophin. *JAMA* 2000;283:1038-45.
155. Marik PE, Zaloga GP. Adrenal insufficiency in the critically ill. A new look at an old problem. *Chest* 2002;122:1784-96.

156. Sibbald WJ, Short A, Cohen M, Wilson RF 1977 Variations in adrenocortical responsiveness during severe bacterial infections. Unrecocognized adreno- cortical insufficiency in severe bacterial infections. *Ann Surg* 186:29–35.
157. Van den BergheG, de Zegher F, Bouillon R. Acute and prolonged critical 3812 J Clin Endocrinol Metab, Ocillness as different neuroendocrine paradigms. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1827–34.
158. Weitzman ED, Zimmerman JC, Czeisler CA, Ronda J. Cortisol secretion is inhibited during sleep in normal man. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;56:352-8.
159. Weibel L, Follenius M, Spiegel K, Ehrhart J, Brandenberger G. Comparative effect of night and daytime sleep on the 24-hour cortisol secretory profile. *Sleep* 1995;18:549-56.
160. Von Treuer K, Norman TR, Armstrong SM. Overnight human plasma melatonin, cortisol, prolactin, TSH, under conditions of normal sleep, sleep deprivation, and sleep recovery. *J Pineal Res* 1996;20:7-14.
161. Leproult R, Copinschi G, Buxton O, Van Cauter E. Sleep loss results in an elevation of cortisol levels the next evening. *Sleep* 1997;20:865-70.
162. Lattova Z, Keckeis M, Maurovich-Horvat E, Wetter TC, Wilde-Frenz J, Schuld A, Pollmächer T. The stress hormone system in various sleep disorders. *J Psychiatr Res* 2011[Epub ahead of print].
163. Edwards KM, Tomfohr LM, Mills PJ, Bosch JA, Ancoli-Israel S, Loredo JS, Dimsdale J. Macrophage migratory inhibitory factor (MIF) may be a key factor in inflammation in obstructive sleep apnea. *Sleep* 2011;34:161-3.
164. Panaree B, Chantana M, Wasana S, Chairat N. Effects of obstructive sleep apnea on serum brain-derived neurotrophic factor protein, cortisol, and lipid levels. *Sleep Breath* 2010 [Epub ahead of print].
165. Louis M, Punjabi NM. Effects of acute intermittent hypoxia on glucose metabolism in awake healthy volunteers. *J Appl Physiol* 2009;106:1538-44.
166. Nieto FJ, Peppard PE, Young TB. Sleep disordered breathing and metabolic syndrome. *WMJ* 2009;108:263-5.
167. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of

- High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). JAMA 2001;285:2486-97.
168. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia 1985;28:412-9.
 169. Rothwell NJ, Stock MJ. Luxuskonsumption, diet-induced thermogenesis and brown fat: the case in favour. Clin Sci (Lond) 1983;64:19-23.
 170. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. Physiol Rev 2004;84:277-359.
 171. Lowell BB, Spiegelman BM. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. Nature 2000;404:652-60.
 172. Nicholls DG, Bernson VS, Heaton GM. The identification of the component in the inner membrane of brown adipose tissue mitochondria responsible for regulating energy dissipation. Experientia Suppl 1978;32:89-93.
 173. Kozak LP, Britton JH, Kozak UC, Wells JM. The mitochondrial uncoupling protein gene. Correlation of exon structure to transmembrane domains. J Biol Chem 1988;263:12274-7.
 174. Bouillaud F, Raimbault S, Ricquier D. The gene for rat uncoupling protein: complete sequence, structure of primary transcript and evolutionary relationship between exons. Biochem Biophys Res Commun 1988;157:783-92.
 175. Dawkins MJR, Hull D. Brown adipose tissue and the response of new-born rabbits to cold. J. Physiol 1964;172:216-38.
 176. Hull D, Segall MM. Heat production in the new-born rabbit and the fat content of the brown adipose tissue. J Physiol 1965;181:468-77.
 177. Mortola JP, Merazzi D, Naso L. Blood flow to the brown adipose tissue of conscious young rabbits during hypoxia in cold and warm conditions. Pflugers Arch 1999;437:255-60.
 178. Rohlicek CV, Saiki C, Matsuoka T, Mortola JP. Oxygen transport in conscious newborn dogs during hypoxic hypometabolism. J Appl Physiol 1998;84:763-8.
 179. Gautier H, Bonora M, MBarek SB, Sinclair JD. Effects of hypoxia and cold acclimation on thermoregulation in the rat. J Appl Physiol 1991;71:1355-63.
 180. Lean ME. Brown adipose t issue in humans. Proc Nutr Soc 1989;48:243-56.

181. Ricquier D, Nechad M, Mory G. Ultrastructural and biochemical characterization of human brown adipose tissue in pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1982;54:803-7.
182. Fukuchi K, Tatsumi M, Ishida Y, Oku N, Hatazawa J, Wahl RL. Radionuclide imaging metabolic activity of brown adipose tissue in a patient with pheochromocytoma. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2004;112:601-3.
183. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, Taittonen M, Laine J, Savisto NJ, Enerbäck S, Nuutila P. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* 2009;360:1518-25.
184. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng YH, Doria A, Kolodny GM, Kahn CR. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 2009;360:1509-17.
185. Vijgen GH, Bouvy ND, Teule GJ, Brans B, Schrauwen P, van Marken Lichtenbelt WD. Brown adipose tissue in morbidly obese subjects. *PLoS One* 2011;6:e17247.
186. Farmer SR. Obesity: Be cool, lose weight. *Nature* 2009;458:839-40.
187. Beaudry JL, McClelland GB. Thermogenesis in CD-1 mice after combined chronic hypoxia and cold acclimation. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2010;157:301-9.
188. National Research Council: Guide for the care and Use of Laboratory Animals. Washington, D.C.: National Academy Press 1996.
189. Shah N, Roux F. The relationship of obesity and obstructive sleep apnea. *Clin Chest Med* 2009;30:455-65.
190. Cinti S. The role of brown adipose tissue in human obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006;16:569-74.
191. McArdle N, Hillman D, Beilin L, Watts G. Metabolic risk factors for vascular disease in obstructive sleep apnea: a matched controlled study. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:190-5.
192. Vgontzas AN, Papanicolaou DA, Bixler EO, et al. Sleep apnea and daytime sleepiness and fatigue: relation to visceral obesity, insulin resistance, and hypercytokinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1151-8.
193. Phillips BG, Kato M, Narkiewicz K, Choe I, Somers VK. Increases in leptin levels, sympathetic drive, and weight gain in obstructive sleep apnea. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H234-7.

194. Tatsumi K, Kasahara Y, Kurosu K, Tanabe N, Takiguchi Y, Kuriyama T. Sleep oxygen desaturation and circulating leptin in obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *Chest* 2005;127:716-21.
195. Kanbay A, Kokturk O, Ciftci TU, Tavil Y, Bukan N. Comparison of serum adiponectin and tumor necrosis factor-alpha levels between patients with and without obstructive sleep apnea syndrome. *Respiration* 2008;76:324-30.

ARTIGO EM INGLÊS

Intermittent hypoxia reduces uncoupling protein 1 expression in brown adipose tissue

^{1,3}Cintia Zappe Fiori; ^{2,3}Denis Martinez, MD, PhD; ^{3,4}Alicia Carissimi; ^{3,4}Diego Baronio; ^{5,6}Nelson Alexandre Kretzmann, PhD; ⁷Luiz Felipe Forgiarini; ⁴Darlan Pase da Rosa, MSc; ³Thays K Schaffer

¹*Graduate Program in Cardiology and Cardiovascular Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS);*

²*MD, PhD, Graduate Program in Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS);*

³*Cardiology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), RS, Brazil;*

⁴*Graduate Program in Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS);*

⁵*Graduate Program in Pathology - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre;*

⁶*Centro de Terapia Gênica - Research Center of Hospital de Clínicas de Porto Alegre;*

⁷*Graduate Program in Pneumology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).*

Address correspondence to:

Cintia Zappe Fiori

Cardiology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

90035-003 - Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS, Brazil

Tel: 55 51 3359-8289; Fax: 55 51 3022-2282

E-mail: cintiazfiori@gmail.com

This study was supported by FIPE – HCPA (Brazil)

DISCLOSURE STATEMENT

Authors have reported no financial conflicts of interest regarding this article. This is not an industry supported study.

ABSTRACT

Study Objectives: To test the hypothesis that an isocapnic intermittent hypoxia model of obstructive sleep apnea affects the white and brown adipose tissue physiology, particularly, leptin, adiponectin, and uncoupling protein-1 (UCP-1).

Design and Intervention: Balb/c mice were exposed either to intermittent hypoxia or to sham intermittent hypoxia. During 8 hours daily, the model alternated 30 seconds of normoxia with 30 seconds of progressive cage hypoxia to a nadir of $9\% \pm 1$ oxygen concentration.

Measurements and Results: After 37 days, brown adipose tissue (BAT) was dissected and immediately frozen. UCP-1 mRNA expression in BAT was measured by real-time PCR. Leptin, adiponectin, and cortisol levels were quantified by ELISA. The hypoxia group consumed significantly less chow than the sham group and gained less body weight. BAT weight was reduced in hypoxia group. Microscopic observation and measurement demonstrated a significant decrease in size of white and brown adipocytes. Leptin and cortisol levels did not differ significantly between the groups. Adiponectin levels in the hypoxia group were significantly lower (84.3 ± 6.2 pg/mL) than in the sham group (116.9 ± 12 pg/mL; $P=0.02$). Median [25-75 percentiles] UCP-1 mRNA expression in the hypoxia and sham groups were, respectively, 0.0007 [0.0002-0.66] and 1.33 [0.49-11.94] ($P=0.006$).

Conclusion: An intermittent hypoxia model of sleep apnea reduces food intake, weight gain, adiponectin levels, and UCP-1 mRNA expression. These original results are in contrast with the increased propensity to obesity in apnea patients and generate the hypothesis of a role of intermittent hypoxia in the reduced BAT activity observed in individuals with obesity.

Keywords: isocapnic intermittent hypoxia, leptin, adiponectin, cortisol, uncoupling protein-1.

INTRODUCTION

OBSTRUCTIVE SLEEP APNEA (OSA) LEADS TO SLEEP FRAGMENTATION AND INTERMITTENT HYPOXIA (IH).^{1,2} Similar effects are obtained in animal models utilizing IH to simulate OSA.³⁻⁵ Changes in adipose tissue metabolism^{6,7} and weight gain are associated with OSA^{8,9} and with sleep time restriction.¹⁰⁻¹² Weight loss has been reported in IH models of OSA utilizing rats and mice.¹³⁻¹⁷ Several mechanisms could explain weight loss under IH. Either reduction of food intake or increase of energy expenditure can be implicated.

Reduction of food intake may occur due to increase of appetite-reducing adipokines as leptin¹⁸. Higher leptin levels have been described in animals exposed to IH during 5 days¹⁹ and 4 weeks.¹⁷ Evidence that adiponectin has a role in controlling food intake is less convincing although adiponectin levels are negatively correlated with obesity.²⁰

Impairment of the energy-sparing mechanism of non-shivering thermogenesis may cause increased energy expenditure. Brown adipose tissue (BAT) and its uncoupling protein 1 (UCP-1) are present and functioning in small mammals²¹ and in the majority of adult humans.²²⁻²⁴ Individuals with obesity show null or low BAT activity. No study investigated presence of OSA in cases with low BAT activity or BAT activity in OSA patients.

In animals exposed to isocapnic intermittent hypoxia, BAT wet weight is reduced^{13,14}, possibly reflecting functional decline of the energy saving mechanisms. No references were found on the response of UCP-1 to isocapnic intermittent hypoxia.

We hypothesized that an isocapnic intermittent hypoxia model of sleep apnea changes the physiology of leptin, adiponectin, cortisol, and UCP-1. The purpose of this study was to examine some of the mechanisms of weight loss under isocapnic intermittent hypoxia, regarding the main adipokines and UCP-1.

METHODS

Animals

Two groups of two-month-old male Balb/c mice were studied: 12 mice submitted to 37 days of hypoxia, and 11 mice, submitted to 37 days of sham. Groups were housed under temperatures ranging between 22.5 and 24.5°C and received standard mice chow and water *ad libitum*. The experiment was approved by the

Institutional Ethics Committee and followed the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”.²⁵

The mice were weighed at the baseline, and every four days until the end of the experiment in a scale with precision of 0.01 g (Marte, model AS 5500C). The food was weighed daily to estimate consumption. The nasal-anal length was measured with a ruler under anesthesia at the beginning and end of the experiment.

Isocapnic Intermittent Hypoxia System

During 37 days, 8 hours a day, from 9 a.m. to 5 p.m., in the lights on period, the animals were placed in the isocapnic intermittent hypoxia system. A mixture with 92% nitrogen and 8% CO₂ was released in the hypoxia chamber, for 30 seconds. The gas mixture progressively reduced the inspired oxygen fraction from 21% to 9±1% and increased the CO₂ fraction to 5±1%. Subsequently, a fan insufflated room air into the chamber for 30 seconds, restoring the oxygen fraction to 21%. Each hypoxia/normoxia cycle lasted for 60 seconds; in 8 hours, 480 periods occurred or 60 per hour. The sham group remained in an adjacent cage and underwent the same fan activity as the hypoxia group, but no gas mixture entered the cage in the hypoxia cycle. Gas insufflation and fan activity reduced temperature in the hypoxic cage by 0.2±0.3°C, as compared to the normoxic cage that reduced 0.1±0.2°C. Temperature in the cage was measured by fast-response thermometers at three cage locations. Deflectors were used to prevent wind chill effect.

Removal of Tissues, Organs, and Blood

When deep anesthesia was confirmed, mice were exsanguinated while blood samples were collected from the retro-orbital sinus²⁶ into heparinized capillary tubes. Interscapular BAT, epididymal fat, heart, liver, and brain used to establish tissue weights were dissected with fine-tipped scissors and tweezers and extracted. All these tissues were weighed while wet in a digital scale with precision of 0.0001 g (Bel Engineering, Italy). The blood samples were centrifuged at 5,000 rpm for 5 min to obtain sera that were used to hormonal analysis. Serum and BAT were placed in microtubes, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until the moment of analysis. Other tissues were fixed during 24 hours in 10% formalin, and blocked in paraffin for future processing.

Histological Examinations

Sections of formalin-fixed tissue specimens were stained with hematoxylin-eosin and examined light microscopically. The average diameter of adipocytes of each mouse was calculated from about of 100 cells by lamina. The cell diameter was measured using Image-Pro Express 5.1 software (Media Cybernetics - Bethesda, EUA). From the mean cell diameter, assuming that the adipocyte is spherical, the area and mean cell volume were calculated.²⁷

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Leptin and adiponectin quantitative determination was done using Invitrogen mouse kits (Camarillo, CA, USA). The minimum detectable dose of mouse leptin and adiponectin is 50 pg/mL. Absorbance (OD) was measured at 450 nm. Cortisol was quantified utilizing Enzo Life Sciences assay (Farmingdale, NY, USA). The minimum detectable dose of mouse cortisol is 56.72 pg/mL. Absorbance (OD) was measured at 405 nm. All samples were analyzed using an Anthos microplate reader (Hamburg, Germany).

RNA Preparation, cDNA Synthesis and Quantitative Real-Time PCR of the UCP-1

The BAT samples that were used for real time PCR were immediately frozen and were not dissected or weighed. At the laboratory, the BAT was unfrozen, immediately dissected, and homogenized in optimized phenol/guanidine-based lysis solution. Total RNA was isolated using QIAzol and the RNeasy Lipid Tissue kit (QIAGEN, Mississauga, ON, Canada). RNA was quantified and the quality tested by photometric measurement on a Nanodrop apparatus (Wilmington, DE, USA). Only highly purified RNA (A260/A280>1.95) was used. cDNA synthesis was performed using the SuperScript™ III/RNaseOUT™ Enzyme Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The cDNA was stored at -20°C and diluted in DNase-free water (1:20) before relative quantification of UCP-1 by real-time PCR. The primers used for UCP-1 expression had the following sequences: UCP-1 forward: 5'-CGACTCAGTCCAAGAGTACTTCTCTTC-3'; reverse: 5'-GCCGGCTGAGATCTTGTTC-3'; B-actin forward: 5'-GCTTCTTGCAGCTCCTCGT-3'; reverse: 5'-ATATCGTCATCCATGGCGAAC-3.

Detection of the PCR products was achieved with SYBR® Green I (LGC Biotecnologia, SP, Brazil) in a final volume of 25 µl, containing 1 µM of both primers, 1x SYBR Green MIX, and variable amounts of cDNA templates. The program profile used for UCP-1 and B-actin amplification was the following: 95°C for 2 min, 40 cycles of denaturation for 30 sec at 95°C, annealing for 15 sec at 60°C and extension for 30 sec at 60°C. Thermal cycling was performed in a Mx3000P™ real-time PCR system Stratagene Thermocycler (Agilent Technologies, Inc. Life Sciences and Chemical Analysis Group, Santa Clara, CA USA). Data were analyzed with the accompanying software MX PRO System Software, using $2\Delta\Delta Ct$ formula.²⁸

Data Analysis

The data were expressed as mean ± standard deviation in table and mean ± one standard error of mean in figure. Medians and percentiles [25th-75th] were utilized to express non-normally distributed data. To evaluate differences of normally distributed variables, paired t-test or Student's t test, were employed. The food intake in the groups was adjusted for body weight using generalized estimating equations.²⁹⁻³¹, followed by pairwise comparisons in Bonferroni's sequential adjustment method. Mann-Whitney U test was used to evaluate difference in the body weight gain between groups. Statistical significance was assumed if the probability of alpha error was <0.05. Statistical analysis was performed using the SPSS for Windows, version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTS

Food Intake and Body Weight

The mice in the hypoxia group ingested significantly less chow when compared to sham group, even after adjusting by body weight. Body weight gain of the hypoxia group was lower significantly than sham group. The hypoxia group gained 7% (2.1g) and o sham group gained 10% (3.3g) of the body weight during the 37 days of experiment (Table 1).

Nasal-Anal Length, Epididymal Fat, Organs Wet Weights, and Brown Adipose Tissue

The groups had similar increase of about 0.5 cm in nasal-anal length from day 1, to day 37 (6% increase; all paired-t $P<0.002$). There were no difference between groups on epididymal fat and heart wet weights. Organs with statistically significant difference after the adjustment by body weight were liver and brain. Liver weight in the hypoxia group was lighter than liver weight in sham group (-10% ; $P<0.001$) while brain weight was heavier in the hypoxia group than in the sham group (13%; $P<0.001$). BAT weight was smaller in hypoxia group compared to sham group even when whole animal weight was considered (-9% ; $P<0.001$) (Table 1). Specimens stained with hematoxylin and eosin (Figure 1) cytoplasm containing mitochondria and multiple fat vacuoles, which are characteristic of BAT, and a single large lipid vacuole in each white fat cell.

Histology of White Adipose Tissue and Brown Adipose Tissue

Figure 1 shows the histology of BAT and white adipose tissue (WAT). Interscapular BAT consisted of multilocular adipocytes in both hypoxia and sham groups, but with apparently larger lipid droplets in sham group (Figure 1A). In epididymal WAT, all the adipocytes were unilocular (Figure 1B), and hypoxia group decreased their size compared to sham group (130 ± 28 vs. $161\pm29\mu\text{m}$ in diameter, $P<0.001$) as well as the cell volume (1.3×10^{-6} vs $2.4\times10^{-6}\text{cm}^3$, $P<0.001$).

Serum Leptin, Adiponectin, and Cortisol Levels

Leptin, adiponectin, and cortisol serum levels were compared between the groups (Figure 2). Hypoxia group did not change significantly leptin (Figure 2A) and cortisol levels (Figure 2C) compared with sham group. The adiponectin (Figure 2B) in the hypoxia group was significantly lower compared with sham group ($P=0.02$), indicating that isocapnic intermittent hypoxia system did play a role changing the levels of this adipokine.

Expression of UCP-1 mRNA in Brown Adipose Tissue

Data of UCP-1 mRNA expression were expressed as box plots showing the median and percentiles [25th-75th] (Figure 2, panel D). Expression of UCP-1 mRNA in the animals of the hypoxia group was 0.0007 [0.0002-0.66], and of the sham group was

1.33 [0.49-11.94] ($P=0.006$). In relative terms, the BAT of the sham group had 1 copy of mRNA per cell for each 0.11 copies of the hypoxia group.

DISCUSSION

The present study shows that isocapnic intermittent hypoxia reduces food intake, body weight gain, adiponectin levels, and mRNA UCP-1 expression in mice. In contrast with earlier reports and with ongoing experiments in our laboratory, no body weight reduction was noticed in the present study.

It was previously shown that during 21 days decreases 4% the body weight of Wistar rats¹⁴ and that isocapnic intermittent hypoxia during 35 days causes a 17% reduction of body weight in Balb/c mice.¹³ The difference in results may be due to the mice being young, still in a growing phase, indicated by the significant increase in nasal-anal length. Another reason can be the hypoxia nadir of 9% in the present study, less severe as compared to the previous experiments that reduced inspired oxygen to 7%. It has been shown that inspired oxygen of 10% does not cause weight loss while a nadir of 5% causes.¹⁷

The body weight gain during the 37 days of experiment was significantly lower in the hypoxia group (7%) than in the sham group (10%, $P=0.04$). All groups were receiving the same standard chow and water *ad libitum* but the hypoxia group ingested significantly less food than the sham group (Table 1). Considering that the same reasons for a lesser weight gain - increased calorie expenditure and/or decreased calorie ingestion – are present in weight loss, the present results are acceptable to confirm our previous findings of weight loss.

Increased caloric output may be due to reduction of BAT quantity and/or UCP-1 activity, as confirmed in the present study.^{13,14} The animals from which BAT was dissected to be weighed were not the same that provided BAT used for determination of mRNA expression. The BAT used for mRNA was immediately immersed in liquid nitrogen to avoid post-mortem functional changes. The UCP-1 mRNA expression was virtually abolished in the hypoxia group. This may cause higher energy expenditure, since non-shivering thermogenesis mediated by UCP-1 is an energy-saving mechanism. The UCP-1 relative protein content after 4 weeks under continuous hypobaric hypoxia (480 mmHg ambient pressure) is similar to control. The UCP-1 relative mRNA expression, however, was about half of the expression in controls.³² In the present study

the relative mRNA expression is 0.11, reduced in nine fold compared to sham group. This suggests that isocapnic intermittent hypoxia 8 hours/day is a more potent inhibitor of UCP-1 expression than constant hypoxia and that an overriding inhibition by hypoxia persists even after two weeks of recovery.

The diminished UCP-1 expression explains previous observations in experimental animals but does not offer mechanistic explanation for what is seen in humans with OSA. In 2009, the doubts regarding the existence of BAT activity in humans have been dissipated. Three studies presented clear evidence of the functionality of BAT in adults by use of integrated positron-emission tomography and computed tomography (PET–CT) with ¹⁸fluorine-fluorodeoxyglucose (¹⁸F-FDG). Repeated immersion of one foot in cold water, causes a 15-fold increase in ¹⁸F-FDG uptake in the supraclavicular region in all individuals.²⁴ Lichtenbelt et al.²² observed BAT activity in 23 of 24 individuals at ambient temperature of 16 °C, but not at 22 °C. BAT activity in the lean group was more than four times higher than in the overweight and obese group. ¹⁸F-FDG uptake was negatively correlated with percentage of body fat and positively with resting metabolic rate. ¹⁸F-FDG-PET/CT diagnostic screening of 1,972 patients performed for various medical reasons showed BAT activity in 7.5% of women and 3.1% of men. Moreover, women had a greater BAT mass, which captured more ¹⁸F-FDG.²³

A higher brain weight and a lower liver weight in the hypoxia group are also relevant findings. Brain is heavier in the hypoxia group probably due to edema or increased brain capillary density. Hypoxia causes brain edema^{33,34} and increases brain capillary density as a mechanism to compensate tissue oxygenation.³⁵⁻³⁸

Liver weight is correlated with dietary restriction.^{39,40} The lower liver weight was, therefore, expected vis-a-vis the lower food ingestion in the hypoxia group.

Leptin reduction was expected since it is secreted in proportion with the body fat content^{18,41,42} acting on the hypothalamus to reduce appetite and induce energy expenditure.⁴³ Leptin, however, is increased in OSA^{6,44}, independently of obesity. In mice model of OSA, moderate chamber hypoxia to a nadir of 10%¹⁷ provoked neither change in leptin levels nor weight loss, as in the present study. Only severe hypoxia to a nadir of 5% increased leptin and was associated with weight loss. Increased leptin levels may be related to abnormal sympathetic activity. OSA creates a vicious cycle where weight gain, aggravates breathing cessation, daytime sleepiness, and leads to additional

weight gain.⁴⁵⁻⁴⁷ This cannot be reproduced in the animal model, being one possible reason for the weight gain in humans and weight loss in rodents.

In contrast to leptin, adiponectin levels are negatively correlated with obesity.²⁰ Adiponectin also circulates in plasma at a much higher concentration than leptin. Data suggest that adiponectin is protective against the development of type 2 diabetes^{48,49}, glucose intolerance, and dyslipidemia⁵⁰, as well as have anti-atherogenic^{51,52} and anti-inflammatory⁵³ properties. However, the evidence that adiponectin has a role in controlling food intake is less convincing. Although, ectopic overproduction of adiponectin can reduce food intake in high-fat-fed rats, preventing the development of obesity⁵⁴, food intake in adiponectin knockout mice is no different from that seen in wild-type littermates.⁵⁵ Our data suggest either positive or null correlation of adiponectin levels with food intake, since the serum levels of this hormone were reduced and the animals exposed to isocapnic intermittent hypoxia diminished food consumption. Reasons for lower serum adiponectin may be: 1) enhanced activity of the sympathetic nervous system;^{56,57} 2) increased levels of interleukin-6;^{58,59} 3) higher levels of tumor necrosis factor-alpha.^{60,61} Adiponectin is a hormone secreted exclusively by adipocytes. It is reduced in diseases linked to obesity and OSA, including coronary artery disease⁶²⁻⁶⁴, type 2 diabetes,⁶⁵⁻⁶⁷ and chronic inflammation.^{68,69} Reduction of adiponectin levels was expected based on the data in OSA patients^{70,71} without, however, the data containing a clear connection with weight control. OSA alters adiponectin and leptin secretion.⁷²⁻⁷⁴

The potential of intermittent hypoxia to elevate cortisol levels has not been confirmed. Comparable levels of serum cortisol have been reported in OSA and control patients.⁷⁵ In healthy volunteers exposed to intermittent hypoxia during 5 hours⁷⁶ no change of cortisol levels was reported. The present negative result agrees with the existing evidence.

The present study tested four possible contributors in the weight control system of rodents that might help to explain the weight loss under intermittent hypoxia. Two possible influences of interest for the research question were observed. The nine-fold reduction of UCP-1 expression may be a reason for weight loss in small animals, as it may lead to increases in energy expenditure. Reduction of adiponectin levels may affect the weight control. None of these two factors, however, explain the consistently lower

food ingestion in the hypoxia group. This finding is difficult to be translated to humans since patients with OSA show weight gain.

TABELA E FIGURAS DO ARTIGO

Table 1 – Means and standard deviations of body weight, food intake, and weight of tissues in the studied groups of mice.

		Sham Intermittent	Isocapnic Intermittent Hypoxia
Body weight, g	Day 1	31.95 ± 1.81	29.22 ± 1.92
	Day 37	$35.20 \pm 2.05^*$	$31.28 \pm 2.59^*$
Food intake, g	Day 1	5.99 ± 0.57	$5.07 \pm 0.58^\dagger$
	Day 37	6.07 ± 0.82	$5.33 \pm 0.31^\dagger$
BAT, g		0.038 ± 0.003	$0.030 \pm 0.003^\dagger$
BAT/body weight, %		0.174 ± 0.034	$0.159 \pm 0.019^\dagger$
Epididymal fat, g		0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.1
Epididymal fat /body weight, %		1.3 ± 0.5	1.5 ± 0.3
Heart weight, g		0.3 ± 0.04	0.2 ± 0.02
Heart weight/body weight, %		0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1
Liver weight, g		1.7 ± 0.3	$1.4 \pm 0.1^\dagger$
Liver weight/body weight, %		4.9 ± 0.6	$4.4 \pm 0.3^\dagger$
Brain weight, g		0.5 ± 0.03	0.5 ± 0.04
Brain weight/ body weight, %		1.4 ± 0.1	$1.6 \pm 0.1^\dagger$

Significance of differences between day 1 and day 37 in body weight and food intake was calculated using generalized estimating equations. BAT - brown adipose tissue, epididymal fat and others organs firstly were weighted (g) and after were corrected by body weight, which was calculated: division organ weight by body weight, multiplied by 100, signify the percentage in relation to body weight. *P<0.05; Significantly different from Day 1. †P<0.05; Significantly different from sham intermittent hypoxia.

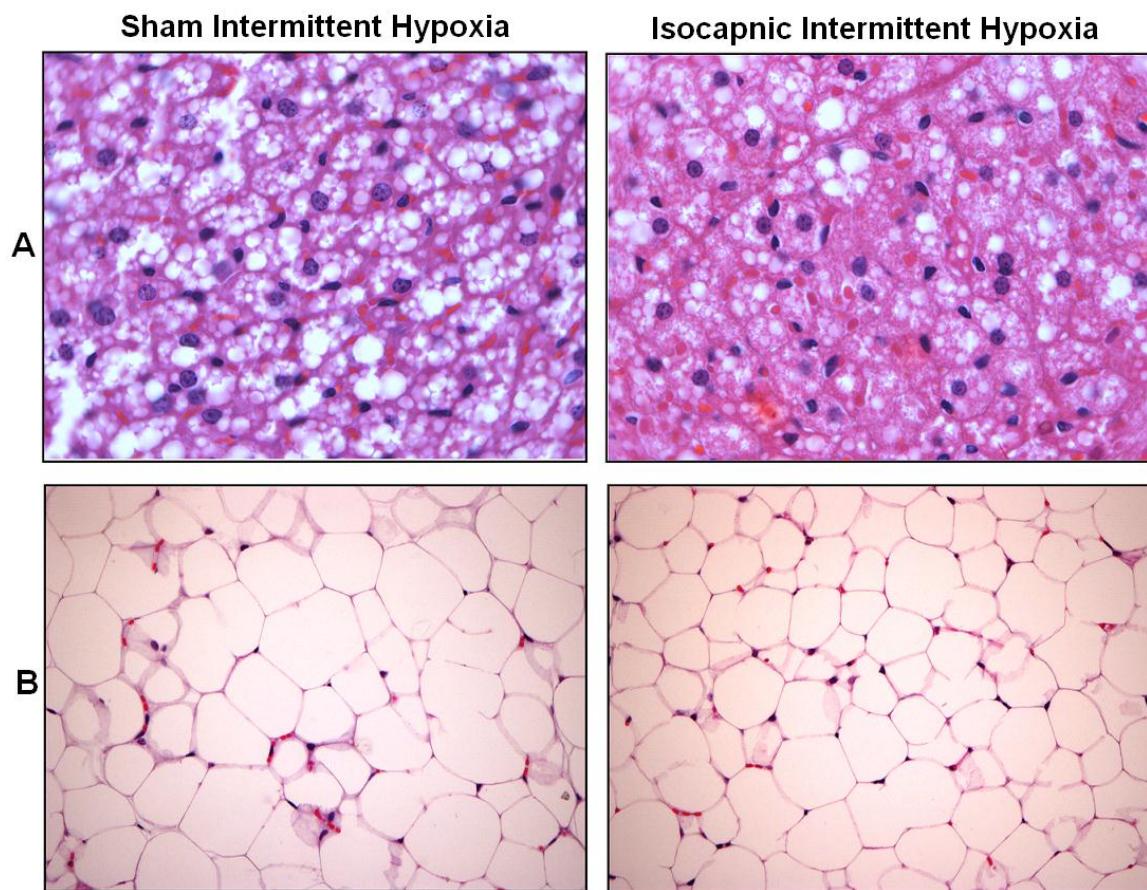


Figure 1 – Histological features of BAT and WAT. Interescapular BAT (A) and epididymal WAT (B) of mice submitted to isocapnic intermittent hypoxia and sham intermittent hypoxia were stained with hematoxylin and eosin. BAT: brown adipose tissue; WAT: white adipose tissue.

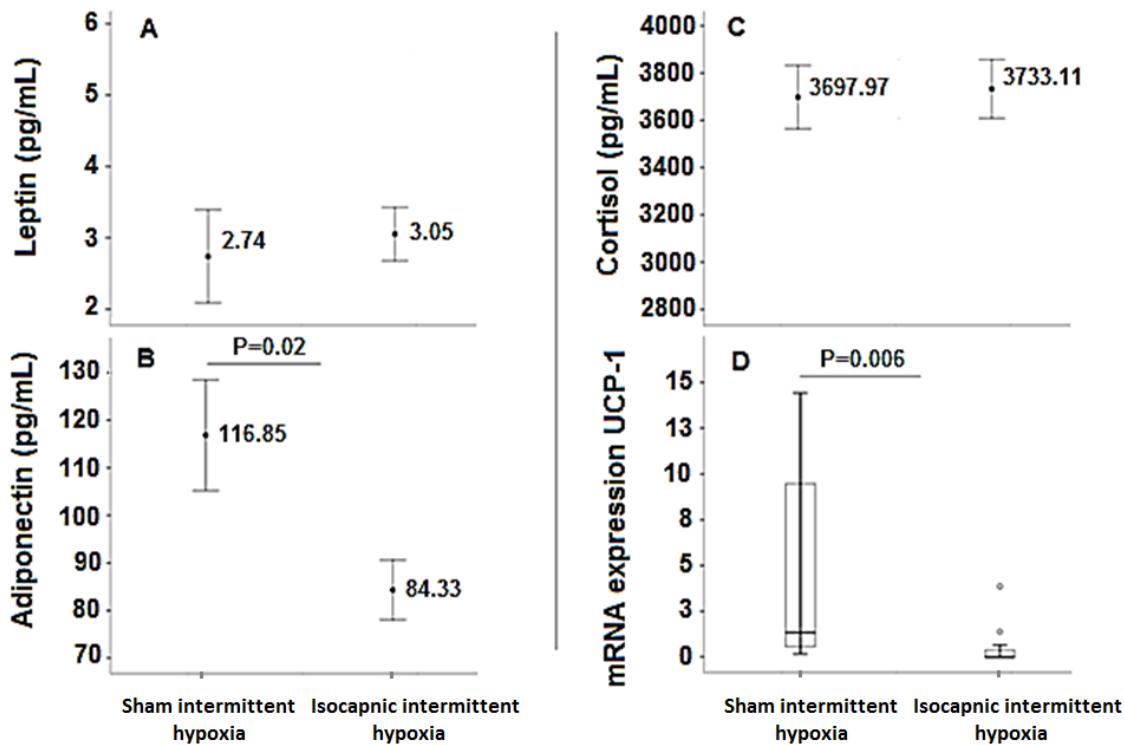


Figure 2 – Means and one standard error mean of studied variables by groups: **A-** Leptin levels showed no significant difference between groups; **B-** Adiponectin levels were significantly lower on the hypoxia group, compared with sham group; **C:** Cortisol levels showed no significant difference between groups. Box-plot of UCP-1 mRNA expression, in which the horizontal lines illustrate the 25th, 50th, and 75th percentiles and the error bars represent the 10th and 90th percentiles: **D-** In the hypoxia group expression of UCP-1 was strongly suppressed. The P values for multiple comparisons were calculated by the Mann-Whitney test.

ACKNOWLEDGMENTS

Miss Fiori is recipient of a scholarship from the Brazilian government agency CNPq. Miss Carissimi and Mister Baronio are recipient of scholarships from Capes.

ABBREVIATIONS:

OSA: obstructive sleep apnea

IH: intermittent hypoxia

BAT: brown adipose tissue

UCP-1: uncoupling protein 1

18F-FDG: 18fluorine-fluorodeoxyglucose

PET/CT: positron emission tomography/computerized tomography

REFERENCES

- ¹. Gastaut H, Tassinari CA, Duron B. Polygraphic study of the episodic diurnal and nocturnal (hypnic and respiratory) manifestations of the Pickwick syndrome. *Brain Res* 1966;1:167-86.
- ². Dempsey JA, Veasey SC, Morgan BJ, O'Donnell CP. Pathophysiology of sleep apnea. *Physiol Rev* 2010;90:47-112.
- ³. Drager LF, Jun JC, Polotsky VY. Metabolic consequences of IH: Relevance to obstructive sleep apnea. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2010;24:843-51.
- ⁴. Almendros I, Farré R, Planas AM, et al. Tissue oxygenation in brain, muscle, and fat in a rat model of sleep apnea: differential effect of obstructive apneas and intermittent hypoxia. *Sleep* 2011;34:1127-33.
- ⁵. Reinke C, Bevans-Fonti S, Drager LF, Shin MK, Polotsky VY. Effects of different acute hypoxic regimens on tissue oxygen profiles and metabolic outcomes. *J Appl Physiol*. 2011 Jul 7. [Epub ahead of print]
- ⁶. Chin K, Shimizu K, Nakamura T. Changes in intra-abdominal visceral fat and serum leptin levels in patients with obstructive sleep apnea syndrome following nasal continuous positive airway pressure therapy. *Circulation* 1999;100:706-12.
- ⁷. Shimizu K, Chin K, Nakamura T, et al. Plasma leptin levels and cardiac sympathetic function in patients with obstructive sleep apnoea-hypopnoea syndrome. *Thorax* 2002;57:429-34.
- ⁸. Phillips BG, Hisel TM, Kato M, et al. Recent weight gain in patients with newly diagnosed obstructive sleep apnea. *J Hypertens*. 1999;17:1297-300.
- ⁹. Phillips BG, Kato M, Narkiewicz K, Choe I, Somers VK. Increases in leptin levels, sympathetic drive, and weight gain in obstructive sleep apnea. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H234-7.
- ¹⁰. Gangwisch JE, Malaspina D, Boden-Albala B, Heymsfield SB. Inadequate sleep as a risk factor for obesity: analyses of the NHANES I. *Sleep* 2005;28:1289-96.
- ¹¹. Cappuccio FP, Taggart FM, Kandala NB, et al. Meta-analysis of short sleep duration and obesity in children and adults. *Sleep* 2008;31:619-26.
- ¹². Watanabe M, Kikuchi H, Tanaka K, Takahashi M. Association of short sleep duration with weight gain and obesity at 1-year follow-up: a large-scale prospective study. *Sleep* 2010;33:161-7.
- ¹³. Martinez D, Fiori CZ, Baronio D, et al. Brown adipose tissue: is it affected by IH? *Lipids Health Dis*. 2010;9:121.
- ¹⁴. Martinez D, Vasconcellos LF, de Oliveira PG, Konrad SP. Weight loss and brown adipose tissue reduction in rat model of sleep apnea. *Lipids Health Dis* 2008;7:26.
- ¹⁵. Leal TL, Alippi RM, Vargas M, León-Velarde F, Bozzini CE. Body weight loss during acute hypoxia: effects of increased convective oxygen transport or previous acclimation. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam* 1995;45:9-14.
- ¹⁶. Li J, Thorne LN, Punjabi NM, et al. Intermittent hypoxia induces hyperlipidemia in lean mice. *Circ Res* 2005;30:698-706.

-
- ¹⁷. Li J, Savransky V, Nanayakkara A, Smith PL, O'Donnell CP, Polotsky VY. Hyperlipidemia and lipid peroxidation are dependent on the severity of chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* 2007;102:557-63.
- ¹⁸. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 2006;21:289-95.
- ¹⁹. Polotsky VY, Li J, Punjabi NM, et al. Intermittent hypoxia increases insulin resistance in genetically obese mice. *J Physiol* 2003;1:253-64.
- ²⁰. Stefan N, Stumvoll M. Adiponectin: its role in metabolism and beyond. *Horm Metab Res* 2002;34:469-74.
- ²¹. Cannon B, Nedergaard J. Studies of thermogenesis and mitochondrial function in adipose tissues. *Methods Mol Biol* 2008;456:109-21.
- ²². Van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommerig JW, Smulders NM, et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med* 2009;360:1500-8.
- ²³. Cypess AM, Lehman S, Williams G, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 2009;360:1509-17.
- ²⁴. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* 2009;360:1518-25.
- ²⁵. National Research Council: Guide for the care and Use of Laboratory Animals. Washington, D.C.: National Academy Press 1996.
- ²⁶. Halpern BN, Pacaud A. Technique of obtaining blood samples from small laboratory animals by puncture of ophthalmic plexus. *C R Seances Soc Biol Fil* 1951;145:1465-6.
- ²⁷. Di Girolamo M, Mendlinger S, Fertig JW. A simple method to determine fat cell size and number in four mammalian species. *Am J Physiol* 1971;221:850-8.
- ²⁸. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-8.
- ²⁹. Zeger S, Liang K. Longitudinal data analysis for discrete and continuous outcomes. *Biometrics* 1986;42:121-30.
- ³⁰. Liang K-Y, Zeger SL. Longitudinal data analysis using generalized linear models. *Biometrika* 1986;73:13-22.
- ³¹. Ballinger GA. Using Generalized Estimating Equations for Longitudinal Data Analysis. *Organizational Research Methods* 2004;7:127-50.
- ³². Beaudry JL, McClelland GB. Thermogenesis in CD-1 mice after combined chronic hypoxia and cold acclimation. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2010;157:301-9.
- ³³. Higashida T, Kreipke CW, Rafols JA, et al. The role of hypoxia-inducible factor-1 α , aquaporin-4, and matrix metalloproteinase-9 in blood-brain barrier disruption and brain edema after traumatic brain injury. *J Neurosurg* 2011;114:92-101.

-
- ³⁴. Chávez JC, Agani F, Pichiule P, LaManna JC. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in the brain of rats during chronic hypoxia. *J Appl Physiol* 2000;89:1937-42.
- ³⁵. Cervós-Navarro J, Sampaolo S, Hamdorf G. Brain changes in experimental chronic hypoxia. *Exp Pathol* 1991;42:205-12.
- ³⁶. Harik SI, Behmand RA, LaManna JC. Hypoxia increases glucose transport at blood-brain barrier in rats. *J Appl Physiol* 1994;77:896-901.
- ³⁷. LaManna JC, Vendel LM, Farrell RM. Brain adaptation to chronic hypobaric hypoxia in rats. *J Appl Physiol* 1992;72:2238-43.
- ³⁸. Harik N, Harik SI, Kuo NT, Sakai K, Przybylski RJ, LaManna JC. Time-course and reversibility of the hypoxia-induced alterations in cerebral vascularity and cerebral capillary glucose transporter density. *Brain Res* 1996;737:335-8.
- ³⁹. Kouda K, Kohno H, Nakamura H, Ha-Kawa SK, Sonoda Y, Iki M. Technetium-99m-GSA clearance in mice under long-term dietary restriction. *Ann Nucl Med* 2009;23:123-9.
- ⁴⁰. Ramsey JJ, Hagopian K, Kenny TM, et al. Proton leak and hydrogen peroxide production in liver mitochondria from energy-restricted rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;286:E31-40.
- ⁴¹. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature medicine* 1995;1:1155-61.
- ⁴². Lonnquist F, Arner P, Nordfors L, Schalling M. Overexpression of the obese (ob) gene in adipose tissue of human obese subjects. *Nat Med* 1995;1:950-3
- ⁴³. Friedman J, Halaas J. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998;395:763-70.
- ⁴⁴. Ip MSM, Lam KSL, Ho C, Tsang KWT, Lam W. Serum leptin and vascular risk factors in obstructive sleep apnea. *Chest* 2000;118:580-6.
- ⁴⁵. Peppard PE, Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J. Longitudinal study of moderate weight change and sleep-disordered breathing. *JAMA* 2000;284:3015-21.
- ⁴⁶. Newman AB, Foster G, Givelber R, Nieto FJ, Redline S, Young T. Progression and regression of sleep-disordered breathing with changes in weight: the Sleep Heart Health Study. *Arch Intern Med* 2005;165:2408-13.
- ⁴⁷. Phillips BG, Hisel TM, Kato M, et al. Recent weight gain in patients with newly diagnosed obstructive sleep apnea. *J Hypertens* 1999;17:1297-300.
- ⁴⁸. Choi KM, Lee J, Lee KW, et al. Serum adiponectin concentrations predict the developments of type 2 diabetes and the metabolic syndrome in elderly Koreans. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;61:75-80.
- ⁴⁹. Spranger J, Kroke A, Mohlig M, et al. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet* 2003;361:226-8.
- ⁵⁰. Nawrocki AR, Rajala MW, Tomas E, et al. Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol Chem* 2006;281:2654-60.

-
- ⁵¹. Ouchi N, KIHara S, Arita Y, et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 1999;100:2473-6.
- ⁵². Ouchi N, KIHara S, Arita Y, et al. Adiponectin, adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF- κ B signaling through cAMP-dependent pathway. *Circulation* 2000;102:1296-1301.
- ⁵³. Yokota T, Oritani K, Takahashi I, et al. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood* 2000;96:1723-32.
- ⁵⁴. Shklyaev S, Aslanidi G, Tenant M, et al. Sustained peripheral expression of transgene adiponectin offsets the development of diet-induced obesity in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:14217-22.
- ⁵⁵. Maeda N, Shimomura I, Kishida K, et al. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 2002;8:731-7.
- ⁵⁶. Delporte ML, Funahashi T, Takahashi M, Matsuzawa Y, Brichard SM. Pre- and post-translational negative effect of beta adrenoceptor agonists on adiponectin secretion: In vitro and in vivo studies. *Biochem J* 2002;367:677-85.
- ⁵⁷. Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R. Adiponectin gene expression is inhibited by beta-adrenergic stimulation via protein kinase A in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS* 2001;507:142-6.
- ⁵⁸. Yokoe T, Minoguchi K, Matsuo H, et al. Elevated levels of C-reactive protein and interleukin-6 in patients with obstructive sleep apnea syndrome are decreased by nasal continuous positive airway pressure. *Circulation* 2003;107:1129-34.
- ⁵⁹. Fasshauer M, Kralisch S, Klier M, et al. Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;301:1045-50.
- ⁶⁰. Gozal D, Serpero LD, Kheirandish-Gozal L, Capdevila OS, Khalyfa A, Tauman R. Sleep measures and morning plasma TNF-alpha levels in children with sleep-disordered breathing. *Sleep* 2010;33:319-25.
- ⁶¹. Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:1084-9.
- ⁶². Pischedda T, Girman CJ, Hotamisligil GS, Rifai N, Hu FB, Rimm EB. Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *JAMA* 2004;291:1730-7.
- ⁶³. Kumada M, KIHara S, Sumitsuji S, et al. Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterio Throm Vasc Bio* 2003;23:85-9.
- ⁶⁴. Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G, et al. Adiponectin, metabolic risk factors, and cardiovascular events among patients with end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:134-41.
- ⁶⁵. Lazar MA. How obesity causes diabetes: not a tall tale. *Science* 2005;307:373-5.
- ⁶⁶. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1595-9.
- ⁶⁷. Li S, Shin HJ, Ding EL, Van Dam RM. Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2009;302:179-88.

-
- ⁶⁸. Tsiaoussoglou M, Bixler EO, Calhoun S, Chrousos GP, Sauder K, Vgontzas AN. Sleep-disordered breathing in obese children is associated with prevalent excessive daytime sleepiness, inflammation, and metabolic abnormalities. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:143-50.
- ⁶⁹. Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Selective activation of inflammatory pathways by IH in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation* 2005;112:2660-7.
- ⁷⁰. Lam JC, Xu A, Tam S, et al. Hypoadiponectinemia is related to sympathetic activation and severity of obstructive sleep apnea. *Sleep* 2008;31:1721-7.
- ⁷¹. Nakagawa Y, Kishida K, Kihara S, et al. Nocturnal reduction in circulating adiponectin concentrations related to hypoxic stress in severe obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;294:E778-84.
- ⁷². Tokuda F, Sando Y, Matsui H, Koike H, Yokoyama T. Serum levels of adipocytokines, adiponectin and leptin, in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Intern Med* 2008;47:1843-9.
- ⁷³. Ulukavak Ciftci T, Kokturk O, Bukan N, Bilgihan A. Leptin and ghrelin levels in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Respiration* 2005;72:395-401.
- ⁷⁴. Zhang XF, Wang YH, Li Q, et al. Changes in genioglossus and their association with serum adiponectin levels in rats subjected to chronic intermittent hypoxia. *Chin Med J (Engl)* 2010;123:2249-53.
- ⁷⁵. Panaree B, Chantana M, Wasana S, Chairat N. Effects of obstructive sleep apnea on serum brain-derived neurotrophic factor protein, cortisol, and lipid levels. *Sleep Breath* 2010 [Epub ahead of print].
- ⁷⁶. Louis M, Punjabi NM. Effects of acute intermittent hypoxia on glucose metabolism in awake healthy volunteers. *J Appl Physiol* 2009;106:1538-44.