

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

Níveis séricos de NSE e S100B: marcadores periféricos de insulto cerebral na síndrome de apnéia e hipopnéia obstrutiva do sono

Por

Carla Winei Braga

Orientador: Professor Doutor Diogo Onofre Gomes de Souza

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica

Porto Alegre

2004

AGRADECIMENTOS

Ao professor Diogo Onofre Gomes de Souza pelo exemplo de pessoa e profissional pesquisador, pelo seu carinho, dedicação incansável e alegria contagiante, pela sua já antiga e eterna amizade, por ter acreditado e investido na minha proposta de trabalho.

Ao professor Deniz Martinez pela seu carinho, dedicação e interesse como co-orientador deste trabalho.

Ao professor Luis Valmor Portela pela sua disponibilidade, dedicação e otimismo.

A professora Suzana Tchernin Wofchuk pela sua disponibilidade, cuidadosa participação e contribuição.

Ao professor Carlos Alberto Saraiva Gonçalves pela sua participação no trabalho.

Ao professor Luiz Lavinsky do serviço de otorrinolaringologia do HCPA, por ter permitido que boa parte dos exames de polissonografia fossem realizados dentro das dependências de sua clínica privada.

Ao professor Simão Levin Piltcher, do serviço de otorrinolaringologia do HCPA, por ter permitido que algumas avaliações fossem feitas nas dependências do serviço.

Ao médico Sérgio Saldanha Menna Barreto e a médica Simone Canani, por terem autorizado a execução de exames no serviço de pneumologia do HCPA, embora isto não tenha sido possível posteriormente.

A médica Márcia Lorena Fagundes Chaves e ao médico Carlos Roberto de Mello Rieder, ambos do serviço de neurologia do HCPA, pelo auxílio na elaboração da anamnese neurológica.

Aos professores que ministraram as disciplinas do Mestrado, em especial o professor Marcos Luiz Santos Perry do Departamento de Bioquímica da UFRGS e o professor Sady Selaimen da Costa do Serviço de Otorrinolaringologia do HCPA, pelos seus ensinamentos.

Ao médico Geraldo Pereira Jotz, colega e amigo, pelo incentivo que me deu para fazer o Mestrado, pelo seu carinho e compreensão de sempre nas atividades de trabalho.

Aos colegas dos laboratórios 26 e 35 por terem compartilhado seu local de trabalho em algumas ocasiões, seus computadores, seus preciosos tempos e pelas dicas que me forneceram, em especial aos colegas Félix Alexandre Antunes Soares, Diogo Losch de Oliveira, Marcelo Farina e Débora Vigevani Schaf (acadêmica de Medicina da UFRGS).

Aos funcionários do departamento de bioquímica da UFRGS.

A todos os funcionárias do Laboratório do Sono, sem os quais não seria possível a realização dos exames de polissonografia e as coletas de sangue.

Aos residentes e funcionários do serviço de otorrinolaringologia do HCPA pela sua disponibilidade e pelo auxílio prestado no início deste trabalho.

Aos colegas das disciplinas do programa de pós-graduação, por terem compartilhado horas de estudo e dedicação.

A colega Roberta Boeck Noer pelo essencial auxílio na coleta de dados.

A todos os profissionais da área da saúde que me abriram portas ao longo deste trabalho.

Aos pacientes que participaram, submetendo-se à avaliação e à coleta de sangue.

A médica psiquiatra Maria Cristina Vasconcellos pelo auxílio na compreensão dos meus sentimentos, conquistas e frustrações.

A todos os meus amigos, os que me incentivaram e os que participaram direta ou indiretamente na execução do trabalho.

A minha família, em especial minha mãe Luiza e meu irmão Marlon, pelo carinho, incentivo e inspiração.

Ao meu amado marido Geraldo, sem o qual seria impossível concluir esta jornada.

Ao meu querido filho Pedro, ainda intra-útero, mas já um participante ativo nesta etapa de vida.

A Deus.

SUMÁRIO

RESUMO.....	2
INTRODUÇÃO.....	3
OBJETIVOS.....	7
RESULTADOS.....	8
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

RESUMO

A Síndrome de Apnéia e Hipopnéia Obstrutiva do Sono (SAHOS) é uma doença crônica que ocasiona alterações neurológicas e comportamentais, entre outras. Apesar de sua gravidade e devido a sua complexidade, a SAHOS muitas vezes não é diagnosticada e seu manejo pode não ser adequado. A presença de um marcador bioquímico de injúria cerebral poderia ser de grande valia no monitoramento da doença.

S100B e NSE são marcadores periféricos astrocitário e neuronal respectivamente de sofrimento cerebral, por isso medimos os níveis séricos das proteínas S100B e NSE em 29 homens com SAHOS, com idade entre 30 e 45 anos, na manhã seguinte ao exame de polissonografia realizado durante toda a noite. Comparamos estes pacientes com um grupo controle do mesmo sexo e da mesma faixa etária. Todos foram avaliados para a detecção de doença neurológica ou psiquiátrica.

Encontramos um aumento dos níveis de S100B nos pacientes com SAHOS quando comparado ao grupo controle (0.15 ± 0.09 vs. 0.08 ± 0.065 ng/ml; $p=0.01$).

Os níveis de NSE não foram diferentes nos dois grupos (17.5 ± 12.2 vs. 15.8 ± 6.8 ng/ml)..

O insulto cerebral subclínico ocasionado pela SAHOS em pacientes sem doença neurológica ou psiquiátrica aumentou os níveis de S100B, tornando este marcador bioquímico muito útil na detecção e acompanhamento da doença.

INTRODUÇÃO

O sono é muito importante para a manutenção da qualidade de vida. Na época de Aristóteles já havia uma tentativa de conceituar sono: “o sono é uma peculiaridade da alma ou do corpo ou comum a ambos; e se comum, a que parte do corpo ou da alma pertencem?” (Aristóteles 350AC).

Atualmente existe um conceito técnico de sono que é a ausência de ondas alfa e a presença de ondas teta e delta no eletroencefalograma (Critérios de Rechtschaffen and Kales). Outras definições são utilizadas sem muito contribuir para a compreensão do fenômeno. São elas: “O sono é um estado fisiológico caracterizado por abolição prontamente reversível da consciência, por quiescência motora relativa e por elevação do limiar de respostas ao meio ambiente, que ocorre em episódios periódicos” . E outra: “O sono é o estado fisiológico que interrompe a vigília e permite restaurar as condições do início da vigília precedente”.

Utilizamos um terço da vida dormindo, garantindo desta forma uma série de funções vitais e uma boa saúde. Qualquer perturbação do sono, inclusive um episódio de apnéia pode piorar a qualidade de vida do indivíduo.

A Síndrome de Apnéia e Hipopnéia Obstrutiva do Sono (SAHOS) é uma doença crônica, evolutiva e apresenta uma variedade de sintomas que podem ocasionar graves alterações hemodinâmicas, neurológicas e comportamentais (2,3). A SAHOS se caracteriza por episódios repetidos de distúrbio respiratório durante o sono, como apnéias e hipopnéias, juntamente com ronco , ocasionados, na maioria das vezes, por obstrução das vias aéreas superiores. Fatores anatômicos e funcionais combinados determinam o estreitamento e o colapso da faringe. Portanto, as relações físicas e espaciais das vias aéreas superiores e as alterações neuromusculares são fundamentais na determinação da etiologia da SAHOS, embora muitas vezes a etiologia permaneça desconhecida. Todos estes eventos ocasionam fragmentação do sono e diminuição da saturação de hemoglobina(26).

O ronco constitui um ruído inspiratório ou expiratório produzido pela vibração das partes moles da orofaringe, principalmente da úvula, palato mole e paredes laterais da faringe. No quadro de distúrbios relacionados com o

sono, o ronco pode representar o início da fase pré – apnéica ou pode ser considerado uma entidade isolada, apesar de ser o sintoma mais freqüente (4).

As causas de obstrução das vias aéreas superiores associadas com a SAHOS e o ronco podem ser: desvio de septo nasal, rinites, polipose naso – sinusal, atresia coanal, colapso de válvula nasal, hiperplasia adenoideana, estenose de rinofaringe, hiperplasia de tonsila faríngea ou lingual, macroglossia, tumores, micrognatia congênita ou adquirida, hipoplasia mandibular, lipoma cervical, edema ou redundância de estruturas supraglóticas, paralisia de prega vocal, paralisia cerebral, distrofia muscular, miastenia gravis, miopatias congênitas ou metabólicas, esclerose múltipla, hipotireoidismo, lesões medulares e acidente vascular cerebral. A obesidade representa um fator de agravamento, pois reduz os volumes pulmonares, estreita o lúmen das vias aéreas e o tecido gorduroso infiltra os espaços parafaríngeos.

A confirmação do diagnóstico de SAHOS é feita através do exame de polissonografia. Polissonografia é o termo genérico que se refere ao registro simultâneo de variáveis fisiológicas durante o sono, tais como: eletroencefalograma, eletroculograma, eletromiograma, eletrocardiograma, fluxo aéreo nasal e oral, esforço respiratório torácico e abdominal, gases sanguíneos (saturação de oxigênio, concentração de dióxido de carbono), temperatura corporal, tumescência peniana, entre outras. Estas variáveis são monitoradas durante toda a noite. Com o exame também pode-se verificar a gravidade da doença, através da detecção do índice de apnéia (27).

A SAHOS tem sido relacionada à sonolência excessiva durante o dia contribuindo para a ocorrência de acidentes automobilísticos. O aumento da prevalência de complicações cardiovasculares nestes indivíduos portadores de SAHOS também tem sido atribuído ao distúrbio em questão (24,25).

Sabe-se que 9% das mulheres e 24% dos homens apresentam cinco ou mais episódios de apnéia por hora, detectados através do exame de polissonografia e que 2% das mulheres e 4% dos homens de idade média apresentam os critérios mínimos para diagnóstico de SAHOS (5): cinco ou mais eventos respiratórios e hipersonolência diurna. Sexo masculino e obesidade estão fortemente associados à esta patologia (1).

Infelizmente, na prática médica em geral, a SAHOS ainda não é investigada e detectada de rotina, fazendo com que muitas vezes a causa principal do problema do paciente não seja identificada. Existe, atualmente uma preocupação cada vez maior em investigar melhor as condições de sono e vigília de pacientes roncadores e com distúrbios cardiocirculatórios.

Déficit neurológico, cognitivo e psicológico também são sintomas freqüentes da SAHOS, portanto uma adequada avaliação neuropsicológica destes pacientes é essencial para a detecção e prognóstico da doença (18). Por isso acredita-se que a presença de um marcador bioquímico periférico de injúria cerebral poderia trazer grande benefício na detecção, na avaliação da gravidade e no acompanhamento desta doença (20).

Estudos recentes mostram que pacientes com doenças neuropsiquiátricas, tais como Esquizofrenia, Transtorno Obsessivo – Compulsivo, Doença de Parkinson, Lúpus Eritematoso Sistêmico, Doença de Alzheimer, Síndrome de Down, Infecção pela HTLV, Acidente Vascular Cerebral, Isquemia Cerebral, as quais se caracterizam por algum grau de comprometimento cerebral, apresentam altos níveis séricos de duas proteínas que estão presentes no cérebro: as proteínas S100B (astrocitária) e NSE (neuronal). Portanto estas proteínas são consideradas marcadoras periféricas de dano cerebral (7-13, 16, 17).

As proteínas S100B e NSE (neuron-specific enolase) são marcadores bioquímicos de lesão astrocitária e neuronal respectivamente (6). A S100B está presente em altas concentrações em células da glia e de Schwann, no cérebro, sendo sintetizada e liberada pelos astrócitos. Fora do cérebro, pode ser detectada em menores quantidades em melanócitos, adipócitos, células de Langerhans, células da hipófise, músculo esquelético, coração e rins. As Variações nos níveis séricos desta proteína podem estar associadas a insulto cerebral. A NSE está localizada no citoplasma dos neurônios e também pode ser encontrado em células neuroendocrinológicas. Seus níveis estão aumentados no sangue de pacientes com neuroblastoma, carcinoma de pulmão, infarto, hipóxia e insultos do sistema nervoso central. Eritrócitos e trombócitos também contêm alguma quantidade de NSE (14,15).

Considerando os efeitos da SAHOS no cérebro, formulou-se a hipótese de que pacientes com SAHOS poderiam apresentar níveis séricos elevados

das proteínas S100B e NSE, o que indicaria que os níveis destas proteínas poderiam marcar algum grau de insulto cerebral.

Neste estudo, verificamos os níveis séricos de S100B e NSE em pacientes com mais de cinco episódios respiratórios por hora, detectados no exame de polissonografia, comparados a pacientes controles (menos de cinco episódios). Os pacientes, todos do sexo masculino, foram pareados por idade. Foram controladas as variáveis de índice de massa corporal, sonolência diurna, distúrbio neuropsiquiátrico, presença de enxaqueca, entre outras.

OBJETIVOS

Os objetivos do estudo são:

1. Verificar se existe diferença nos níveis séricos dos marcadores bioquímicos S100B e NSE em pessoas com e sem SAHOS.
2. Caracterizar insulto cerebral em pacientes com SAHOS se houver aumento dos marcadores nestes pacientes quando comparados aos controles.
3. Correlacionar os níveis séricos de S100B e NSE em pacientes com SAHOS.
4. Determinar se existe correlação entre o grau de hipóxia e os níveis séricos de S100B ou NSE.
5. Determinar se existe correlação entre o índice de Massa Corporal e os níveis séricos de S100B ou NSE.

RESULTADOS

Os resultados do presente trabalho foram reunidos em um artigo submetido a publicação na revista European Respiratory Journal.

Carla Winei Braga, Luis Valmor Portela, Suzana Tchernin Wolfchuk, Deniz Martinez e Diogo Onofre Gomes de Souza. *NSE and S100B serum levels: peripheral biochemical markers of cerebral damage in sleep apnea syndrome.*

NSE and S100B serum levels: peripheral biochemical markers of cerebral damage in sleep apnea syndrome

Braga CW¹, Portela LVC¹, Wofchuk S¹, Martinez D², Souza DO^{1*}.

1. Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS
2. Departamento de Medicina Interna, FAMED-UFRGS

*Diogo O. Souza

Corresponding author

Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS

Rua Ramiro Barcelos, 2600 – Anexo

CEP 90035-003, Porto Alegre- RS

BRAZIL

Fax: (55-51) 3316 550

E-mail: diogo@ufrgs.br

ABSTRACT

Obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) is a chronic disease that can be mild or severe, innocuous or life-threatening. Among its various manifestations OSAS causes neurobehavioral alterations indicating its complexity. Impairment of brain function is, manifested as neurological deficits and cognitive dysfunction. The presence of a biochemical marker of cerebral damage would be useful to help in the assessment and care of this disease.

We measured the serum levels of S100 β protein and neuron-specific enolase (NSE) in 29 male patients with OSAS in the morning after polysomnography. We compared the data so obtained with that from a matched

control group of 17 subjects. Every individual was evaluated by means of validated questionnaires to detect neurological and psychiatric alterations.

Serum levels of S100 β were higher in patients with OSAS when compared with the control group (0.15 ± 0.09 vs. 0.08 ± 0.065 ng/ml; $p=0.01$). Serum levels of NSE were similar in both groups (17.5 ± 12.2 vs. 15.8 ± 6.8 ng/ml).

Cerebral impairment caused by obstructive sleep apnea syndrome in patients with subclinical neurological or psychiatric alterations can be the cause of the increase in S100 β levels, making this biochemical marker potentially useful to detect and monitor the consequences of OSAS.

Introduction

We spend one-third of our lives sleeping and events taking place during sleep are important to support health. If abnormalities disturb sleep quality of life worsens due to unknown mechanisms.

One of these abnormalities is the Obstructive Sleep Apnea Syndrome (OSAS). It is characterized by recurrent breathing disturbances during sleep with repetitive hypopneic and apneic phases as well as snoring, due to intermittent narrowing or occlusion of the upper airways. This leads to sleep fragmentation and fall in oxyhemoglobin oxygen saturation. OSAS has been associated with daytime hypersomnolence, automobile accidents, cardiovascular morbidity and mortality [31,32]. Besides increased prevalence of cardiovascular complications, thromboembolic and haemodynamic events with repetitive ischemic stroke are possible consequences of OSAS] and cerebral ischemia is one of the major risks for patients with OSAS [1-5,27-30].

The severity of OSAS is measured by the apnea-hypopnea index (AHI), calculated dividing the total number of apneas and hyponeas (AH) by the number of hours of sleep recorded in overnight polysomnography. Prevalence of sleep-disordered breathing, defined as an AHI higher than 5 AH per hour, is estimated as 9% for women and 24% for men. For the diagnosis of the syndrome it is required the presence of a sleep symptom, usually hypersomnolence [33]. It is estimated that 2% of women and 4% of men in the middle-aged work force meet the minimal diagnostic criteria for sleep apnea syndrome (an apnea-hypopnea score of 5 or higher and daytime hypersomnolence). Male gender and obesity are strongly associated with the

presence of sleep-disordered breathing. Habitual snorers, men or women, tend to have a higher AHI (15 AH/hour or higher) [6].

The prevalence of undiagnosed sleep-disordered breathing is high among men and much higher than previously suspected among women [7].

Neurological deficit or subtle neuropsychological dysfunction such like memory impairment, are frequent in OSAS. Such deficits may be associated to some degree of brain damage due either to recurrent hypoxemia or to sleep fragmentation. However, it is important to emphasize that application of neuropsychological tests requires specialized staff, being costly and time-consuming in clinical practice.

Nowadays there is a great interest and investment to identify markers able to be predictive or to evaluate answer to treatment in acute or chronic brain disorders. Therefore, the existence of biochemical markers of cerebral damage would be of great usefulness in assessing the consequences of OSAS [8].

In the search for practical ways of detecting brain damage, blood levels of two proteins have become known as biochemical markers: S100 β protein and neuron-specific enolase (NSE).

S100 β is a family of calcium-binding proteins, present in vertebrate tissues, consisting of two subunits, alpha and beta (A and B). The S100 β isoform is present in high concentrations in glial cells and Schwann cells in brain, being synthesized and released by astrocytes. Outside of the brain, it is detected in melanocytes, adipocytes, Langerhans cells, cells of the anterior pituitary, skeletal muscle, heart and kidney. Several studies from our group have shown that elevations of S100 β serum levels are associated with brain diseases [9-14]. Brain cells contain a number of glycolytic enzymes enolases. The YY-isoenzyme subunit, designed as neuron specific enolase (NSE) presents its serum levels increased in neuroblastoma and carcinoma of the lung [15]. Importantly, serum levels of NSE are also increased in various insults to the central nervous system [16-19]. Erythrocytes and thrombocytes also contain considerable amounts of NSE; therefore its measurements suffer interference of haemolysis in sample collection [20].

Thus, to assess the effects of OSAS on brain, in this study we measured the serum levels of S100 β protein and NSE in patients with OSAS.

Materials and methods

Study subjects

We selected exclusively male subjects with ages ranging from 30-45 years old.

Every patient underwent interview, at night, just before the sleep study, involving the following questionnaires: anamneses, neurological evaluation, Epworth scale to quantify somnolence and M.I.N.I. (Mini International Neuropsychiatric Interview - Brazilian version- DSM IV) to assess neurocognitive status. All subjects underwent full-night polysomnography at same night in the sleep laboratory. It was obtained a blood venous sample (5 ml) in a peripheral blood vessel in the morning after polysomnography, at 7:00h. Serum samples (obtained by centrifugation at 5000 x g for 10 min) were frozen (-70 °C) until S100 β and NSE measurements.

This study was approved by the Research Ethical Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre and written consent was obtained from each patient.

Study design

The men were divided in two groups: patients with OSAS (AHI greater more than 5 AH/hour – 29 patients) and control (men with less than 5 respiratory disturbances per hour – 17 controls). The apneas and hypopneas were detected by polysomnography as described below.

Methods

Sleep analysis

Polysomnography was recorded overnight following international guidelines in a polygraph (BrainNet, EMSA, Rio de Janeiro) consisting of electroencephalogram (C3-A2 and C4-A1), right and left electrooculogram, electrocardiogram, and electromyogram of submental and anterior tibialis muscles. Respiratory parameters were assessed by inductance plethysmography (Respirace, AMI, NY) with thoracic and abdominal belts, calibrated with isovolume maneuver. A pulse oximeter with a finger probe was used to continuously measure arterial oxyhemoglobin saturation (Ohmeda, CO).

Body position and movements were detected by video monitoring. All recordings were stored on a personal computer system and scored by trained technicians following standard rules (Rechtschaffen and Kales, 1969). Apneas were defined as reductions of tidal volume below 10% of baseline for 10 seconds or longer; hypopneas, as reductions of tidal volume below 50% of baseline for 10 seconds or longer, accompanied by at least 3% desaturation or an unequivocal arousal.

Laboratory methods

Measurement of S100 β protein levels

As previously described by Portela et al [21], S100 β measurement was performed in a Lumat LB9507 luminometer (EG&G Berthold) using an immunoluminescent assay kit, which use an antibody labeled with isoluminol. The S100 β standard curve was linear up to 20 μ g/l and the coefficient of variation of the duplicates in all range levels of standards and samples were within 5%. S100 β levels are expressed as μ g/l (mean \pm S.D.).

Measurement of NSE protein levels

NSE was measured using an eletrochemiluminescent assay kit. It consists of a double sandwich assay that use an antibody anti-NSE bound with ruthenium, which is the luminescent molecule. The reaction and quantification were performed by Elecsys-2010 (Roche Diagnostics Corporation[®]) [22]. The assay was carried out in duplicate and the coefficient of variation was less than 5%. NSE levels are expressed as ng /ml (mean \pm S.D.).

Analysis

Data are expressed as percentages or means and standard deviations (SD), as specified. The statistical analysis of group differences was performed using t-test, U-test and Fisher's exact test. Relationships between the measurements were investigated by Pearson's correlation analysis. Statistical significance was considered for p less than 0.05.

Results

S100 β was measured in 29 patients with OSAS and in 17 controls, and NSE in 29 patients with OSAS and in 11 of 17 controls. The characteristics of the subjects are shown in table 1.

In patients with OSAS we found significant negative correlation between oxygen saturation and apnea/hypopnea index (AHI) (Figure 1), and positive correlation between AHI and body mass index (Figure 2). Importantly, serum S100 β levels were significantly higher in OSAS group than control group (Table 1 and Figure 3). Serum NSE levels were similar in both groups (Table 1) in spite that there was a positive correlation between S100 β and NSE levels in OSAS group (Figure 4).

There was no correlation of S100 β levels with oxygen saturation (Figure 5) and with body mass index (Figure 6).

We observed a negative correlation between oxygen saturation and NSE levels (Figure 7) and no correlation of NSE levels with body mass index (Figure 8).

Table 1: Baseline comparison of SAS and control groups

Variable	SAS n=29	Control n=17	P
Age y.	38,2 \pm 5,7	34.5 \pm 4.4	0.02 ^t
Body Mass Index. kg/m ²	26.2 \pm 3.8	28.3 \pm 5.5	0.13 ^t
Apnea events	75.0 (40.0 – 180.5)	4.0 (1.5 – 10)	<0.001 ^u
Hipopnea events	43.0 (21.5 – 66.0)	8.0 (3.0 – 10.5)	<0.001 ^u
Apnea Index (events per hour)	18.0 (9.5 – 39.0)	2 (0.73 – 3.5)	<0.001 ^u
Sleep Time during polysomnography	402 (364 – 428)	399 (358 – 429)	0.6 ^u

(minutes)				
Epworth Scale	9.4±4.5	8.1±5.7		0.45 ^t
Lowest Oxygen Saturation (%)	82.1±8.1	86.7±5.1		0.02 ^t
Smoker, n (%)	12 (41.4)	6 (35,3)		0.22 ^F
Caffeine (%)	27 (93.1)	15 (88.2)		0.33 ^F
M.I.N.I.(altered test),n(%) *	11 (37.9)	2 (18.2)		0.29 ^F
Migraine, n (%) *	2 (6.9)	2 (18.2)		0.30 ^F
Previous rhynolaringologyc surgery, n (%) *	6 (20.7)	2 (18.2)		0.99 ^F
NSE (ng/ml) *	17.5±12.2 13.3 (10.5 – 21.4)	15.8±6.8 13.5 (10.3 – 21.2)		0.88 ^U
S100β (µg/l)	0.15±0.09 0.16 (0.08 – 0.19)	0.08±0.065 0.06 (0.02 – 0.14)		0.01 ^U

Data are presented as number (percentage), mean ± SD, or median (interquartile range. 25th-75th percentile). M.I.N.I:... ; NSE (ng/ml): Enolase...; S100β (µg/l). P: statistic meaning, t: test t of Student, U: test U of Mann-Whitney, F: Fisher test; * = variable tested in only 11 patients of control group (apnea index ≤ 5).

Discussion

Patients with OSAS are submitted to a number of potentially damaging physiologic occurrences during sleep, including gas exchange abnormalities and increased sympathetic nervous system activity. The latter is probably a response to intermittent hypoxemia and hypercapnia, chemoreflex activation, and the increased central nervous system arousal that occurs with obstructed breathing [23]. Recurrent arousals are thought to contribute to fragmented sleep architecture. Evidence suggests that OSAS increases risk of daytime systemic arterial hypertension and cardiovascular and cerebrovascular diseases, as well as neurocognitive dysfunction [24]. Abnormalities in mood and affect have been reported in both OSAS and in subjects with heavy snoring [25]. Activities that are impaired are general intellectual ability, learning and memory, sustained and focused attention, executive function, information processing efficiency, and visual and psychomotor performance [26].

Serum S100 β levels increased has been described in different acute and chronic CNS diseases [9-4]. Considering the strong evidences that OSAS may affect brain activity, it would be useful to search for peripheral markers that could help to determine the brain involvement in OSAS. In this study, we found that serum S100 β levels are higher in OSAS patients, compared to controls (Table 1 and Fig. 3). The observed increase in serum S100 β levels in OSAS might be a peripheral biochemical marker of brain damage caused by hypoxia or sleep fragmentation. Importantly, as there was no alteration on the Epworth scale and M.I.N.I. in patients with OSAS, the increase in S100 β levels could may be indicating some sub clinical ischemic brain injury. Although there was a positive correlation between S100 β and NSE levels (Fig. 4), patients with OSAS presented only slightly higher NSE serum levels.

Although a previous study did not detect any variation in serum S100 β and NSE levels in OSAS [8], here we could indicate that S100 β serum levels could be a promising peripheral marker of sub clinical brain injury in patients with OSAS.

Bibliography

1. International classification of sleep disorders. In: Thorpy MJ, ed. Diagnostic and coding manual. Lawrence, Kans.: Allen Press, 1990)
2. Bassiri AG, Guilleminault C. Clinical features and evaluation of obstructive sleep apnea. In: Kryger MH, Roth T, Dement WC, Eds. Principles and practice of sleep medicine. Philadelphia: W.B. Saunders, 3rd Edition, 2000, 869-78).
3. Partinen M, Guilleminault C. Daytime sleepiness and vascular morbidity at seven-year follow-up in obstructive sleep apnea patients. *Chest* 1990; 97:27-32
4. Pressman MR, Schetman WR, Figueroa WG, Van Uiter B, Caplan HJ, Peterson DD. Transient ischemic attacks and minor stroke during sleep. Relationship to the obstructive sleep apnea syndrome. *Stroke* 1995; 26:2361-2365
5. Palomäki H, Partinen M, Erkinjuntti T, Kaste M. Snoring, sleep apnea syndrome, and stroke. *Neurology* 1992; 42: Suppl. 6, 75-82
6. Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Webar S, Badr S. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N Engl J Med* 1993; 29:1230-1235
7. *N Engl J Med* 1993; 328:1230-5
8. Jordan W, Hagedohm J, Wiltfang J, Laier-Groeneveld G, Tuman H, Rodenbeck A, Rütner E, Hajak G. Biochemical markers of cerebrovascular injury in sleep apnoea syndrome. *Eur Resp J* 2002; 20:158-164
9. Walz R, Portela LV, Tort AB, Neto EC, Fernandes LN, Goncalves CA, Souza DO. Serum S100 β levels in patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Neurology*. 2000 54:2021-2
10. Portela LC, Tort AB, Neto EC, Kessler RG, Penchaszadeh V, Souza DO, Goncalves CA, Giugliani R. High immunoccontent of S100 beta protein in amniotic fluid of pregnancies with Down syndrome. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2000 16: 590-592
11. Lara DR, Gama CS, Belmonte-de-Abreu P, Portela LV, Goncalves CA, Fonseca M, Hauck S, Souza DO. Increased serum S100 β protein in

- schizophrenia: a study in medication-free patients. *J Psychiatr Res.* 2001 35: 11-14;
12. Portela LV, Brenol JC, Walz R, Bianchin M, Tort AB, Canabarro UP, Beheregaray S, Marasca JA, Xavier RM, Neto EC, Goncalves CA, Souza DO. Serum S100 β levels in patients with lupus erythematosus: preliminary observation. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002 9: 164-166
 13. Machado-Vieira R, Lara DR, Portela LV, Goncalves CA, Soares JC, Kapczinski F, Souza DO. Elevated serum S100 β protein in drug-free bipolar patients during first manic episode: a pilot study. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2002 12:269-72
 14. Portela LV, Tort AB, Walz R, Bianchin M, Trevisol-Bittencourt PC, Wille PR, Cardoso RC, Ishida MM, vonWangenheim A, Grisard EC, Steindel M, Goncalves CA, Souza DO. Interictal serum S100 β levels in chronic neurocysticercosis and idiopathic epilepsy. *Acta Neurol Scand.* 2003 108: 424-427
 15. Marangos PJ, Schmechel DE. Neuron specific enolase, a clinically useful marker for neurons and neuroendocrine cells. *Ann Rev Neurosci* 1987; 10: 269-295
 16. Missler U, Wiesmann M, Friedrich C, Kaps M. S-00 Protein and neuron specific enolase concentrations in blood as indicators of infarction volume and prognosis in acute ischemic stroke. *Stroke* 1997; 28: 1956-960
 17. Persson L, Hardemark HG, Gustafsson J, et al. S-100 protein and neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid and serum: markers of cell damage in human central nervous system. *Stroke* 1987; 18: 911-918
 18. Rosen H, Rosengren L, Herlitz J, Blomstrand C. Increased serum levels of S-100 protein are associated with hypoxic brain damage after cardiac arrest. *Stroke* 1998; 29: 473-477
 19. Cunningham RT, Young IS, Winder J, et al. Serum neurone specific enolase levels as an indicator of neuronal damage in patients with cerebral infarction. *Eur J Clin Invest* 1991; 21: 497-500
 20. Ghobrial M, Ross ER. Immunocytochemistry of neuron-specific enolase: a re-evaluation. In: Zimmerman HM, ed. *Progress in Neuropathology*. New York, Raven Press, 1986; pp. 199-221

21. Portela LV, Tort AB, Schaf DV, Ribeiro L, Nora DB, Walz R, et al. The serum S100 β concentration is age dependent. *Selim. Chem* 2002; 48: 950-952)
22. Kulpa J, Wojcik E, Reinfuss M, Kolodziejski L. Carcinoembryonic antigen, squamous cell carcinoma antigen, CYFRA 21-1, and neuron-specific enolase in squamous cell lung cancer patients. *Clin Chem* 2002; 48: 1931-7
23. Tilkian AG, Guilleminault C, Schroeder JS, et al: Hemodynamics in sleep-induced apnea: Studies during wakefulness and sleep. *Ann Intern Med* 1976; 85:714-719
24. Vital Statistics of the United States 1087. Washington, DC: National Center for Health Statistics, 1988
25. Naëgelé B, Thoivard V, Pépin JL, et al: Deficits of cognitive executive functions in patients with sleep apnea syndrome. *Sleep* 18(1): 43-52, 1995
26. Bedard MA, Montplaisir J, et al: Persistent neuropsychological deficits and vigilance impairment in sleep apnea syndrome after treatment with continuous positive airways pressure (CPAP). *J Clin Exp Neuropsychol* 15:330-341, 1993
27. Moee T, Franklin KA, Holmstrom K, Rabben T, Wiklund U. Sleep-disordered breathing and coronary artery disease: long-term prognosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:1910-3.
28. Nieto FJ, Herrington DM, Redline S, Benjamin EJ, Robbins JA. Sleep apnea and markers of vascular endothelial function in a large community sample of older adults. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169:354-60.
29. Hermann DM, Bassetti CL. Sleep-disordered breathing and stroke. *Curr Opin Neurol* 2003;16:87-90.
30. Ancoli-Israel S, DuHamel ER, Stepnowsky C, Engler R, Cohen-Zion M, Marler M. The relationship between congestive heart failure, sleep apnea, and mortality in older men. *Chest*. 2003 Oct;124(4):1400-5.
31. Marti S, Sampol G, Munoz X, Torres F, Roca A, Lloberes P, Sagales T, Quesada P, Morell F. Mortality in severe sleep apnoea/hypopnoea syndrome patients: impact of treatment. *Eur Respir J*. 2002 Dec;20(6):1511-8.
32. Poceta JS, Loubé DI, Kellgren EL, Bizik K, Mitler MM. Mortality in Obstructive Sleep Apnea: Association with Impaired Wakefulness. *Sleep Breath*. 1999;3(1):3-8.

33. Newman AB, Spiekerman CF, Enright P, Lefkowitz D, Manolio T, Reynolds CF, Robbins J. Daytime sleepiness predicts mortality and cardiovascular disease in older adults. The Cardiovascular Health Study Research Group. *J Am Geriatr Soc.* 2000;48:115-23.

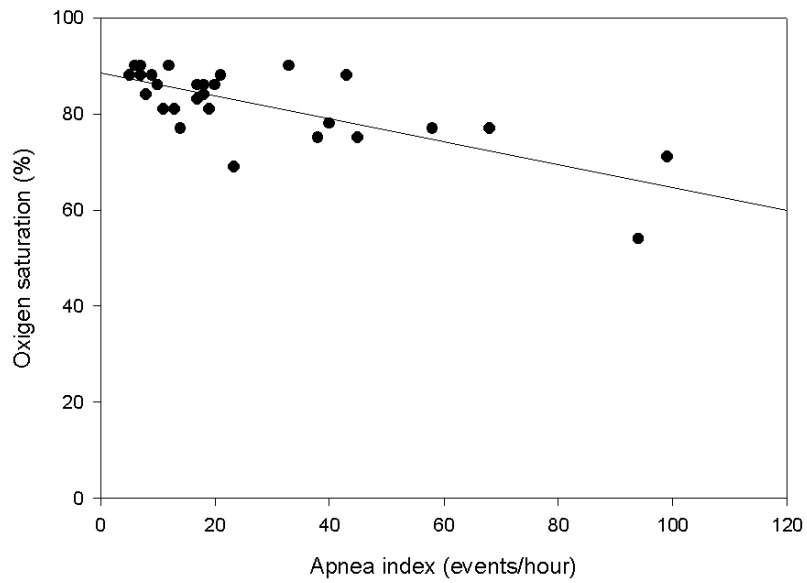


Figure 1: Correlation between oxygen saturation (%) and apnea index (events/hour) in patients with SAS. Each black circle represents an individual. N = 29. A significant correlation was observed by Pearson's coefficient (- 0.755; p = 0.00).

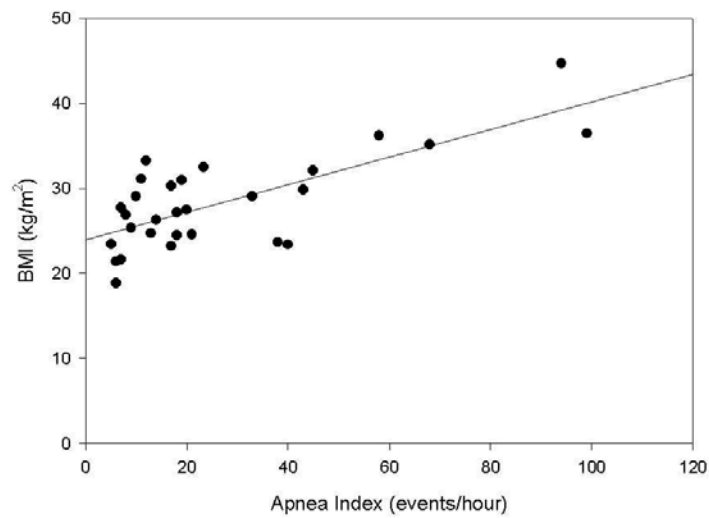


Figure 2: Correlation between body mass index (Kg/m²) and apnea index (events/hour) in patients with SAS. Each black circle represents an individual. N = 29. A significant correlation was observed by Pearson's coefficient (0.739; p=0.00).

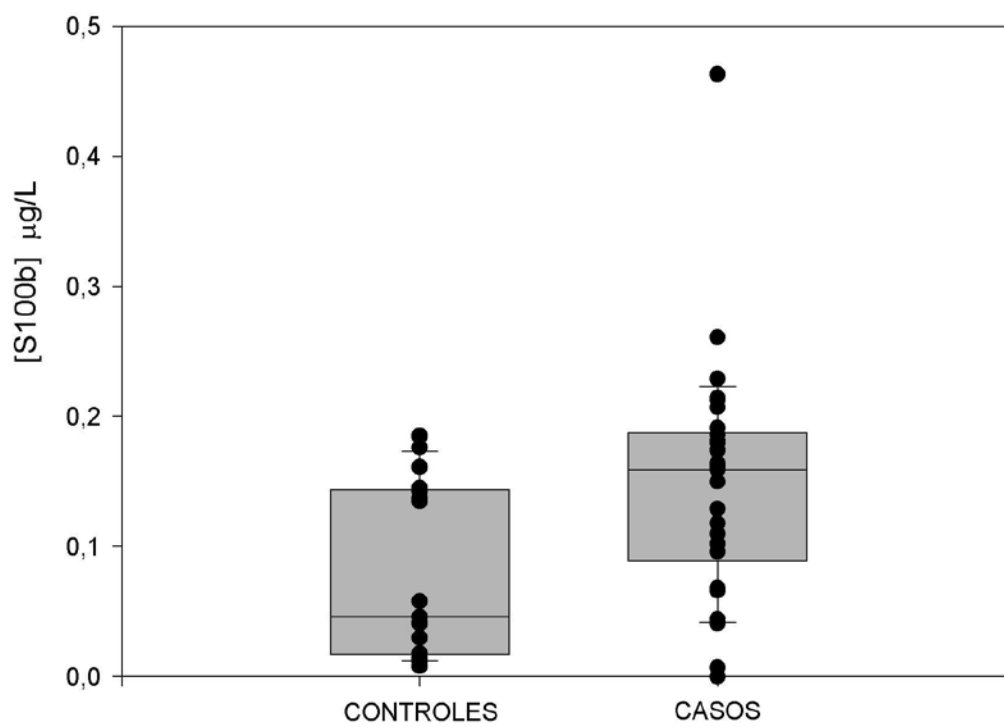


Figure 3: S100B levels (µg/L) in control group (17 patients) and SAS group (29 patients). *Significantly different from control group, $p < 0,05$.

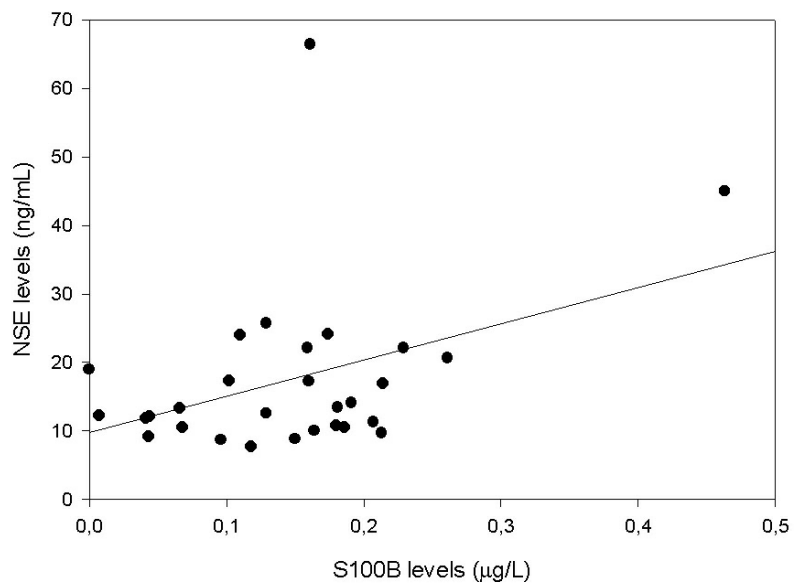


Figure 4: Correlation between serum S100B ($\mu\text{g/L}$) and NSE (ng/ml) levels in patients with SAS. Each black circle represents an individual. $N = 29$. A significant correlation was observed by Pearson's coefficient (0.395; $p = 0.034$).

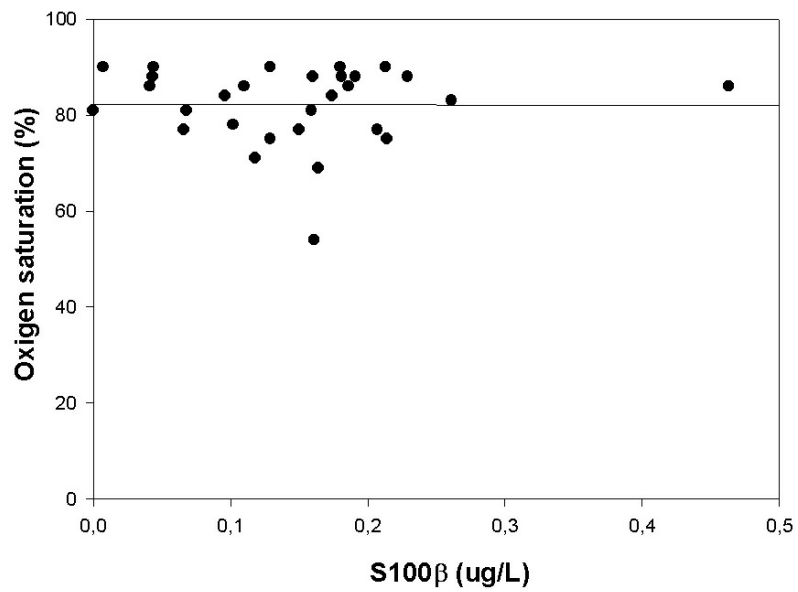


Figure 5: Correlation between oxygen saturation and S00B levels ($\mu\text{g/L}$) in patients with SAS. Each black circle represents an individual. $N= 29$. No correlation was observed by Pearson's coefficient (0,39; $p= 0,842$).

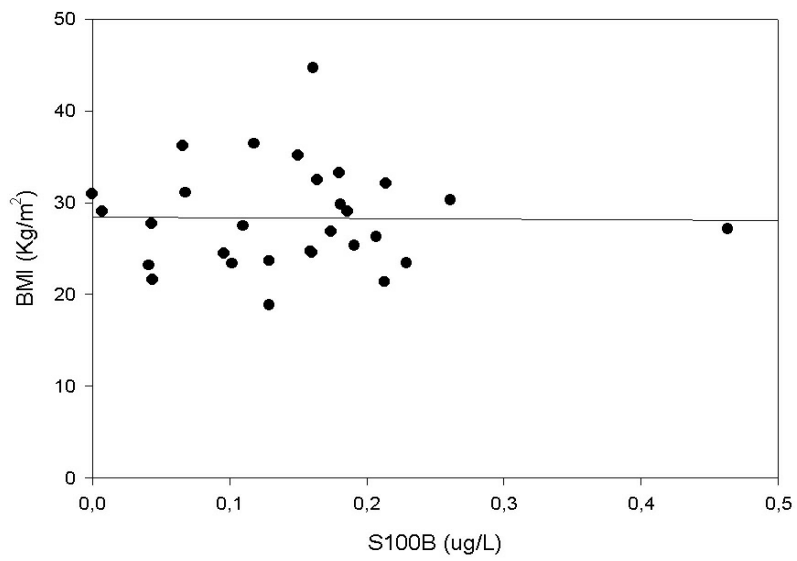


Figure 6: Correlation between body mass index and S100B ($\mu\text{g/L}$) in patients with SAS. Each black circle represents an individual. $N = 29$. No correlation was observed by Pearson's coefficient (-0.12 ; $p = 0.951$).

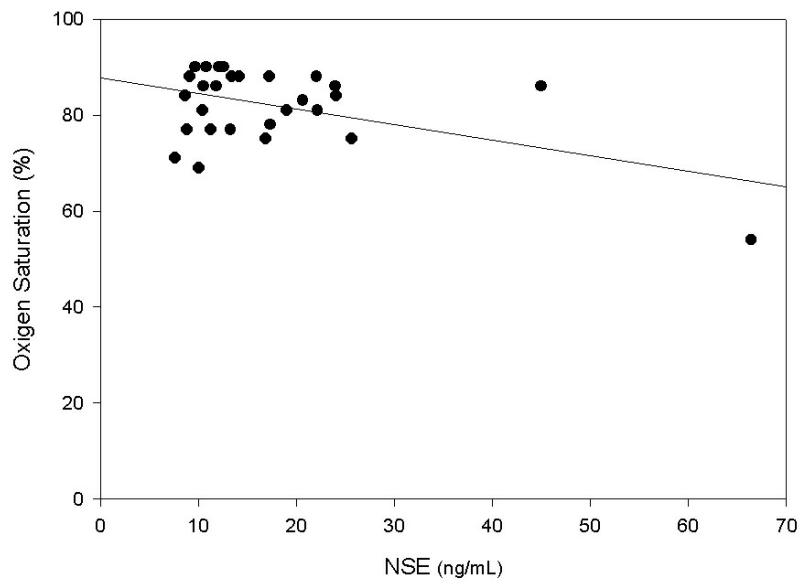


Figure 7: Correlation between oxygen saturation (%) and serum NSE (ng/ml) levels in patients with SAS. Each black circle represents an individual. N = 29. A significant correlation was observed by Pearson's coefficient (- 0.488; p = 0.007).

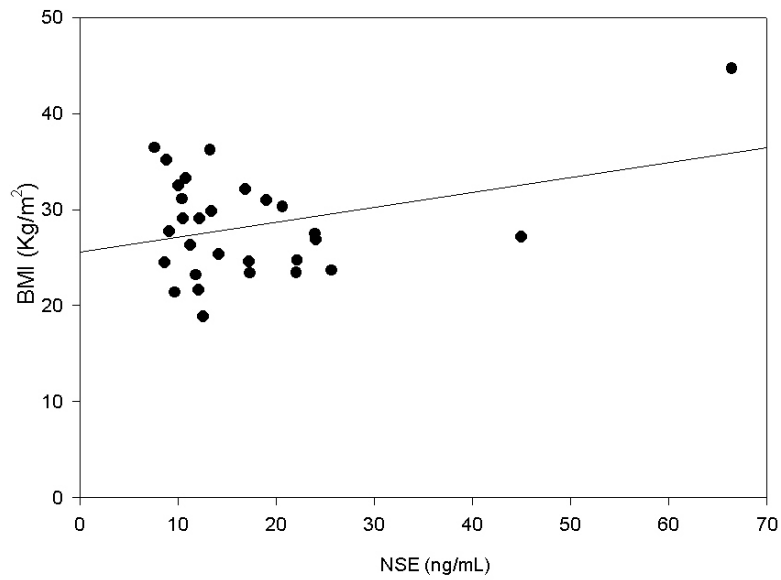


Figure 8: Correlation between NSE (ng/ml) and body mass index (Kg/m²) in patients with SAS. Each black circle represents an individual. N = 29. No correlation was observed by Pearson's coefficient (0.342; p = 0.07).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Nos pacientes estudados observamos que houve uma correlação negativa entre a saturação de oxigênio e o índice de apnéia e uma correlação positiva entre o índice de massa corporal e o índice de apnéia, ou seja, a medida que aumenta o número de apnéias reduz o oxigênio circulante e os pacientes parecem pesar mais. Na verdade a obesidade poderia determinar acúmulo de tecido adiposo na parafaringe ocasionando estreitamento da via aérea e conseqüentes paradas respiratórias ou a própria doença (SAHOS) ocasionaria maior letargia e menor disposição para as atividades em geral, ocasionando aumento de peso. De qualquer forma, estes achados confirmam que estes pacientes foram bem avaliados e divididos em grupos de caso ou controle.

Os níveis sanguíneos de S100B foram significativamente maiores no grupo com SAHOS quando comparado ao grupo controle, sugerindo um aumento da atividade astrocitária em resposta a algum grau de insulto cerebral. Com estes achados reforçamos a possibilidade de insulto cerebral ocasionada pela SAHOS (19,21,22).

Os níveis de NSE foram iguais nos dois grupos, entretanto quando comparamos NSE e S100B nos pacientes com SAHOS, verificamos uma correlação positiva sugerindo a hipótese de que, haveria primeiramente algum insulto neuronal (não marcado pelos níveis séricos da NSE) e um aumento reacional da atividade astrocitária (astroglíose reativa). Não houve uma correlação da saturação de oxigênio com níveis de S100B, mas houve com o NSE, quanto menor a saturação maior os níveis séricos de NSE (17).

Não encontramos correlação do índice de massa corporal com os níveis de S100B e NSE ou da saturação de oxigênio com a S100B.

Os pacientes com SAHOS sofrem alterações fisiológicas adversas durante o sono, incluindo anormalidade na troca de gases e aumento da atividade do sistema nervoso simpático. Estas alterações ocorrem devido à hipóxia intermitente, hipercapnia e ativação de quimiorreceptores, decorrentes de despertares ocasionados pela obstrução e interrupção da respiração.

Os despertares recorrentes fragmentam a arquitetura do sono no paciente com SAHOS e aumentam o risco de Hipertensão, Doença Cardiovascular e Cerebrovascular e Distúrbios Neurocognitivos (19,20).

Alterações de humor e afeto também ocorrem em pacientes que roncam e que supostamente apresentam algum grau de SAHOS, bem como piora das habilidades intelectuais em geral, déficit de memória e aprendizagem, dificuldade em manter a atenção e processar informações, alterações visuais e piora da psicomotricidade (18).

Os níveis de S100B podem estar aumentados em locais do cérebro onde ocorra aumento da atividade astrocitária. Esta elevação está descrita em várias doenças agudas e crônicas do cérebro. Para estes pacientes com injúria cerebral, um marcador bioquímico pode ser muito útil no prognóstico e na prevenção de uma possível seqüela neurológica.

Concluindo, pacientes que não apresentam nenhuma doença psiquiátrica ou neurológica, mas que sofrem de síndrome de apnéia e hipopnéia obstrutiva do sono, parecem apresentar algum grau de insulto cerebral subclínico, detectado através do aumento dos níveis séricos de proteína S100B. A dosagem deste marcador bioquímico poderá ser de muita utilidade na detecção da doença ou no acompanhamento da mesma em termos de prognóstico, já que trata-se de uma patologia grave, mórbida e com índice de mortalidade associado (23).

Certamente, ainda temos muito que aprender no que diz respeito tanto ao comportamento da SAHOS, quanto ao seu grau de comprometimento cerebral, mas sabemos que uma contribuição importante foi dada: a proteína S100B pode ser considerada um marcador de injúria cerebral em pacientes com apnéia do sono.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. International classification of sleep disorders. In: Thorpy MJ, ed. Diagnostic and coding manual. Lawrence, Kans.: Allen Press, 1990).
2. Bassiri AG, Guilleminault C. Clinical features and evaluation of obstructive sleep apnea. In: Kryger MH, Roth T, Dement WC, Eds. Principles and practice of sleep medicine. Philadelphia: W.B. Saunders, 3rd Edition, 2000:869-78).
3. Partinen M, Guilleminault C. Daytime sleepiness and vascular morbidity at seven-year follow-up in obstructive sleep apnea patients. Chest 1990; 97:27-32.
4. Pressman MR, Schetman WR, Figueroa WG, Van Uitert B, Caplan HJ, Peterson DD. Transient ischemic attacks and minor stroke during sleep. Relationship to the obstructive sleep apnea syndrome. Stroke 1995; 26:2361-2365.
5. Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Webar S, Badr S. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. N Engl J Med 1993; 29:1230-1235.
6. Hagedohm J, Wiltfang J, Laier-Groeneveld G, Tumani H, Rodenbeck A, Rütner E, Hajak G. Biochemical markers of cerebrovascular injury in sleep apnoea syndrome. Eur Resp J 2002; 20:158-164.
7. Walz R, Portela LV, Tort AB, Neto EC, Fernandes LN, Goncalves CA, Souza DO. Serum S100 β levels in patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. Neurology. 2000 54:2021-2.
8. Portela LC, Tort AB, Neto EC, Kessler RG, Penchaszadeh V, Souza DO, Goncalves CA, Giugliani R. High immunocontent of S100 beta protein in

amniotic fluid of pregnancies with Down syndrome. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2000 16: 590-592.

9. Lara DR, Gama CS, Belmonte-de-Abreu P, Portela LV, Goncalves CA, Fonseca M, Hauck S, Souza DO. Increased serum S100 β protein in schizophrenia: a study in medication-free patients. *J Psychiatr Res.* 2001 35: 11-14.
10. Portela LV, Brenol JC, Walz R, Bianchin M, Tort AB, Canabarro UP, Beheregaray S, Marasca JA, Xavier RM, Neto EC, Goncalves CA, Souza DO. Serum S100 β levels in patients with lupus erythematosus: preliminary observation. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002 9: 164-166.
11. Machado-Vieira R, Lara DR, Portela LV, Goncalves CA, Soares JC, Kapczinski F, Souza DO. Elevated serum S100 β protein in drug-free bipolar patients during first manic episode: a pilot study. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2002 12:269-72.
12. Portela LV, Tort AB, Walz R, Bianchin M, Trevisol-Bittencourt PC, Wille PR, Cardoso RC, Ishida MM, vonWangenheim A, Grisard EC, Steindel M, Goncalves CA, Souza DO. Interictal serum S100 β levels in chronic neurocysticercosis and idiopathic epilepsy. *Acta Neurol Scand.* 2003 108: 424-427.
13. Persson L, Hardemark HG, Gustafsson J, et al. S-100 protein and neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid and serum: markers of cell damage in human central nervous system. *Stroke* 1987; 18: 911-918.
14. Rosen H, Rosengren L, Herlitz J, Blomstrand C. Increased serum levels of S-100 protein are associated with hypoxic brain damage after cardiac arrest. *Stroke* 1998; 29: 473-477.

15. Cunningham RT, Young IS, Winder J, et al. Serum neurone specific enolase levels as an indicator of neuronal damage in patients with cerebral infarction. *Eur J Clin Invest* 1991; 21: 497-500.
16. Portela LV, Tort AB, Schaf DV, Ribeiro L, Nora DB, Walz R, et al. The serum S100 β concentration is age dependent. *Semin. Chem* 2002; 48: 950-952).
17. Kulpa J, Wojcik E, Reinfuss M, Kolodziejcki L. Carcinoembryonic antigen, squamous cell carcinoma antigen, CYFRA 21-1, and neuron-specific enolase in squamous cell lung cancer patients. *Clin Chem* 2002; 48: 1931-7.
18. Naëgelé B, Thoivard V, Pépin JL, et al: Deficits of cognitive executive functions in patients with sleep apnea syndrome. *Sleep* 18(1): 43-52, 1995.
19. Moe T, Franklin KA, Holmstrom K, Rabben T, Wiklund U. Sleep-disordered breathing and coronary artery disease: long-term prognosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:1910-3.
20. Nieto FJ, Herrington DM, Redline S, Benjamin EJ, Robbins JA. Sleep apnea and markers of vascular endothelial function in a large community sample of older adults. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169:354-60.
21. Hermann DM, Bassetti CL. Sleep-disordered breathing and stroke. *Curr Opin Neurol* 2003;16:87-90.
22. Ancoli-Israel S, DuHamel ER, Stepnowsky C, Engler R, Cohen-Zion M, Marler M. The relationship between congestive heart failure, sleep apnea, and mortality in older men. *Chest*. 2003 Oct;124(4):1400-5.
23. Marti S, Sampol G, Munoz X, Torres F, Roca A, Lloberes P, Sagales T, Quesada P, Morell F. Mortality in severe sleep apnoea/hypopnoea syndrome patients: impact of treatment. *Eur Respir J*. 2002 Dec;20(6):1511-8.

24. Poceta JS, Loubé DI, Kellgren EL, Bizik K, Mitler MM. Mortality in Obstructive Sleep Apnea: Association with Impaired Wakefulness. *Sleep Breath*. 1999;3(1):3-8.
25. Newman AB, Spiekerman CF, Enright P, Lefkowitz D, Manolio T, Reynolds CF, Robbins J. Daytime sleepiness predicts mortality and cardiovascular disease in older adults. The Cardiovascular Health Study Research Group. *J Am Geriatr Soc*. 2000;48:115-23.
26. Doenças das Vias Aéreas – Uma Visão Clínica Integradora (Viaerologia). Bruno Carlos Palombini. Capítulo 54: Apnéias do Sono- Deniz Martinez. Editora Revinter. 2001.
27. Ronco e Apnéias do Sono. José Antônio Pinto. Capítulo 6. Editora Revinter. 2000.