

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES METABÓLICAS E PANCREÁTICAS
EM CAMUNDONGOS NÃO OBESOS SUBMETIDOS À HIPÓXIA INTERMITENTE
ISOCÁPNICA

Dissertação de Mestrado

LUCIANA RODRIGUES VIEIRA

Porto Alegre

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES METABÓLICAS E PANCREÁTICAS EM
CAMUNDONGOS NÃO OBESOS SUBMETIDOS À HIPÓXIA INTERMITENTE
ISOCÁPNICA

LUCIANA RODRIGUES VIEIRA

Orientador: Professor Dr. Denis Martinez

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Médicas,
UFRGS, como requisito para obtenção de
título de Mestre

Porto Alegre

2012

CIP - Catalogação na Publicação

Vieira, Luciana Rodrigues
AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES METABÓLICAS E
PANCREÁTICAS EM CAMUNDONGOS NÃO OBESOS SUBMETIDOS À
HIPÓXIA INTERMITENTE ISOCÁPNIC / Luciana Rodrigues
Vieira. -- 2012.
87 f.

Orientador: Denis Martinez.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2012.

1. apneia do sono. 2. alterações metabólicas. 3.
proteína desacopladora-2. 4. glicose. 5. insulina. I.
Martinez, Denis, orient. II. Título.

Dedico aos maiores incentivadores desta conquista,
minha mãe Berenice Vieira e meu namorado Rodrigo Saccone

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe Berenice pelo amor, carinho e palavras de conforto que me tornaram mais forte nesta trajetória. Ao meu pai José Nelson, *in memoriam*, pelo exemplo de bom caráter e esforço. Agradeço a vocês por me ensinarem que sempre devemos superar nossas dificuldades com dignidade.

Ao meu namorado Rodrigo pelo amor, paciência e incentivo. Obrigada por fazer parte de mais esta conquista.

Ao Professor Dr. Denis Martinez pelo excelente papel de orientador. Muito obrigada pela disponibilidade e pelas críticas construtivas. Aprendi muito com o senhor e sempre vou lembrar de uma frase sua: “Só conseguimos o que queremos com muito trabalho e trabalho”.

Aos colegas do grupo de pesquisa LIPES (Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas em Sono) pela colaboração na execução deste trabalho. Em especial às colegas Silvana Perini, Cintia Fiori e Alicia Carisimi, obrigada pela contribuição e amizade e de vocês.

À equipe da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, ao Programa de pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas e ao Fundo de incentivo à Pesquisa (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo apoio à pesquisa.

“O que nos tranquiliza no sono é a certeza de que dele retornamos, e retornamos os mesmos, já que uma estranha interdição nos impede de trazer conosco o resíduo exato dos nossos sonhos. Outra coisa nos tranquiliza ainda: é que ele nos cura temporariamente da fadiga pelo mais radical dos processos, isto é, arranjando para que cessemos de existir durante algumas horas.”

Marguerite Yourcenar, Memórias de Adriano, 1951

RESUMO

Introdução: A apneia do sono causa hipóxia intermitente (HI), que tem sido implicada na resistência à insulina. A proteína desacopladora 2 (UCP2) no pâncreas é reguladora negativa da secreção de insulina.

Objetivos do Estudo: Avaliar se a exposição animal ao modelo de apneia do sono influencia na produção de insulina via expressão do mRNA da UCP2.

Desenho e intervenções: Camundongos C57BL machos foram expostos durante 35 dias à hipóxia intermitente (HI; n = 18) ou HI simulada (HIS; n = 18). Durante 8 horas diárias o grupo HI foi submetido a um total de 480 ciclos de 30 segundos de hipóxia progressiva a um nadir da fração inspirada de oxigênio de $8 \pm 1\%$, seguido por 30 segundos de normóxia.

Métodos e Resultados: A expressão do mRNA da UCP-2 no pâncreas, avaliada por PCR em tempo real, foi 18% mais baixa no grupo HI do que no grupo HIS (P = 0,14). Imunohistoquímica identificou maior número de células beta no grupo HI do que no HIS (P = 0,14). Os níveis de glicose no soro medidos por métodos colorimétricos enzimáticos foram menores no grupo HI do que no grupo HIS (P = 0,025). Níveis significativamente maiores de insulina no soro, quantificados por ELISA, e níveis significativamente mais baixos de glucagon, quantificados por EIA, foram observados no grupo HI, quando comparado ao grupo HIS. Os cálculos do modelo de avaliação da homeostase (HOMA) para a resistência à insulina sugerem maior sensibilidade em HI do que em camundongos HIS (P = 0,09). A função das células beta, avaliada por HOMA - β foi maior em camundongos HI do que nos HIS (P = 0,014). O peso corporal, ajustado ao consumo alimentar, foi relativamente estável durante o experimento. Não foram encontradas diferenças significativas no perfil lipídico.

Conclusões: Estes resultados sugerem que a HI provoca alterações na função pancreática que não podem ser relacionadas com a expressão do mRNA da UCP2.

Palavras-chave: apneia do sono, síndrome metabólica X, glicose, insulina, proteína desacopladora-2

ABSTRACT

Background: Sleep apnea causes intermittent hypoxia (IH) that has been implicated in insulin resistance. Pancreatic uncoupling protein-2 (UCP2) is a negative regulator of insulin secretion.

Study Objectives: To evaluate whether exposure to an animal model of sleep apnea influences insulin output via UCP2 expression.

Design and interventions: Male C57BL mice were exposed during 35 days to intermittent hypoxia (IH; n=18) or to sham IH (SIH; n=18). During 8 hours daily the IH group underwent a total of 480 cycles of 30 seconds of progressive hypoxia to a nadir FIO₂ of 8±1% followed by 30 seconds of normoxia.

Measurements and Results: The expression of pancreatic UCP-2 mRNA assessed by real-time PCR was 18% lower (P=0.14) in the IH than in the SIH group. Immunohistochemistry identified higher number of beta cells in IH than in SIH group (P=0.14). Glucose levels measured in serum by enzymatic colorimetric methods was lower in IH than in SIH group (P=0.025). Significantly higher serum insulin quantified by ELISA and lower glucagon levels quantified by EIA were seen in the IH group when compared with SIH. Calculations of homeostasis model assessment (HOMA) for insulin resistance suggest higher sensitivity in IH than in SIH mice (P=0.09). HOMA for beta-cell function was higher in IH than in SIH mice (P=0.014). Body weight, adjusted for food intake, was relatively stable during the experiment. No significant differences in lipid profile were encountered.

Conclusions: These results suggest that IH causes changes in pancreatic function that may be not related to expression of mRNA UCP2.

Keywords: Sleep apnea, metabolic syndrome X, glucose, insulin, uncoupling protein-2.

LISTA DE TABELAS DA REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1 - Critérios de Diagnóstico da síndrome da apneia obstrutiva do sono em adultos

Tabela 2 - Tipos de polissonografia

Tabela 3 - Principais comorbidades da SAOS

Tabela 4 - Estudos em humanos sobre apneia do sono e transtornos metabólicos

Tabela 5 - Estudos em animais sobre apneia do sono e transtornos metabólicos

LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 - Imagem sagital, analisada por ressonância magnética de indivíduo normal e com apneia obstrutiva do sono. A: indivíduo normal e destacada as regiões da VAS. B: indivíduo com apneia do sono grave com destaque para os tecidos moles. O indivíduo B apresenta as regiões retropalatal e retroglossal da VAS mais estreitas, assim como o palato mole, a língua e a gordura subcutânea são maiores. Adaptada referência 30.

Figura 2 - Paciente obeso com retro/micrognatismo. Adaptada referência 31.

Figura 3 - Esquema do modelo mecânico do espaço aéreo faríngeo na apneia obstrutiva do sono. A interação entre os tecidos moles e as estruturas ósseas determina o tamanho da via aérea faríngeo. P_{tecido} = pressão tecidual em torno da via colapsável. Adaptada referência 29.

Figura 4 - A) Ilustração do monitor portátil tipo III. B) demonstração do paciente com o monitor.

Figura 5 - Parâmetros de traçado cefalométrico. S: sela; N: nácio; A: subespinhal; B: supramental; Go:gônio; Gn: gnátio; PM: plano mandibular, P: ponta do palato mole; H: hióide; ENP: espinha nasal posterior; EAP: espaço aéreo posterior. Adaptada referência 77.

Figura 6 - A) Apneia obstrutiva do sono (via aérea ocluída); B) A pressão de ar exercida pelo CPAP desobstrui a via aérea superior (via aérea permeável). Adaptada referência 98.

Figura 7 - Modelo esquemático da função da UCP2 nas células β pancreáticas. O aumento da concentração plasmática de glicose (1) eleva a concentração citoplasmática (2). A absorção ocorre através do transportador de glicose na membrana (GLUT2). Isto aumenta o fornecimento de piruvato para o ciclo mitocondrial do ácido tricarboxílico (ATC), o que leva a um aumento na proporção NADH / NAD⁺, elevação da força próton-motriz da

ATP-sintase através da cadeia de transporte de elétrons (CTE) e aumento da síntese de ATP. O aumento na razão ATP/ADP (3) provoca o fechamento dos canais de KATP, levando a despolarização do potencial de membrana plasmática ($\Delta\psi$) e influxo de Ca^{2+} . Os íons de cálcio provocam alteração conformacional dos grânulos para a membrana possibilitando a liberação de insulina. Elétrons provenientes da CTE reduzem o O_2 a ânion radical superóxido (O_2^-). Se ocorrer acúmulo de superóxido, a UCP2 será ativada. Esta dissipa prótons, reduz a força próton-motriz, provocando diminuição da proporção de ATP/ADP (4), abertura dos canais de K^+ e, como consequência, menor secreção de insulina. Adaptada referência 163.

Figura 8 - Localização genômica do gene da UCP2 em humanos. Adaptada referência 185.

Figura 9 – Localização genômica do gene da UCP2 em camundongos. Adaptada referência 186.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS DO ARTIGO EM INGLÊS

Table 1 – Median scores [25th percentile, 75th percentile] of lipid profile parameters.

Figure 1: Box plots of glucose metabolism variables showing 10th, 25th, 50th, 75th, and 90th percentiles and outliers (circles) and extreme outliers (asterisks). P values calculated by Mann-Whitney test.

Figure 2: Box-plot of the relative area of the islet occupied by beta and alpha cell in immunohistochemistry staining for insulin and glucagon magnified 400 times. Box plots shows 10th, 25th, 50th, 75th, and 90th percentiles and outliers (circles) and extreme outliers (asterisks). Sham intermittent hypoxia group (SIH) and intermittent hypoxia (IH) groups.

Figure 3: Changes in body weight during 35 days of exposure to intermittent hypoxia (IH) and to sham intermittent hypoxia group (SIH). Values are mean \pm 1SE.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACS: apneia central do sono

ADP: difosfato de adenosina

AOS: apneia obstrutiva do sono

ATP: trifosfato de adenosina

EAP: espaço aéreo posterior

EEG: eletroencefalograma

EMG: eletromiograma

EOG: eletrooculograma

EROs: espécies reativas de oxigênio

FiO₂: fração inspirada de oxigênio

HDL-colesterol: lipoproteína de alta densidade

HI: hipóxia intermitente

HOMA: modelo de avaliação da homeostase

HOMA-IR: Modelo de avaliação da homeostase utilizado para quantificar a resistência à insulina

IAH: índice de apneia e hipopneia

ICDS-2: *International Classification of Sleep Disorders* (Classificação Internacional dos Transtornos do Sono)

LDL-colesterol: lipoproteína de baixa densidade

mRNA: *messenger ribonucleic acid* (RNA mensageiro)

O₂^{•-}: ânion superóxido

RERAs: *respiratory effort-related arousals* (despertares esforço respiratório-relacionados).

SAOS: síndrome da apneia obstrutiva do sono

Sono NREM: *Non Rapid Eye Movement* (sono sem movimento rápido dos olhos)

Sono REM: *Rapid Eye Movement* (sono com movimento rápido dos olhos)

TOTG: teste oral de tolerância à glicose

TRS: transtornos respiratórios do sono

TTGIV: tolerância à glicose intravenosa

UCPs: *uncoupling proteins* (proteínas desacopladoras)

VAS: via aérea superior

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	9
LISTA DE TABELAS DA REVISÃO DE LITERATURA.....	10
LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO DE LITERATURA.....	11
LISTA DE TABELAS E FIGURAS DO ARTIGO EM INGLÊS.....	13
LISTA DE ABREVIATURAS.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 SONO	19
2.2 TRANSTORNOS RESPIRATÓRIOS DO SONO	20
2.3 SÍNDROME DA APNEIA OBSTRUTIVA DO SONO.....	21
2.4 PATOGÊNESE DA SAOS	23
2.5 DIAGNÓSTICO.....	28
2.5.1 Sintomas	28
2.5.2 Polissonografia	29
2.5.3 Outros exames	29
2.5.5 Questionários.....	31
2.6 REPERCUSSÕES CLÍNICAS DA SAOS.....	32
2.6.1 Comorbidades.....	32
2.6.2 Tratamento.....	33
2.7 MODELOS EXPERIMENTAIS DE APNEIA DO SONO	34
2.8 ALTERAÇÕES METABÓLICAS NA APNEIA DO SONO.....	36
2.8.1 Apneia do sono e dislipidemia	39
2.8.2 Apneia do sono, resistência à insulina e diabete	41
2.8.2.1 Diagnóstico da resistência à insulina.....	41
2.8.2.2 Estudos clínicos e experimentais.....	42
2.9 PROTEÍNAS DESACOPLADORAS	44
2.9.1 Proteína Desacopladora 2 (UCP2).....	45
3. JUSTIFICATIVA.....	49
4. OBJETIVOS.....	50
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA.....	51
6. ARTIGO EM INGLÊS.....	66
6.1 TABELA E FIGURAS DO ARTIGO.....	79
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	87

1.INTRODUÇÃO

Apneia obstrutiva do sono é caracterizada pelo colapso recorrente das vias aéreas superiores durante o sono. Cada apneia resulta em dessaturação do oxigênio e despertar que causa fragmentação do sono e hipóxia intermitente (HI).

A síndrome metabólica tem várias características em comum com SAOS, incluindo obesidade, hiperlipidemia, hipertensão e resistência à insulina. Modelos experimentais que expõem os animais à HI são utilizados para estudar as consequências da apneia obstrutiva do sono. Metabolismo lipídico anormal e resistência à insulina são relatados em modelos experimentais de apneia do sono com ratos ou camundongos.

Estudos sugerem uma relação causal entre a síndrome da apneia do sono e os componentes da síndrome metabólica, porém, os mecanismos das alterações metabólicas, em especial de resistência à insulina, permanecem incertos. O presente estudo investigou, em camundongos C57BL, o efeito da HI na expressão do mRNA da proteína desacopladora 2 (UCP2), reguladora negativa da secreção de insulina.

Foi usada a base de dados eletrônica Pubmed com a seguinte estratégia: buscando por “intermittent hypoxia” se obteve 2274 referências; quando adicionado “metabolic disorder” se encontrou 132 referências; quando acrescentado à “intermittent hypoxia” a palavra “glucose” se encontrou 98 referências; quando se adicionou à “intermittent hypoxia” a palavra “insulin” foram encontradas 82 referências; e quando se acrescentou à “intermittent hypoxia” a palavra “uncoupling protein 2” foram encontradas 0 referências.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SONO

O sono é um dos estados da vida. Pode-se 'estar' acordado ou dormindo. O sono, ao contrário de ser um desligamento monótono, muda de característica a cada poucos minutos. A caracterização das fases do sono pode ser feita com base em três registros. O eletroencefalograma (EEG) apresenta sucessão ordenada e cíclica de ondas cerebrais de diferentes amplitudes e frequências. O eletrooculograma (EOG) revela a existência de movimentos oculares. O eletromiograma (EMG) apresenta a atividade elétrica associada ao tônus muscular.

O registro simultâneo de EEG, EOG e EMG permite distinguir dois estados de sono: o sono REM (*Rapid Eye Movement*), caracterizado pela presença de ondas dessincronizadas no eletroencefalograma, movimentos oculares rápidos, músculos atônicos e sonhos; sono NREM (*Non Rapid Eye Movement*) associado com presença de ondas corticais sincronizadas, com atividade psicológica mínima pelo EEG e baixo tônus muscular.¹ O sono NREM era subdividido em quatro estágios. O estágio N1 representa a fase de transição da vigília para o sono na qual ainda se conserva parcialmente a consciência. O estágio N2 ocupa aproximadamente metade do tempo de sono e é marcado pela alternância cíclica de ondas excitatórias (complexos K) e inibitórias (fusos do sono). Do estágio N3, a quantidade de ondas lentas ou delta deve ser maior do que 20% da atividade do EEG. Ocorre aumento progressivo de ondas delta, conforme o sono avança para o estágio N4, com mais de 50% de ondas lentas. As ondas deltas são vistas no coma e esse é o estágio mais profundo do sono. Recentemente, os estágios N3 e N4 foram agrupados, na medida em que as diferenças entre os dois se revelaram quantitativas sem

importância fisiológica qualitativa. Nos adultos o sono é formado por quatro a seis ciclos de sono NREM/REM.² Cada ciclo tem duração de 90 a 110 minutos.

Uma das finalidades do sono seria repor os depósitos de adenosina trifosfato (ATP) em neurônios, músculos e outros tecidos com alto consumo energético. A adenosina, derivada da lise do ATP, se acumula quando o estoque de ATP está baixo. Receptores de adenosina são responsáveis pelo aparecimento de sonolência e por isso, a adenosina é considerada um “neurotransmissor retaliatório”.³ O sono é deflagrado e mantido por mecanismos complexos. Falhas nesses mecanismos constituem transtornos ou doenças do sono

2.2 TRANSTORNOS RESPIRATÓRIOS DO SONO

Perturbações que ocorram na ventilação durante o sono são denominadas transtornos respiratórios do sono (TRS).⁴ Apneias e hipopneias são os TRS mais facilmente identificáveis. Causam hipóxia intermitente e hipercapnia intermitente, ou seja, asfixia intermitente.⁵ Apneia é definida como interrupção completa do fluxo aéreo ventilatório por pelo menos 10 segundos. Hipopneia é a redução de 30 à 50% do fluxo, acompanhada de dessaturação de oxigênio da hemoglobina no sangue arterial maior que 3% e/ou de evidência de despertar no eletroencefalograma.⁶ Com o despertar, retorna a ventilação e retornam ao normal os níveis de oxigênio. Apneias e hipopneias apresentam fisiopatologia e impactos clínicos semelhantes, porém, diferem quanto ao grau de obstrução da faringe.⁷

Os episódios de apneia do sono podem ser classificados em três tipos: apneia obstrutiva do sono (AOS), apneia central do sono (ACS) e apneia mista. O critério de diferenciação entre elas é a presença ou ausência de esforço respiratório concomitante.⁸ Na apneia do sono, os esforços respiratórios são mantidos, mas há interrupções repetitivas da

ventilação causada pelo colapso parcial ou total da via aérea superior, devido ao relaxamento da musculatura abdução da faringe.^{9, 10} Nesta condição, o tono da musculatura da via aérea superior (VAS) pode ser insuficiente para manter sua permeabilidade.⁹ ACS é definida como redução do esforço respiratório, resultando em ventilação reduzida ou ausente, causada por disfunção dos centros neurais que regulam a respiração.¹¹ A apneia mista é caracterizada por uma combinação da ACS seguida pelo evento obstrutivo.

Além das apneias e hipopneias, o sono pode ser interrompido por despertares esforço respiratório-relacionados (em inglês, *respiratory effort-related arousals*, RERAs). Esses eventos se devem ao aumento da resistência da via aérea superior, que obrigam a pessoa a acordar antes que ocorra o contato entre as paredes da faringe, provocando ronco e parada do fluxo aéreo. Não havendo interrupção do fluxo, a saturação de oxigênio permanece inalterada. Os breves despertares duram de 3 a 15 segundos. Esses despertares causam sono não reparador, sonolência diurna e fadiga. Sua fisiopatologia é a mesma das apneias obstrutivas do sono, devendo os RERAs fazer parte da contagem dos eventos obstrutivos e ser incluídos entre os eventos anormais para alcançar os critérios de diagnóstico da apneia do sono.¹²

A gravidade da apneia do sono é medida pelo índice de apneia e hipopneia (IAH), calculado como total de apneias e hipopneias dividido por horas de sono. Classifica-se o IAH em: normal, quando for menor que 5 eventos por hora; leve, de 5 a 14 AH/h; moderado, de 15 a 29 AH/h; e grave, acima de 30 AH/h.⁸

2.3 SÍNDROME DA APNEIA OBSTRUTIVA DO SONO

A síndrome da apneia obstrutiva do sono (SAOS) inclui a presença concomitante de no mínimo cinco eventos obstrutivos por hora de sono e de sintomas associados. A tabela 1

mostra os critérios de diagnóstico da SAOS conforme a segunda edição da Classificação Internacional dos Transtornos do Sono (em inglês, *International Classification of Sleep Disorders ICDS-2*).¹²

Tabela1 - Critérios de Diagnóstico da síndrome da apneia obstrutiva do sono em adultos

Critérios: A, B e D ou C e D

A) Pelo menos uma das seguintes queixas:

- Episódios de sono não intencionais durante a vigília, sonolência diurna excessiva, sono não reparador, fadiga ou insônia
- Acordar com pausas respiratórias, engasgos ou asfíxia
- Relato por observador de ronco alto e/ ou pausas respiratórias no sono

B) Polissonografia mostra:

- Cinco ou mais eventos respiratórios (apneia e/ou hipopneias e/ou despertares esforço respiratório-relacionados – RERA) por hora de sono.
- Evidência de esforço respiratório durante a totalidade ou parte de cada evento.

C) Polissonografia mostra:

- Quinze ou mais eventos respiratórios (apneia e/ou hipopneias e/ou despertares relacionados a esforço respiratório) por hora de sono.
- Evidência de esforço respiratório durante a totalidade ou porção de cada evento.

D) O transtorno não pode ser mais bem explicado por outro transtorno do sono, desordem médica ou neurológica, uso de medicamentos ou transtorno por uso de substâncias.

Baseando-se nesses critérios, mais abrangentes por incluírem os RERAs no cálculo dos cinco eventos por hora, a prevalência de SAOS na população é maior. Os estudos epidemiológicos da década de 90 indicavam a presença de apneia do sono em 2% das

mulheres e 4% dos homens.¹³ Desde lá, porém, a porcentagem de obesos na população mais do que dobrou. Usando os novos critérios da ICDS-2, Tufik et al. detectaram a prevalência de SAOS em 32,8% na população adulta da cidade de São Paulo.¹⁴

Fatores predisponentes para a SAOS incluem: obesidade, particularmente acúmulo de tecido adiposo na região perifaríngea; sexo masculino; anormalidades craniofaciais assim como hipoplasia mandibular e maxilar; aumento de tecido mole ou linfóide da região da faringe, incluindo hipertrofia de tonsilas; obstrução nasal; anormalidades endócrinas como hipertireoidismo e histórico familiar.⁸

2.4 PATOGÊNESE DA SAOS

A apneia do sono tem causas funcionais e anatômicas. Os principais fatores funcionais para a patogênese da SAOS são: relaxamento excessivo da musculatura dilatadora da via aérea superior durante o sono, baixo volume pulmonar de reserva expiratória, perturbação da estabilidade do sistema de controle da ventilação e instabilidade do sono.^{5,15}

Cada apneia obstrutiva do sono tem início, meio e fim. O início é caracterizado pelo colapso e o fim pela reabertura da faringe. Durante o colapso, a asfixia causa aumento do esforço respiratório e das oscilações de pressão intratorácica. O crescente esforço respiratório é detectado por mecanorreceptores da parede torácica (fusos e órgãos de Golgi) terminando por levar à interrupção do sono com ativação dos músculos que reabrem a VAS.¹⁶ Os despertares repetitivos causam sonolência excessiva que pode resultar em acidentes,¹⁷ insuficiência cognitiva,¹⁸ ansiedade¹⁹ e depressão.²⁰ Além disso, o sistema nervoso autônomo simpático é excitado a cada despertar, levando a hipertensão,²¹ morbidade cardiovascular²² e disfunção metabólica²³.

O maior músculo dilatador da VAS é o genioglosso, que forma a maioria do corpo da língua.¹⁵ Embora sua atividade seja reduzida durante o sono, propiciando o estreitamento da VAS, sua função aumenta em resposta a elevações da resistência da VAS e a hipercapnia. O genioglosso tem sua atividade modulada por diversos componentes do sistema de controle da ventilação e por ativação/desativação dos centros de sono/vigília, de neurônios geradores de padrão respiratório e de quimiorreceptores e mecanorreceptores que informam sobre a eficiência da ventilação e do fluxo de ar na VAS.²⁴

Além de mecanismos funcionais que permitem o surgimento da apneia obstrutiva, a anatomia da faringe tem papel importante. A faringe é dividida em quatro subsegmentos anatômicos: nasofaringe, velofaringe ou orofaringe retropalatal, orofaringe retroglossal e hipofaringe (Figura 1A). O bloqueio da passagem de ar pode ocorrer em uma ou mais das regiões colapsáveis da faringe em indivíduos com apneia do sono. Mesmo durante a vigília estas regiões podem apresentar estreitamento.²⁵ A ausência de ossos ou cartilagens nestes segmentos faz com que a sua luz se mantenha pérvia por ação de músculos abdutores, os quais ativamente dilatam o lúmen da via aérea superior.²⁶

A região retropalatal da orofaringe é o local mais comum de colapso (Figura 1B), porém, o estreitamento das vias aéreas é um processo dinâmico e pode variar entre indivíduos incluindo, muitas vezes, as áreas retroglossal e hipofaringe.^{27,28} Em pacientes obesos com apneia obstrutiva do sono o colapso das VAS ocorre principalmente na orofaringe retropalatal, enquanto que em pacientes não obesos, a oclusão ocorre na orofaringe retropalatal e retroglossal, principalmente se houver retro/micrognatismo.²⁹

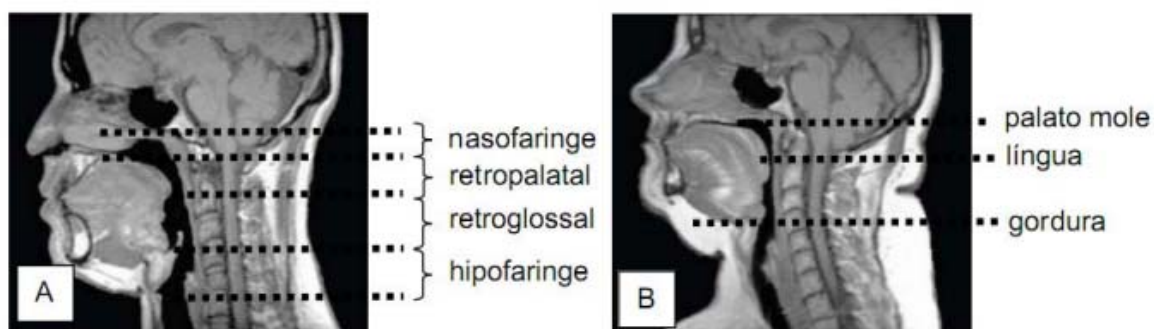


Figura 1- Imagem sagital, analisada por ressonância magnética de indivíduo normal e com apneia obstrutiva do sono. A: indivíduo normal e destacada as regiões da VAS. B: indivíduo com apneia do sono grave com destaque para os tecidos moles. O indivíduo B apresenta as regiões retropalatal e retroglossal da VAS mais estreitas, assim como o palato mole, a língua e a gordura subcutânea são maiores. Adaptada referência ³⁰

Estruturas de tecido mole formam as paredes da VAS, incluindo as tonsilas palatinas, palato mole, úvula, língua e parede lateral da faringe. A mandíbula e o osso hióide, onde os músculos e tecido moles se sustentam, são as principais estruturas ósseas craniofaciais que determinam o tamanho da via aérea. ²⁶ Uma mandíbula e maxila pequenas ou aumento de estruturas de tecido mole, como se encontra na obesidade, pode resultar em um tamanho da VAS reduzida; a combinação irá resultar em um tamanho lúmen ainda menor (Figura 2 e 3).²⁹

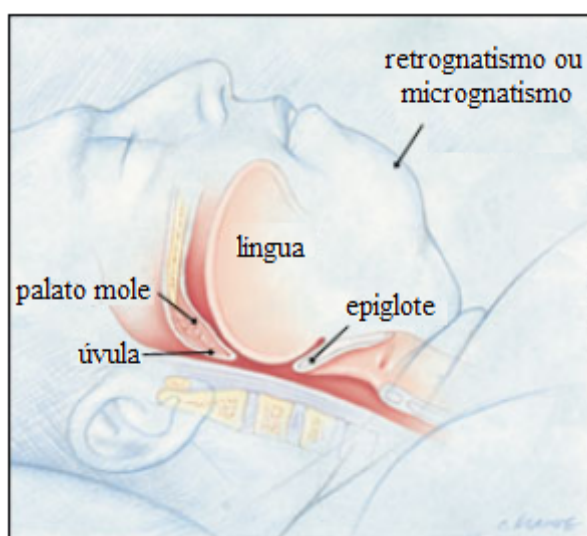


Figura 2 - Paciente obeso com retro/micrognatismo. Adaptada referência 31.

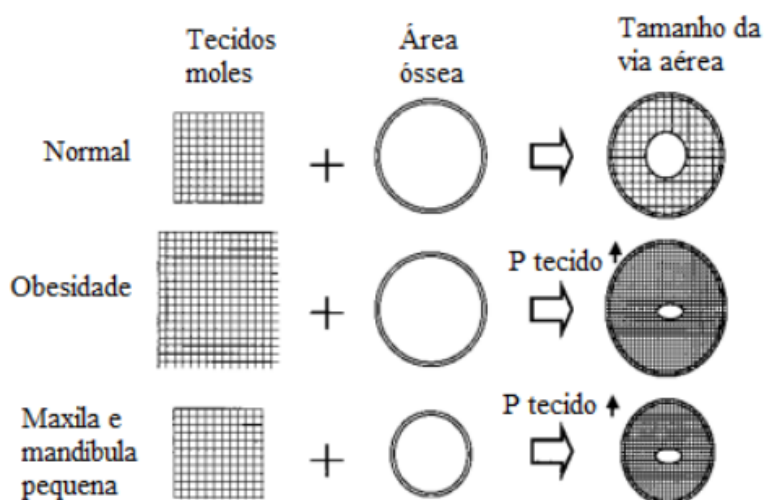


Figura 3 - Esquema do modelo mecânico do espaço aéreo faríngeo na apneia obstrutiva do sono. A interação entre os tecidos moles e as estruturas ósseas determina o tamanho da via aérea faríngea. P tecido = pressão tecidual em torno da via colapsável. Adaptada referência 29.

Em humanos, a obstrução da VAS durante o sono é mais prevalente, em parte, porque o osso hioide não é rigidamente preso às estruturas esqueléticas.^{5, 32} Em outros mamíferos, o osso hioide se fixa aos processos estiloides do crânio.^{33,34} Assim, a faringe humana não tem suporte rígido, exceto nos extremos superior e inferior onde ela está ancorada à rinofaringe e à laringe.

Pacientes obesos e com SAOS além de ter VAS anatomicamente menores³⁵ e queda na atividade dilatadora muscular das mesmas após início do sono,^{36,37,38} o volume pulmonar reduzido também contribui para a diminuição da função da VAS. Menor volume pulmonar expiratório final, como ocorre na obesidade, potencialmente reduz o grau de tração caudal exercida sobre a VAS e, portanto, aumenta propensão para o colapso.^{39,40,41}

Outro fator que contribui para o estreitamento das VAS é a instabilidade do controle ventilatório.⁴² Se o impulso respiratório é eliminado, como em uma apneia central, os músculos das vias respiratórias superiores também são desligados, resultando em estreitamento das vias aéreas.⁴³

O colapso parcial ou total da faringe durante uma apneia do sono causa aumento do esforço ventilatório estimulando o despertar do sono.¹⁶ Este despertar pode desempenhar um papel de resgate, abrindo as vias aéreas bloqueadas e permitindo a retomada da ventilação. Porém, se ocorrer prematuramente o despertar pode abortar o mecanismo compensatório de aumento da atividade dilatadora da faringe, que poderia abrir as VAS, sem interrupção do sono.⁴⁴ A excitação ventilatória durante o sono gera um curto período de hiperventilação e hipocapnia. A hipocapnia reduz o estímulo (“*drive*”) ventilatório e leva a instabilidade ventilatória, levando a hipoventilação. Como observado anteriormente, a instabilidade ventilatória por sua vez pode promover colapso das VAS, perpetuando a repetição de eventos obstrutivos.⁴⁵

Um possível fator que também contribui para a obstrução das VAS nos pacientes com SAOS pode ser deslocamento de fluidos das pernas para o pescoço durante o sono.^{46, 47, 48, 49} Durante a noite, a circunferência do pescoço aumenta e a circunferência das pernas diminui. Quando se mede por meio de bioimpedância o volume de líquido deslocado das pernas de homens não obesos com suspeita de SAOS, se observa que este volume apresenta forte correlação com a gravidade da apneia do sono, com a mudança na circunferência do pescoço, e com o tempo que o indivíduo passa sentado durante o dia.⁵⁰

A apneia do sono tem uma forte base genética, com 35-40% da variância atribuída a fatores genéticos.⁵¹ Há evidências em estudos raciais, familiares e de gêmeos de que os determinantes genéticos de atividade muscular da faringe, estrutura craniofacial, obesidade, distribuição de gordura, e controle respiratório podem interagir para causar AOS.^{52,53,54}

2.5 DIAGNÓSTICO

2.5.1 Sintomas

Os achados clínicos são a base para o diagnóstico da SAOS. Sonolência diurna, sono não reparador e insônia de manutenção do sono são as queixas mais comuns dos pacientes.⁵⁵ A entrevista clínica estruturada visa identificar pacientes que devam ser investigados por meio de polissonografia.⁵⁶

Os despertares noturnos repetitivos dos pacientes com SAOS resultam em sonolência diurna excessiva. A sonolência pode estar associada ou não à perda de funções cognitivas como memória, atenção e capacidade de aprendizagem.⁵⁷ Essas perdas cognitivas podem tanto ser secundárias à sonolência como devidas a dano cerebral causado pelos repetidos episódios de hipóxia intermitente. Em modelo animal, hipóxia intermitente causa morte dos neurônios corticais por apoptose.⁵⁸

Por causa da sonolência, pacientes com SAOS têm maior risco de acidentes de trabalho e automobilísticos.^{59, 60, 61} Este risco é especialmente alto em condutores profissionais.¹⁷ Mesmo que o tratamento da SAOS cause redução significativa do risco desses acidentes,⁶² os pacientes podem continuar se sentindo sonolentos. Modelo animal demonstrou a irreversibilidade da sonolência, em camundongos. Isso se deve a lesão no sistema nervoso central por reações de oxidação e nitração em áreas do prosencéfalo basal responsáveis pela manutenção da vigília.⁶³

O ronco, a queixa mais comum da SAOS, precede a queixa de sonolência diurna. A intensidade do roncar aumenta com consumo noturno de álcool.⁶⁴ O roncar nem sempre é preditor da SAOS,⁶⁵ no entanto, a probabilidade diminui com a ausência do ronco.⁶⁶ Ronco alto afeta negativamente o sono dos parceiros de cama, causando fragmentação do sono por despertares, posteriormente, resultando em diminuição da qualidade de vida.⁶⁷ Queixas como fadiga, diminuição da libido, cefaleia, distúrbios de humor ou de ansiedade,

dificuldade de concentração e irritabilidade também são comuns em pacientes com SAOS.

68

Apneia observada por testemunha é motivo comum para o encaminhamento a laboratório do sono.⁶⁹ Alguns pacientes despertam com sensação de ter parado de respirar, porém, a quase totalidade dos pacientes não está consciente das apneias, levando a que a doença seja cognominada – ironicamente – como “o mal silencioso”. As testemunhas costumam relatar súbita cessação do ronco, que geralmente dura de 20 a 30 segundos, seguida por ronco alto e retomada do ronco.⁷⁰

2.5.2 Polissonografia

A polissonografia, exame no qual é registrado múltiplas variáveis fisiológicas durante o sono, é considerada padrão áureo para o diagnóstico da SAOS.¹⁰ O exame pode ser realizado em laboratório do sono ou domicílio.⁷¹

No laboratório é possível estagiar o sono a partir dos registros de eletroencefalograma, o qual detecta atividade cerebral e padrões característicos que permitem o estagiamento do sono; eletrooculograma, que capta movimentos oculares horizontais e verticais; e eletromiografia que registra tono muscular, movimento das pernas e masseteres.⁷² Adicionalmente registram-se dados de eletrocardiograma, fluxo aéreo e movimentos torácicos e abdominais, que, juntamente com a saturação de oxigênio, revelam o desempenho respiratório e quantificam o número de apneias e hipopneias durante o sono.

2.5.3 Outros exames

A polissonografia realizada em domicílio utiliza monitores portáteis que têm sido propostos como método alternativo, para facilitar e tornar o diagnóstico da SAOS mais precoce.⁷³ Os monitores portáteis podem ter desde um único canal como a oximetria de pulso até a monitorização completa sem o acompanhamento de um técnico por toda a noite (Tabela 2).⁷⁴

Tabela 2: Tipos de polissonografia	
Tipo I	Polissonografia completa no laboratório com acompanhamento por um técnico durante toda a noite
Tipo II	Polissonografia completa no domicílio sem acompanhamento por técnico.
Tipo III	No mínimo quatro canais, incluindo fluxo aéreo, roncar, saturação de O ₂ e pulso.
Tipo IV	Um ou mais canais, no mínimo saturação de O ₂ .

O tipo mais comum de monitor portátil é o de tipo III (Figura 4 A e B). Quando comparados à polissonografia padrão, os monitores portáteis apresentam sensibilidade de 88 a 100% e especificidade e 79 a 88%.^{75, 76}

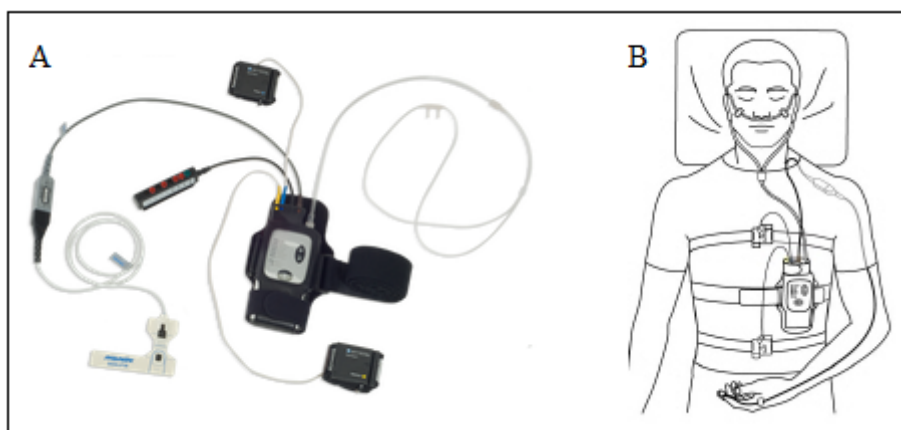


Figura 4 - A) Ilustração do monitor portátil tipo III. B) demonstração do paciente com o monitor.

A cefalometria permite avaliar as estruturas ósseas. Nos casos de micro ou retrognatismo (síndrome de Pierre Robin) ou deformidades do andar médio da face (síndrome de Crouzon) a cefalometria permite confirmar o defeito e indicar cirurgia buco-maxilo-facial corretiva. As medidas mais importantes da cefalometria são as que afetam diretamente o espaço aéreo posterior (EAP; Figura 5) A cefalometria é ferramenta útil de triagem para avaliar a gravidade da apneia obstrutiva do sono em pacientes que roncam.⁷⁷

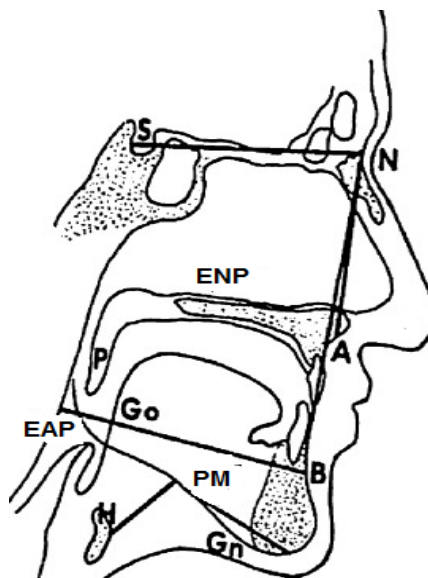


Figura 5 - Parâmetros de traçado cefalométrico. S: sela; N: násio; A: subespinhal; B: supramental; Go:gônio; Gn: gnátio; PM: plano mandibular, P: ponta do palato mole; H: hióide; ENP: espinha nasal posterior; EAP: espaço aéreo posterior. Adaptada referência 77.

2.5.5 Questionários

Questionários com algumas informações preditivas de transtornos do sono, entregues aos pacientes antes da avaliação formal, podem contribuir para a avaliação clínica.^{78,79} Os comumente utilizados são questionários autoaplicáveis com a finalidade de avaliar a qualidade do sono e sonolência diurna.⁸⁰

Exemplo de questionários com informações de transtornos do sono:

- *Sleep Apnea Scale of the Sleep Disorders Questionnaire*
- *Pittsburgh Sleep Quality Index*
- *Mini-sleep Questionnaire*
- *Sleep Quality Scale*
- *STOP Questionnaire*
- *Snoring Questionnaire*
- *Sleep Questionnaire*
- *Escala de sonolência de Epworth*

- *Questionário de Berlin*

2.6 REPERCUSSÕES CLÍNICAS DA SAOS

2.6.1 Comorbidades

As comorbidades da SAOS são devidas principalmente a dois fenômenos característicos da apneia do sono: 1) o despertar e 2) a hipóxia intermitente. O despertar causa aumento do tono simpático.⁸¹ A hipóxia intermitente causa liberação de radicais livres e estresse oxidativo. Também ativa mecanismos neuronais, humorais, trombóticos, metabólicos, e inflamatórios. As principais comorbidades da SAOS já confirmadas por artigos publicados em revistas de alto impacto estão na tabela 3.

Tabela 3: Principais comorbidades da SAOS

Comorbidades	Periódico e Ano
Cardiovasculares	
Hipertensão	N Engl J Med. 2000 ⁸² JAMA. 2000 ⁸³
AVC	N Engl J Med. 2005 ⁸⁴
Morte súbita	N Engl J Med. 2005 ⁸⁵
Arritmia	Am J Respir Crit Care Med. 2006 ⁸⁶
Coronariopatia	Lancet. 2005 ⁸⁷
Metabólicas	
Diabete	Thorax. 2009 ⁸⁸ Am J Respir Crit Care Med. 2005 ⁸⁹
Dislipidemia	Eur Respir J. 2006 ⁹⁰
Síndrome metabólica	N Engl J Med. 2011 ⁹¹

Estudos mostram correlação entre apneia do sono, inflamação, resistência à insulina e dislipidemia e a contribuição destas condições para aterosclerose e doença cardiovascular.^{92, 93} Devido à sua importante associação com problemas cardiovasculares e metabólicos, a apneia do sono tem sido tratada – mais do que como anormalidade respiratória – como doença sistêmica.^{92, 93 94}

As alterações glicolípídicas aumentam o risco cardiovascular. Acredita-se que a associação de diabetes e apneia do sono represente um duplo perigo, talvez sinérgico, para doença vascular isquêmica.⁹⁵ Mais adiante, a presente revisão terá seu foco na literatura específica da relação apneia do sono-diabete.

2.6.2 Tratamento

O tratamento mais eficaz da SAOS é a pressão positiva contínua das vias aéreas (em inglês, *continuous positive airway pressure* - CPAP). O CPAP mantém a pressão estável nas VAS ao longo do ciclo respiratório. Uma fonte de pressão de ar gera fluxos que são entregues às VAS através de uma máscara nasofacial (Figura 6 A e B). CPAP induz a permeabilidade das VAS durante a inspiração e expiração. Assim, ocorre diminuição das apneias, bem como eventos de dessaturação da oxihemoglobina.^{96, 97}

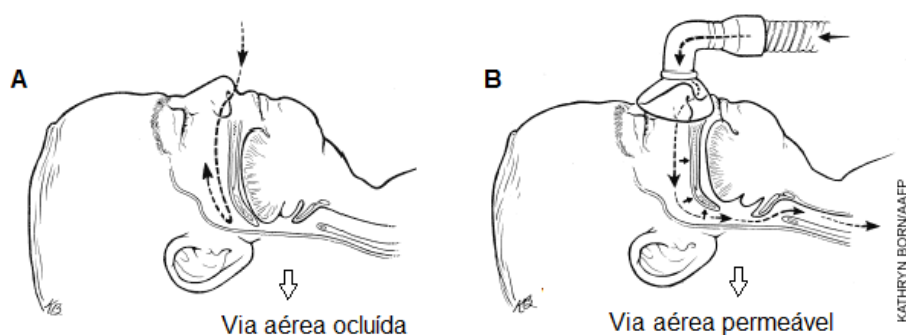


Figura 6- A) Apneia obstrutiva do sono (via aérea ocluída); B) A pressão de ar exercida pelo CPAP desobstrui a via aérea superior (via aérea permeável). Adaptada referência 98.

O CPAP é eficaz particularmente em pacientes com IAH acima de 15, mas ele também é recomendado para pacientes com apneia obstrutiva do sono sintomática, mesmo se o IAH for leve.^{99, 100} Devido à sua facilidade de aplicação e eficácia comprovada, o CPAP é considerado terapia de primeira linha para a apneia obstrutiva do sono grave.

2.7 MODELOS EXPERIMENTAIS DE APNEIA DO SONO

Investigar os mecanismos causadores de morbidade em humanos com distúrbios respiratórios do sono exige o controle de inúmeros fatores de confusão. A pesquisa com modelos de apneia do sono em animais permite a avaliação destes mecanismos sem a interferência dos fatores confundidores. Alguns modelos utilizam animais de médio porte como cães,^{101,102} porcos¹⁰³ ou gatos¹⁰⁴ para aplicar a obstrução experimental da via aérea superior. Modelos com esses animais fornecem informações importantes sobre consequências cardiovasculares e respiratórias, no entanto, aumentam o custo, exigem trabalho intensivo e limitam o número de animais por experimento. Modelos de hipóxia intermitente com pequenos animais, geralmente roedores, superam estas limitações.

Nos modelos mais complexos, o eletroencefalograma é monitorado e, apenas quando o animal adormece, a ventilação é interrompida e a hipóxia inicia. Quando retorna a vigília, a ventilação é restaurada.^{105, 106} A exposição dos animais à HI simula as apneias de forma não invasiva. A aplicação de hipóxia intermitente em ciclos de um minuto, durante determinado período, em geral de 8 horas, representa uma alternativa simples, permitindo fixar a dose de hipóxia intermitente e o grau de dessaturação da oxihemoglobina. Grande parte dos estudos utiliza esses modelos de HI em roedores, independente da presença de sono.

Os experimentos envolvem um sistema de controle de gás que regula o fluxo de ar ambiente, nitrogênio (N₂) ou nitrogênio mais gás carbônico (CO₂) em câmaras

personalizadas. A maioria dos estudos que utiliza esse sistema expõem os roedores à períodos de hipóxia e reoxigenação durante a fase de luz, o período de sono dos roedores, e são desligados durante a fase de escuro quando os roedores estão em vigília.

O principal objetivo é manter o protocolo de experimentação o mais próximo possível da apneia do sono observada clínica. Na apneia obstrutiva do sono, o paciente sofre hipercapnia e hipóxia simultaneamente, ou seja, asfíxia. Muitos modelos de HI utilizam somente N₂ na câmara, desta forma, os animais hiperventilam, por causa da hipóxia, e sofrem hipocapnia intermitente. Modelos de hipóxia intermitente isocápnica obtêm alterações mais rapidamente, por acrescentar de CO₂ ao N₂ inalado. Este modelo reproduz melhor a asfíxia que ocorre na AOS. Modelos em roedores geralmente utilizam HI com nadir da fração inspirada de oxigênio (FiO₂) entre 5% e 10%, ciclos de 9 à 60 vezes por hora e com períodos de 6 à 12 horas por dia.^{107,108,109.}

A pesquisa com modelos de hipóxia intermitente permite obter nos roedores as mesmas consequências cardiovasculares observadas em pacientes com AOS: hipertensão¹¹⁰, danos do miocárdio,¹¹¹ disfunção ventricular esquerda,¹¹² vasoconstrição,¹¹³ e aterosclerose¹¹⁴. A compreensão dos mecanismos envolvidos nas consequências neurocognitivas também foi melhorada por meio da pesquisa animal de AOS: alterações neuronais e cerebrais¹¹⁵ e disfunções cognitivas¹¹⁶. Os modelos animais também são utilizados para investigar os mecanismos de inflamação e disfunção das vias aéreas superiores.^{117, 118} Além disso, é possível avaliar as consequências sistêmicas e metabólicas de AOS: inflamação,¹¹⁹ resistência à insulina,¹²⁰ alterações no metabolismo lipídico¹⁰⁹ e morbidade hepática^{121, 122.}

2.8 ALTERAÇÕES METABÓLICAS NA APNEIA DO SONO

Apneia do sono se associa à transtornos metabólicos. O conjunto de transtornos metabólicos mais comuns: obesidade, dislipidemia, hiperglicemia, resistência à insulina e hipertensão arterial tem sido chamado por alguns autores de síndrome metabólica. Esta, por reunir fatores de risco reconhecidos, se associa a aumento do risco de doenças cardiovasculares.^{123, 124, 125} De acordo com o “*National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatment Panel III (ATP III)*” indivíduos que preenchem três ou mais dos seguintes critérios podem ser classificados como portadores dessa síndrome: obesidade abdominal com circunferência da cintura >102 cm em homens e > 88 cm nas mulheres, elevados níveis séricos de triglicerídeos (>150mg/dl), baixos níveis séricos de lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol < 40mg/dl em homens e < 50mg/dl em mulheres), hipertensão (>130/85mmHg), resistência à insulina e glicose em jejum (>110mg/dl).^{126, 127, 128}

A síndrome metabólica, também é chamada de Síndrome X. Muitas de suas características são vistas na SAOS. Dentre elas a principal é a obesidade. A combinação de Síndrome X e apneia do sono é chamada, ironicamente de "Síndrome de Z".¹²⁹

A apneia do sono se associa com cada um dos componentes da síndrome metabólica.¹³⁰ Indivíduos com apneia do sono apresentam de 6 a 9 vezes mais probabilidade de ter síndrome metabólica do que indivíduos sem apneia.¹³¹ A evidência ligando apneia do sono a transtornos metabólicos é extensa. As referências de estudos em humanos mais recentes estão na Tabela 4.

Além da extensa literatura em pacientes com apneia do sono, investigaram-se as consequências metabólicas da hipóxia intermitente em animais. A relação dos estudos em animais, usando diversos modelos de hipóxia intermitente, estão na Tabela 5.

Tabela 4: Estudos em humanos sobre apneia do sono e transtornos metabólicos

Autor e ano	Objetivos	Metodologia	Parâmetros avaliados	Resultados
Bonsignore et al. ¹³² 2012	Avaliar a prevalência de SMet e associação com resistência à insulina e sonolência diurna em pacientes com SAOS	529 pacientes com SAOS que realizaram PSG completa	- Escala de Sonolência de Epworth Parâmetros para a SMet: circunferência da cintura, TRI, CT, HDL, PA e GLI. - HOMA-IR	- A prevalência da SMet foi de 51,2% e aumentou com a gravidade da SAOS. - O número de componentes da SMet aumentou com HOMA-IR
Weinstock et al. ¹³³ 2012	Analisar se o tratamento com CPAP em pacientes com AOS: - normaliza a tolerância diminuída à glicose - melhora a resistência a insulina	50 indivíduos com IAH>15, avaliados por PSG, e tolerância à glicose diminuída. - 8 semanas de tratamento com CPAP ou CPAP sham	GLI, Insulina, Glicose e Insulina após TOTG Resistência à Insulina	- Após CPAP: - Índice de tolerância à glicose não normalizou - Pacientes com IAH≥ 30 melhoraram a sensibilidade à insulina
Sharma et al. ⁹¹ 2011	Verificar se o tratamento com CPAP altera componentes da SMet em pacientes com SAOS	- 86 pacientes com SAOS, avaliados por PSG, submeteram-se a 3 meses de CPAP terapêutico, seguido de 3 meses de CPAP simulado, ou vice-versa. - Os parâmetros analisados foram realizados antes e após cada intervenção.	Variáveis antropométricas, PA, GLI, resistência à insulina, perfil lipídico no sangue em jejum, níveis de hemoglobina glicada, relação da espessura das camadas íntima e média, e gordura visceral.	- 87% dos pacientes tinham SMet - <u>Tratamento com CPAP:</u> - diminuiu PA, CT, não-HDL, LDL, TRI e hemoglobina glicada - A frequência da SMet reduziu após a terapia com CPAP
Theorell-Haglöw et al. ¹³⁴ 2011	Avaliar a associação entre AOS e SMet em amostra populacional de mulheres	400 mulheres realizaram PSG e coleta de sangue venoso em jejum -2 grupos: IAH ≥15 ou IAH <15	- GLI, TRI, HDL e PA Variáveis antropométricas: peso, altura, circunferência da cintura e circunferência do quadril	- Todos os componentes da SMet foram mais comuns em mulheres com SAOS. - A prevalência da SMet aumenta com a idade e com o IAH. -A gravidade da AOS foi associada à SMet.
Trombetta et al. ¹³⁵ 2010	Examinar se a presença de AOS em pacientes com SMet afeta variáveis hemodinâmicas e autonômicas relacionadas com o desfecho cardiovascular.	36 pacientes com SMet, divididos em 2 grupos: 1) SMet + AOS 2) SMet –AOS AOS: avaliada por PSG IAH> 15	Circunferência da cintura, TRI, HDL, PA, GLI, atividade nervosa simpática muscular, FC e sensibilidade do barorreflexo	Pacientes com SMet + AOS tiveram PA mais elevada, maior atividade nervosa simpática muscular, e diminuição da sensibilidade do barorreflexo em comparação ao SMet – AOS.
Tkacova et al. ¹³⁶ 2008	Determinar se AOS relaciona-se o risco cardiovascular com da SMet independente da obesidade e resistência à insulina	Total de 98 pacientes: - 28 sem AOS - 39 com AOS leve à moderada - 31 com AOS grave AOS foi diagnosticada por PSG	Circunferência da cintura, CT, TG, HDL, LDL, GLI e PA.	SMet foi associada com gravidade da SAOS AOS grave foi associada com o aumento do HOMA-IR, PA, TRI e GLI

Continuação Tabela 4

Autor e ano	Objetivos	Metodologia	Parâmetros avaliados	Resultados
Gruber et al. ¹³⁷ 2006	Definir as interações entre AOS e vários fatores de risco cardiovascular independentes da obesidade.	38 pacientes com SAOS e 41 controles.	Variáveis antropométricas, GLI, TRI, HDL, CT, insulina, PA e HOMA-IR	A prevalência de SMet foi maior em pacientes com SAOS. A resistência à insulina não foi associada com SAOS, independente da obesidade.

Legenda: CPAP: pressão positiva contínua nas vias aéreas; CT: colesterol total em jejum; FC: frequência cardíaca; GLI: glicemia de jejum; HDL: lipoproteína de alta densidade em jejum; HOMA-IR: Modelo de avaliação da homeostase utilizado para quantificar a resistência à insulina; IAH: índice de apneia/hipopneia por hora de sono; LDL: lipoproteína de baixa densidade em jejum; PA: pressão arterial; PSG: polissonografia; SMet: síndrome metabólica; TOTG: teste oral de tolerância à glicose; TRI: triglicérides em jejum.

Tabela 5: Estudos em animais sobre apneia do sono e transtornos metabólicos

Autor e ano	Espécies	Metodologia	Modelo da Hipóxia	Parâmetros avaliados	Resultados
Reinke et al. ¹³⁸ 2011	Camundongos C57BL/6J	HI ou HS ou AI com/ sem dieta rica em gordura	1) HI 60 vezes/h FIO2 5%, ciclos de 30s, 12 horas 2) HI 12 vezes/h FIO2 5%, ciclos de 5 minutos, 12 horas 3) Hsust, FIO2 10% sustentado 12 horas	CT, TRI, GLI, Insulina	<u>Camundongos não obesos:</u> - Grupo 1: aumentou GLI, reduziu TRI - Grupo 2: aumentou GLI, CT; reduziu TRI - Grupo 3: aumentou GLI <u>Camundongos obesos:</u> - Grupo 1: aumentou GLI e insulina - Grupo 3: aumentou GLI e insulina; reduziu TRI
Drager et al. ¹³⁹ 2011	Camundongos C57BL/6J	HCI ou AI + dieta rica em gordura HCI ou AI + dieta padrão	HCI FIO2 6-7%, ciclos de 30s, 60vezes/h, 12h/dia, 4 semanas	GLI, TITG, insulina, HOMA, CT, AGL, TRI	<u>Camundongos não obesos:</u> -HCI diminuiu peso e aumentou HOMA - <u>Camundongos obesos:</u> -HCI aumentou GLI, insulina e HOMA
Savransky et al. ¹⁴⁰ 2008	Camundongos C57BL/6J	HCI ou AI + dieta rica em gordura	HCI FIO2 5%, ciclo de 30s, 60 vezes/h, 12h/dia, 10 semanas	CT, TG, GLI, insulina	-HCI aumentou CT
Savransky et al. ¹²¹ 2007	Camundongos C57BL/6J	HCI ou AI	HCI FIO2 5%, ciclos de 30s, 60vezes/h, 12h/dia, 12semanas	CT, LDL, HDL, TG, GLI e insulina	- HCI aumentou GLI, CT e TG - HCI diminuiu insulina

Continuação Tabela 5

Autor e ano	Espécies	Metodologia	Modelo da Hipóxia	Parâmetros avaliados	Resultados
Iiyori et al. ¹²⁰ 2007	Camundongos C57BL/6J	HI ou AI	FIO2 5-6%, ciclos de 30s, 60 vezes/h, 9 horas	- GLI e insulina; -Produção hepática de glicose; - Utilização muscular de glicose; - Sensibilidade à insulina.	- HI aumentou GLI, diminuiu a sensibilidade à insulina e reduziu a utilização muscular de glicose, sem alterar a produção de glicose hepática.
Li et al. ¹⁴¹ 2007	Camundongos C57BL/6J	HCI ou AI	HCI FIO2 10% ou 5%, ciclos de 30s, 60 vezes/h, 12h/dia, 4semanas	CT, LDL, HDL, FL, TG e insulina	- <u>HCI 5% vs. AI</u> : aumentou CT, LDL, HDL, FL e TRI - <u>HCI 5% vs. HCI 10%</u> : aumentou CT, LDL e HDL e diminuiu TG
Li et al. ¹⁰⁹ 2005	Camundongos C57BL/6J (não obeso) e camundongos deficientes de leptina C57BL/6J- Lep (obesos)	HI ou AI	FIO2 5%, ciclos de 30s, 60 vezes/h, 12h/dia 5 dias	CT, HDL, LDL, FL, TG, GLI e insulina	- HI em camundongos não obesos aumentou CT, HDL, FL e TG
Polotsky et al. ¹⁴² 2003	Camundongos C57BL/6J (não obesos) e camundongos deficientes de leptina C57BL/6J- Lep(obesos)	HCI ou AI	<u>HCI 5 dias</u> : FIO2 5%, ciclos de 30s, 60 vezes/h, 16 h/dia <u>HCI 12 semanas</u> : FIO2 5%, ciclos de 30s, 60 vezes/h, 12 h/dia	GLI, Insulina, HOMA e TITG	<u>Camundongos não obesos HCI 5 dias</u> : diminuiu GLI e HOMA; melhorou o TITG <u>Camundongos obesos HCI 5 dias</u> : diminuiu GLI, aumentou HOMA e insulina, melhorou o TITG. <u>Camundongos obesos HCI 12 semanas</u> : aumentou insulina e piorou o TITG

Legenda: AGL: Ácidos graxos livres em jejum; AI: ar intermitente; CT: colesterol total em jejum; FIO2: fração inspirada de oxigênio; FL: fosfolipídios; GLI: glicemia de jejum; HDL: lipoproteína de alta densidade em jejum; HI: hipóxia intermitente; HIC: hipóxia crônica intermitente; HOMA-IR: Modelo de avaliação da homeostase utilizado para quantificar a resistência à insulina; HOMA-β: Modelo de avaliação da homeostase para avaliar a função das células beta do pâncreas. HSI: hipóxia sustentada isobárica; LDL: lipoproteína de baixa densidade em jejum; PA: pressão arterial; TG: triglicérides em jejum; TITG: teste intraperitoneal de tolerância à glicose.

2.8.1 Apneia do sono e dislipidemia

Alguns estudos da tabela 4 e 5 mostram evidências de que a apneia do sono está associada com a dislipidemia.^{91, 109, 121, 140, Erro! Indicador não definido.} O aumento do risco

cardiovascular em pacientes com apneia do sono é atribuído, pelo menos em parte, com as anormalidades induzidas pela hipóxia intermitente.^{114, 143, 144, 145} No entanto, o papel da apneia do sono na causalidade da dislipidemia ainda não foi estabelecido.

A evidência clínica atual apoiando o impacto da apneia do sono na dislipidemia é escassa. A maioria dos estudos são transversais e não randomizados com número pequeno de pacientes. Diversos estudos mostram diminuição no HDL-colesterol e aumento nos triglicerídeos.^{145, 146, 90, 147} A maioria dos estudos, porém, sugere que o colesterol total e a lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol) não estão aumentados em pacientes com apneia do sono quando comparado aos controles.^{145, 146, 147, 148}

O tratamento para apneia do sono com CPAP demonstra na maioria dos estudos diminuição no colesterol total^{91, 149, 150, 151} LDL-colesterol^{91, 149, 151, 152, 153} e triglicerídeos.^{91, 150, 153} Os dados sobre o HDL-colesterol são variados, alguns estudos tiveram como resultado aumento^{152, 153} ou nenhum efeito.^{149, 150, 151}

Em modelo animal de apneia do sono Li et al.¹⁰⁹ examinaram os efeitos da HI durante 5 dias sobre os níveis de lipídeos séricos na ausência e presença de obesidade. Em camundongos magros, a exposição à HI aumentou níveis de colesterol total, HDL-colesterol, fosfolípidos, e triglicerídeos, bem como triglicerídeos do fígado. Estas alterações não foram observadas em ratos obesos. Savransky et al.¹²¹ utilizaram HI durante 84 dias em camundongos C57BL/6J e observaram aumento de colesterol total e triglicerídeos, sem alteração nos níveis de LDL/HDL-colesterol. Em 2007 Li et al.^{Erro!} **Indicador não definido.** relataram que o grau de desregulação lipídica é dependente da gravidade do estímulo hipóxico. Hipóxia moderada não induziu hiperlipidemia. Já os camundongos expostos à hipóxia intermitente grave apresentaram aumentos significativos de colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol e triglicerídeos quando comparado aos controles.

Em geral, não há nenhuma evidência definitiva sobre o efeito da apneia do sono sobre o perfil lipídico. Assim, é importante aprofundar os conhecimentos nesta área, tanto nos cenários clínicos quanto nos experimentais.

2.8.2 Apneia do sono, resistência à insulina e diabetes

A associação entre apneia obstrutiva do sono e alterações do mecanismo de controle da glicose é suportada por um grande conjunto de estudos. Esses estudos sugerem a existência da relação independente entre os marcadores de gravidade da apneia do sono, resistência à insulina e consequentemente aumento do risco de diabetes mellitus tipo 2. Na resistência à insulina há diminuição da resposta dos tecidos periféricos a ação da insulina, assim as células-beta do pâncreas aumentam a produção de insulina na tentativa de manter a normoglicemia. Esta condição precede a evolução da diabetes tipo 2. A pesquisa clínica no entendimento da associação da SAOS e resistência à insulina não está tão avançada por que, como regra, o laboratório do sono não é primariamente aparelhado para pesquisa com fisiologia “úmida”, envolvendo coleta de fluidos corporais como sangue, urina ou líquido.

2.8.2.1 Diagnóstico da resistência à insulina

O diagnóstico da resistência à insulina requer dosagens repetidas de glicose, como no teste oral de tolerância à glicose (TOTG), ou no mínimo, uma dosagem de glicose e uma de insulina, como no modelo de avaliação da homeostase, o índice HOMA.¹⁵⁴ O teste de tolerância à glicose intravenosa (TTGIV) é outra avaliação metabólica já utilizada na pesquisa em pacientes com apneia do sono. O teste padrão-áureo na sensibilidade à insulina é o teste de *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico.¹⁵⁵ Este teste é pouco utilizado na pesquisa clínica devido às exigências técnicas. Assim, os desafios da avaliação dos parâmetros envolvidos na homeostase da glicose interferem na evolução da investigação da relação entre diabetes e apneia do sono.

2.8.2.2 Estudos clínicos e experimentais

Estudos clínicos mostram a associação positiva, independente da obesidade, entre a gravidade da SAOS e os índices de resistência à insulina. Ip et al.¹⁵⁶ investigaram a relação entre distúrbios respiratórios do sono e resistência à insulina, indicado pelo nível de insulina sérica em jejum e índice de resistência à insulina (HOMA-IR), em 270 pacientes. Associação entre SAOS e resistência à insulina foi observada em indivíduos obesos e não obesos. Cada apneia ou hipopneia adicional por hora de sono aumentou o nível de insulina em jejum e HOMA-IR cerca de 0,5%.

Punjabi et al.¹⁵⁷ avaliou a associação entre distúrbios respiratórios do sono, intolerância à glicose e resistência à insulina em um subconjunto de 2.656 pacientes do Sleep Heart Health Study. Após ajuste para idade, índice de massa corpórea, circunferência da cintura, raça, sexo e tabagismo, indivíduos com apneia grave tiveram elevação nos níveis de glicemia em jejum e nos níveis de glicose após TOTG de 2 horas. Além disso, estes pacientes tiveram índice de HOMA-IR elevado. Os resultados deste estudo fornecem evidências de que os distúrbios respiratórios do sono estão associados com intolerância à glicose e resistência à insulina independentemente das variáveis de confusão. Este foi um dos maiores estudos epidemiológicos que avaliou apneia do sono por polissonografia e quantificou parâmetros de glicemia e insulinemia.

A relação entre o uso de CPAP e índices de resistência à insulina tem sido o foco de vários estudos recentes em pacientes com SAOS. Weinstock et al.¹³³ analisaram em 50 pacientes com IAH>15, se o tratamento com 8 semanas de CPAP normalizaria a tolerância diminuída à glicose e melhoraria a resistência à insulina. Após CPAP o índice de tolerância à glicose não normalizou e pacientes com IAH \geq 30 diminuíram a resistência à insulina.

Na apneia, o sono é fragmentado por despertares respiratórios. Stamatakis et al.¹⁵⁸ utilizaram estímulos auditivos e mecânicos, em 11 indivíduos saudáveis, para provocar

despertares e reproduzir a fragmentação do sono na apneia. A hipótese era que a fragmentação do sono experimental, em todos os estágios do sono, alteraria o metabolismo da glicose. Os indivíduos tiveram o sono de duas noites fragmentado de 30 a 40 vezes por hora. A indução da fragmentação do sono experimentalmente causou diminuição de 20,4% no índice de sensibilidade à insulina, avaliada pelo TTGIV.

Em modelo experimental animal de apneia do sono, Iiyori et al.¹²⁰ mostraram aumentar a resistência à insulina avaliada pelo teste de *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico, em camundongos não-obesos submetidos à hipóxia intermitente durante 9 horas, 60 ciclos / hora, com nadir FiO₂ de 5-6%. Este aumento na resistência à insulina pareceu ser independente da atividade do sistema nervoso simpático, pois persistiu quando o sistema nervoso autônomo foi quimicamente bloqueado.

Polotsky et al.¹²⁸, observaram em camundongos obesos, aumento da resistência à insulina após exposição de 12 semanas de hipóxia intermitente. Este aumento não foi observado na hipóxia intermitente de 5 dias, em camundongos obesos e não-obesos, houve porém, uma diminuição da resistência à insulina. Neste estudo, níveis deficientes de leptina foram identificados como um fator de ligação a hipóxia intermitente e resistência à insulina.

Hipóxia intermitente, aumento do estresse oxidativo, desregulação do eixo hipotálamo-hipófise, disfunção endotelial, alterações na liberação de citocinas e adipocina, ativação de vias inflamatórias, bem como despertares associados com a ativação do sistema nervoso simpático e fragmentação do sono, são mecanismos potenciais para o metabolismo anormal da glicose em pacientes com SAOS.^{159,160} O aumento do estresse oxidativo está relacionado com o aparecimento da diabetes.¹⁶¹ A hipóxia intermitente ocasiona aumento do estresse oxidativo,^{122,162,58,163} portanto, este pode ser outro

mecanismo contribuinte para a resistência à insulina e o desenvolvimento da diabetes em pacientes com apneia do sono.

2.9 PROTEÍNAS DESACOPLADORAS

As proteínas desacopladoras (*uncoupling proteins*; UCPs) estão localizadas na membrana interna da mitocôndria. Os mamíferos expressam cinco homólogos da UCP, da UCP1 até a UCP5.¹⁶⁴ Elas pertencem à superfamília de proteínas transportadoras de prótons e elétrons do espaço intermembranas para a matriz mitocondrial, disseminando o gradiente de prótons através da membrana interna da mitocôndria.¹⁶⁵

No processo de síntese de trifosfato de adenosina (ATP), a cadeia respiratória transporta prótons e elétrons através da membrana interna da mitocôndria para o espaço intermembranas, criando um gradiente de prótons. Os prótons, ao retornarem do espaço intermembranas para o interior da matriz mitocondrial, entregam energia para as proteínas ATP-sintases fosforilarem difosfato de adenosina (ADP) e sintetizarem ATP, em uma complexa reação em que a enzima gira em torno de seu eixo. Assim como a ATP-sintase, a UCP também está localizada na membrana interna e serve como um canal para que os prótons atravessem de volta para a matriz sem participar da síntese de ATP.¹⁶⁶ A ativação da UCP abre uma rota alternativa que rouba a energia da fosforilação do ADP, gerando apenas calor. A ativação desse caminho de translocação de prótons para a matriz mitocondrial resulta, indiretamente, em maior oxidação de substratos energéticos, diminuindo a eficiência da síntese de ATP e produzindo mais calor, com implicações na regulação da temperatura, do gasto energético e do peso corporal.¹⁶⁷ Portanto, o mecanismo de ação da UCP é desacoplar a fosforilação oxidativa da molécula de ADP.¹⁶⁸

2.9.1 Proteína Desacopladora 2 (UCP2)

A existência de UCP2 foi descrita em 1997 em vários tecidos.¹⁶⁹ A UCP2, como as demais UCPs, influencia a fosforilação oxidativa mitocondrial. A expressão da UCP2 ocorre em tecido adiposo marrom e branco, músculo esquelético e ilhotas pancreáticas. Nas células beta pancreáticas, regula a secreção da insulina.

Aumento da presença de UCP2 no pâncreas regula negativamente a secreção de insulina. O aumento na concentração de glicose plasmática causa maior influxo de glicose para as células β , via o transportador de glicose GLUT2. A maior disponibilidade de glicose aumenta síntese de ATP e conseqüentemente a razão ATP/ADP. Os canais de potássio ATP-dependentes (K_{ATP}) da célula beta se fecham quando essa razão aumenta, provocando a despolarização da membrana plasmática. A liberação de insulina dos seus grânulos ocorre em função da despolarização, pelo influxo de cálcio. A UCP2, por atenuar a síntese de ATP, diminuindo a taxa de despolarização e de secreção de insulina (Figura 7).¹⁷⁰

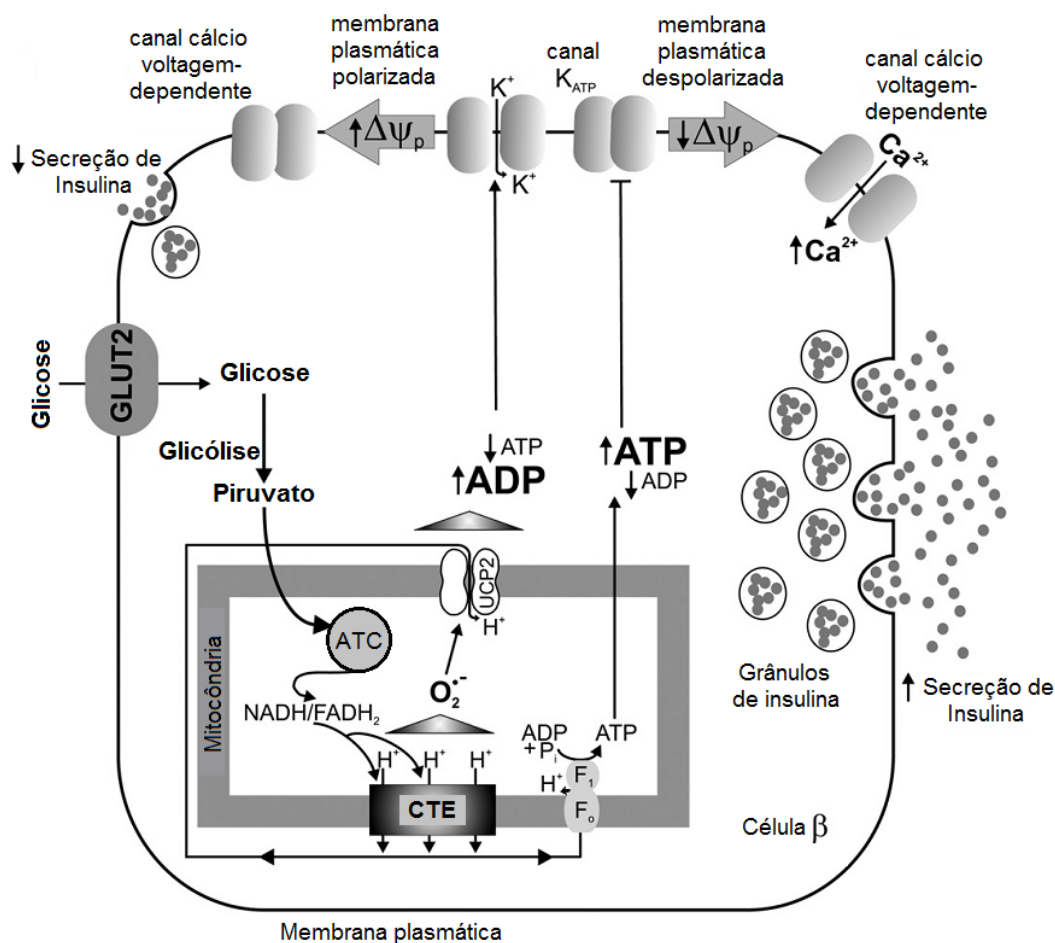


Figura 7 - Modelo esquemático da função da UCP2 nas células β pancreáticas. O aumento da concentração plasmática de glicose (1) eleva a concentração citoplasmática (2). A absorção ocorre através do transportador de glicose na membrana (GLUT2). Isto aumenta o fornecimento de piruvato para o ciclo mitocondrial do ácido tricarboxílico (ATC), o que leva a um aumento na proporção NADH / NAD⁺, elevação da força próton-motriz da ATP-sintase através da cadeia de transporte de elétrons (CTE) e aumento da síntese de ATP. O aumento na razão ATP/ADP (3) provoca o fechamento dos canais de K_{ATP}, levando a despolarização do potencial de membrana plasmática ($\Delta\psi$) e influxo de Ca²⁺. Os íons de cálcio provocam alteração conformacional dos grânulos para a membrana possibilitando a liberação de insulina. Elétrons provenientes da CTE reduzem o O₂ a ânion radical superóxido (O₂⁻). Se ocorrer acúmulo de superóxido, a UCP2 será ativada. Esta dissipa prótons, reduz a força próton-motriz, provocando diminuição da proporção de ATP/ADP (4), abertura dos canais de K⁺ e, como consequência, menor secreção de insulina. Adaptada referência 170.

A mitocôndria é a principal fonte de espécies reativas de oxigênio (EROs) na célula.¹⁷¹ As células aeróbicas produzem constantemente EROs, tais como ânion superóxido (O₂⁻) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂).¹⁷² Por serem citotóxicas quando acumuladas, contribuem na etiologia de diversas doenças, dentre elas a diabete.¹⁷³ As EROs, porém, são importantes fatores em processos normais de transdução de sinais celulares.¹⁷⁴ Nas células β pancreáticas, além de ATP e a relação ATP/ADP, as EROs derivadas do metabolismo da

glicose servem como estímulos adicionais para a secreção de insulina glicose-estimulada.¹⁷⁵ A UCP2 tem papel na regulação negativa das EROs derivadas da mitocôndria.

As EROs estão presentes normalmente em todas as células aeróbias, em equilíbrio com antioxidantes. Quando há interrupção neste equilíbrio ocorre estresse oxidativo que pode ser causado pelo excesso de EROs, depleção de antioxidantes, ou ambos. A superexpressão da UCP2 em células β , in vitro, protege contra danos oxidativos.¹⁷⁶ A ausência aguda de UCP2 em ilhotas de camundongos resulta em diminuição da glutatona reduzida e aumento de sua forma oxidada, bem como níveis elevados de nitrotirosina, sugerindo estresse oxidativo. Contrariamente, a ausência crônica da UCP2 faz com que o estresse oxidativo em ilhotas pancreáticas, se acompanhe por secreção de insulina prejudicada.¹⁷⁷

O superóxido pode inibir a secreção de insulina ativando a UCP2.^{178, 179} Em condições que causam disfunção das células β pancreáticas, por exemplo, hiperglicemia, hiperlipidemia e obesidade, ocorre aumento da concentração de $O_2^{\cdot-}$,¹⁸⁰ bem como a aumento da expressão do mRNA da UCP2 e concentração da proteína^{181,182,183}. Ativação da UCP2 pode funcionar como resposta adaptativa ao estresse oxidativo e ter papel determinante no surgimento de diabete. O papel de sinalização das EROs na produção de insulina glicose-estimulada juntamente com regulação negativa das EROs derivadas da mitocôndria suporta o papel da UCP2 como supressora da secreção de insulina endógena.¹⁸⁴

O gene da UCP2 se localiza no cromossomo 11, região 11q13, em humanos (Figura 8).¹⁸⁵ Em camundongos, se localiza no cromossomo 7, região 7qE3 (Figura 9).¹⁸⁶



Figura 8 - Localização genômica do gene da UCP2 em humanos.¹⁸⁵

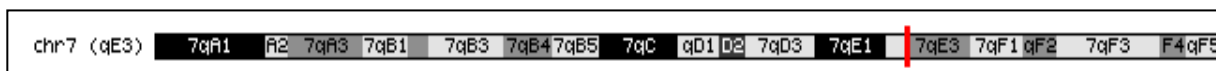


Figura 9 – Localização genômica do gene da UCP2 em camundongos.¹⁸⁶

Os polimorfismos do gene da UCP2 podem representar a principal chave para a herança genética da diabetes.^{187, 188} Dentre os polimorfismos mais estudados se destacam os seguintes: -866G/A (rs659366) na região promotora;¹⁸⁹ Ala55Val (C/T; rs660339) no éxon 4;¹⁹⁰ e Ins/Del, que é uma inserção/ deleção de 45pb na região 3'NTR (3' não traduzida) do éxon 8.¹⁹¹ Os estudos do papel desses polimorfismos na gênese da diabetes têm resultados variados. Enquanto alguns demonstraram relação de um ou mais destes polimorfismos com níveis de secreção de insulina pelas células β pancreáticas, resistência à insulina e diabetes,^{189, 192, 193, 194, 195} outros estudos não encontraram qualquer associação.^{190,191, 196, 197}

Polimorfismos na região codificadora do gene da UCP2 foram associados com o nível de gasto de energia durante o sono. A média de gasto energético durante o sono de indivíduos heterozigotos para o polimorfismo Ala/Val no éxon 4 da UCP2 foi 153 kcal/ dia superior à homozigotos Ala/Ala e 52 kcal/dia superior à homozigotos Val/Val, ajustado para o índice de massa magra e massa gorda. Em indivíduos heterozigotos para o polimorfismo Ins/Del na região 3'NTR do éxon 8, a média de gasto energético durante o sono foi maior do que os homozigotos Del/Del e Ins/Ins. Esses achados indicam que a UCP2 merece ser estudada na apneia do sono, doença que aumenta o consumo de energia durante o sono e está fortemente associada a desequilíbrio do gasto energético.

3. JUSTIFICATIVA

Considerando-se que:

1. A síndrome metabólica é comum em pacientes com apneia do sono;
2. Existe, aparentemente, um elo entre apneia do sono e síndrome metabólica;
3. Os mecanismos fisiopatológicos da relação entre apneia do sono e síndrome metabólica ainda não estão completamente esclarecidos;
4. A UCP2 é um regulador negativo da secreção de insulina potencialmente envolvido na gênese da diabetes;
5. Os estudos em humanos são de difícil execução e confundidos devido ao efeito da obesidade;
6. Os estudos experimentais usando modelos em animais da apneia do sono contribuíram significativamente para os avanços na compreensão da fisiologia e fisiopatologia da obesidade, resistência à insulina e diabetes;
7. Investigar o papel da UCP2 como potencial elo entre secreção de insulina e apneia do sono agregará informação relevante para o avanço do conhecimento nesta área ...

... decidiu-se empreender o primeiro estudo a investigar a relação da hipóxia intermitente isocápnica com a expressão da UCP2 pancreática e o desenvolvimento das alterações metabólicas.

4. OBJETIVOS

Geral

Investigar o efeito da hipóxia intermitente sobre a expressão da UCP2 no pâncreas e o metabolismo glicolipídico.

Específicos

- Investigar o efeito da hipóxia intermitente sobre os níveis de mRNA da UCP2 medidos por PCR em tempo real em células pancreáticas.
- Investigar o efeito da hipóxia intermitente sobre glicose, insulina e o modelo de avaliação da homeostase (HOMA).
- Investigar efeito da hipóxia intermitente sobre a área de células beta e alfa.
- Investigar o efeito da hipóxia intermitente sobre o perfil lipídico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA

¹ Carkasdon MA, Dement, WC. Normal human sleep: na overview. In: Principles and Practice of Sleep Medicine, 4th Edition; edited by Meir H. Kryger, Thomas Roth, and William C. Dement, Elsevier Saunders; 2005.

² Martinez D. Prática da medicina do sono. São Paulo, BYK, 1999: 27-28

³ Porkka-Heiskanen T, Kalinchuk AV. Adenosine, energy metabolism and sleep homeostasis. Sleep Med Rev. 2011;15:123-35.

⁴ Banno K, Kryger MH. Sleep apnea: clinical investigations in humans. Sleep Med. 2007;8:400-426

⁵ Dempsey JA, Veasey SC, Morgan BJ, O'Donnell CP. Pathophysiology of sleep apnea. Physiol Rev. 2010;90:47-112.

⁶ Tsai WH, Flemons WW, Whitelaw WA, Remmers JE. A comparison of apnea-hypopnea indices derived from different definitions of hypopnea. Am J Respir Crit Care Med. 1999;159:43-8.

⁷ Somers VK, White DP, Amin R, Abraham WT, Costa F, Culebras A, 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.

⁸ 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.

⁹ Drazen JM. Sleep apnea syndrome. N Engl J Med. 2002;7;346:390.

¹⁰ Flemons WW. Obstructive sleep apnea. N Engl J Med. 2002;15;347:498-504.

¹¹ Eckert DJ, Jordan AS, Merchia P, Malhotra A. Central sleep apnea: Pathophysiology and treatment. Chest. 2007;131:595-607.

-
- ¹² The International Classification of Sleep Disorders: diagnostic and Coding Manual. 2nd ed. Westchester, Westchester, IL: American Academy of Sleep Medicine 2005.
- ¹³ Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Weber S, Badr S. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N Engl J Med*. 1993;328:1230-5.
- ¹⁴ Tufik S, Santos-Silva R, Taddei JA, Bittencourt LR. Obstructive sleep apnea syndrome in the Sao Paulo Epidemiologic Sleep Study. *Sleep Med*. 2010;11:441-6.
- ¹⁵ Eckert DJ, Malhotra A, Jordan AS. Mechanisms of apnea. *Prog Cardiovasc Dis*. 2009;51:313-23.
- ¹⁶ Gleeson K, Zvillich CW, White DP. The influence of increasing ventilator effort on arousal from sleep. *Am Rev Respir Dis*. 1990;142:295-300.
- ¹⁷ Hartenbaum N, Collop N, Rosen IM, Phillips B, George CF, Rowley JA, et al. American College of Chest Physicians; American College of Occupational and Environmental Medicine; National Sleep Foundation. Sleep apnea and commercial motor vehicle operators: Statement from the joint task force of the American College of Chest Physicians, the American College of Occupational and Environmental Medicine, and the National Sleep Foundation. *Chest*. 2006;130:902-5.
- ¹⁸ Quan SF, Wright R, Baldwin CM, Kaemingk KL, Goodwin JL, Kuo TF, et al. Obstructive sleep apnea-hypopnea and neurocognitive functioning in the Sleep Heart Health Study. *Sleep Med*. 2006;7:498-507.
- ¹⁹ Saunamäki T, Jehkonen M. Depression and anxiety in obstructive sleep apnea syndrome: a review. *Acta Neurol Scand*. 2007;116:277-88.
- ²⁰ Akashiba T, Kawahara S, Akahoshi T, Omori C, Saito O, Majima T, Horie T. Relationship between quality of life and mood or depression in patients with severe obstructive sleep apnea syndrome. *Chest*. 2002;122:861-5.
- ²¹ Pedrosa RP, Drager LF, Gonzaga CC, Sousa MG, de Paula LK, Amaro AC, et al. Obstructive sleep apnea: the most common secondary cause of hypertension associated with resistant hypertension. *Hypertension*. 2011;58:811-7.
- ²² Caples SM, Garcia-Touchard A, Somers VK. Sleep-disordered breathing and cardiovascular risk. *Sleep* 2007;30:291-303.
- ²³ Parish JM, Adam T, Facchiano L. Relationship of metabolic syndrome and obstructive sleep apnea. *J Clin Sleep Med*. 2007;3:467-72.
- ²⁴ Worsnop C, Kay A, Pierce R, Kim Y, Trinder J. Activity of respiratory pump and upper airway muscles during sleep onset. *J Appl Physiol* 1998;85:908-920.

-
- ²⁵ 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: 719-735.
- ²⁶ Ayappa I, Rapoport DM. The upper airway in sleep: physiology of the pharynx. *Sleep Med Ver*. 2003;7:9-33.
- ²⁷ Hudgel DW. Variable site of airway narrowing among obstructive sleep apnea patients. *J Appl Physiol*. 1986;61: 1403-1409.
- ²⁸ Morrison DL, Launois SH, Isono S, Feroah TR, Whitelaw WA, Remmers JE. Pharyngeal narrowing and closing pressures in patients with obstructive sleep apnea. *Am Rev Respir Dis*. 1993;148:606-611.
- ²⁹ 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.
- ³⁰ 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.
- ³¹ Victor LD. Obstructive sleep apnea. *Am Fam Physician*. 1999;60:2279-86.
- ³² Dempsey JA, Veasey SC, Morgan BJ, O'Donnell CP. Pathophysiology of sleep apnea. *Physiol Rev*. 2010;90:47-112.
- ³³ 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.
- ³⁴ 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.
- ³⁵ Isono S, Remmers JE, Tanaka A, Sho Y, Sato J, Nishino T. Anatomy of pharynx in patients with obstructive sleep apnea and in normal subjects. *J Appl Physiol*. 1997;82:1319-26.
- ³⁶ Fogel RB, Trinder J, White DP, Malhotra A, Raneri J, Schory K, et al. The effect of sleep onset on upper airway muscle activity in patients with sleep apnoea versus controls. *J Physiol*. 2005;564:549-62.
- ³⁷ Mezzanotte WS, Tangel DJ, White DP. Influence of sleep onset on upper-airway muscle activity in apnea patients versus normal controls. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;153:1880-7.
- ³⁸ 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.

³⁹ Owens RL, Malhotra A, Eckert DJ, White DP, Jordan AS. The influence of end-expiratory lung volume on measurements of pharyngeal collapsibility. *J Appl Physiol.* 2010;108:445-51.

⁴⁰ Heinzer RC, Stanchina ML, Malhotra A, Jordan AS, Patel SR, Lo YL, et al. Effect of increased lung volume on sleep disordered breathing in patients with sleep apnoea. *Thorax.* 2006;61:435-9.

⁴¹ Heinzer RC, Stanchina ML, Malhotra A, Fogel RB, Patel SR, Jordan AS, et al. Lung volume and continuous positive airway pressure requirements in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172:114-7.

⁴² Hudgel DW, Gordon EA, Thanakitcharu S, Bruce EN. Instability of ventilatory control in patients with obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:1142-1149.

⁴³ Badr MS, Roiber F, Skatrud JB, Dempsey J. Pharyngeal narrowing/ occlusion during central sleep apnea. *J Appl Physiol* 1995;78:1806-1815.

⁴⁴ White DP. Pathogenesis of obstructive and central sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172:1363-1370

⁴⁵ Younes M. Role of arousals in the pathogenesis of obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:623-633.

⁴⁶ Fischer MK, Martinez D, Cassol CM, Rahmeier L, Vieira LR. Immediate and overnight recumbence-dependent changes of neck circumference: relationship with OSA severity in obese and nonobese subjects. *Sleep Med.* 2012;13:650-5.

⁴⁷ Shiota S, Ryan CM, Chiu KL, Ruttanaumpawan P, Haight J, Arzt M, et al. Alterations in upper airway cross-sectional area in response to lower body positive pressure in healthy subjects. *Thorax.* 2007;62:868-72.

⁴⁸ Chiu KL, Ryan CM, Shiota S, Ruttanaumpawan P, Arzt M, Haight JS, et al. Fluid shift by lower body positive pressure increases pharyngeal resistance in healthy subjects. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174:1378-1383

⁴⁹ Su MC, Chiu KL, Ruttanaumpawan P, Shiota S, Yumino D, Redolfi S, et al. Lower body positive pressure increases upper airway collapsibility in healthy subjects. *Respir Physiol Neurobiol.* 2008;161:306-312.

⁵⁰ Redolfi S, Yumino D, Ruttanaumpawan P, Yau B, Su MC, Lam J, Bradley TD. Relationship between overnight rostral fluid shift and obstructive sleep apnea in nonobese men. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179:241-246.

-
- ⁵¹ Casale M, Pappacena M, Rinaldi V, Bressi F, Baptista P, Salvinelli F. Obstructive sleep apnea syndrome: from phenotype to genetic basis. *Curr Genomics* 2009;10:119-126.
- ⁵² el Bayadi S, Millman RP, Tishler PV, Rosenberg C, Saliski W, Boucher MA, Redline S. A family study of sleep apnea. Anatomic and physiologic interactions. *Chest*. 1990;554-9.
- ⁵³ Desai AV, Cherkas LF, Spector TD, Williams AJ. Genetic influences in self-reported symptoms of obstructive sleep apnoea and restless legs: a twin study. *Twin Res*. 2004;589-95.
- ⁵⁴ Redline S, Tishler PV, Hans MG, Tosteson TD, Strohl KP, Spry K. Racial differences in sleep-disordered breathing in African-Americans and Caucasians. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;186-92.
- ⁵⁵ Kapur VK. Obstructive sleep apnea: diagnosis, epidemiology, and economics. *Respir Care*. 2010;55:1155-67.
- ⁵⁶ Ross SD, Sheinait IA, Harrison KJ, Kvasz M, Connelly JE, Shea SA, et al. Systematic review and meta-analysis of the literature regarding the diagnosis of sleep apnea. *Sleep*. 2000;23:519-32.
- ⁵⁷ Naëgelé B, Thouvard V, Pépin JL, Lévy P, Bonnet C, Perret JE, et al. Deficits of cognitive executive functions in patients with sleep apnea syndrome. *Sleep*. 1995;18:43-52.
- ⁵⁸ Xu W, Chi L, Row BW, Xu R, Ke Y, Xu B, et al. Increased oxidative stress is associated with chronic intermittent hypoxia-mediated brain cortical neuronal cell apoptosis in a mouse model of sleep apnea. *Neuroscience* 2004;126:313–323.
- ⁵⁹ Jackson ML, Howard ME, Barnes M. Cognition and daytime functioning in sleep-related breathing disorders. *Prog Brain Res*. 2011;190:53-68.
- ⁶⁰ Tregear S, Reston J, Schoelles K, Phillips B. Obstructive sleep apnea and risk of motor vehicle crash: systematic review and meta-analysis. *J Clin Sleep Med*. 2009;5:573-81.
- ⁶¹ Vennelle M, Engleman HM, Douglas NJ. Sleepiness and sleep-related accidents in commercial bus drivers. *Sleep Breath*. 2010;14:39-42.
- ⁶² Cassel W, Ploch T, Becker C, Dugnus D, Peter JH, von Wichert P. Risk of traffic accidents in patients with sleep-disordered breathing: reduction with nasal CPAP. *Eur Respir J*. 1996;9:2606-11.
- ⁶³ Veasey SC, Davis CW, Fenik P, Zhan G, Hsu YJ, Pratico D, et al. Long-term intermittent hypoxia in mice: protracted hypersomnolence with oxidative injury to sleep-wake brain regions. *Sleep*. 2004;27:194-201.
- ⁶⁴ Riemann R, Volk R, Müller A, Herzog M. The influence of nocturnal alcohol ingestion on snoring. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2010;267:1147-56.

-
- ⁶⁵ Flemons WW, Whitelaw WA, Brant R, Remmers JE. Likelihood ratios for a sleep apnea clinical prediction rule. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:1279–85.
- ⁶⁶ Viner S, Szalai JP, Hoffstein V. Are history and physical examination a good screening test for sleep apnea? *Ann Intern Med* 1991;115:356–9
- ⁶⁷ Beninati W, Harris CD, Herold DL, Shepard Jr JW. The effect of snoring and obstructive sleep apnea on the sleep quality of bed partners. *Mayo Clin Proc* 1999;74:955–8.
- ⁶⁸ Skomro RP, Kryger MH. Clinical presentations of obstructive sleep apnea syndrome. *Prog Cardiovasc Dis.* 1999;41:331-40.
- ⁶⁹ Strollo PJ Jr, Rogers RM. Obstructive sleep apnea. *N Engl J Med.* 1996;334:99-104.
- ⁷⁰ Hoffstein V, Szalai JP. Predictive value of clinical features in diagnosing obstructive sleep apnea. *Sleep* 1993;16:118–22.
- ⁷¹ Malhotra A, White DP. Obstructive sleep apnoea. *Lancet.* 2002;360:237-45.
- ⁷² 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.
- ⁷³ Iber C, Redline S, Kaplan Gilpin AM, Quan SF, Zhang L, Gottlieb DJ, et al. Polysomnography performed in the unattended home versus the attended laboratory setting--Sleep Heart Health Study methodology. *Sleep.* 2004;27:536-40.
- ⁷⁴ Practice parameters for the use of portable recording in the assessment of obstructive sleep apnea. Standards of Practice Committee of the American Sleep Disorders Association. *Sleep.* 1994;17:372-7.
- ⁷⁵ Fleury B, Rakotonanahary D, Hausser-Hauw C, Lebeau B, Guilleminault C. A laboratory validation study of the diagnostic mode of the Autoset system for sleep-related respiratory disorders. *Sleep.* 1996;19:502-5.
- ⁷⁶ Mayer P, Meurice JC, Philip-Joet F, Cornette A, Rakotonanahary D, Meslier N, et al. Simultaneous laboratory-based comparison of ResMed Autoset with polysomnography in the diagnosis of sleep apnoea/hypopnoea syndrome. *Eur Respir J.* 1998;12:770-5.
- ⁷⁷ Sonsuwan N, Suchachaisri S, Chaloeykitti L. The relationships between cephalometric parameters and severity of obstructive sleep apnea. *Auris Nasus Larynx.* 2011;38:83-7.
- ⁷⁸ Maislin G, Pack AI, Kribbs NB, Smith PL, Schwartz AR, Kline LR, et al. A survey screen for prediction of apnea. *Sleep.* 1995;18:158-66.

-
- ⁷⁹ Netzer NC, Stoohs RA, Netzer CM, Clark K, Strohl KP. Using the Berlin Questionnaire to identify patients at risk for the sleep apnea syndrome. *Ann Intern Med.* 1999;131:485-91.
- ⁸⁰ Buysse DJ, Hall ML, Strollo PJ, Kamarck TW, Owens J, Lee L, et al. Relationships between the Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI), Epworth Sleepiness Scale (ESS), and clinical/polysomnographic measures in a community sample. *J Clin Sleep Med.* 2008;4:563-71.
- ⁸¹ Sulit L, Storfer-Isser A, Kirchner HL, Redline S. Differences in polysomnography predictors for hypertension and impaired glucose tolerance. *Sleep.* 2006;29:777-83.
- ⁸² 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.
- ⁸³ Nieto FJ, Young TB, Lind BK, Shahar E, Samet JM, Redline S, et al. Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea, and hypertension in a large community-based study. Sleep Heart Health Study. *JAMA.* 2000;283:1829-36.
- ⁸⁴ Yaggi HK, Concato J, Kernan WN, Lichtman JH, Brass LM, Mohsenin V. Obstructive sleep apnea as a risk factor for stroke and death. *N Engl J Med.* 2005;353:2034-41.
- ⁸⁵ Gami AS, Howard DE, Olson EJ, Somers VK. Day-night pattern of sudden death in obstructive sleep apnea. *N Engl J Med.* 2005;352:1206-14.
- ⁸⁶ Mehra R, Benjamin EJ, Shahar E, Gottlieb DJ, Nawabit R, Kirchner HL, et al.; Sleep Heart Health Study. Association of nocturnal arrhythmias with sleep-disordered breathing: The Sleep Heart Health Study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173:910-6.
- ⁸⁷ Marin JM, Carrizo SJ, Vicente E, Agusti AG. Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study. *Lancet.* 2005;365:1046-53.
- ⁸⁸ Ronksley PE, Hemmelgarn BR, Heitman SJ, Hanly PJ, Faris PD, Quan H, et al. Obstructive sleep apnoea is associated with diabetes in sleepy subjects. *Thorax.* 2009;64:834-9.
- ⁸⁹ Reichmuth KJ, Austin D, Skatrud JB, Young T. Association of sleep apnea and type II diabetes: a population-based study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172:1590-5.
- ⁹⁰ Börgel J, Sanner BM, Bittlinsky A, Keskin F, Bartels NK, Buechner N, et al. Obstructive sleep apnoea and its therapy influence high-density lipoprotein cholesterol serum levels. *Eur Respir J.* 2006;27:121-7.
- ⁹¹ Sharma SK, Agrawal S, Damodaran D, Sreenivas V, Kadhiravan T, Lakshmy R, et al. CPAP for the metabolic syndrome in patients with obstructive sleep apnea. *N Engl J Med.* 2011;365:2277-86.

-
- ⁹² Schulz R, Eisele HJ, Reichenberger F, Seeger W. Obstructive sleep apnoea and metabolic syndrome *Pneumologie*. 2008;62:88-91.
- ⁹³ Vgontzas AN, Bixler EO, Chrousos GP. Sleep apnea is a manifestation of the metabolic syndrome. *Sleep Med Rev*. 2005;9:211-24.
- ⁹⁴ Tassone F, Lanfranco F, Gianotti L, et al. Obstructive sleep apnoea syndrome impairs insulin sensitivity independently of anthropometric variables. *Clin Endocrinol*. 2003;59:374-9.
- ⁹⁵ Yim-Yeh S, Rahangdale S, Nguyen AT, Stevenson KE, Novack V, Veves A, et al. Vascular dysfunction in obstructive sleep apnea and type 2 diabetes mellitus. *Obesity (Silver Spring)*. 2011;19:17-22.
- ⁹⁶ Basner RC. Continuous positive airway pressure for obstructive sleep apnea. *N Engl J Med*. 2007 26;356:1751-8.
- ⁹⁷ Sanders MH, Kern N. Obstructive sleep apnea treated by independently adjusted inspiratory and expiratory positive airway pressures via nasal mask. Physiologic and clinical implications. *Chest*. 1990;98:317-24.
- ⁹⁸ Information from your family doctor. CPAP for sleep apnea. *Am Fam Physician*. 2004;69:572-4.
- ⁹⁹ Kushida CA, Littner MR, Hirshkowitz M, Morgenthaler TI, Alessi CA, Bailey D, et al; American Academy of Sleep Medicine. Practice parameters for the use of continuous and bilevel positive airway pressure devices to treat adult patients with sleep-related breathing disorders. *Sleep*. 2006;29:375-80.
- ¹⁰⁰ Loube DI, Gay PC, Strohl KP, Pack AI, White DP, Collop NA. Indications for positive airway pressure treatment of adult obstructive sleep apnea patients: a consensus statement. *Chest*. 1999;115:863-6.
- ¹⁰¹ Scharf SM, Graver LM, Balaban K. Cardiovascular effects of periodic occlusions of the upper airways in dogs. *Am Rev Respir Dis*. 1992;146:321-9.
- ¹⁰² Kimoff RJ, Makino H, Horner RL, Kozar LF, Lue F, Slutsky AS, Phillipson EA. Canine model of obstructive sleep apnea: model description and preliminary application. *J Appl Physiol*. 1994;76:1810-7.
- ¹⁰³ Chen L, Scharf SM. Effects of aortic nerve on hemodynamic response to obstructive apnea in sedated pigs. *J Appl Physiol*. 2000;89:1455-61.
- ¹⁰⁴ O'Donnell CP, Schwartz AR, Smith PL, Robotham JL, Fitzgerald RS, Shirahata M. Reflex stimulation of renal sympathetic nerve activity and blood pressure in response to apnea. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;154:1763-70.

-
- ¹⁰⁵ Tagaito Y, Polotsky VY, Campen MJ, Wilson JA, Balbir A, Smith PL, et al. A model of sleep-disordered breathing in the C57BL/6J mouse. *J Appl Physiol*. 2001;91:2758-66.
- ¹⁰⁶ Hamrahi H, Stephenson R, Mahamed S, Liao KS, Horner RL. Selected Contribution: Regulation of sleep-wake states in response to intermittent hypoxic stimuli applied only in sleep. *J Appl Physiol*. 2001;90:2490-501.
- ¹⁰⁷ Fletcher EC, Bao G, Miller CC 3rd. Effect of recurrent episodic hypocapnic, eucapnic, and hypercapnic hypoxia on systemic blood pressure. *J Appl Physiol*. 1995;78:1516-21.
- ¹⁰⁸ Li J, Grigoryev DN, Ye SQ, Thorne L, Schwartz AR, Smith PL, et al. Chronic intermittent hypoxia upregulates genes of lipid biosynthesis in obese mice. *J Appl Physiol*. 2005;99:1643-8.
- ¹⁰⁹ Li J, Thorne LN, Punjabi NM, Sun CK, Schwartz AR, Smith PL, et al. Intermittent hypoxia induces hyperlipidemia in lean mice. *Circ Res*. 2005;97:698-706.
- ¹¹⁰ Kanagy NL, Walker BR, Nelin LD. Role of endothelin in intermittent hypoxia-induced hypertension. *Hypertension*. 2001;37:511-5.
- ¹¹¹ Wu Y, Wang H, Brautigan DL, Liu Z. Activation of glycogen synthase in myocardium induced by intermittent hypoxia is much lower in fasted than in fed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;292:E469-75.
- ¹¹² Naghshin J, McGaffin KR, Witham WG, Mathier MA, Romano LC, Smith SH, et al. Chronic intermittent hypoxia increases left ventricular contractility in C57BL/6J mice. *J Appl Physiol*. 2009;107:787-93.
- ¹¹³ Snow JB, Kitzis V, Norton CE, Torres SN, Johnson KD, Kanagy NL, et al. Differential effects of chronic hypoxia and intermittent hypocapnic and eucapnic hypoxia on pulmonary vasoreactivity. *J Appl Physiol*. 2008;104:110-8.
- ¹¹⁴ Savransky V, Nanayakkara A, Li J, Bevans S, Smith PL, Rodriguez A, et al. Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175:1290-7.
- ¹¹⁵ Vermehren-Schmaedick A, Jenkins VK, Knopp SJ, Balkowiec A, Bissonnette JM. Acute intermittent hypoxia-induced expression of brain-derived neurotrophic factor is disrupted in the brainstem of methyl-CpG-binding protein 2 null mice. *Neuroscience*. 2012;206:1-6.
- ¹¹⁶ Shan X, Chi L, Ke Y, Luo C, Qian S, Gozal D, Liu R. Manganese superoxide dismutase protects mouse cortical neurons from chronic intermittent hypoxia-mediated oxidative damage. *Neurobiol Dis*. 2007;28:206-15.
- ¹¹⁷ Almendros I, Carreras A, Ramírez J, Montserrat JM, Navajas D, Farré R. Upper airway collapse and reopening induce inflammation in a sleep apnoea model. *Eur Respir J*. 2008;32:399-404.

-
- ¹¹⁸ Almendros I, Acerbi I, Puig F, Montserrat JM, Navajas D, Farré R. Upper-airway inflammation triggered by vibration in a rat model of snoring. *Sleep*. 2007;30:225-7.
- ¹¹⁹ Carreras A, Almendros I, Montserrat JM, Navajas D, Farré R. Mesenchymal stem cells reduce inflammation in a rat model of obstructive sleep apnea. *Respir Physiol Neurobiol*. 2010;172:210-2.
- ¹²⁰ Iiyori N, Alonso LC, Li J, Sanders MH, Garcia-Ocana A, O'Doherty RM, et al. Intermittent hypoxia causes insulin resistance in lean mice independent of autonomic activity. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175:851-7.
- ¹²¹ Savransky V, Nanayakkara A, Vivero A, Li J, Bevans S, Smith PL, et al. Chronic intermittent hypoxia predisposes to liver injury. *Hepatology*. 2007;45:1007-13.
- ¹²² 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.
- ¹²³ Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005; 365:1415–1428.
- ¹²⁴ Tasali E, Ip MS. Obstructive Sleep apnea and metabolic syndrome: alterations in glucose metabolism and inflammation. *Proc Am Thorac Soc*. 2008 15;5:207-17.
- ¹²⁵ Grundy,SM, Brewer,B, Cleeman,SD. Definition of metabolic syndrome:report of the national Heart, Lung and blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition. *Circulation* 2004; 27: 433-438.
- ¹²⁶ 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;285:2486–2497.
- ¹²⁷ Kono M, Tatsumi K, Saibara T, Nakamura A, Tanabe N, Takiguchi Y, et al. Obstructive sleep apnea syndrome is associated with some components of metabolic syndrome. *Chest*. 2007;131:1387-92.
- ¹²⁸ Polotsky VY. Mouse model of the metabolic syndrome: the quest. *J Appl Physiol*. 2007;102:2088-9.
- ¹²⁹ Wilcox I, McNamara SG, Collins FL, Grunstein RR, Sullivan CE. "Syndrome Z": the interaction of sleep apnoea, vascular risk factors and heart disease. *Thorax*. 1998;53:S25-8.
- ¹³⁰ Wolk R, Somers VK. Sleep and the metabolic syndrome. *Exp Physiol*. 2007;92:67-78.
- ¹³¹ Mugnai G. Pathophysiological links between obstructive sleep apnea syndrome and metabolic syndrome. *G Ital Cardiol (Rome)*. 2010;11:453-9.

-
- ¹³² Bonsignore MR, Esquinas C, Barceló A, Sanchez-de-la-Torre M, Paternó A, Duran-Cantolla J, et al. Metabolic syndrome, insulin resistance and sleepiness in real-life obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J*. 2012;39:1136-43.
- ¹³³ Weinstock TG, Wang X, Rueschman M, Ismail-Beigi F, Aylor J, Babineau DC, et al. A Controlled Trial of CPAP Therapy on Metabolic Control in Individuals with Impaired Glucose Tolerance and Sleep Apnea. *Sleep*. 2012;35:617-625B.
- ¹³⁴ Theorell-Haglöw J, Berne C, Janson C, Lindberg E. The role of obstructive sleep apnea in metabolic syndrome: a population-based study in women. *Sleep Med*. 2011;12:329-34.
- ¹³⁵ Trombetta IC, Somers VK, Maki-Nunes C, Drager LF, Toschi-Dias E, Alves MJ, et al. Consequences of comorbid sleep apnea in the metabolic syndrome--implications for cardiovascular risk. *Sleep*. 2010;33:1193-9.
- ¹³⁶ Tkacova R, Dorkova Z, Molcanyiova A, Radikova Z, Klimes I, Tkac I. Cardiovascular risk and insulin resistance in patients with obstructive sleep apnea. *Med Sci Monit*. 2008;14:CR438-44.
- ¹³⁷ Gruber A, Horwood F, Sithole J, Ali NJ, Idris I. Obstructive sleep apnoea is independently associated with the metabolic syndrome but not insulin resistance state. *Cardiovasc Diabetol*. 2006;5:22.
- ¹³⁸ 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;111:881-90.
- ¹³⁹ Drager LF, Li J, Reinke C, Bevans-Fonti S, Jun JC, Polotsky VY. Intermittent hypoxia exacerbates metabolic effects of diet-induced obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 2011;19:2167-74.
- ¹⁴⁰ Savransky V, Jun J, Li J, Nanayakkara A, Fonti S, Moser AB, et al. Dyslipidemia and atherosclerosis induced by chronic intermittent hypoxia are attenuated by deficiency of stearoyl coenzyme A desaturase. *Circ Res*. 2008;103:1173-80.
- ¹⁴¹ 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.
- ¹⁴² Polotsky VY, Li J, Punjabi NM, Rubin AE, Smith PL, Schwartz AR, et al. Intermittent hypoxia increases insulin resistance in genetically obese mice. *J Physiol*. 2003;552:253-64.
- ¹⁴³ Jun J, Polotsky VY. Metabolic consequences of sleep-disordered breathing. *ILAR J*. 2009;50:289-306.

-
- ¹⁴⁴ 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.
- ¹⁴⁵ Newman AB, Nieto FJ, Guidry U, Lind BK, Redline S, Pickering TG, et al.; Sleep Heart Health Study Research Group. Relation of sleep-disordered breathing to cardiovascular disease risk factors: the Sleep Heart Health Study. *Am J Epidemiol.* 2001;154:50-9.
- ¹⁴⁶ Coughlin SR, Mawdsley L, Mugarza JA, Calverley PM, Wilding JP. Obstructive sleep apnoea is independently associated with an increased prevalence of metabolic syndrome. *Eur Heart J.* 2004;25:735-41.
- ¹⁴⁷ Roche F, Sforza E, Pichot V, Maudoux D, Garcin A, Celle S, Picard-Kossovsky M, et al.; PROOF Study Group. Obstructive sleep apnoea/hypopnea influences high-density lipoprotein cholesterol in the elderly. *Sleep Med.* 2009;10:882-6.
- ¹⁴⁸ Czerniawska J, Bieleń P, Pływaczewski R, Czystowska M, Korzybski D, Sliwiński P, Górecka D. [Metabolic abnormalities in obstructive sleep apnea patients]. *Pneumonol Alergol Pol.* 2008;76:340-7.
- ¹⁴⁹ Cuhadaroglu C, Utkusavaş A, Oztürk L, Salman S, Ece T. Effects of nasal CPAP treatment on insulin resistance, lipid profile, and plasma leptin in sleep apnea. *Lung.* 2009;187:75-81.
- ¹⁵⁰ Dorkova Z, Petrasova D, Molcanyiova A, Popovnakova M, Tkacova R. Effects of continuous positive airway pressure on cardiovascular risk profile in patients with severe obstructive sleep apnea and metabolic syndrome. *Chest.* 2008;134:686-92.
- ¹⁵¹ Steiropoulos P, Tsara V, Nena E, Fiteli C, Kataropoulou M, Froudarakis M, et al. Effect of continuous positive airway pressure treatment on serum cardiovascular risk factors in patients with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *Chest.* 2007;132:843-51.
- ¹⁵² Chin K, Nakamura T, Shimizu K, Mishima M, Nakamura T, Miyasaka M, et al. Effects of nasal continuous positive airway pressure on soluble cell adhesion molecules in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Am J Med.* 2000;109:562-7.
- ¹⁵³ Gozal D, Capdevila OS, Kheirandish-Gozal L. Metabolic alterations and systemic inflammation in obstructive sleep apnea among nonobese and obese prepubertal children. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177:1142-9.
- ¹⁵⁴ 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(7):412-9.
- ¹⁵⁵ DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol.* 1979;237:E214-23.

-
- ¹⁵⁶ Ip MS, Lam B, Ng MM, Lam WK, Tsang KW, Lam KS. Obstructive sleep apnea is independently associated with insulin resistance. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:670-6.
- ¹⁵⁷ Punjabi NM, Shahar E, Redline S, Gottlieb DJ, Givelber R, Resnick HE; Sleep Heart Health Study Investigators. Sleep-disordered breathing, glucose intolerance, and insulin resistance: the Sleep Heart Health Study. *Am J Epidemiol.* 2004;160:521-30.
- ¹⁵⁸ Stamatakis KA, Punjabi NM. Effects of sleep fragmentation on glucose metabolism in normal subjects. *Chest.* 2010;137:95-101.
- ¹⁵⁹ Punjabi NM, Ahmed MM, Polotsky VY, Beamer BA, O'Donnell CP. Sleep-disordered breathing, glucose intolerance, and insulin resistance. *Respir Physiol Neurobiol.* 2003;136:167-78.
- ¹⁶⁰ Tasali E, Mokhlesi B, Van Cauter E. Obstructive sleep apnea and type 2 diabetes: interacting epidemics. *Chest.* 2008;133:496-506.
- ¹⁶¹ Rains JL, Jain SK. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic Biol Med.* 2011;50:567-75.
- ¹⁶² Zhan G, Serrano F, Fenik P, Hsu R, Kong L, Pratico D, et al. NADPH oxidase mediates hypersomnolence and brain oxidative injury in a murine model of sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172:921-9.
- ¹⁶³ Pialoux V, Hanly PJ, Foster GE, Brugniaux JV, Beaudin AE, Hartmann SE, et al. Effects of exposure to intermittent hypoxia on oxidative stress and acute hypoxic ventilatory response in humans. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;180:1002-9.
- ¹⁶⁴ Krauss S, Zhang CY, Lowell BB. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6:248-61.
- ¹⁶⁵ Chan CB, Kashemsant N. Regulation of insulin secretion by uncoupling protein. *Biochem Soc Trans.* 2006 Nov;34:802-5.
- ¹⁶⁶ Salopuro T, Pulkkinen L, Lindström J, Kolehmainen M, Tolppanen AM, Eriksson JG, et al. Variation in the UCP2 and UCP3 genes associates with abdominal obesity and serum lipids: the Finnish Diabetes Prevention Study. *BMC Med Genet.* 2009;10:94.
- ¹⁶⁷ Harrold JA, Widdowson PS, Clapham JC, Williams G. Individual severity of obesity in unselected Wistar rats: relationship with hyperphagia. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000; 279: E340-E347.
- ¹⁶⁸ Ricquier D, Bouillaud F. Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *J Physiol.* 2000; 529:3-10.

-
- ¹⁶⁹ Gimeno RE, Dembski M, Weng X, Deng N, Shyjan AW, Gimeno CJ, et al. Cloning and characterization of an uncoupling protein homolog: a potential molecular mediator of human thermogenesis. *Diabetes*. 1997; 46 :900–906.
- ¹⁷⁰ Echtay KS. Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role? *Free Radic Biol Med*. 2007;43:1351-71.
- ¹⁷¹ Mailloux RJ, Harper ME. Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. *Free Radic Biol Med*. 2011;51:1106-15.
- ¹⁷² Forman HJ, Torres M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166:S4-8.
- ¹⁷³ Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002;82:47-95.
- ¹⁷⁴ Rhee SG. Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science*. 2006;312:1882-3.
- ¹⁷⁵ Leloup C, Turrel-Cuzin C, Magnan C, Karaca M, Castel J, et al. Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion. *Diabetes*. 2009;58:673-81.
- ¹⁷⁶ Li LX, Skorpen F, Egeberg K, Jørgensen IH, Grill V. Uncoupling protein-2 participates in cellular defense against oxidative stress in clonal beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;282:273-7.
- ¹⁷⁷ Pi J, Bai Y, Daniel KW, Liu D, Lyght O, Edelstein D, Brownlee M, Corkey BE, Collins S. Persistent oxidative stress due to absence of uncoupling protein 2 associated with impaired pancreatic beta-cell function. *Endocrinology*. 2009;150:3040-8.
- ¹⁷⁸ Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, Jekabsons MB, Cadenas S, Stuart JA, et al. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature*. 2002;415:96-9.
- ¹⁷⁹ Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, et al. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med*. 2004;37:755-67.
- ¹⁸⁰ Krauss S, Zhang CY, Scorrano L, Dalgaard LT, St-Pierre J, Grey ST, et al. Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic beta cell dysfunction. *J Clin Invest*. 2003;112:1831-42.
- ¹⁸¹ Dalgaard LT. UCP2 mRNA expression is dependent on glucose metabolism in pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;417:495-500.
- ¹⁸² Joseph JW, Koshkin V, Saleh MC, Sivitz WI, Zhang CY, Lowell BB, et al. Free fatty acid-induced beta-cell defects are dependent on uncoupling protein 2 expression. *J Biol Chem*. 2004;279:51049-56.

-
- ¹⁸³ Yamashita T, Eto K, Okazaki Y, Yamashita S, Yamauchi T, Sekine N, Nagai R, et al. Role of uncoupling protein-2 up-regulation and triglyceride accumulation in impaired glucose-stimulated insulin secretion in a beta-cell lipotoxicity model overexpressing sterol regulatory element-binding protein-1c. *Endocrinology*. 2004;145:3566-77.
- ¹⁸⁴ Zhang CY, Baffy G, Perret P, Krauss S, Peroni O, Grujic D, et al. Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell*. 2001;105:745-55.
- ¹⁸⁵ <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?org=Human&db=hg19&position=chr11:73685712-73694352>. Capturado em: 30 de julho de 2012
- ¹⁸⁶ <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?org=Mouse&db=mm9&position=chr7:107641846-107650529> Capturado em: 30 de julho de 2012
- ¹⁸⁷ Souza BM, Assmann TS, Kliemann LM, Gross JL, Canani LH, Crispim D. The role of uncoupling protein 2 (UCP2) on the development of type 2 diabetes mellitus and its chronic complications. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2011;55:239-48.
- ¹⁸⁸ Jia JJ, Zhang X, Ge CR, Jois M. The polymorphisms of UCP2 and UCP3 genes associated with fat metabolism, obesity and diabetes. *Obes Rev*. 2009;10:519-26.
- ¹⁸⁹ Sasahara M, Nishi M, Kawashima H, Ueda K, Sakagashira S, Furuta H, et al. Uncoupling protein 2 promoter polymorphism -866G/A affects its expression in beta-cells and modulates clinical profiles of Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2004;53:482-5.
- ¹⁹⁰ Kubota T, Mori H, Tamori Y, Okazawa H, Fukuda T, Miki M, et al. Molecular screening of uncoupling protein 2 gene in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus or obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83:2800-4.
- ¹⁹¹ Cassell PG, Neverova M, Janmohamed S, Uwakwe N, Qureshi A, McCarthy MI, et al. An uncoupling protein 2 gene variant is associated with a raised body mass index but not Type II diabetes. *Diabetologia*. 1999;42:688-92.
- ¹⁹² Yu X, Jacobs DR Jr, Schreiner PJ, Gross MD, Steffes MW, Fornage M. The uncoupling protein 2 Ala55Val polymorphism is associated with diabetes mellitus: the CARDIA study. *Clin Chem*. 2005;51:1451-6.
- ¹⁹³ D'Adamo M, Perego L, Cardellini M, Marini MA, Frontoni S, Andreozzi F, et al. The -866A/A genotype in the promoter of the human uncoupling protein 2 gene is associated with insulin resistance and increased risk of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2004;53:1905-10.

¹⁹⁴ Sesti G, Cardellini M, Marini MA, Frontoni S, D'Adamo M, Del Guerra S, et al. A common polymorphism in the promoter of UCP2 contributes to the variation in insulin secretion in glucose-tolerant subjects. *Diabetes*. 2003;52:1280-3.

¹⁹⁵ Wang H, Chu WS, Lu T, Hasstedt SJ, Kern PA, Elbein SC. Uncoupling protein-2 polymorphisms in type 2 diabetes, obesity, and insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004;286:E1-7.

¹⁹⁶ Dalgaard LT, Andersen G, Larsen LH, Sørensen TI, Andersen T, Drivsholm T, et al. Mutational analysis of the UCP2 core promoter and relationships of variants with obesity. *Obes Res*. 2003;11:1420-7.

¹⁹⁷ Hsu YH, Niu T, Song Y, Tinker L, Kuller LH, Liu S. Genetic variants in the UCP2-UCP3 gene cluster and risk of diabetes in the Women's Health Initiative Observational Study. *Diabetes*. 2008;57:1101-7.

6. ARTIGO EM INGLÊS

Pancreatic uncoupling protein-2 (UCP2) expression in C57BL mice submitted to intermittent hypoxia

¹Luciana Rodrigues Vieira; ^{1,2}Denis Martinez, MD, PhD; ²Cintia Zappe Fiori, MSc; ¹Darlan Pase da Rosa, MSc; ³Luis Felipe Forgiarini; ¹Silvana Perini; ⁴Gustavo Ochs de Muñoz, ¹Renata Schenkel Kaminski.

¹ *Graduate Program in Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), RS, Brazil;*

² *Cardiology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), RS, Brazil; Graduate Program in Cardiology and Cardiovascular Sciences, UFRGS RS, Brazil;*

³ *Graduate Program in Pulmonology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) RS, Brazil;*

⁴ *Biomedical School, Universidade Feevale, RS, Brazil;*

Address correspondence to: Luciana Rodrigues Vieira, Graduate Program in Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), RS, Brazil. CEP 90670-001; Tel: +5551 9298-8996; FAX: +55 (55) 3308-5605; e-mail: luciana.rodrigues.vieira@gmail.com

DISCLOSURE STATEMENT

This was not an industry-supported study. The authors have reported no financial conflicts of interest.

ABSTRACT

Background: Sleep apnea and intermittent hypoxia have been implicated in insulin resistance. Pancreatic uncoupling protein-2 (UCP2) is a negative regulator of insulin secretion.

Study Objectives: To investigate whether exposure to an animal model of sleep apnea influences insulin output via UCP2 expression.

Design and interventions: Male C57BL mice were exposed during 35 days to intermittent hypoxia (n=18) or to sham intermittent hypoxia (n=18). During 8 hours daily the hypoxia group underwent a total of 480 cycles of 30 seconds of progressive hypoxia to an inspired oxygen concentration nadir of $8\pm 1\%$ followed by 30 seconds of normoxia.

Measurements and Results: The expression of pancreatic UCP-2 mRNA, assessed by real-time PCR, was 18% lower ($P=0.14$) in the hypoxia than in the control group. The hypoxia group compared with controls showed lower glucose ($P=0.025$) and glucagon levels ($P=0.023$) and higher serum insulin quantified by ELISA ($P=0.011$). Calculations of homeostasis model assessment (HOMA) indicate lower insulin resistance ($P=0.09$) and higher beta-cell function in hypoxia than in control mice ($P=0.014$). Body weight, adjusted for food intake, was maintained relatively stable during the experiment. No significant differences in lipid profile were encountered between groups.

Conclusions: The observed reduction in UCP2 mRNA expression, though non-significant, suggests a possible role of this protein in the metabolic influences of intermittent hypoxia. Further investigation of the activity of this regulatory protein is warranted.

Keywords: Sleep apnea, metabolic syndrome X, glucose, insulin, glucagon, uncoupling protein-2

INTRODUCTION

Obstructive sleep apnea (OSA) is characterized by recurrent collapse of the upper airway during sleep. Each apnea results in oxygen desaturation and in an arousal causing sleep fragmentation and intermittent hypoxia (IH).¹ OSA may affect up to 32% of the adult population.²

Metabolic syndrome, also known as syndrome X, is called syndrome Z when combined with OSA.³ Metabolic syndrome in OSA patients may be improved by treatment with continuous positive airway pressure.^{4,5} Metabolic syndrome has several features in common with OSA including obesity, hyperlipidemia, hypertension, and insulin resistance that may be related to the increased risk of cardiovascular disease.^{6,7}

Experimental models that submit animals to intermittent hypoxia are used to study the consequences of OSA. Insulin resistance and metabolic changes have been reported after exposure to models of OSA.^{8,9} The mechanisms for the changes in glucose metabolism induced by intermittent hypoxia were not fully explored.

The uncoupling proteins (UCPs), located in the mitochondrial inner membrane, translocate protons from the intermembrane space to the mitochondrial matrix. The protons that leak through the UCP can no longer be used to drive the ATP synthase, thus decreasing the generation of ATP. Uncoupling protein 2 (UCP2) is a negative regulator of pancreatic β -cell insulin secretion.^{10,11} Increases in plasma glucose concentration cause a greater influx of glucose into the β cells via glucose transporter (GLUT2). This increases the synthesis of ATP and the ATP/ADP ratio, causing the closure of ATP-sensitive potassium channels. The closure of these channels leads to cell depolarization and influx of calcium that triggers

release of insulin from granules to the circulation.¹² UCP2, by reducing the ATP synthesis, regulates the glucose-stimulated insulin secretion.¹³

Although the reversal of metabolic alterations by CPAP suggests a causal relationship between the OSA and the components of the metabolic syndrome, the mechanisms of metabolic changes, in particular of insulin resistance, remain unclear.¹⁴ We hypothesized that changes in expression of UCP2 might mediate the effects of intermittent hypoxia on insulin levels. The present study investigated, in C57BL mice, the effect of an OSA model on pancreatic UCP2 expression and glycolipid profile.

METHODS

Animals

Male C57BL mice were used in the study, 18 submitted to IH, and 18 to sham IH. All mice were 8–9 weeks of age at the beginning of the study. The protocol followed the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” and was approved by the Institutional Ethics Committee.¹⁵

Groups of 6 mice were housed under temperatures between 22.5 and 24.5°C with a 12:12-hour light-dark cycle (lights on at 07 AM) and received standard mice chow and water *ad libitum*. The mice were weighed at the baseline, and every three days until the end of the experiment in a scale with precision of 0.01 g (Marte, AS 5500C, Brazil). The food was weighed daily.

Isocapnic Intermittent Hypoxia

In the period of 35 days, 8 hours per day, from 9 AM to 5 PM, in the lights on period, the animals were placed in the intermittent hypoxia system. A gas mixture with 92% nitrogen and 8% CO₂ was issued in the hypoxia chamber during 30 seconds progressively reducing the inspired oxygen fraction from 21% to a nadir of 8±1%. Next, a fan insufflated room air into the chamber for 30 seconds, restoring the inspired oxygen fraction to 21% in 5 seconds. Each hypoxia/normoxia cycle lasted for 60 seconds; in 8 hours, 480 hypoxia cycles occurred or 60 per hour. The group undergoing sham intermittent hypoxia remained in an adjacent cage and underwent the same fan activity as the hypoxia group, but no gas mixture entered the cage during the hypoxia cycle.

Removal of Blood and Pancreas

At the end of the experimental period, fasted for at least 6 hours, the animals were anesthetized with ketamine 100 mg/kg and xylazine 10 mg/kg intraperitoneally. After anesthesia was confirmed, blood samples were collected from the retro-orbital sinus. The blood samples were centrifuged at 10,000 rpm for 10 min, at 4°C to obtain serum samples. The pancreases of twelve mice per group were extracted after dissected and placed during 24 hours in 5 volumes of RNAlater® Tissue Collection (Ambion, Austin, TX, USA), stored at 4°C overnight, then moved to -80°C until analysis. The pancreases of six mice per group were fixed during 24 hours in 10% formalin and blocked in paraffin for future processing.

RNA Preparation, cDNA Synthesis, and Quantitative Real-Time PCR of the UCP-2

The pancreases were unfrozen, dissected, and homogenized in optimized phenol/guanidine-based lysis solution. Total RNA was isolated using TRI Reagent® Solution

(Applied Biosystems, Austin, Texas). RNA was quantified and the quality tested by photometric measurement on a Nanodrop apparatus (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Two micrograms of highly purified RNA ($A_{260}/A_{280} > 1.95$) was used for cDNA synthesis performed with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The cDNA was stored at -20°C and diluted in DNase-free water (1:100) before relative quantification by real-time PCR. Gene expression analysis was performed using TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) for the uncoupling protein-2 gene (UCP2; Mm00627598_m1). GAPDH was used as normalizing gene. Thermal cycling was performed in a StepOne™ real-time PCR system from Applied Biosystems.

Gene expression was quantified using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (threshold cycle) method.¹⁶ Each sample was analyzed in duplicate and the ΔC_T value was obtained by subtracting the GAPDH C_T value from the C_T value of the UCP2 gene. To calculate the difference between groups, the ΔC_T mean value obtained for the control group was used to calculate the $\Delta\Delta\text{C}_\text{T}$ of gene ($2^{-\Delta\Delta\text{C}_\text{T}}$).

Islet Immunohistochemistry

The paraffin blocks of the pancreases, were sectioned in $5\mu\text{m}$ slices. Sections were mounted on glass slides and coated with 3-aminopropyl-triethoxy-silane. The sections were deparaffinized using xylene (2 times for 5 minutes) and rehydrated after four successive washings in ethanol followed by immersion in distilled water and phosphate-buffered saline (PBS). For antigen retrieval, the slides immersed in 10 mM sodium citrate buffer, pH 6.0, were heated in a microwave oven for 21 min and cooled to room temperature. To inhibit the

activity of the endogenous peroxidase, the slides were immersed twice in hydrogen peroxide 5% for 15 min. Nonspecific antibody-binding sites were blocked with 5% nonfat dry milk diluted in PBS for 20 minutes. Immunohistochemistry staining for β and α cells were processed using, respectively, polyclonal guinea pig anti-insulin (1:200 dilution; A0564, Dako, Carpinteria, CA, USA) and rabbit polyclonal antibody to glucagon (1:4000 Dilution; Enzo Life Sciences no. GA 1181, Farmingdale, USA). After having been washed three times in running water, distilled water, and PBS, the slides were incubated for 1 hour in humid chamber at room temperature. After washing with distilled water and three times with PBS, sections were incubated with secondary antibody (PicTure™-MAX Polymer Detection kit, 87-8983; Invitrogen, Camarillo, CA, USA) for 30 min at humid chamber. The color was developed with a DAB CHROMOGEN according to the instruction manual. Sections were counterstained with hematoxylin-Harris for 20 seconds, washed in running water, and then rinsed with ammoniacal water to obtain a light blue color. After this procedure, slides were washed in water, twice with ethanol and three times with xylene. All sections were analyzed using light microscopy with 400-time magnification, captured and evaluated by a computer image analysis system (Image-Pro® Plus version 6.0, Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA). The area of β cells in the islets was determined by insulin-positive cell area, which was calculated as the ratio of intra-islet insulin-positive area to total islet area. The relative area of glucagon, which represented the amount of α cells in an islet, was evaluated by the same method. The insulin and glucagon positive-cell indices for each group were evaluated by the average of at least 24 sections. Nuclei were not used for the quantification analysis of islet cell composition.

Biochemical Assays

Fasting serum glucose, total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol, and triglycerides were measured by enzymatic colorimetric methods using commercial kits from Labtest Diagnostics (Belo Horizonte, Brazil). Low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol concentration was estimated by the Friedewald formula ($\text{LDL cholesterol} = \text{total cholesterol} - \text{HDL cholesterol} - \text{triglycerides}/5$).¹⁷ Fasting serum insulin was determined using mouse insulin Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kit from ALPCO Diagnostics (Salem, NH, USA). Fasting serum glucagon was quantified utilizing glucagon Enzyme Immunoassay (EIA) kit from Phoenix Pharmaceuticals (Burlingame, CA). To evaluate the degree of insulin resistance, the homeostasis model assessment (HOMA- IR) was calculated using the following formula: $\text{HOMA} = \text{fasting serum insulin } (\mu\text{U/ml}) \times \text{fasting blood glucose (mmol/l)}/22.5$.¹⁸ The HOMA- β index was calculated as the product of 20 times basal insulin levels ($\mu\text{U/ml}$) divided by the value of basal glucose concentrations (mmol/l) minus 3.5.

Statistical Analysis

Medians and quartiles [25th-75th] were utilized to express grouped data in tables and in box plots showing: 10th, 25th, 50th, 75th, and 90th percentiles and outliers. Comparisons of median values between groups, for UCP2 mRNA, insulin/ glucagon-positive cell area, and biochemical assays expression, were made using the Mann–Whitney U-test. The body weight in the groups was adjusted for food intake using generalized estimating equation (GEE), followed by pairwise comparisons in Bonferroni's sequential adjustment method. Statistical analysis was performed using the SPSS for Windows, version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Statistical significance was assumed if the probability of alpha error was <0.05 .

RESULTS

Expression of pancreatic UCP-2 mRNA

Data showing the expression of UCP2 in both groups is displayed in Figure 1A. Relative expression of UCP-2 in hypoxia group was 0.82 [0.71 – 0.94] and in sham group was 0.98 [0.78 – 1.19] without significant difference between groups (P=0.14).

Fasting Serum Glucose, Insulin and Glucagon levels

Fasting serum glucose levels (Figure 1B) was significantly lower in the hypoxia group than sham group (143.58 [115.02 – 155.50] vs. 162.71 [133.49 – 183.87] mg/dl; P=0.025). Fasting serum insulin levels (Figure 1C) was significantly higher in the hypoxia group, compared with the sham group (0.44 [0.42 – 0.46] vs. 0.42 [0.40 – 0.44] ng/ml; P= 0.011). Fasting serum glucagon levels (Figure 1D) were significantly lower in the hypoxia group than in the sham group (6.84 [3.64 – 9.90] vs. 10.87 [7.43 – 14.21] ng/ml; P= 0.023).

Insulin resistance and β -cell function parameters

After exposure to intermittent hypoxia, the HOMA-IR index (Figure 1E) of insulin resistance was lower in the hypoxia group than in the sham group without significant difference between groups (3.45 [3.00– 4.17] vs. 4.06 [3.35– 4.55]; P= 0.095). HOMA- β (Figure 1F) was significantly higher in the hypoxia group than in the sham group (46.6 [42 – 74] vs. 36.6 [29 – 52]; P=0.014).

Area of beta and alpha cells intra-islets

The relative area of insulin-positive cells in the hypoxia group was non-significantly higher than in the sham group, respectively 0.62 [0.56 – 0.67] vs. 0.56 [0.51 – 0.59] (P=0.14). The area of glucagon-positive cells was 0.10 [0.06 - 0.15] in the hypoxia and 0.09 [0.08 - 0.17] in the sham group (P=0.67). Figure 2.

Fasting Serum Lipid Levels

Lipid profile parameters were compared between groups (Table 1). Mice exposed to intermittent hypoxia did not differ significantly from the sham group in terms of fasting serum triglycerides, total cholesterol, HDL- cholesterol and LDL- cholesterol.

Food Intake and Body Weight

Body weight remained relatively stable over the 35 days: 23.7±0.3 g at day 1 versus 25.1±0.3 g at day 35 in the sham group and 24.6±0.5 g at day 1 versus 24.8±0.3 g at day 35 in the hypoxia group (Figure 3). Body weight entered as dependent variable in the GEE model showed neither effect of hypoxia/sham groups nor of food ingestion. Time had a significant effect as well as a significant interaction time*hypoxia/sham groups (both P<0.001).

DISCUSSION

This was the first study to analyze the effect of an intermittent hypoxia model of OSA on the expression of UCP2 mRNA in the pancreas. In this model, using 8% nadir oxygen in 480 cycles per day, during 35 days, the hypoxia group showed non-significantly lower levels of UCP2 mRNA expression than the sham group. These preliminary results add a new bit of information to the current knowledge on the mechanisms of metabolic consequences of OSA.

The results are also a coherent display of metabolic changes. Data show that mice exposed to intermittent hypoxia have lower fasting serum glucose and glucagon levels than those exposed to sham hypoxia. Previous reports have found either elevated^{8,19} or lowered⁹ glucose levels after exposure to intermittent hypoxia. The present results of reduced glucose levels agree with a previous study in lean and obese C57BL/6J mice exposed to chronic intermittent hypoxia during 5 days. In the lean mice, glucose and insulin resistance levels decreased after hypoxia. In the obese leptin deficient mice, a decrease in glucose levels was also seen, but insulin resistance increased⁹. In our study only lean mice were employed, so our results are within the expected.

The present findings of higher fasting serum insulin levels and function of β -cells in the hypoxia group than in the sham group are consistent with the lower glucose and glucagon levels. Previous reports of insulin levels after intermittent hypoxia show that in obese mice group, with different fraction of inspired oxygen ($F_{I}O_2$) and time of exposure, were observed higher values of insulin than control group^{9,19,20}. Another study, with lean mice, showed lower values of insulin in hypoxia group than sham group²¹.

Our study observed higher values of insulin in the mice exposed to intermittent hypoxia than in the sham group. The significantly lower values of glucagon in the hypoxia group may indicate that compensatory mechanisms are activated to maintain the glucose homeostasis. No comparable studies reporting the response of glucagon to intermittent hypoxia were found.

No difference in insulin resistance under intermittent hypoxia was detected by HOMA-IR, as glucose levels are lower than in controls. HOMA- β was higher, suggesting that some mechanism was activated to increase insulin production. This could be the lowering of

UCP2 levels. HOMA-IR and β are not validated in rodents although the formula represents a measure of β -cell function in humans²².

To date, there are few reports in the literature about pancreatic β -cell function and sleep. In our experiment, the animals exposed to intermittent hypoxia for 35 days showed a significantly higher HOMA- β . Although the presence of outliers may be influencing the result, even in non-parametric tests, the HOMA- β was 10% higher in the hypoxia than in the sham group. In another study²¹, beta-cell function estimated by the HOMA- β formula was 25% lower in lean C57BL mice exposed to intermittent hypoxia during 84 days compared to the control group. Their finding of a reduced HOMA- β after this long exposure time suggest that pancreatic β -cell function only becomes impaired after an exposure almost three times longer than the one utilized in the present study. This speculation is further supported by another study performed in severely obese adults with normal glucose metabolism showing that OSA severity is associated with increased basal beta-cell function independently of gender and adiposity²³. The increase in HOMA- β implies that OSA represents an exceeding functional demand on pancreatic β -cells, which leads to worsening of the insulin secretion as the disease progresses.

The intermittent hypoxia has the potential to generate reactive oxygen species²⁴. UCP2, besides being a negative regulator of insulin secretion, acts as an antioxidant. The decrease of UCP2 levels may disturb the oxidative balance leading to the emergence of oxidative damage. Chronic absence of UCP2 causes oxidative stress in pancreatic islets accompanied by impaired insulin secretion²⁵. We observed a non-significant reduction of UCP2, which may indicate either that exposure during 35 days of intermittent hypoxia causes no change in the UCP2 role as a regulator in the glucose homeostasis system or that a slight down-regulation of

UCP2 expression occurs, which was below the threshold of the statistical power conveyed by our small numbers. Several limitations make this result preliminary and subject to cautious interpretation.

Hyperlipidemia is one of the components of the metabolic syndrome that is common in OSA. Experiments evaluating the effect intermittent hypoxia on the lipid profile differ as the methods change from one study to another. Duration of exposure in days and in hours per day, duration of each hypoxia cycle in seconds, nadirs of $F_{I}O_2$, lineage of the mice, are examples of causes for variation. The magnitude of the metabolic disorder induced by intermittent hypoxia depends on the inspired oxygen concentration nadir. Experiments using 10% oxygen as nadir of hypoxia cycle did not provoke metabolic changes after 28 days. Using 5% oxygen nadir altered all common lipid profile indices²⁶. The moderate severity of intermittent hypoxia – both in terms of oxygen nadir and of hours of exposure per day – may be one reason for the absence of change in lipid parameters in the present results. On the same note, 8% $F_{I}O_2$ nadir during 8 hours here employed may have not been severe enough also to change UCP2 expression.

The present study investigated the participation of UCP2 in the glucose homeostasis system. The results indicate that after 35 days of exposure to intermittent hypoxia no significant change in expression of this regulatory protein was observed. In the dose here employed, intermittent hypoxia causes changes in pancreatic function that may be unrelated to the changes in the expression of mRNA UCP2.

6.1 TABELA E FIGURAS DO ARTIGO

Table 1 – Median [25th percentile, 75th percentile] levels of lipid profile parameters.

	Sham Intermittent Hypoxia	Intermittent Hypoxia	P value
Fasting serum triglycerides (mg/dl)	22.6 [19.9 - 28.1]	19.93 [18.15 - 28.78]	0.4
Fasting serum total cholesterol (mg/dl)	42.17 [37.16 - 45.51]	42.17 [40.08 – 50.94]	0.3
Fasting serum HDL- cholesterol (mg/dl)	22.91 [21.27 – 24.27]	23.73 [21.81 – 25.64]	0.5
LDL- cholesterol (mg/dl)*	13.75 [9.68 – 17.14]	16.03 [13.37 – 21.05]	0.2

HDL: high-density lipoprotein; LDL: low-density lipoprotein; *estimated by the Friedewald formula

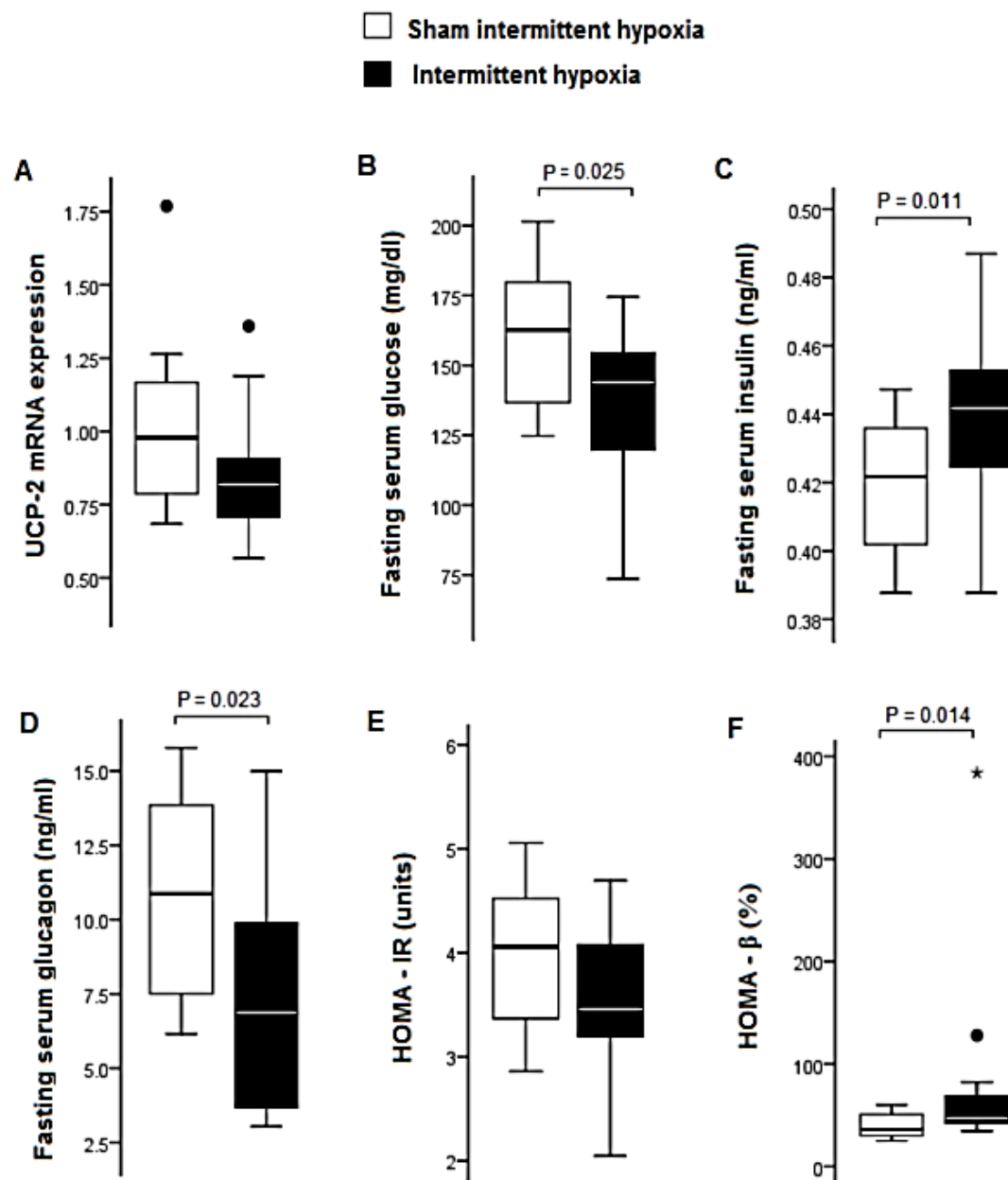


Figure 1: Box plots of glucose metabolism variables showing 10th, 25th, 50th, 75th, and 90th percentiles and outliers (circles) and extreme outliers (asterisks). P values calculated by Mann-Whitney test.

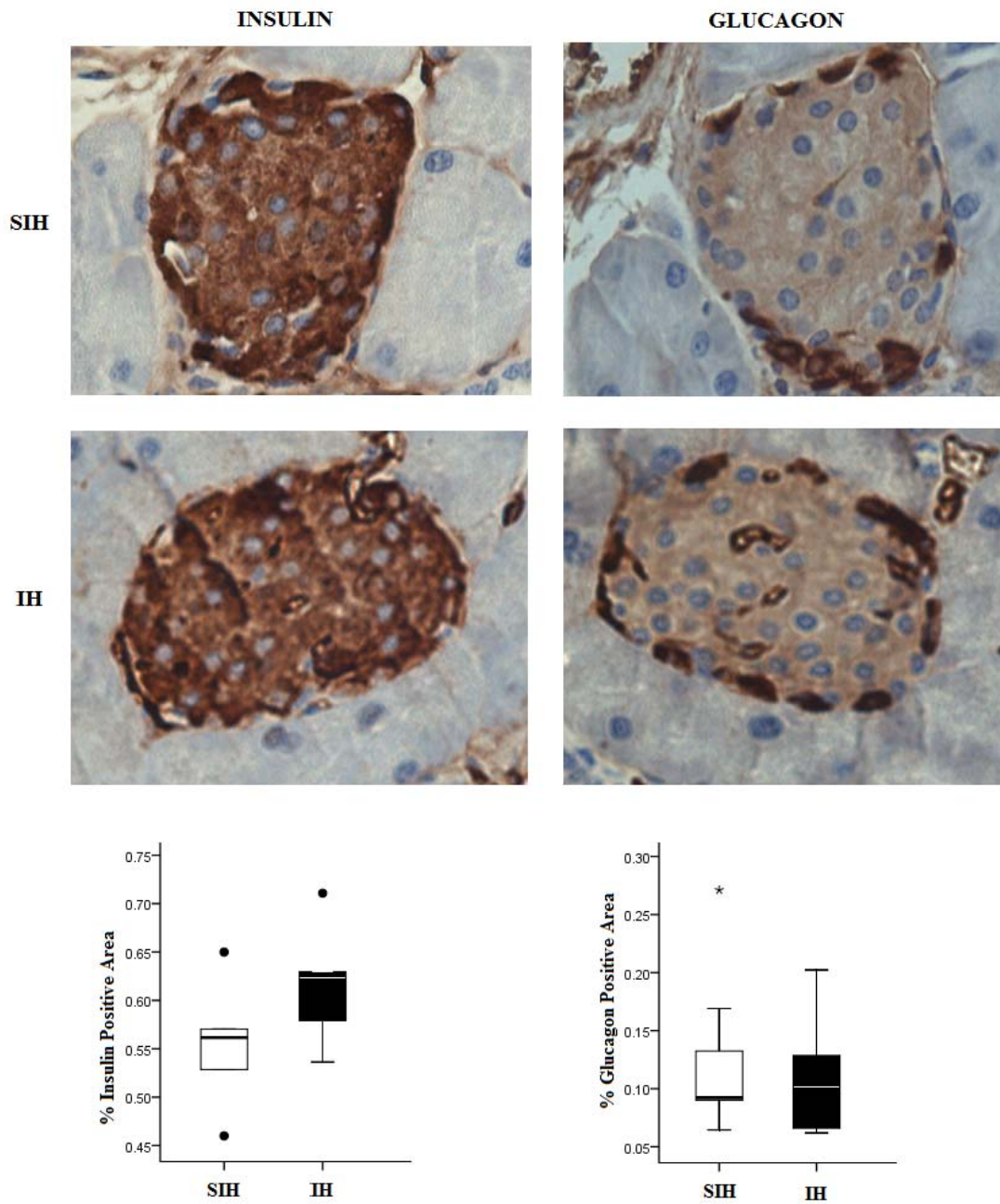


Figure 2: Box-plot of the relative area of the islet occupied by beta and alpha cell in immunohistochemistry staining for insulin and glucagon magnified 400 times. Box plots shows 10th, 25th, 50th, 75th, and 90th percentiles and outliers (circles) and extreme outliers (asterisks). Sham intermittent hypoxia group (SIH) and intermittent hypoxia (IH) groups.

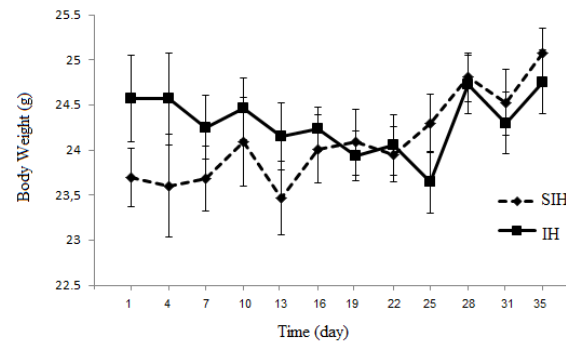


Figure 3: Changes in body weight during 35 days of exposure to intermittent hypoxia (IH) and to sham intermittent hypoxia group (SIH). Values are mean \pm 1SE.

ACKNOWLEDGMENTS

Research was supported by the Research Incentive Fund, Hospital de Clinicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA). Ms. Fiori was recipient of a grant from the National Research Council (CNPq). Prof. Dr. Luise Meurer was instrumental in the analyses of immunohistochemistry.

ABBREVIATIONS

CPAP- continuous positive airway pressure

F_IO₂ - fraction of inspired oxygen

IH- intermittent hypoxia

OSA- Obstructive sleep apnea

SIH - sham intermittent hypoxia

UCP2- uncoupling protein-2

REFERENCES

- ¹ Dempsey JA, Veasey SC, Morgan BJ, O'Donnell CP. Pathophysiology of sleep apnea. *Physiol Rev.* 2010;90:47-112.
- ² Tufik S, Santos-Silva R, Taddei JA, Bittencourt LR. Obstructive sleep apnea syndrome in the Sao Paulo Epidemiologic Sleep Study. *Sleep Med* 2010;11:441-6.
- ³ Wilcox I, McNamara SG, Collins FL, Grunstein RR, Sullivan CE. "Syndrome Z": the interaction of sleep apnoea, vascular risk factors and heart disease. *Thorax.* 1998;53 Suppl 3:S25-8.
- ⁴ Weinstock TG, Wang X, Rueschman M, et al. A controlled trial of CPAP therapy on metabolic control in individuals with impaired glucose tolerance and sleep apnea. *Sleep.* 2012;35:617-625B.
- ⁵ Sharma SK, Agrawal S, Damodaran D, et al. CPAP for the metabolic syndrome in patients with obstructive sleep apnea. *N Engl J Med.* 2011;365:2277-86.
- ⁶ Trombetta IC, Somers VK, Maki-Nunes C, et al. Consequences of comorbid sleep apnea in the metabolic syndrome--implications for cardiovascular risk. *Sleep.* 2010;33:1193-9.
- ⁷ 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(10):1080-111.
- ⁸ Iiyori N, Alonso LC, Li J, et al. Intermittent hypoxia causes insulin resistance in lean mice independent of autonomic activity. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175:851-7.
- ⁹ Polotsky VY, Li J, Punjabi NM, et al. Intermittent hypoxia increases insulin resistance in genetically obese mice. *J Physiol.* 2003;552:253-64.

-
- ¹⁰ Zhang CY, Baffy G, Perret P, et al. Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell*. 2001;105:745-55.
- ¹¹ Chan CB, De Leo D, Joseph JW, et al. Increased uncoupling protein-2 levels in beta-cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: mechanism of action. *Diabetes*. 2001;50:1302-10.
- ¹² Ashcroft FM, Gribble FM. ATP-sensitive K⁺ channels and insulin secretion: their role in health and disease. *Diabetologia*. 1999;42:903-19.
- ¹³ Echtay KS. Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role? *Free Radic Biol Med*. 2007;43:1351-71.
- ¹⁴ Drager LF, Jun JC, Polotsky VY. Metabolic consequences of intermittent hypoxia: relevance to obstructive sleep apnea. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2010;24:843-51.
- ¹⁵ National Research Council: Guide for the care and Use of Laboratory Animals. Washington, D.C.: *National Academy Press*.1996. National Research Council: Guide for the care and Use of Laboratory Animals. Washington, D.C.: *National Academy Press* 1996.
- ¹⁶ 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
- ¹⁷ Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972;18:499-502.
- ¹⁸ 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.
- ¹⁹ 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;111:881-90.
- ²⁰ Drager LF, Li J, Reinke C, Bevans-Fonti S, Jun JC, Polotsky VY. Intermittent hypoxia exacerbates metabolic effects of diet-induced obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 2011;19:2167-74.

-
- ²¹ Savransky V, Nanayakkara A, Vivero A, et al. Chronic intermittent hypoxia predisposes to liver injury. *Hepatology*. 2007;45:1007-13
- ²² Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care*. 2004;27:1487-95.
- ²³ Pallayova M, Steele KE, Magnuson TH, et al. Sleep apnea predicts distinct alterations in glucose homeostasis and biomarkers in obese adults with normal and impaired glucose metabolism. *Cardiovasc Diabetol*. 2010;9:83.
- ²⁴ Xu J, Long YS, Gozal D, Epstein PN. Beta-cell death and proliferation after intermittent hypoxia: role of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2009;46(6):783-90.
- ²⁵ Pi J, Bai Y, Daniel KW, Liu D, et al. Persistent oxidative stress due to absence of uncoupling protein 2 associated with impaired pancreatic beta-cell function. *Endocrinology*. 2009;150:3040-8.
- ²⁶ 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.

7. CONSIDERAÇÕES GERAIS

De acordo com nossos objetivos, os achados sinalizam que:

- A hipóxia intermitente não alterou os níveis de mRNA da UCP2 em células pancreáticas.
- Os camundongos submetidos à hipóxia intermitente tiveram níveis de glicose e glucagon mais baixos e níveis de insulina mais altos do que camundongos submetidos à hipóxia simulada.
- Na avaliação da homeostase (HOMA) o grupo hipóxia intermitente teve maior função das células- β quando comparado ao grupo controle.
- A hipóxia intermitente não teve efeito sobre o perfil lipídico.

A influência da hipóxia intermitente em relação à proteína UCP2 no pâncreas será analisada por imunistoquímica.