

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE DISTÚRBIOS RESPIRATÓRIOS DO SONO,
ESTRESSE OXIDATIVO E DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA.**

Dissertação de Mestrado

CRISTINI KLEIN

Porto Alegre, janeiro de 2010.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE DISTÚRBIOS RESPIRATÓRIOS DO SONO,
ESTRESSE OXIDATIVO E DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Aluna: Cristini Klein

Orientadora: Dra. Mara Silveira Benfato

Colaborador: Dr. Denis Martinez

Porto Alegre, janeiro de 2010.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Estresse Oxidativo, do Departamento de Biofísica da UFRGS e nas unidades de Hemodinâmica e Métodos não invasivos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Teve apoio do FIPE-HCPA e Propesq-UFRGS.

AGRADECIMENTOS

Meu muito obrigado...

... em primeiro lugar a Deus, que sempre esteve ao meu lado, sendo que sem ele nada seria possível;

... a orientadora professora Mara Silveira Benfato, pelos ensinamentos, pela confiança em mim depositada, pelo apoio e incentivo;

... aos professores Denis Martinez e Marco Wainstein pelos ensinamos;

... ao colaborador e amigo Sandro Cadaval Gonçalves um dos incentivadores iniciais deste trabalho;

... aos professores membros da minha comissão de acompanhamento professora Márcia Margis e Guido Lenz;

...as minhas primas Luisa Lazzaretti e Lucia Lazzaretti pelo incentivo, companherismo e amizade;

...as colegas Tassia Machado Medeiros, Fernanda Shafer Hackenhaar, Daniela Massierer, Fabíola Suris Machado e Marina Lima Marcolin que muito me auxiliaram na coleta de dados, e parte experimental deste trabalho;

... Aos demais colegas de laboratório Paulo Alabarse, Cleber Verona, Marcus Mendes, Maxwell Abegg, Tiago Salomon, Paula Viacava, Arthur Schuller pelo auxílio, companheirismo e momentos de descontração no laboratório ;

...ao meu esposo Charles Roesler pelo amor, dedicação, incentivo incondicional;

...aos meus pais Edio e Nelsi Klein, pelo empenho, dedicação, incentivo, amor, sendo que eles são o meu exemplo;

...as minhas irmãs, cunhado e sobrinho pelo apoio e entendimento pelos momentos de ausência;

...aos meus colegas do Hospital de Clínicas pelo apoio e incentivo;

... aos pacientes que participaram do estudo.

ABREVIATURAS

8-OHdG - 8-hidroxi-2'deoxiguanosina

AGE - produtos finais da glicação avançada

AHOS - apnéias-hipopnéias obstrutivas do sono

CAT – catalase

DAC - doença arterial coronariana

DCV - doença cardiovascular

DRS - distúrbios respiratórios do sono

ERO – espécies reativas de oxigênio

GPx - glutaciona peroxidase

GR – glutaciona redutase

GSH - Glutaciona reduzida

GSSG – glutaciona oxidada

HDL – lipoproteína de alta densidade

HMG-CoA - 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase

HPLC - high-performance liquid chromatography

IAH – índice de apnéias-hipopnéias

IMC - índice de massa corporal

LDL – lipoproteína de alta densidade

LDL-Ox - lipoproteína de baixa densidade oxidada

MDA - malondialdeído

PCR-US - proteína C reativa ultra sensível

PON-1 – paraoxonase-1

PP – polissonografia portátil

SAHOS – Síndrome das apnéias-hipopnéias obstrutivas do sono

SOD – Superóxido dismutase

SPSS - Statistical package for the social sciences

TBARS - Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	4
ABREVIATURAS.....	5
RESUMO	9
ABSTRACT.....	10
INTRODUÇÃO	11
1.1 Distúrbios respiratórios do sono	11
1.2 Manifestações clínicas.....	12
1.3 Epidemiologia	13
1.4 Diagnóstico	14
1.5 Tratamento dos DRS	16
1.6 DRS e comorbidades.....	17
1.7 Hipóxia e Espécies Reativas de Oxigênio	19
1.8 DRS e estresse oxidativo	22
1.9 DRS, Doença cardiovascular e estresse oxidativo	25
2. OBJETIVOS.....	30
2.1 Objetivo geral.....	30
2.2 Específicos:.....	30
3. MATERIAL E MÉTODO E RESULTADO.....	31
3.1 Artigo científico	32
3.2 MÉTODOS COMPLEMENTARES.....	54
3.2.1.Coleta de Dados.....	54
3.2.2 Análises laboratoriais.....	55

3.2.2.1 Avaliação de dano em lipídios	55
3.2.2.2 Análises bioquímicas	56
3.2.2.3 Descarte de Reagentes	56
3.3 Análise Estatística	56
4. RESULTADOS COMPLEMENTARES	57
5 DISCUSSÃO	60
6. PERSPECTIVAS	67
REFERÊNCIAS	68
APÊNDICE 1 – Termo de Consentimento	80
APÊNDICE 2 - Ficha de coleta de dados.....	82
APÊNDICE 3 – Formulário preenchido pelo paciente após realização da polissonografia portátil	83
APÊNDICE 4 - <i>CURRICULUM VITAE</i>	84
ANEXO 5 - Comprovante de submissão do artigo.....	89

RESUMO

TÍTULO: Associação entre Distúrbios Respiratórios do Sono, Estresse Oxidativo e Doença Arterial Coronariana.

INTRODUÇÃO: Evidências sugerem associação entre a doença arterial coronariana (DAC) e os distúrbios respiratórios do sono (DRS), porém o mecanismo que explica essa associação é incerto. Episódios repetitivos de hipóxia e reoxigenação vivenciados pelos indivíduos com DRS levam ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO). ERO no interior dos eritrócitos podem ser detoxificadas pelas enzimas antioxidantes glutatona peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). Ainda no citoplasma as ERO podem ser detoxificadas pela vitamina C ou ácido úrico. O estresse oxidativo é caracterizado por um desequilíbrio entre os níveis de ERO e antioxidantes. Este desequilíbrio promove lesão oxidativa em biomoléculas, mecanismo este associado à fisiopatologia da DAC.

OBJETIVOS: Verificar a relação entre o índice de apnéia hipopnéia (IAH) e a presença de DAC. Verificar a associação entre IAH, DAC e a atividade das enzimas antioxidantes: SOD, CAT, GPx e antioxidantes não enzimáticos, ácido úrico e vitamina C. Avaliar a relação entre IAH, DAC e os produtos de danos oxidativos em lipídios, proteínas. Entre os marcadores de estresse oxidativo identificar preditores para DAC.

MATERIAIS E MÉTODOS: Estudo transversal. Entre junho de 2007 e maio de 2008 na Hemodinâmica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, triamos consecutivamente 519 indivíduos encaminhados para angiografia diagnóstica ou terapêutica. Incluímos 14 pacientes com DAC ($\geq 50\%$ diminuição do lúmen da coronária) e 30 controles com $< 50\%$ de obstrução. O IAH foi mensurado por meio de polissonografia portátil. Verificamos presença de DAC através da angiografia coronariana. A quantificação dos grupos carbonil no hemolisado e no plasma e as atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx foram verificadas por método espectrofotométrico. Mensuramos malondialdeído (MDA) e vitamina C por cromatografia líquida de alta eficiência.

RESULTADOS: Este é o primeiro trabalho que evidencia correlação entre IAH e o aumento de carbonilação de proteínas eritrocitárias. Além disso, os resultados obtidos mostram que os indivíduos portadores de DAC apresentam níveis maiores de grupos carbonil no hemolisado quando comparados aos indivíduos controles. Em um modelo de regressão multivariado ajustado para idade, sexo e índice de massa corporal, buscando verificar preditores para DAC, verificamos que o aumento de uma unidade de carbonil aumenta 1,7% o risco para desenvolvimento de DAC, já uma unidade do IAH aumenta em 3,9% o risco de desenvolvimento de DAC. Não foi encontrada correlação entre IAH e os marcadores MDA, carbonil no plasma e os antioxidantes: SOD, CAT, GPx vitamina C e ácido úrico. Não verificamos correlação entre DAC e os marcadores MDA, carbonil no plasma e entre os antioxidantes SOD, CAT, GPx e ácido úrico. Pacientes com CAD significativa apresentaram níveis menores de vitamina C. Correlação positiva foi observada entre os níveis de vitamina C e a concentração de proteínas carboniladas no plasma.

CONCLUSÃO: Foi evidenciado que a carbonilação de proteínas eritrocitárias e o IAH tem importância na fisiopatologia da DAC. Da mesma forma a vitamina C parece ter importância na prevenção da DAC.

Palavras Chave: Distúrbios Respiratórios do Sono, Doença Arterial Coronariana, Estresse Oxidativo

ABSTRACT

TITLE: Association among Sleep Disordered Breathing, Oxidative Stress and Coronary Artery Disease.

INTRODUCTION: Evidences suggest association between Coronary Artery Disease (CAD) and Sleeping Disordered Breathing (SDB), however the mechanism is uncertain. Repetitive episodes of hypoxia and reoxygenation experienced by individuals with SDB lead to an increase of Reactive Oxygen Species (ROS). ROS inside the erythrocytes may be scavenging by glutathione peroxidase antioxidants enzymes (GPx), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD). In the cytoplasm ROS may be inhibited by vitamin C, or uric acid. Oxidative stress is characterized by an unbalance between ROS and antioxidants. These unbalance promotes oxidative damage in biomolecules, this mechanism is associated to the CAD physiopathology .

OBJECTIVE: Verify the relation between apnea hypopnea index (AHI) and CAD. Verify association between AHI, CAD and antioxidants enzymes activity: SOD, CAT, GPx and non enzymatic antioxidants, uric acid, and vitamin C. Evaluate the relation between AHI, CAD and oxidative damage products in lipids and proteins. Among the oxidative stress markers identify the predictors for CAD.

MATERIALS AND METHODS: Cross sectional study. Between June and May 2008 in the hemodynamic ward of Clinicas Hospital of Porto Alegre, we consecutively screened 519 individuals sent for diagnostic or therapeutic angiography. We included 14 cases with CAD ($\geq 50\%$ narrowing of coronary lumen) and 30 controls with $< 50\%$ narrowing. The AHI was measured by portable polisomnography. We found the presence of CAD through coronary angiography. Carbonyl groups quantification in the hemolysed and plasma and antioxidants enzyme activities of SOD, CAT and GPx were verified by spectrophotometric method. Malondyaldeyde (MDA) and vitamin C were measured by HPLC.

RESULTS: This work is the first one that shows correlation between AHI and increased erythrocytes protein carbonylation. In the same way evidences that individuals with significant CAD compared to controls present higher levels of carbonyl groups in the hemolysates. In a multivaried regression model adjusted to age, gender and body mass index to verify predictors for CAD, we verified that the carbonyl unit increased 1.7% the risk for development of CAD, while one unit of IAH increased in 3.9% the risk to develop CAD. We did not find correlation between AHI and the markers MDA, plasma carbonyl and the antioxidants: SOD, CAT, GPx vitamin C and uric acid. We didn't verify correlation between CAD and the markers MDA, plasma carbonyl and the others antioxidants SOD, CAT , GPx and uric acid. Patients with significant CAD had lower levels of vitamin C. Positive correlation was observed between vitamin C and erythrocyte carbonyl concentration.

CONCLUSION: We evidenced that erythrocytes protein carbonylation and AHI are important in the physiopathology of CAD. In the same way vitamin C appears important factor in CAD prevention.

Keywords: Sleep Disordered Breathing, Coronary Artery Disease, Oxidative Stress.

INTRODUÇÃO

1.1 DISTÚRBIOS RESPIRATÓRIOS DO SONO

Durante o sono o sistema de controle ventilatório torna-se sujeito a instabilidades. Distúrbios respiratórios do sono(DRS) é o termo genérico que engloba apnéias, hipopnéias, hipoventilação, respiração periódica (AMERICAN ACADEMY OF SLEEP MEDICINE, 1999). Nos DRS as apnéias e hipopnéias podem ser tanto centrais como obstrutivas (CAPLES et al., 2007; YOUNG et al., 2002). As apnéias-hipopnéias obstrutivas do sono são causadas pela obstrução das vias aéreas superiores durante a inspiração, cuja ação neuromuscular é insuficiente para compensar os episódios. As apnéias-hipopnéias obstrutivas do sono são denominadas como síndrome das apnéias-hipopnéias obstrutivas do sono (SAHOS) quando estão associadas a sintomas como sonolência, roncos e despertares (IBER et al., 2007). No entanto, as apnéias centrais são resultantes da diminuição da atividade neuronal, onde os motoneurônios são incapazes de ativar o diafragma e músculos respiratórios. Nas apnéias centrais não ocorre obstrução das vias aéreas, exceto nas apnéias de etiologia mista (YOUNG et al., 2002). As apnéias centrais estão predominantemente presentes em indivíduos com insuficiência cardíaca (BRADLEY & FLORAS, 2003; CAPLES et al., 2005; ECKERT et al.,2007; OLSON & SOMERS, 2007) e acometem de 25 a 40% dos indivíduos com esta doença (SHAHAR et al., 2001; JAVAHERI et al., 1998) ou indivíduos com distúrbios neurológicos (ROCHESTER & MOHSENIN, 2002).

De acordo com a *American Academy of Sleep Medicine* (1999) a apnéia é caracterizada como diminuição do fluxo respiratório a $\leq 10\%$ do basal, ou parada do fluxo aéreo por mais de 10 segundos. Em 2007 a *American Academy of Sleep Medicine* (IBER et

al., 2007) definiu hipopnéia como a redução do fluxo em $\geq 30\%$ do basal, associada a 4% de queda na saturação de oxigênio. Nesta mesma recomendação, as hipopnéias podem ser alternativamente denominadas como redução do fluxo em $\geq 50\%$ do basal, associada a 3% de queda na saturação de oxigênio.

Os DRS são caracterizados pela frequência de apnéias e hipopnéias associados à diminuição na concentração de oxigênio durante o sono. O índice de apnéias hipopnéias (IAH), é a soma das apnéias e hipopnéias dividido pelo tempo de registro polissonográfico, independente da causa das mesmas. A gravidade dos distúrbios respiratórios do sono é definida de acordo com o IAH por hora. São considerados sem DRS indivíduos com IAH < 5 . São diagnosticados com DRS leve, indivíduos com IAH ≥ 5 até ≤ 15 ; moderado IAH > 15 até ≤ 30 ; e DRS grave quando o IAH é > 30 (AMERICAN ACADEMY OF SLEEP MEDICINE, 1999).

1.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

As manifestações dos DRS e suas repercussões têm sido motivo de vários estudos. As apnéias e hipopnéias repetitivas causam sonolência, hipóxia intermitente, hipercapnia, aumento de frequência cardíaca, arritmias, despertares breves, sintomas estes resultantes principalmente do aumento da ativação simpática (MEHRA et al., 2006, SOMERS et al., 1995; NARKIEWICZ et al.(1), 1998; NARKIEWICZ et al.(2), 1998). Roncos são vivenciados por 30-50% dos adultos com mais de 50 anos, sonolência diurna é referenciada por mais de 30% dos adultos. Sonolência e roncos são comuns nos DRS, porém não podemos afirmar que todos os indivíduos que apresentam roncos e sonolência têm DRS (NETZER et al., 2003; YOUNG et al., 2002).

1.3 EPIDEMIOLOGIA

No quadro 1 são apresentados os principais estudos de prevalência dos DRS em diversas populações. Os estudos apresentados indicam que a prevalência dos DRS varia entre as diferentes populações estudadas. A prevalência dos DRS também varia conforme o gênero, acometendo de 8,8% a 27% dos homens e de 3,7% a 28% das mulheres. A prevalência de SAHOS é de 3,4% a 4% nos homens e de 3,2 a 1,2% nas mulheres.

Estudo	Pacientes (idade/anos)	IAH \geq 5	IAH \geq 15	SAHOS	Definição de hipopnéia
Wisconsin* (YOUNG et al., 1993)	Homens: 352 Mulheres: 250 Idade: 30-60	Homens: 24% Mulheres: 9%	Homens: 9% Mulheres: 4%	Homens: 4% Mulheres: 2%	redução do fluxo, com 4% queda saturação de O ₂
Pensilvânia* (BIXLER et al., 1998, 2001)	Homens: 741 Mulheres: 1000 Idade: 20-100	Homens: 17% Mulheres: 5%	Homens: 7% Mulheres: 2%	Homens: 3,3% Mulheres: 1,2%	redução do fluxo, com 4% queda saturação de O ₂
Espanha* (DURAN et al., 2001)	Homens: 325 Mulheres: 235 Idade: 30-70	Homens: 26% Mulheres: 28%	Homens: 14% Mulheres: 7%	Homens: 3,4% Mulheres: 3%	redução de 50% no fluxo aéreo, associada a queda de 4% na saturação de O ₂ , ou despertar
Austrália** (BEARPARK et al., 1995)	Homens: 294 Idade: 40-65	Homens: 25,95	Homens: 10% (IAH \geq 10)	Homens: 3,1%	queda da saturação de oxigênio \geq 3% associado a aumento da frequência cardíaca ou ronco
China* (IP et al., 2001, 2002)	Homens: 153 Mulheres: 106 Idade: 30-60	Homens: 8,8% Mulheres: 3,7%	Homens: 5,3% Mulheres: 1,2%	Homens: 4,1% Mulheres: 2,1%	redução do fluxo, com 4% queda saturação de O ₂
Korea ⁺ (KIM et al., 2004)	Homens: 309 Mulheres: 148 Idade: 40-69	Homens: 27% Mulheres: 16%	Homens: 10,1% Mulheres: 4,7%	Homens: 4,5% Mulheres: 3,2%	redução do fluxo, com 4% queda saturação de O ₂
Índia ⁺⁺ (SHARMA et al., 2006)	Homens: 88 Mulheres: 63 Idade: 30-60	Homens: 19,7% Mulheres: 7,4%	não avaliado	Homens: 4,9% Mulheres: 2,1%	redução de 50% no fluxo aéreo, associada a queda de 4% na saturação de O ₂ , ou despertar

Quadro 1 – Prevalência dos DRS. Traduzido de Lee et al., 2008. SAHOS = síndrome das apnéias-hipopnéias obstrutivas do sono. *Polissonografia assistida. **Polissonografia portátil (ronco e saturação de oxigênio).⁺Polissonografia no domicílio ou polissonografia no laboratório do sono. ⁺⁺Polissonografia no laboratório

Estudo incluindo indivíduos com idades entre 40 e 97 anos, considerando o índice de apnéia central como ≥ 1 , verificou-se que 9% destes indivíduos apresentavam apnéias centrais (YOUNG et al., 2002). Atualmente 80% dos casos de DRS moderado e severo não são diagnosticados (KAPUR et al., 2002; YOUNG et al., 1997; YOUNG et al., 2004).

1.4 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico dos DRS é feito por meio da polissonografia. A polissonografia pode ser realizada tanto no domicílio como no laboratório do sono, onde os indivíduos submetidos à polissonografia são monitorados durante uma noite inteira de sono (KUSHIDA et al., 2005).

Os comitês *American Academy of Sleep Medicine*, *American Thoracic Society* e *American College of Chest Physicians* (CHESSON et al., 2003) classificam os monitores em 4 categorias. Categoria tipo I, realizada no laboratório do sono, padrão ouro para diagnóstico de DRS é realizada através da monitoração da eletroencefalografia, eletromiografia (eletrodos nas pernas e queixo), eletrooculografia, eletrocardiograma, saturação de oxigênio, monitorização de esforço respiratório e fluxo aéreo (o gráfico representativo de um resultado de uma polissonografia está apresentado na figura 1).

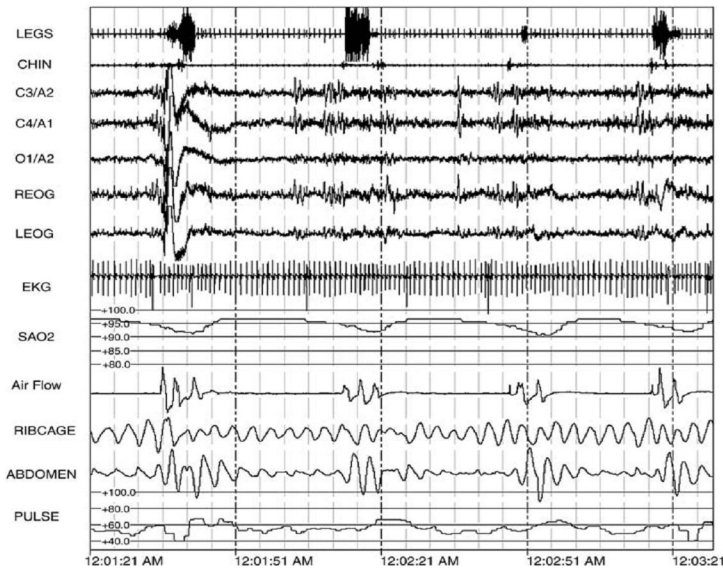


Figura 1- Gráfico representativo de uma polissonografia padrão para diagnóstico de DRS. LITTNER, 2007.

As outras três categorias (II, III e IV) de polissonografias contemplam os monitores portáteis que servem para monitorar a noite de sono do paciente geralmente no seu domicílio. Tipo II inclui no mínimo sete canais, incluindo eletroencefalograma, eletrooculograma, eletromiografia do queixo, frequência cardíaca, fluxo aéreo, esforço respiratório e saturação de oxigênio. Tipo III, monitores que incluem no mínimo quatro canais que monitorizam o fluxo aéreo (dois canais para monitorização ventilatória), frequência cardíaca e saturação de oxigênio (utilizado neste estudo). A figura 2 mostra o resultado de uma polissonografia tipo III. A polissonografia tipo IV monitoriza somente um ou dois dos parâmetros anteriormente citados.

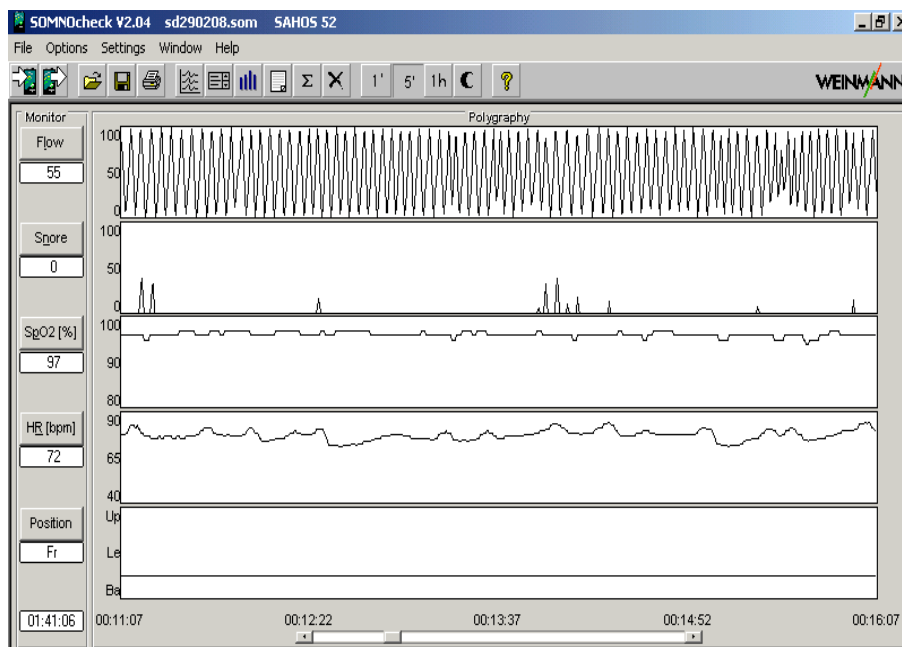


Figura 2 - Apresentação gráfica da Polissonografia portátil utilizada neste estudo. Cinco canais verificando: fluxo aéreo, ronco, saturação de oxigênio, frequência cardíaca, posição do paciente.

1.5 TRATAMENTO DOS DRS

Quando diagnosticado o DRS, o paciente deve ser encaminhado a um serviço especializado para escolha do tratamento. Em geral a terapia de primeira escolha, e mais eficaz no tratamento dos DRS, é realizada por meio de um aparelho que mantém pressão positiva contínua nas vias aéreas superiores (CPAP terapia) durante o período de sono. O paciente recebe a pressão positiva por meio de máscara nasal, porém pode fazê-lo por meio de máscara oro-nasal. Quando indicado a CPAP terapia, o indivíduo deve fazer a chamada “titulação”, que irá indicar qual a menor pressão necessária para manter as vias aéreas do indivíduo abertas durante o sono, deste modo inibindo os episódios de apnéias e hipopnéias. (KUSHIDA et al., 2006-1).

O tratamento dos DRS é individualizado e deve ser indicado considerando a causa do DRS. Indivíduos com DRS com índice de massa corporal (IMC)<30 e apnéia leve ou moderada, podem beneficiar-se do tratamento com o aparelho intra oral para expansão mandibular (KUSHIDA et al., 2006-2). Conforme a American Sleep Disorders Association (1996), ainda dependendo da causa do DRS, alguns pacientes podem beneficiar-se de cirurgia nas vias aéreas superiores como uvulopalatofaringoplastia, glosectomia, osteostomia mandibular sagital inferior e traqueostomia.

A obesidade é um dos principais fatores de risco modificáveis para DRS. É recomendada a redução de peso nos indivíduos com DRS (MORGENTHALER et al., 2006).

1.6 DRS E COMORBIDADES

Nos últimos anos tem se relacionado os DRS com diversas patologias como mostrado no gráfico 1. Outros estudos vêm relacionando DRS com risco aumentado de acidentes de trânsito, devido ao aumento de sonolência e maior risco de adormecer ao volante (MCNICHOLAS & KRIEGER, 2002).

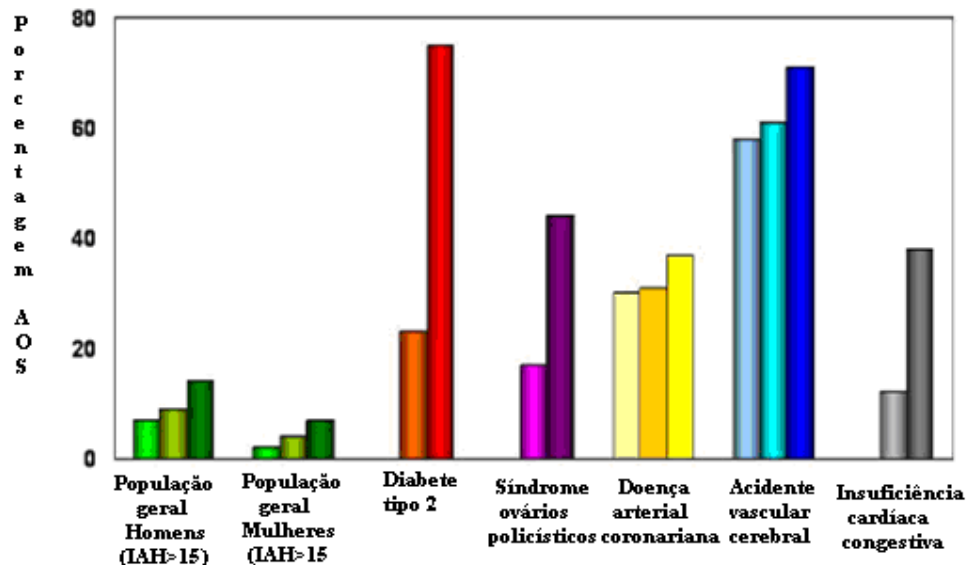


Gráfico 1 – Prevalência de DRS considerando diferentes moléstias. DRS definido como $AHI \geq 10$ ou 15. Cada barra da figura representa um estudo distinto. Em verde (YOUNG et al., 1993; DURAN et al., 2001; BIXTER et al., 2001; BIXLER et al., 1998), vermelho (FOSter et al., 2005; WESTE et al., 2006); roxo (FOGEL et al., 2001; TASALI et al., 2006), amarelo (MOOE et al.(1), 1996; MOOE et al.(2), 1996; PEKER et al., 1999), azul (PARRA et al., 2000; BASSETI et al., 2006; HUI et al., 2002), cinza (JAVAHERI, 2006; OLDENBUG et al., 2007; SIN et al., 1999). Figura traduzida de LEE et al., 2008.

Os DRS estão associados tanto ao aumento de comorbidades como aumento de mortalidade. Marshall et al. (2008), em um estudo com 397 indivíduos australianos com seguimento de 14 anos, verificou que indivíduos com apnéia do sono moderada e grave apresentam risco 6 vezes maior para morrer, independente da causa de morte.

As doenças cardiovasculares (DCV) são as maiores causas de morbidade e mortalidade no Brasil e no mundo. As DCV são o principal problema de saúde pública nos países ocidentais, somando elevados custos para o sistema de saúde. Estima-se que 80.000.000 americanos adultos (um em três) tem um ou mais tipos de doenças cardiovasculares; destes 38.100.000 tem idade igual ou maior que 60 anos. Em adultos maiores de 20 anos, a prevalência de DAC em 2006 era de 16.800.000 (AMERICAN HEART ASSOCIATION STATISTICS COMMITTEE, 2009).

O estudo *Sleep Heart Health Study Cohort* (SHAHAR et al., 2001) verificou que DRS são fatores de risco independentes para DAC, insuficiência cardíaca congestiva e doenças cerebrovasculares. Complementando o gráfico 1, outras DCV também são relacionadas aos DRS como hipertensão (THOMAS et al., 2009; RUTTANAUMPAWAN et al., 2009; FRIEDMAN & LOGAN, 2009) e arritmias (MEHRA et al., 2006). Visto o impacto das DCV, um crescente número de estudos buscando elucidar a relação fisiopatológica entre DRS e DCV tem sido descrito.

1.7 HIPÓXIA E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

A oxidação é fundamental para a vida e processo normal do metabolismo aeróbico. Episódios de hipóxia-reoxigenação sofridos por indivíduos com DRS estão associados a processos de oxidação-redução de compostos que ocasionam aumento de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), especialmente ânions superóxido (SUZUKI et al., 2007). ERO podem ser radicalares ou não radicalares e são formadas continuamente em quantidades pequenas durante os processos metabólicos. Radicais livres de oxigênio são resultantes da redução de um ou dois elétrons do oxigênio. A adição de um elétron ao oxigênio gera o superóxido, uma ERO radicalar. A adição de dois elétrons ao íon superóxido leva à formação do peróxido de hidrogênio, uma ERO não radicalar (HALLIWELL & GUTTERRIDGE, 2007). As ERO são responsáveis por atividades vitais como produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular e sinalização intercelular (GENESTRA, 2007; HENSLEY et al., 2000).

Embora diversos estudos demonstrem aumento de ERO durante a hipóxia (PARK & SUZUKI, 2007; PRABHAKAR et al., 2009), a fonte precisa de ERO ainda permanece incerta. Em geral, ERO são geradas pelo sistema NADPH oxidase ou pela cadeia

transportadora de elétrons (PEARLSTEIN et al., 2002). Na mitocôndria, em condições de normoxia, os elétrons fluem através da cadeia transportadora de elétrons do complexo I para complexo II, via complexo III, para a citocromo oxidase, transferindo 4 elétrons para o oxigênio. Entretanto, durante a hipóxia, a ubisemiquinona que intermédia o complexo III, potencialmente gera superóxido por transferência univalente de elétron para o oxigênio molecular (Figura 4). O superóxido gerado pode migrar para o citosol através de canais aniônicos.

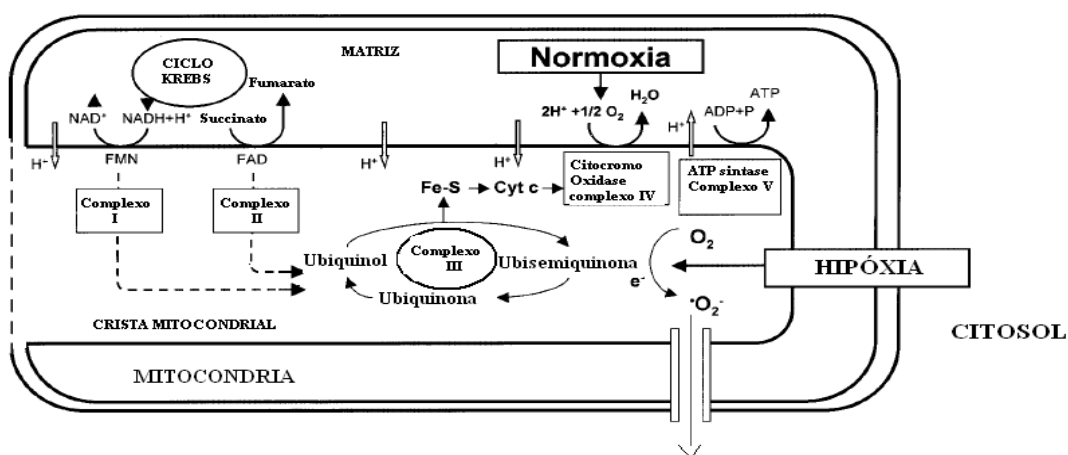


Figura 4 – Representação esquemática da formação das EROS durante hipóxia. Traduzida de WARNHOLTZ et al., 2002.

Embora as ERO sejam vitais para a sobrevivência, o desequilíbrio entre ERO e antioxidantes caracteriza o estresse oxidativo. Na presença de excesso de espécies reativas de oxigênio ou ineficientes defesas antioxidantes ocorre o dano em biomoléculas como proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos (HENSLEY et al., 2000; VALKO et al., 2007).

Os seres humanos possuem um sistema de defesa antioxidante complexo com componentes que podem ser produzidos pelo próprio corpo, ou absorvidos da dieta. As

defesas antioxidantes podem ser enzimáticas ou não-enzimáticas. As defesas enzimáticas constituídas por enzimas tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) fazem parte do sistema endógeno (HALLIWELL & GUTTERRIDGE, 2007; ÇIMEN, 2008).

O radical superóxido sofre ação enzimática da superóxido dismutase dismutando-o em peróxido de hidrogênio, que possui reatividade limitada. A redução do peróxido de hidrogênio a água é realizada por um ciclo contínuo mediado pela CAT e GPx. A GPx reduz tanto peróxido de hidrogênio como outros peróxidos a água ou álcool. A glutathione, um tripeptídeo (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina), está presente no organismo na formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) e é um substrato da GPx. Outra enzima que age conjuntamente com a GPx é a enzima glutathione redutase (GR), dependente de NADPH, que reconverte continuamente a GSSG para o estado reduzido. A manutenção dos níveis elevados da GPx é essencial para proteger e manter no estado reduzido os grupos constituídos por compostos organosulfurados (grupo thiol) das enzimas celulares, bem como das proteínas intermembrana e do citoesqueleto. Além disso, a atividade de GPx é dependente da glutathione reduzida. A catalase, por sua vez, tem atuação importante, pois decompõe peróxido de hidrogênio em água, no entanto encontra-se apenas nos peroxissomos da maioria das células e no citosol das hemácias (HALLIWELL & GUTTERRIDGE, 2007; ÇIMEN, 2008).

As defesas não-enzimáticas são absorvidas da dieta. Extracelularmente, o ácido ascórbico ou vitamina C, destaca-se entre os mais eficientes mecanismos biológicos com capacidade redutora. A vitamina C é um potente antioxidante hidrossolúvel, tendo sido evidenciada sua ação antioxidante no plasma (PADAYATTY et al., 2003). A vitamina C reage com radicais livres como radical hidroxil, radical peroxil, ânion superóxido, e

dióxido de nitrogênio, bem como com espécies não radicalares tais como ácido hipocloroso, ozônio, oxigênio singlet e peroxinitrito, formando o radical ascorbil, radical este pouco reativo (CARR & FREI, 1999). Em pH fisiológico encontra-se na forma de ascorbato, que é a forma em que a vitamina C atua como antioxidante doando hidrogênio para um radical. O ascorbato pode contribuir ainda como antioxidante regenerando a glutathione, b-caroteno e o a-tocopherol, inibindo a progressão da peroxidação lipídica (PADAYATTY et al., 2003). O principal mecanismo pelo qual o ascorbato previne a oxidação de proteínas é via redução dos radicais livres e inibição da propagação do dano oxidativo (PADAYATTY et al., 2003).

Outro importante antioxidante extracelular é ácido úrico, que em pH fisiológico encontra-se na forma de urato. Este é produzido a partir das purinas com ação da enzima xantina oxidase e xantina desidrogenase. Sua ação antioxidante é devida à sua reação com os agentes oxidantes em velocidade superior as outras purinas. O urato reage com o radical hidroxil, porém não reage com o superóxido e peróxidos. Durante sua ação antioxidante forma-se o radical urato que posteriormente pode ser regenerado pelo ascorbato (KUTZING & FIRESTEIN, 2008).

A quantidade de ERO no sangue está associada à quantidade de metais de transição como cobre, mas principalmente o ferro devido a sua biodisponibilidade no organismo. O ferro está envolvido no processo de produção de espécies reativas de oxigênio através da reação de Fenton. A reação de Fenton ocorre quando o íon ferro II (Fe^{2+}) reage com peróxido de hidrogênio formando ferro III e radical hidroxil, um dos mais reativos radicais livres no sistema biológico (HALLIWELL & GUTTERRIDGE, 2007).

1.8 DRS E ESTRESSE OXIDATIVO

Diversos estudos verificaram relação entre DRS e estresse oxidativo. Estudos que relacionam estresse oxidativo e apnéias do sono o fazem por meio de marcadores como a atividade das enzimas antioxidantes e verificação de dano oxidativo em biomoléculas (Barceló & Barbé, 2005; Lavie, 2003). A análise dos marcadores de estresse oxidativo deve ser feita de forma harmoniosa, considerando tanto os resultados da atividade de antioxidantes como a análise de dano oxidativo nas biomoléculas.

Considerando a capacidade antioxidante COFTA et al.(2008), em estudo não controlado conduzido com 41 pacientes com SAHOS e 20 controles sem a síndrome, verificaram menor atividade da SOD e capacidade antioxidante total nos indivíduos com SAHOS. Da mesma forma CRISTOU et al. (2003) verificaram correlação positiva entre capacidade antioxidante total e IAH em 14 indivíduos com SAHOS grave (IAH >20), porém não verificaram diferença quando comparados os indivíduos com e sem SAHOS (considerando IAH \geq 10).

Os DRS estão relacionados a dano oxidativo em biomoléculas como mostra o estudo de BARCELÓ et al. (2000) que em um grupo de 14 pacientes com SAHOS, comparado a 13 pacientes sem a síndrome, evidenciou níveis elevados de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), marcador de dano oxidativo em lipídeos, nos pacientes com SAHOS. Da mesma forma COFTA et al.(2008) verificaram relação positiva entre os níveis de TBARS e a gravidade da SAHOS. TAN et al (2006), em estudo realizado em 119 indivíduos com OSA comparado a 243 pacientes controles sem a síndrome, verificaram aumento dos níveis de produtos finais da glicação avançada (AGE) nos indivíduos com OSA. Os níveis de AGE correlacionaram-se positivamente com o tempo de dessaturação e com os níveis de 8-isoprostano (marcador de dano oxidativo em lipídeos).

Um estudo japonês, embora sem grupo controle, verificou aumento dos níveis urinários de 8-hydroxy-2'-deoxyguanosina (8-OHdG) nos pacientes com SAHOS, associado ao aumento da gravidade da síndrome. O nível de 8-OHdG é utilizado como marcador de dano oxidativo do DNA (YAMAUCHI et al., 2005).

Poucos estudos falharam em mostrar associação entre DRS e marcadores de estresse oxidativo, porém estes incluíam número reduzido de pacientes. Como no estudo de WALI et al. (1998), que comparou 15 mulheres com AHOS (apnéias-hipopnéias obstrutiva do sono) com 6 controles (mulheres) sem AHOS, e não verificaram diferenças na susceptibilidade de oxidação do LDL, e níveis das enzimas antioxidantes CAT e GPx comparando ambos os grupos. Da mesma forma OZTURK et al. (2003) comparou 6 indivíduos com SAHOS e 10 controles sem a síndrome, e não verificou diferença entre peroxidação lipídica, níveis de glutathiona e fragilidade dos eritrócitos entre indivíduos de ambos os grupos.

Considerando as terapêuticas utilizadas para o tratamento dos DRS verificou-se que os métodos terapêuticos utilizados para tratamento dos DRS diminuem o estresse oxidativo. LAVIE et al. (2004) verificaram que os níveis de TBARS e peróxidos diminuíram em 5 pacientes que utilizaram CPAP terapia por 9 meses, comparados a 4 controles com SAHOS não tratada. Em outro estudo MURRI et al. (2009), incluíram 78 pacientes com SAHOS e verificaram que a terapia com CPAP por 1 mês reduziu a peroxidação lipídica e a pressão diastólica e aumentou atividade antioxidante total e a atividade das enzimas CAT e GR. Da mesma forma ITZHAKI et al. (2007) verificou que indivíduos com AHOS tratados por 3 meses com o aparelho intra-oral para avanço mandibular apresentaram diminuição no IAH, e diminuição dos níveis de TBARS.

1.9 DRS, DOENÇA CARDIOVASCULAR E ESTRESSE OXIDATIVO

Como evidenciado em estudos anteriores (SUZUKI et al., 2006; LAVIE & LAVIE, 2009; BRADLEY & FLORAS, 2009) os DRS aumentam o estresse oxidativo. Evidências indicam que a formação excessiva de ERO está associada à fisiopatologia das DCV (TÜRKOĞLU et al., 2005; VICTOR et al., 2009). A hipótese de que qualquer distúrbio do sono possa aumentar o risco cardiovascular não encontra respaldo em um estudo que analisou a mortalidade associada à insônia (PHILLIPS & MANNINO, 2005). Acredita-se que a hipóxia intermitente induzida pelas apnéias seja o principal fator aterogênico (SUZUKI et al., 2006).

Sob condições fisiológicas, o endotélio mantém-se em equilíbrio e, nessa condição, o tônus vascular, o crescimento celular, a coagulação, a migração de moléculas de adesão, citocinas e moléculas de sinalização celular são mantidos em equilíbrio. As células endoteliais são dependentes do metabolismo aeróbico. Em condições de hipóxia as células endoteliais passam a sofrer desequilíbrio, tanto pela diminuição da oferta de oxigênio, como pelo aumento de espécies reativas de oxigênio (MADAMANCHI et al., 2005; BUI et al., 2009).

O processo inicial da aterosclerose se dá pela mudança no endotélio, onde células ativadas recrutam monócitos e linfócitos T para a parede do vaso. A alteração endotelial guia o processo, levando à expressão aumentada de células endoteliais, de moléculas de adesão vascular, de células mediadoras inflamatórias e de permeabilidade das lipoproteínas e processo de oxidação de biomoléculas (TURKOGLU et al., 2005; UCHIDA, 2000). O elevado número de lipoproteínas aterogênicas e linfócitos T na íntima estimulam monócitos a se tornarem macrófagos (MADAMANCHI et al., 2005; BUI et al., 2009). O transporte da lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDL-Ox), do interior do endotélio

para o lúmen da artéria tem importância na formação da placa de ateroma. Níveis de LDL-Ox relacionam-se positivamente com a severidade da síndrome coronariana aguda (EHARA et al., 2001) e com DAC subclínica (LIU et al., 2004). Os macrófagos fagocitam as lipoproteínas oxidadas, formando as células espumosas. Processos inflamatórios, aumento nos níveis de moléculas de adesão, do fator de crescimento vascular endotelial (angiogênese) e fatores de coagulação são alguns dos principais fatores aterogênicos (KHURANA et al., 2005). Células da musculatura lisa migram e proliferam. Há amplificação do recrutamento de leucócitos e agregação plaquetária aderindo ao endotélio com injúria. Com a progressão dessas alterações, as placas acumulam depósitos de lipídios, levando a maior ativação da cascata da inflamação. Ocorre o revestimento fibrótico desta região e possível calcificação (WASSERMAN & SHIPLEY, 2006; LIBBY & THEROUX, 2005). O processo de remodelamento dos vasos na aterosclerose é dinâmico e pode demorar décadas. O resultado final será de manifestações clínicas e eventos cardiovasculares agudos (PETER et al., 1995; CHAN et al., 1991).

Diversos trabalhos sugerem que eventos cardiovasculares isquêmicos, relacionados à aterosclerose, são precipitados por aumento de ERO e por estado de hipercoagulabilidade (LAVIE, 2003; VON KANEL et al., 2006). Aumento da coagulabilidade é considerado fator de risco para os acidentes vasculares, associado ao aumento de ERO. Quando se comparam pacientes com SAHOS a controles, observa-se maior nível de fibrinogênio plasmático, atividade plaquetária aumentada e capacidade fibrinolítica reduzida nos indivíduos com SAHOS (VON KANEL et al., 2003). A proteína amilóide A foi recentemente associada ao desenvolvimento de aterosclerose, acidente vascular cerebral, diabetes e demência. Níveis sanguíneos elevados desta proteína são encontrados duas

vezes mais em pacientes com SAHOS moderada a grave quando se compara com o grupo controle (SVATIKOVA et al., 2003).

DRUGOWSKAYA et al.(2002) avaliaram neutrófilos de pacientes com SAHOS, verificando aumento da atividade de CD15 e CD11 em monócitos destes pacientes, e este processo esteve associado ao aumento de ERO. CARPAGNANO et al. (2003) comparando 18 pacientes com AHOS com 15 controles, verificou que os indivíduos com AHOS tem níveis maiores de IL-6 e de 8-isoprostano no condensado expiratório.

Um estudo recente mostrou que após uma noite com CPAP há diminuição da ligandina CD40, mediador pró-inflamatório, sendo maior a redução com três meses de CPAP. Com o uso de CPAP nasal, observou-se, também, decréscimo dos linfócitos T CD8, relacionados à formação de placas ateromatosas (DYUGOVSKAYA et al., 2005). Estes achados indicam os benefícios do tratamento da SAHOS, principalmente na diminuição do risco da DAC (KOBAYASHI et al., 2006).

No artigo de TAN et al. (2006) foi demonstrado aumento da disfunção do HDL (lipoproteína de alta densidade), em indivíduos com SAHOS com conseqüente maior oxidação do LDL (lipoproteína de baixa densidade) nestes indivíduos. Esses autores evidenciaram ainda que o IAH prediz 30% da variância da disfunção do HDL, ou seja os episódios de hipóxia e reoxigenação estão relacionados a disfunção do HDL, contribuindo para formação da placa de ateroma. A enzima paraoxonase-1(PON1) protege o HDL e LDL da oxidação, e tem sido relatada como importante antioxidante na prevenção das doenças ateroscleróticas (AVIRAM et al., 2004; GRUPTA et al., 2009). LAVIE et al. (2004) evidenciaram aumento dos níveis plasmáticos de TBARS e peróxidos em 114 indivíduos com SAHOS (com e sem DCV) quando comparados com 30 controles sem a síndrome, e verificaram que a atividade da enzima antioxidante PON1 está diminuída em

indivíduos com a SAHOS e DCV. Em um modelo multivariado para prever TBARS, verificou-se que idade, sexo, IMC, predisseram 5,45% da variância do TBARS, e o índice de saturação explicou 19,6% da variância do TBARS. Neste mesmo estudo foi verificado que a atividade da enzima PON1 é explicada pelo índice de dessaturação, independente da idade, sexo e IMC.

LAVIE et al (2004) compararam indivíduos com apnéia do sono portadores ou não de doença cardiovascular com grupo controle sem apnéias e verificaram elevação de TBARS e peróxidos nos pacientes com SAHOS. Porém não foi evidenciada diferença nos níveis de TBARS e peróxidos entre pacientes com e sem doença cardiovascular.

A resistência à insulina é um fator de risco para aterosclerose (SEMENKOVICH , 2006). A associação entre SAHOS e resistência à insulina tem sido demonstrada em obesos e não obesos (IP et al., 2002). A síndrome plurimetabólica, que inclui hipertensão, resistência à insulina, intolerância à glicose e dislipidemia, é mais prevalente em pacientes com SAHOS (COUGHLIN et al., 2004).

Em um trabalho prospectivo conduzido por MILLERON et al. (2004), foram incluídos 54 pacientes com doença coronariana e SAHOS. Destes, 25 pacientes foram tratados, 21 pacientes com CPAP e 4 pacientes com cirurgia em vias aéreas superiores. Foram incluídos ainda 29 pacientes sem tratamento específico para SAHOS. O desfecho, que compreendia doença cardiovascular, síndrome coronariana aguda, hospitalização por insuficiência cardíaca ou necessidade de revascularização miocárdica, ocorreu em 6 de 25 pacientes com tratamento (24%) e 17 dos 29 pacientes sem tratamento (58%).

Pacientes com SAHOS estão mais predispostos a formação de placas e estenose de vasos extra cranianos, quando comparados aos indivíduos sem a síndrome (SCHULZ et al., 2005). O espessamento da íntima da artéria carotídea apresenta correlação com a gravidade

da SAHOS (SUZUKI et al., 2004). Da mesma forma quando se analisa a velocidade da onda de pulso na artéria braquial, esta também se correlaciona com maior chance de aterosclerose em pacientes com SAHOS (NAGAHAMA et al., 2004). Baseado nestes estudos verificou-se que os DRS têm importante papel no desenvolvimento e progressão da aterosclerose, independente de outros fatores de risco conhecidos (DRAGER et al., 2005).

Os estudos apresentados indicam existir associação entre estresse oxidativo, DAC e DRS. O estresse oxidativo parece ter papel de importância na fisiopatogenia da DAC em indivíduos com DRS, embora este mecanismo não esteja totalmente elucidado. Para esclarecer aspectos destas associações, investigamos os possíveis marcadores de estresse oxidativo que possam estar relacionados ao desenvolvimento de DAC em indivíduos com DRS.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar marcadores de estresse oxidativo relacionados com DRS e DAC.

2.2 ESPECÍFICOS:

Verificar a relação entre IAH e a presença de DAC;

Verificar a associação entre IAH, DAC e a atividade das enzimas antioxidantes: SOD, CAT e GPX, e antioxidantes não enzimáticos tais como, vitamina C e ácido úrico;

Avaliar a relação entre IAH, DAC e produtos de danos oxidativos em lipídios e proteínas;

Identificar entre os marcadores de estresse oxidativo, possíveis preditores para DAC.

3. MATERIAL E MÉTODO E RESULTADO

3.1 ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo submetido a revista “ Antioxidants & Redox Signaling”

Comprovante de submissão (Anexo 5)

**CARBONYL GROUPS: BRIDGING THE GAP BETWEEN SLEEP
DISORDERED BREATHING AND CORONARY ARTERY DISEASE**

Cristini Klein MsC^{1,2,3}, Denis Martinez MD, PhD^{3,4},
Fernanda Schäfer Hackenhaar MsC^{1,2,3}, Tássia Machado
Medeiros^{1,3}, Marina Lima Marcolin^{1,3}, Fabíola Suris Silveira^{1,3},
Marco Vugman Wainstein MD, PhD⁴, Sandro Cadaval Gonçalves
MD, PhD⁴, Mara Silveira Benfato MsC, PhD^{1,2,3}.

¹ Departamento de Biofísica, ² Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, ³ Universidade Federal of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; ⁴ Cardiology Unit, Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA).

Institutions: From the Cardiology Division, Hospital de Clínicas Porto Alegre, Brazil.
Department of Biophysics, Universidade Federal Rio Grande do Sul Porto Alegre, Brazil.
Zip Code: 91501-970

Corresponding author: *Dr. Mara Silveira Benfato, Departamento de Biofísica,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500 prédio 43431,
Porto Alegre, RS, Brazil, 91501-970 - Phone: (55-51) 33087603 Fax: (55-51) 33087003
E-mail mara.benfato@ufrgs.br

CARBONYL GROUPS: BRIDGING THE GAP BETWEEN SLEEP DISORDERED BREATHING AND CORONARY ARTERY DISEASE

ABSTRACT

Sleep disordered breathing (SDB) is related to coronary artery disease (CAD), but the mechanisms are uncertain. SDB is characterized by periods of intermittent hypoxia and free radical formation. Excess of free radicals leads to protein carbonylation, which by its turn, is linked to the etiology of CAD. We tested the hypothesis that carbonylation, a marker of protein oxidation, can be the link between SDB and CAD. We included 14 cases with CAD ($\geq 50\%$ narrowing of coronary lumen) and 30 controls with $< 50\%$ narrowing. CAD cases have higher erythrocyte carbonyl levels than controls, respectively, $110 \pm 32 \text{ pmol/gHb}$ and $85 \pm 29 \text{ pmol/gHb}$ ($p=0.012$). Positive correlation was observed between apnea-hypopnea index (AHI) and erythrocyte carbonyl concentration ($\rho=0.310$; $p=0.027$). To predict CAD, including as regressors: 1) AHI, 2) erythrocyte carbonyl, 3) gender, 4) age, and 5) body mass index, the significant variables in the Poisson multiple regression model were AHI and erythrocytes carbonyl. Increase of one pmol/gHb in erythrocyte carbonyl levels, increases 1.8% the risk of CAD, and one unit of AHI increase 3.8% the risk of CAD. Plasma carbonyl did not differ between CAD and controls, but showed a negative correlation with vitamin C. The present findings represent the first evidence in humans that SDB may cause CAD through protein carbonylation.

INTRODUCTION

Studies suggest a link between sleep-disordered breathing (SDB) and coronary artery disease (CAD) but the mechanisms are uncertain (3,11,17,26,36). SDB included obstructive sleep apnea (OSA) and central sleep apnea. Repeated episodes of hypoxia and reoxygenation experienced by individuals with sleep apnea lead to increased formation of reactive oxygen species (10,25,40) with consequent oxidative damage of biomolecules (7,15, 23,41). Oxidative damage is prevented by enzymatic antioxidants, such as superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT) or non-enzymatic endogenous and dietary antioxidants, such as vitamin C (14). The imbalance between oxidants and antioxidants triggers oxidative stress and, consequently, protein, nucleic acids and lipid damage. Oxidative damage to proteins, DNA and to lipids can cause alterations in cell membrane, enzymatic systems, and cell signaling, processes involved in pathophysiology of CAD (8,15,34,39,40).

Carbonylation, both plasmatic and cellular, indicates oxidative damage in proteins (9). Carbonyl groups (C=O) are formed through the oxidation of the lateral chains of amino acids proline, lysine, arginine and treonine(9), or they can be introduced in proteins through the aldehyde groups reaction produced during lipid peroxidation or through end-products from glucose oxidation reactions (6, 18,38). In the literature do not exist studies quantifying carbonyl in hemolysate from patients with CAD or SDB. Increased carbonylation of plasma proteins were observed in patients with CAD (28,35, 37). In humans only one study was reported showing evidence of augmented carbonylation of intercostal muscle proteins in OSA patients (1).

The purpose of this study is to test the hypothesis that carbonyl formation in erythrocytes and plasma, secondary to increases with the apnea-hypopnea index (AHI), can lead to CAD development.

MATERIALS AND METHODS

Patients

A cross-sectional study was conducted between March 2007 and February 2008, screening consecutively patients between 35 and 65 years of age that were referred by their physicians for diagnostic or therapeutic coronary angiography. The exclusion criteria were: smoking in the previous six months; clinical diagnosis, dietary, or pharmacological treatment for diabetes mellitus; anginous pain in the previous week; use of anxiolytic medication; treatment for chronic pulmonary disease; use of vitamin supplement; body mass index (BMI) $> 40 \text{ kg/m}^2$; any physical, psychological, or social issue encumbering the attainment of the home polysomnographic test, and previous coronary intervention (myocardial revascularization or angioplasty). A full medical history was taken from all study participants. The project was approved by the institutional ethics committee and all participants signed an informed consent form.

Laboratory measurements

Blood Collection

In the morning, 3 to 6 hours after wake up time, 20-mL arterial blood samples were collected from each patient, fasted for at least 8 hours, at the site of femoral artery puncture for catheterization. Blood was collected in three vials, containing: coagulation activator, EDTA, and citrate. Immediately after the collection, the samples were refrigerated to 0°C , centrifuged for 10 minutes in a 0°C -cooled centrifuge, aliquoted and stored at -80°C .

Hemolysates were prepared by lysing red blood cell (RBC) with ethanol 2% (ratio 1:10) followed by centrifugation to obtain crude extracts. Glucose, high-sensitivity C-reactive

protein, total proteins, lactate dehydrogenase were quantified in the routine clinical analysis laboratory, and the additional tests at the research laboratory.

Protein carbonyl content

Plasma and hemolysates were used to determine protein carbonyl groups. Carbonyl content was measured using the method described by Levine et al (24). Plasma protein (0.025 mL) or RBC hemolysates (0.025 mL) were added with 0.2 mL of 10% trichloroacetic acid. The samples were centrifuged (4,300g, 10 min) and 1 mL of either 2M chloridric acid or 10mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) in 2M HCl were added to the precipitates and incubated at 37°C for 90 min. After the samples were centrifuged (4,300g, 10 min) the DNPH excess was removed with ethanol-ethyl acetate 1:1. The samples were centrifuged (4,300g, 10 min) and the protein was then dissolved with the addition of 6M guanidine hydrochloride. The quantification was performed using a spectrophotometer at 370 nm absorbance. The carbonyl content was calculated using a molar absorption coefficient of hydrazone ($21.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Plasma carbonyl was normalized by total proteins and erythrocyte carbonyl was normalized by hemoglobin content.

Superoxide dismutase

The SOD activity was measured in erythrocyte hemolysates using RanSOD® (Randox) Kit. The assay principle is based on the reaction of xanthine-xanthine oxidase, to form superoxide radical, which reacts with 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride (I.N.T) to form a red formazan dye. We measured the inhibition degree of this reaction using a spectrophotometer. The results are given in SOD units/g hemoglobin.

Glutathione Peroxidase

To verify the enzymatic kinetic of GPx, one solution was prepared with buffer phosphate 100mM, pH 7.4, 1 mM EDTA , 0.15mM NADPH , 1mM glutathione and 1U glutathione reductase enzyme. The reaction was started with the addition 10 μ L of t-BOOH 70%, and the GPx activity was measured by observation of the NADPH decrease with a spectrophotometer at 340 nm (33). The results are given in units/g hemoglobin.

Catalase

The following was introduced into a quartz cuvette: 2.8mL phosphate buffer 100mM, pH 7.4, 100 μ L of 300mM H₂O₂, the reaction was started with the addition of hemolysates. The CAT activity was determined with a spectrophotometer, where we monitored the disappearance of H₂O₂ at 240 nm (21). The results are given in units/g hemoglobin.

Vitamin C

Vitamin C was measured through high-performance liquid chromatography (HPLC) (20). Nine hundred μ L of 0.1M perchloric acid were added to a 100 μ L aliquot portion of human plasma. The samples were centrifuged at 4,300g for 10 min and used for HPLC analysis, LC-18 DB column. The mobile phase was 82.5:17.5 (v/v) 30 mM monobasic potassium phosphate (pH 3.6)-methanol, the flow rate was 1mL/min and the chromatograms were monitored at 250 nm.

Sleep Study

The volunteers underwent portable polysomnography at home using a level III monitor (SomnoCheck, Weinmann, Germany), a procedure, validated by our group that showed the same variability as two sequential full polysomnographies (29). Air flow and snoring were measured through a nasal cannula connected to a pressure transducer. In addition, inspiratory effort, pulse oximetry, heart rate, and sleep position were measured.

The records were made at the patient's home, usually between 11 PM and 7 AM. The polysomnography respiratory analyses were made by a board-certified sleep specialist in a different location, blind to the other results.

Apneas were defined as the airflow reduction to 10% or less of the baseline value for 10 seconds or more; hypopneas as airflow reduction of 50% or more, associated with reduction of oxygen saturation of 3% or more. The AHI was calculated by dividing the total apneas and hypopneas by the hours of recording without artifacts, and expressed as apnea/hypopnea episodes per hour.

Coronary Angiography Study

All patients were assessed by quantitative angiography, using the same equipment and projection, with the table and image intensifier kept at constant height. Image quantification was carried out in all cases by the same investigator, who was blinded to carbonyl levels. A magnification of seven inches was used for all images. Significant CAD was defined as $\geq 50\%$ luminal narrowing of at least 1 coronary segment. Controls were patients with no lesion or with lesions $< 50\%$ luminal narrowing.

Statistical analysis

Categorical variables are presented as absolute values and analyzed by chi-square test. Variables with normal distribution are presented as mean \pm SD, means were compared by Student's *t* test. Variables with no normal distribution are presented as median (minimum –maximum), median were compared by Mann Whitney test. Spearman coefficient was employed to test correlation between variables with no normal distribution. Regression model, mode Poisson was employed to predict CAD. The following regressors were tested in the model: AHI, erythrocytes carbonyl, age, gender, and BMI. A *p* value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Individuals attending the cardiac catheterization laboratory due to suspected coronary artery disease were consecutively screened; 47 were included in the study. Fourteen patients (group 1), had significant obstructive CAD ($\geq 50\%$ luminal narrowing of at least 1 major coronary or segment) and 33 patients served as controls (without lesion or lesion less than $< 50\%$ luminal narrowing; group 2). Table 1 shows the clinical and anthropometric characteristics of the individuals of both groups. The AHI was significantly higher in group 1 than that of individuals of group 2 ($p < 0.004$).

Table 1- Clinical and anthropometric characteristics of included patients.

	Group1 CAD	Group 2 Controls	p
Variables	n=14	n=33	
Male Gender (n)	9 (64)	15 (46)	ns
Age (years)	54 \pm 6	52 \pm 7	ns
Body mass index (kg/m ²)	28 \pm 4	28 \pm 4	ns
AHI (events/h)	23 (7-56)	10 (1-48)	0.004
Lowest O ₂ saturation (%)	85 \pm 4	86 \pm 3	ns
Hypertension n(%)	11(78)	25(75)	ns
Other diseases n(%)	2(14)	9(27)	ns
Past smoking n(%)	8(64)	20(62)	ns
Medication use			
Statins n(%)	8(57)	9(27)	0.041
Antihypertensive n(%)	10(71)	22(67)	ns
Acetylsalicylic acid n(%)	8(57)	11(33)	ns
Antidepressants n(%)	2(14)	5(15)	ns

Categorical data are presented as n (%), variables compared by χ^2 test. Variables with normal distribution are presented as mean \pm SD, means were compared by Student's *t* test. Variables with non normal distribution are presented as median (minimum – maximum), medians were compared by Mann Whitney test. ns: $p > 0.05$. Body mass index: weight divided by the square of height (Kg/m²); other diseases: hypothyroidism, depression, multiple sclerosis, aortic aneurism, heart valve disease, stroke; AHI: apnea-hypopnea index (apnea-hypopnea/hour of sleep).

The number of patients taking medication in groups 1 and 2 differ in statin use (respectively $n=8/14$ and $n=9/33$; $p=0.041$). Other treatments did not differ statistically and include, respectively: antihypertensives, acetylsalicylic acid and antidepressants (table 1).

The biochemical data from groups 1 and 2 are presented in Table 2. Plasma carbonyl levels, SOD, CAT and GPx activities did not differ in the two groups (Table 2). Lower levels of erythrocyte carbonyl were observed in Group 2 (85 ± 29 pmol/gHb) than in Group 1 (110 ± 32 pmol/gHb; $p=0.012$; table 2). In the same form the levels of high-density lipoprotein are major in patients from group 2 (50 ± 12 mg/dL and 38 ± 11 mg/dL; $p=0.003$), and correlate inversely with the IAH ($\rho=-0.377$; $p=0.009$). AHI no correlate with enzymatic antioxidants activity, SOD, CAT and GPx.

Table 2– Biochemical data of patients from groups 1 and 2

	Group 1 CAD n=14	Group 2 Controls n=33	p
Risk factors			
Glucose (mg/dL)	104 ± 8	106 ± 13	ns
Low-density lipoprotein (mg/dL)	94 ± 40	110 ± 35	ns
High-density lipoprotein (mg/dL)	38 ± 11	50 ± 12	0.003
Triglycerides (mg/dL)	152(60-295)	93(20-640)	ns
High-sensitivity C-Reactive protein (mg/L)	2.3(0.4-18.4)	1.9 (0.2-21.5)	ns
Correction factors			
Total protein (g/dL)	6.9 ± 0.6	6.8 ± 1	ns
Hemoglobin (g)	13 ± 1.2	13 ± 1.2	ns
Lactate dehydrogenase (mmol/L)	1.03 ± 0.4	1.15 ± 0.4	ns
Oxidative damage markers			
Erythrocyte Carbonyl (pmol/gHb)	110 ± 32	85 ± 29	0.012
Plasmatic carbonyl (nmol/g total proteins)	0.012 ± 0.004	0.012 ± 0.003	ns
Antioxidants			
SOD (U/gHb)	1893 ± 242	1692 ± 424	ns
CAT (U/gHb)	20706 ± 4866	20144 ± 5676	ns
GPx (U/gHb)	200 ± 26	203 ± 22	ns
Vitamin C (μ M)	$88 (5-178)$	$149(14-527)$	0.029

Variables with normal distribution are presented as mean \pm SD, means were compared by Student's *t* test. Variables with no normal distribution are presented as median (minimum –maximum), median were compared by Mann Whitney test. ns: $P>0.05$. SOD: superoxide dismutase; CAT: catalase; GPx : glutathione peroxidase.

A positive correlation was observed between AHI and erythrocyte carbonyl ($\rho = 0.310$; $p=0.027$), and AHI and age ($\rho=0.419$; $p=0.003$). In the Poisson multiple regression model, to predict CAD including as regressors, AHI, erythrocytes carbonyl,

gender, age, and BMI, these variable entered in the model were AHI and erythrocytes carbonyl. The model explain that one pmol/gHb of carbonyl increase 1.8% the risk to development CAD, and one unit of AHI/hour increase 3.8% the risk to develop CAD (Table 3). We did not observe any parametric or non-parametric correlation between plasma carbonyl and CAD or AHI. Plasma carbonyl showed a negative correlation with vitamin C ($\rho = -0.436$; $p = 0.003$), and vitamin C level is lower in group 1 than in group 2 ($p = 0.029$; table 2).

Table 3 – Results from Poisson stepwise regression model to predict coronary artery disease

Dependent variable	Obstructive Coronary Artery Disease	
Regressor	RR (CI)	p
AHI	1.038(1.003-1.075)	0.034
Erythrocyte Carbonyl	1.018(1.005-1.032)	0.005
Gender (male 1)	1.570(0.552-4.466)	ns
Age	0.964(0.898-1.036)	ns
Body mass index	0.981(0.831-1.157)	ns

ns: $p > 0.05$. Body mass index (weight divided by the squares height; Kg/m^2). AHI: apnea-hypopnea index (apnea-hypopnea/hour of sleep).

DISCUSSION

Growing evidence suggests that oxidative stress, specially oxidative damage, such as lipid peroxidation, carbohydrate glycation, and protein oxidation are linked to pathogenesis of CAD (23,37,19). Our study is the first to show that the carbonylation of erythrocytic proteins associated to AHI is predictor of CAD, controlling for known confounders such as age, gender, and obesity as well as excluding smoking and diabetes from the roll of causes of oxidative stress.

This finding emphasizes the role of hypoxia-reoxygenation episodes seen in SDB (32, 22) and formation of erythrocytes protein damage as a mechanism of CAD. Vitamin C inversely correlating with plasma carbonyl indicates that this circulating antioxidant is a possible protective factor, explaining the absence of differences of plasma proteins damage in the two groups.

Hypoxia but not sleep deprivation (12) leads to ROS increase (10), which, in excess or unbalanced with respect to antioxidants, promotes oxidative damage to biomolecules (2,14). This suggests that it is the number of hypoxia-reoxygenation episodes that determines the amount of damage and not the intensity of hypoxia. Several studies have implicated the AHI in oxidative damage (3, 7, 1).

In the literature do not exist studies that quantify carbonyl in hemolysate from patients with CAD or SDB. Our data agrees with Barreiro et al. (1) the only study in patients with OSA , correlate carbonylation findings of further carbonylation in intercostal muscle cells of 12 male individuals with severe OSA compared to 6 controls without OSA. In relation CAD, only had been observed increase in carbonyl groups formation in the plasma of patients with this disease (28, 37).

AHI and CAD did not correlate with the intraerythrocyte antioxidant enzymes we measured: SOD, CAT, and GPx. The literature on this topic is controversial (7, 25, 30,34) The antioxidant enzymes act promptly on oxygen free radicals, preventing their linkage to structural biomolecules and the consequent oxidative damage (14). In our study, arterial blood was collected during cardiac catheterization, up to 3 hours after the exposure to hypoxia episodes during sleep. Probably, at the time we collected blood, the antioxidant enzymes were no longer reflecting AHI severity. But independent of the time, the antioxidant enzymes were insufficient to inhibit the oxidative damage, reflecting in protein damage. Mildly oxidized proteins are readily degraded ($t_{1/2}$ human serum albumin (HAS)= $273\pm 6.25/\text{min}$; $t_{1/2}$ carbonylated HAS= $150\pm 5.09/\text{min}$), whereas severe oxidation stabilizes proteins due to aggregation, cross-linking, and/or decreased solubility, thus increasing their half-lives (16-13). Thus, the fact still contain carbonylated proteins up to 3 hours after the exposure to hypoxia episodes, suggests that the protein oxidative damage is severe.

We observed a negative correlation between plasma carbonyl and vitamin C, but not between plasma carbonyl and AHI. Vitamin C is a powerful water-soluble antioxidant, with plasmatic activity (31) that reacts with reactive oxygen species, forming the ascorbyl radical, a less reactive compound (5). Ascorbate can also contribute as an antioxidant, regenerating glutathione, b-carotene and alpha-tocopherol, inhibiting the lipid peroxidation progress (14). The main mechanism through which ascorbate prevents protein oxidation are the reduction of free radicals and the inhibition of oxidative damage propagation. Plasma carbonyl and AHI might not have been correlated due to the vitamin C action, protecting plasma proteins from carbonylation.

Previous investigations, one by our group, showed increased circulating carbonyl in individuals with sickle-cell anemia (27) and high erythrocyte fragility (4). Erythrocyte fragility could have increased plasma carbonyl in the present study, due to outflow of oxidative damage products to plasma. Ozturk et al (30), in a study enrolling 6 patients with OSA and 10 controls, did not discern differences in erythrocyte fragility between the two groups. In our study, erythrocyte fragility was not measured, but the integrity of the erythrocyte membrane in individuals with sleep apnea is vouched by normal values of lactate dehydrogenase in both groups.

The evidence here obtained supports our initial hypothesis that repeated episodes of hypoxia encountered in sleep apnea increase the oxidative damage to erythrocyte proteins, suggesting, therefore, involvement of sleep apnea in CAD pathogenesis through oxidative stress mechanisms. Vitamin C may assist in preventing plasmatic protein damage in patients with sleep apnea.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

Acknowledgements

This study received grants from the Brazilian Government through Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE – HCPA), Conselho Nacional de Desenvolvimento científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo e Pesquisa do Rio Grande do Sul (Fapergs).

ABBREVIATIONS

AHI- apnea-hypopnea index

BMI- body mass index

CAD –coronary artery disease

CAT -catalase

DNPH -2,4-dinitrophenylhydrazine

GPx -glutathione peroxidase

HPLC- high-performance liquid chromatography

OSA- obstructive sleep apnea

RBC- red blood cell

SDB- Sleep disordered breathing

SOD- superoxide dismutase

REFERENCES

1. Barreiro E, Nowinski A, Gea J, and Sliwinski P. Oxidative stress in the external intercostal muscle of patients with obstructive sleep apnoea. *Thorax* 62:1095-1101, 2007.
2. Berlett BS, and Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272: 20313-20316, 1997.
3. Bradley TD, and Floras JS. Obstructive sleep apnoea and its cardiovascular consequences. *Lancet* 373:82-93, 2009.
4. Briehl RW, and Guzman AE. Fragility and structure of hemoglobin S fibers and gels and their consequences for gelation kinetics and rheology. *Blood* 82: 573-579, 1994.
5. Carr A, and Frei B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J* 13: 007–24, 1999.
6. Çimen MYB. Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clin Chim Acta* 390:1-11, 2008.
7. Cofta S, Wysocka E, Piorunek T, Rzymkowska M, Batura-Gabryel H, and Torlinski L. Oxidative stress markers in the blood of person with different stages of obstructive sleep apnea syndrome. *J Physiol Pharmacol* 59: 183-190, 2008.
8. Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, and Milzani A. Protein Carbonylation in Human Disease. *Trends Mol Med* 9:169-176, 2003.
9. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, and Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinic Chimic Acta* 329: 23–38,2003.
10. Duranteau J, Chandel NS, Kulisz A, Shao Z, and Schumacker PT. Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes . *J Biol Chem* 273: 11619–11624, 1998.

11. Gonçalves SC, Martinez D, Gus M, de Abreu-Silva EO, Bertoluci C, Dutra I, Branchi T, Moreira LB, Fuchs SC, de Oliveira AC, and Fuchs FD. Obstructive sleep apnea and resistant hypertension: A case-control study. *Chest* 132: 1858-1862, 2007.
12. Gopalakrishnan A, Ji LL, and Cirelli C. Sleep deprivation and cellular responses to oxidative stress. *Sleep* 27:27-35, 2004.
13. Grune T, Merker K, Sandig G, and Daviesb K J.A. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Bioche Biophy Res Com* 305:709–718, 2003.
14. Halliwell B, and Gutteridge JMC. Antioxidant defences: endogenous and diet derived. *Free radicals in biology and Medicine*, 3rd ed. New York: Oxford University Press, 79-186, 2007.
15. Hoffmann MS, Singh P, Wolk R, Romero-Corral A, Raghavakaimal S, and Somers VK. Microarray studies of genomic oxidative stress and cell cycle responses in obstructive sleep apnea. *Antioxid Redox Signal* 9:661-669, 2007.
16. Iwao Y, Anraku M , Yamasaki K, Kragh-Hansen U, Kawai K, Maruyama T, and Otagiri M. Oxidation of Arg-410 promotes the elimination of human serum albumin. *Bioch Biophy Acta* 1764:743–749, 2006.
17. Jain V. Clinical perspective of obstructive sleep apnea-induced cardiovascular complications. *Antioxid Redox Signal* 9: 701-10, 2007.
18. Jung T, Engels M, Kaiser B, Poppek D, and Grune T. Intracellular distribution of oxidized proteins and proteasome in HT22 cells during oxidative stress. *Free Rad Biol Med* 40:1303–1312, 2006.

19. Kaneda H, Taguchi J, Ogasawara K, Aizawa T, and Ohno M. Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery diseases, *Atherosclerosis* 162:221–225, 2002.
20. Karatepe M. Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC-UV. *LCGC North Am* 22: 362-365, 2004.
21. Kawamura N. Catalase. In: Taniguchi N, Gutteridge JMC, eds. *Experimental Protocols for Reactive Oxygen and Nitrogen Species*. New York: Oxford University Press 77-80, 2000.
22. Kono M, Tatsumi K, Saibara T, Nakamura A, Tanabe N, Takiguchi Y, and Kuriyama T. Obstructive sleep apnea syndrome is associated with some components of metabolic syndrome. *Chest* 131:1387-1392, 2007.
23. Lavie L and Lavie P. Molecular mechanisms of cardiovascular disease in OSAHS: the oxidative stress link. *Eur Resp J* 33: 1467-1484, 2009.
24. Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease. *Free Rad Biol Med* 32: 790-796, 2002.
25. Lloret A, Buj J, Badia MC, Sastre J, Morera J, and Viña J. Obstructive sleep apnea: arterial oxygen desaturation coincides with increases in systemic oxidative stress markers measured with continuous monitoring. *Free Radic Biol Med* 42: 893–894, 2007.
26. Lüthje L, and Andreas S. Obstructive sleep apnea and coronary artery disease. *Sleep Med Rev* 12:19-31, 2008.
27. Manfredini V, Lazzaretti LL, Griebeler IH, Santin AP, Brandão VD, Wagner S, Castro SM, Peralba Mdo C, and Benfato MS. Blood antioxidant parameters in sickle cell anemia patients in steady state. *J Natl Med Assoc* 100:897-902, 2008.

28. Mocatta TJ, Pilbrow AP, Cameron VA, Senthilmohan R, Frampton CM, Richards AM, and Winterbourn CC. Plasma concentrations of myeloperoxidase predict mortality after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 49:1993-2000, 2007.
29. Oliveira ACT, Martinez D, Vasconcelos LFT, Gonçalves SC, Lenz MC, Fuchs SC, Gus M, Abreu-Silva EO, Moreira LB, and Fuchs FD. Diagnosis of obstructive sleep apnea syndrome and its outcomes with home portable monitoring. *Chest* 135: 330-336, 2009.
30. Ozturk L, Mansour B, Yuksel M, Yalçın AS, Celikoğlu F, and Gökhan N. Lipid peroxidation and osmotic fragility of red blood cells in sleep-apnea patients. *Clin Chim Acta* 332:83-88, 2003.
31. Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee JH, Chen S, Corpe C, Dutta A, Dutta SK, and Levine M. Vitamin C as an antioxidant: Evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr* 22: 18-35, 2003.
32. Patil SP, Schneider H, Schwartz AR, and Smith PL. Adult obstructive sleep apnea: Pathophysiology and diagnosis. *Chest* 132:325-337, 2007.
33. Pinto R E. and Bartley W. Effect of age and sex on Glutathione reductase and Glutathione peroxidase activities and on aerobic glutathione oxidation in rat liver homogenates. *Biochem J* 112: 109-115, 1969.
34. Prabhakar NR, Kumar GK, Nandurj J, and Semenza GL. ROS signaling in systemic and cellular responses to chronic intermittent hypoxia. *Antioxid Redox Signal* 9: 1397-1403, 2007.
35. Serdar Z, Aslan K, Dirican M, Sarandöl E, Yeşilbursa D, and Serdar A. Lipid and protein oxidation and antioxidant status in patients with angiographically proven coronary artery disease. *Clin Biochem* 39:794-803, 2006.

36. Sorajja D, Gami AS, Somers VK, Behrenbeck TR, Garcia-Touchard A, and Lopez-Jimenez F. Independent association between obstructive sleep apnea and subclinical coronary artery disease. *Chest*. 133:927-33, 2008.
37. Turkoglu UM, Akalin Z, Ilhan E, Yilmaz E, Bilge A, Nisanci Y, and Uysal M. Increased plasma malondialdehyde and protein carbonyl levels and lymphocyte DNA damage in patients with angiographically defined coronary artery disease. *Clin Biochem* 38:1059-1065, 2005.
38. Uchida K. Role of reactive aldehyde in Cardiovascular Disease. *Free Rad Biol Med* 28:1685-1696, 2000.
39. Upston JM, Niu X, Brown AJ, Mashima R, Wang H, Senthilmohan R, Kettle AJ, Dean RT, and Stocker R. Disease stage-dependent accumulation of lipid and protein oxidation products in human atherosclerosis. *Am J Pathol* 160:701–710, 2002.
40. Yamauchi M, and Kimura H. Oxidative Stress in Obstructive Sleep Apnea: Putative Pathways to the Cardiovascular Complications. *Antioxid Redox Signal* 10: 755-68, 2008.
41. Yamauchi M, Nakano H, Maekawa J, Okamoto Y, Ohnishi Y, Suzuki T, and Kimura H. Oxidative Stress in Obstructive sleep apnea. *Chest* 127: 1674-1679, 2005.

3.2 MÉTODOS COMPLEMENTARES

3.2.1. Coleta de Dados

A indicação para realização de cateterismo cardíaco com cinecoronariografia ficou integralmente a critério do médico assistente do paciente, não havendo relação com o estudo polissonográfico. Os pacientes encaminhados para hemodinâmica para realização cinecoronariografia foram individualmente triados, buscando verificar quais pacientes preenchiam os critérios para participação do estudo. Os pacientes que preenchiam os critérios de inclusão, e que aceitaram participar do estudo, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice 1). Após o aceite, os pacientes responderam questões referentes ao histórico de saúde e doença (Apêndice 2), e subsequentemente foi marcada data para a realização da polissonografia portátil (PP). Ao término da realização da PP o paciente preenchia um formulário, informando sobre a qualidade do seu sono na vigente noite (Apêndice 3). O Apêndice 3 foi utilizado como auxiliar para a análise da PP.

A técnica de realização do cateterismo cardíaco esquerdo seguiu o padrão da Unidade de Hemodinâmica. Para realização da cineangiocoronariografia, o médico hemodinamicista punçou a arterial femoral direita, da qual foram coletados 20 mL de sangue. As amostras foram armazenadas separadamente em seis frascos; três tubos com soro e gel, dois tubos com citrato 3,2% e um tubo com EDTA 5,0%. Após a coleta, as amostras contidas em dois tubos com soro e gel e as amostras nos tubos com citrato foram centrifugadas, aliqüotadas e armazenadas a -80°C . As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Estresse Oxidativo do Departamento de Biofísica da UFRGS. As amostras contidas no tubo com EDTA e um tubo com amostra em soro/gel foram encaminhadas para o laboratório de patologia do Hospital de clínicas de Porto Alegre para análise bioquímica.

A coronária esquerda foi estudada em, pelo menos, quatro projeções angiográficas ortogonais distintas, enquanto a coronária direita foi avaliada em duas ou mais projeções. Após o término do exame, as imagens digitais registradas foram arquivadas em CDs. As imagens gravadas no CD foram examinadas por um hemodinamicista experiente, cego para os resultados da polissonografia e medidas de estresse oxidativo. O hemodinamicista avaliou as imagens digitais e apresentou um laudo individual por paciente, onde constava a descrição do vaso acometido, e grau de estenose. Conceitualmente consideramos DAC significativa como presença de lesão obstrutiva $\geq 50\%$ de oclusão em algumas das artérias coronárias principais ou seus ramos (TÜRKOGLU et al., 2005). No grupo controle foram considerados indivíduos sem obstrução ou obstrução menor de 50% de algumas das artérias coronárias principais ou seus ramos.

No dia em que foi marcada a realização da PP, o paciente ou um familiar compareceu à Unidade de métodos não-invasivos para retirar o aparelho de PP. Nesta ocasião foram feitas orientações para o uso da PP. A PP foi realizada no domicílio do paciente e o monitor foi devolvido na manhã seguinte. Os traçados foram analisados por um dos pesquisadores, certificado para análise da PP, cego para o resultado da cinecoronariografia.

3.2.2 Análises laboratoriais

3.2.2.1 Avaliação de dano em lipídios

O malondialdeído (MDA) foi quantificado por HPLC segundo o método descrito por KARATEPE (2004). Após o plasma ter sido desproteínizado com ácido perclórico 0,1M, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 4.300g. O método analisa amostras aquosas contendo MDA usando a coluna LC-18-DB com detecção espectrofotométrica a

250 nm. A fase móvel era composta por 82,5:17,5 (v/v) de fosfato de potássio monobásico 30 mm (ph 3,6) e metanol. O fluxo foi mantido a 1,0 ml/min e os cromatogramas foram monitorados a 250 nm. A curva de calibração do MDA foi traçada a partir de uma solução de 1 mL de 1,1,3,3 tetraidroxipropano e HCL 0,1 M. Os resultados foram apresentados como μm .

3.2.2.2 *Análises bioquímicas*

Foram dosados no laboratório de patologia clínica do HCPA os níveis de LDL-C, HDL-C, triglicerídeos, hemograma, proteína C-ultra-sensível, proteínas totais, glicose, gasometria, lactato desidrogenase e ácido úrico.

3.2.2.3 *Descarte de Reagentes*

O descarte do material biológico foi realizado segundo resolução da diretoria colegiada – RDC 306, de 7 de dezembro de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Variáveis contínuas com distribuição normal foram comparadas pela teste t de Student e apresentadas como média \pm DP. Correlação de Sperman para verificar correlação entre variáveis contínuas de distribuição assimétrica, resultados apresentados como coeficiente de correlação de Spearman (ρ). Consideramos significativo um $p \leq 0,05$. As análises foram realizadas por meio do programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) for Windows, versão 15.0.

4. RESULTADOS COMPLEMENTARES

Triou-se consecutivamente 519 indivíduos que compareceram ao setor de hemodinâmica para realizar cateterismo cardíaco por suspeita de cardiopatia isquêmica; 94 foram convidados para participar do estudo por preencherem critérios de inclusão, 33 não consentiram com o estudo, 10 apresentaram problemas durante a polissonografia, 4 apresentaram problemas durante a angiografia ou gravação de seus dados, 47 pacientes foram incluídos no estudo (Figura 5).

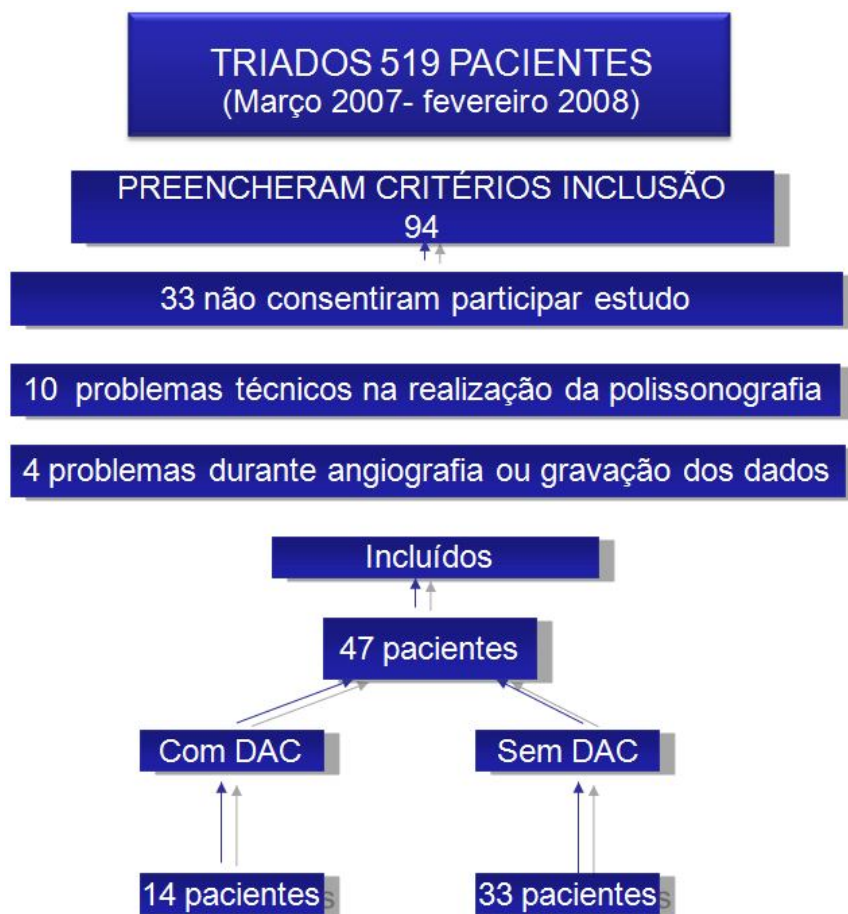


Figura 5- Esquematização da triagem de pacientes

Não foi verificada correlação entre IAH e os níveis de glicose ($\rho=0,232$; $p=0,117$), triglicerídeos ($\rho=0,200$; $p=0,178$), LDL-C ($\rho=0,138$; $p=0,364$), PCR-US ($\rho=0,115$; $p=0,445$).

Não foram observadas diferenças significativas entre os indivíduos com DAC e os controles, considerando, respectivamente, os níveis de MDA ($6,89\pm 2,19$; $7,21\pm 2,21$; gráfico 2) e ácido úrico ($6,04\pm 1,2$; $5,52\pm 1,6$; gráfico 3). Da mesma forma, não foi verificada correlação entre os níveis de MDA e IAH ($\rho = -0,20$; $p=0,896$) e ácido úrico e IAH ($\rho = 0,272$; $p=0,065$).

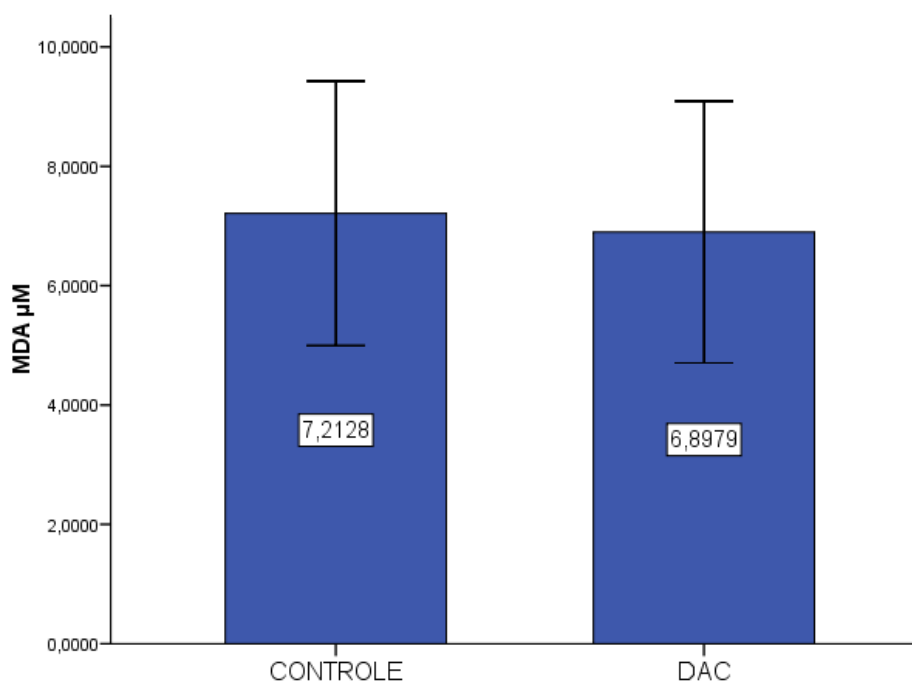


Gráfico 2 - Níveis de MDA nos indivíduos com DAC significativa, comparado aos controles. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão. Teste t de Student. MDA = malondialdeído.

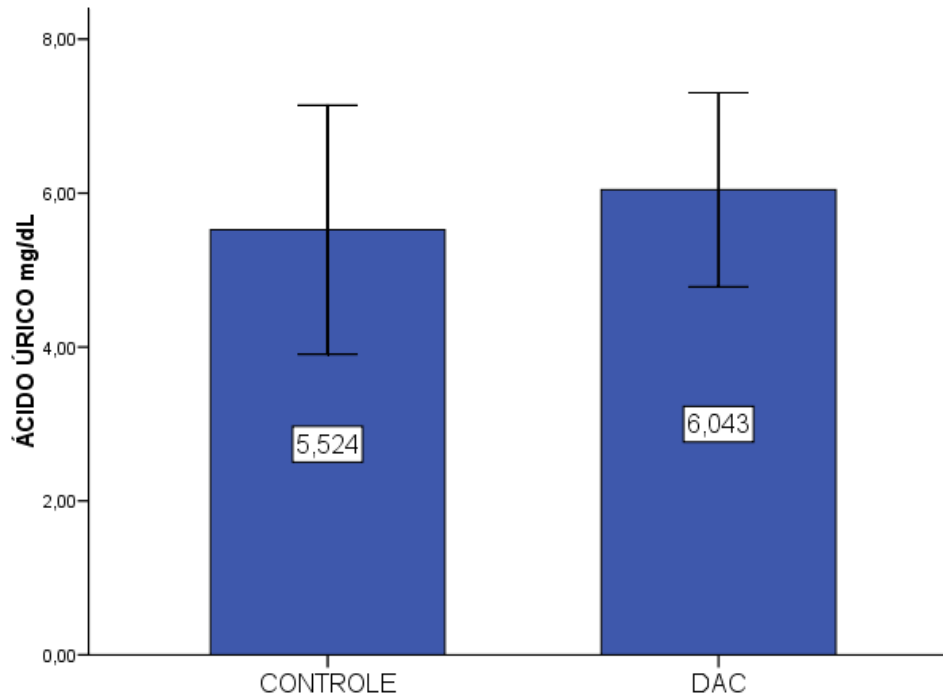


Gráfico 3 - Níveis de ácido úrico nos indivíduos com DAC significativa, comparado aos controles. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão. Teste *t* de Student.

5 DISCUSSÃO

Evidências indicam a existência de relação entre DRS e DAC. Porém, a quantidade e qualidade da literatura sobre a relação fisiopatológica dos DRS com coronariopatia ainda são inconclusivos e muitas questões permanecem em aberto (SHAMSUZZAMAN et al., 2003; LÜTHJE et al, 2008, SOMERS et al., 2008; BUTT et al., 2009). Os mecanismos fisiopatológicos que levam a esta associação ainda são baseados em estudos com evidências fragmentadas e muitas vezes acompanhados de limitações técnicas. Verifica-se dificuldade na análise dos dados, visto que muitos dos estudos existentes não são controlados para as comorbidades associadas, tanto aos DRS e a DAC, como IMC, idade e sexo.

Um dos melhores trabalhos disponíveis sobre a relação entre DAC e DRS analisou pacientes com isquemia cardíaca, submetidos a cateterismo cardíaco. Neste trabalho os pacientes foram classificados quanto à gravidade da lesão aterosclerótica pela escala de Gensini. Verificou-se correlação positiva entre a gravidade da DAC e o índice de dessaturação do oxigênio arterial. Porém, a avaliação foi realizada por oximetria, sem registro polissonográfico (HAYASHI et al., 2003).

Crescentes evidências sugerem que os DRS estão relacionados à fisiopatologia da DAC devido aos episódios de hipóxia e reoxigenação vivenciados durante os períodos de apnéias e hipopnéias (LAVIE, 2003; BARCELÓ & BARBÉ, 2005; SVATIKOVA et al., 2005; LAVIE & LAVIE, 2009). Hipóxia e reoxigenação levam à formação de radicais livres de oxigênio (PARK & SUZUKI, 2007; PRABHAKAR et al., 2009). O desequilíbrio entre as ERO e antioxidantes promove o estresse oxidativo, que conseqüentemente promove peroxidação lipídica, oxidação dos aminoácidos e ácidos nucléicos, mecanismos

estes relacionados à fisiopatogenia da DAC (TURKOGU et al., 2005; UCHIDA, 2000, FEARON & FAUX, 2009).

Muitos trabalhos que verificam relação entre estresse oxidativo e DAC o fazem através da mensuração de produtos do dano oxidativo em lipídeos e antioxidantes (SHISHEBOR et al., 2006; SERDAR et al., 2006, FLORES-MATEO et al., 2009). Na literatura são poucos os trabalhos que investigam relação entre modificações oxidativas em proteínas e DAC (KANEDA ET AL., 2002; UPSTON et al., 2002; TURKOGU et al., 2005, SERDAR et al., 2006). Reforça-se o papel da oxidação de proteínas na fisiopatologia da DAC, uma vez que em humanos foi evidenciada presença de produtos da oxidação de proteínas em placas ateroscleróticas (UPSTON et al., 2002).

Nosso estudo foi o primeiro a evidenciar que a carbonilação de proteínas eritrocitárias e IAH são preditores da DAC, controlando para idade, sexo e IMC (tabela 3, artigo). Embora alguns artigos tenham evidenciado relação entre DAC e dano oxidativo em proteínas plasmáticas (TÜRKOĞLU et al., 2005; MOCATTA et al., 2007), no nosso estudo não verificamos esta relação (tabela 2 artigo). Porém os níveis de carbonil no plasma se relacionaram a vitamina C, e da mesma forma, os níveis de vitamina C foram maiores nos indivíduos controles comparados aos com DAC significativa (pg. 43 e tabela 2 artigo). Baseados nestes resultados, nós consideramos que a vitamina C contribuiu para evitar o dano oxidativo em proteínas plasmáticas. A vitamina C é doador de elétrons, portanto um agente redutor, prevenindo oxidação de biomoléculas, entre elas as proteínas (PADAYATTY et al., 2003). Nossos resultados indicam que a vitamina C, devido a sua capacidade antioxidante, possa ter contribuído para o controle da carbonilação das proteínas plasmáticas, independente do provável aumento de ERO nos indivíduos com DRS, conseqüentemente não se associando a DAC.

Considerando a relação entre DRS e os produtos da oxidação de proteínas, somente um estudo não controlado, conduzido por BARREIRO et al. (2007), até o momento, mostrou evidências do aumento dos níveis de proteínas carboniladas no músculo intercostal de indivíduos com AHOS. Porém nenhum estudo até o momento havia evidenciado correlação positiva entre IAH e aumento de carbonilação de proteínas eritrocitárias.

Diversos estudos evidenciam associação entre DRS e enzimas antioxidantes (YAMAUCHI & KIMURA, 2008). Embora tenhamos verificado relação entre DAC e IAH nos 47 indivíduos incluídos no nosso estudo, estes ainda apresentavam outras patologias e uso de diversos fármacos (página 41 e tabela 1 artigo). Os medicamentos utilizados no tratamento de DCV podem interferir no balanço redox, tanto como antioxidantes ou como prooxidantes (FLESCH et al., 1999; KOPFF et al., 2004). No nosso estudo, os pacientes utilizavam medicamentos como, beta bloqueadores, bloqueadores dos canais de cálcio, ácido acetilsalicílico e estatinas. Evidências ainda controversas indicam que o ácido acetilsalicílico, as estatinas e beta bloqueadores, têm efeitos antioxidantes. (FLESCH et al., 1999; DELBOSC et al., 2002; KOPFF et al., 2004). Portanto, é possível que estes fatores, acrescidos dos descritos previamente na discussão do artigo, possam ter interferido nos resultados das enzimas antioxidantes, e prejudicado o aparecimento desta relação.

Um dos principais fatores conhecidos como iniciadores da formação da placa de ateroma é a hipercolesterolemia, associada com aumento da suscetibilidade de oxidação do LDL-C (LUSIS, 2000). Considerando os lípideos analisados, verificamos que os níveis de LDL-C não diferem entre os indivíduos com DAC significativa e controles (tabela 2 artigo), provavelmente a ação das estatinas pode ter influenciado nestes resultados. Considerando o uso de estatinas, verificamos que indivíduos com DAC faziam mais uso

deste medicamento que os indivíduos controle (página 40). Estatinas são hipolemiantes, cuja ação é devida a inibição da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA), que promove a diminuição do LDL-C através da inibição hepática da biossíntese de colesterol, aumentando os receptores de LDL e diminuindo os níveis de LDL-C (DEEDWANIA et al., 2009). Sabe-se que além dos efeitos hipolemiantes, as estatinas também tem efeito anti-inflamatório e aumentam os níveis de HDL-C. Os efeitos dos inibidores da HMG-CoA no balanço redox ainda são pouco conhecidos.

Está bem estabelecido que diminuição dos níveis de LDL-C e níveis de HDL-C acima de 40 mg/dL, protegem contra DCV (NCEP, 2002). No nosso estudo verificamos que indivíduos com DAC apresentam significativa diminuição dos níveis de HDL-C comparado aos controles. Da mesma forma verificamos correlação entre HDL-C e IAH (página 42). Estudos prévios não mostraram relação entre IAH e HDL-C e LDL-C (SHAMSUZZAMAN et al., 2002; TAN et.al, 2006). Porém no mesmo estudo em que TAN et al.(2006) verificaram inexistência de relação entre IAH e HDL-C e LDL-C, foi verificada a relação entre o IAH com o aumento do LDL-oxidado e a diminuição da capacidade antioxidante do HDL em indivíduos com SAHOS. As propriedades anti-aterogênicas do HDL-C, incluindo capacidade antioxidante, anti-inflamatória, anti-apoptótica, anti-trombótica e propriedades vasodilatadoras são bem conhecidas (DEEDWANIA et al., 2009; RADER, 2006).

Muitos autores relacionam DAC e DRS com aumento do dano oxidativo em lipídeos (BARCELÓ et al., 2000; TAN et al., 2006; COFTA et al., 2008). Diferente da maioria dos estudos que evidenciaram aumento dos produtos da peroxidação lipídica, nós não verificamos relação entre MDA e DAC ou MDA e IAH (gráfico 2 e página 57). Os radicais livres liberados em reações oxidativas durante a peroxidação lipídica levam a

formação de hidroperóxidos lipídicos que se decompõem em diversos produtos secundários, tais como: aldeídos, cetonas, entre outros. Dentre os aldeídos que podem ser formados está o MDA, cuja quantificação foi realizada no presente estudo.

Os níveis de MDA verificados nos indivíduos do presente estudo, podem ter tido interferência dos efeitos das estatinas. Baseado nas evidências de que as estatinas diminuem a oferta de LDL-C, menor será a oferta de LDL a ser oxidada. Estudo conduzido por YILMAZ et al. (2004) mostrou que indivíduos tratados com estatinas apresentaram diminuição dos níveis de LDL-C e diminuição dos níveis de TBARS. TANI et al. (2005) relataram a diminuição dos níveis de MDA-LDL em indivíduos que fizeram uso de estatinas, e os níveis de MDA-LDL foram evidenciados como preditores na regressão da placa de ateroma. O uso de estatinas é indicado como profilático em indivíduos com LDL elevado (NCEP, 2002), portanto provavelmente os indivíduos de maior risco para DAC já estavam fazendo uso das estatinas.

Nas nossas análises não foi verificada correlação entre IAH e ácido úrico (página 57), e da mesma forma não se evidenciou diferença nos níveis de ácido úrico nos indivíduos com DAC significativa comparados aos controles (gráfico 3). Os resultados de estudos prévios sobre a relação entre DRS e os níveis de ácido úrico ainda são controversos (SAHEBJANI, 1998; GARCIA et al., 2006; STEIROPOULOS et al., 2009). Doenças como DAC, insuficiência cardíaca e insuficiência renal estão associadas á aumento dos níveis de ácido úrico (MADSEN et al., 2005, REYES, 2003). O uso de medicamentos como diuréticos, betabloqueadores, ácido acetil salicílico, inibidores da enzima conversora do angiotensina, utilizados nos indivíduos incluídos no presente estudo, interferem nos níveis de ácido úrico (REYS, 2003). Também não controlamos a dieta dos indivíduos incluídos no estudo; sabe-se que a quantidade de purinas ingeridas interfere

aumentando os níveis de ácido úrico (JOHNSON & RIDEOUT, 2004). Da mesma forma dietas ricas em sódio aumentam os níveis de ácido úrico (REYS, 2003). A soma dos fatores que interferem nos níveis de ácido úrico pode ter interferido na real relação entre níveis de ácido úrico, IAH e DAC, porém são necessários mais estudo para confirmar esta hipótese.

Com base nas evidências do presente estudo não foram verificadas diferenças nos níveis de proteína C reativa ultra sensível (PCR-US), entre indivíduos com DAC significativa e controles (tabela 2 artigo). Da mesma forma não houve correlação entre PCR-US e IAH (página 57). Conforme a *American Heart Association e Centers for Disease Control and Prevention* (PEARSON et al., 2003) a PCR-US é indicada como marcador inflamatório para predizer risco de DCV. Níveis de PCR-US menores que 1mg/L são considerados de baixo risco para desenvolvimento de DCV, níveis PCR-US entre 1 e 3 mg/L, médio risco, e níveis superiores à 3mg/L representam alto risco para DCV. Indivíduos com valores de PCR-US maiores de 10mg/L, apresentam infecção ou inflamação aguda; nestes casos não é indicado o uso da proteína C como marcador de risco para DCV. Sete dos indivíduos incluídos no nosso estudo apresentaram PCR-US acima de 10 mg/L. Outros fatores também podem ter interferido nestes resultados como o uso de estatinas e o ácido acetil salicílico, inibidores da enzima conversora do angiotensionogênio, betabloqueadores que têm entre os seus efeitos diminuir os níveis de PCR-US (PRASAD, 2006).

A relação entre PCR-US com DRS é controversa (PUNJABI & BEAMER, 2007; TAHERI et al., 2007, RYAN et al., 2007). Estas controvérsias são devidas principalmente ao fato de que os níveis de PCR-US correlacionam-se positivamente com a obesidade (KAO et al., 2009). Da mesma forma os DRS também são mais freqüentes em obesos

(LEINUM et al., 2009). Além dos indivíduos incluídos no nosso estudo não diferirem quanto ao IMC, verificamos que os indivíduos com DAC significativa faziam mais uso de estatinas, medicamento este relacionado à diminuição dos níveis de PCR-US (MCMURRAY et al., 2009).

Baseado nos resultados deste estudo reforça-se a necessidade de diagnóstico precoce dos DRS, visto que o aumento da carbonilação de proteínas e o IAH estão relacionados ao aumento do risco para desenvolvimento de DAC. A DAC é uma doença aterosclerótica, e a aterosclerose ocorre de forma sistêmica. Provavelmente o aumento da carbonilação de proteínas seja secundário ao aumento do IAH e desta forma pode estar envolvido na fisiopatologia de outras doenças ateroscleróticas. Reforça-se a necessidade de novos estudos buscando elucidar a relação entre DRS, doenças ateroscleróticas e carbonilação de proteínas eritrocitárias.

6. PERSPECTIVAS

- Aumentar o número de indivíduos no estudo.
- Quantificar os níveis de MDA nos eritrócitos.
- Medir níveis de vitamina E no soro.
- Quantificar os níveis de dano em DNA.
- Correlacionar marcadores de estresse oxidativo com gravidade da DAC.

REFERÊNCIAS

AMERICAN ACADEMY OF SLEEP MEDICINE. 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* 22:667-89, 1999.

American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics — 2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee.

AMERICAN SLEEP DISORDERS ASSOCIATION POLYSOMNOGRAPHY TASK FORCE. Practice parameters for the indications for polysomnography and related procedures. Standards of Practice Committee. *Sleep* 20:406-22, 1997.

AMERICAN SLEEP DISORDERS ASSOCIATION. Practice parameters for the treatment of obstructive sleep apnea in adults: the efficacy of surgical modifications of the upper airway. *Sleep* 19:152-5, 1996.

AVIRAM, M, & ROSENBLAT, M. Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Rad Biol Med* 37:1304-16, 2004.

BARCELÓ A, MIRALLES C, BARBÉ F, VILA M, PONS S, AGUSTÍ AG. Abnormal lipid peroxidation in patients with sleep apnoea. *Eur Respir J.* 16:644-7, 2000.

BARCELÓ A. & BARBÉ F. Oxidative Stress and Sleep Apne-Hypopnea Syndrome. *Arch Bronmconeumol* 41: 393-399, 2005.

BARREIRO, E.; NOWINSKI, A.; GEA, J.& SLIWINSKI, P. Oxidative stress in the external intercostal muscle of patients with obstructive sleep apnoea. *Thorax* 62:1095-1101, 2007.

BASSETTI, C.L.; MILANOVA, M. & GUGGER, M. Sleep-disordered breathing and acute ischemic stroke: diagnosis, risk factors, treatment, evolution, and long-term clinical outcome. *Stroke* 37:967– 972, 2006.

BEARPARK, H.; ELLIOTT, L.; GRUNSTEIN, R.; CULLEN, S.; SCHNEIDER, H.; ALTHAUS, W. & SULLIVAN, C. Snoring and sleep apnea. A population study in Australian men. *Am J Respir Crit Care Med* 151:1459-65, 1995.

BIXLER, E.O.; VGONTZAS, A.N.; TEN-HAVE, T.; TYSON, K. & KALES, A. Effects of age on sleep apnea in men: Prevalence and severity. *Am J Respir Crit Care Med* 157:144–148, 1998.

BIXLER, E.O.; VGONTZAS, A.N.; LIN, H.M.; TEN-HAVE, T.; REIN, J.; VELA-BUENO, A. & KALES A. Prevalence of sleep-disordered breathing in women: effects of gender. *Am J Respir Crit Care Med* 163:608-13, 2001.

BIXLER, E.O.; VGONTZAS, A.N.; TEN-HAVE, T.; TYSON, K. & KALES, A. Effects of age on sleep apnea in men: I. Prevalence and severity. *Am J Respir Crit Care Med* 157:144-8, 1998.

- BRADLEY, T.D. & FLORAS J.S. Sleep apnea and heart failure: part II: central sleep apnea. *Circulation* 107:1822–1826, 2003.
- BRADLEY, T.D. & FLORAS, J.S. Obstructive sleep apnoea and its cardiovascular consequences. *Lancet* 373:82-93, 2009.
- BUI, Q.T.; PREMPEH, M. & WILENSKY, R.L. Atherosclerotic Plaque Development. *Int J Biochem Cell Biol* 41:2109-2113, 2009.
- BUTT, M.; DWIVEDI, G.; KHAIR, O. & LIP, G.Y. Obstructive sleep apnea and cardiovascular disease. *Int J Cardiol* 2009 (in press).
- CAPLES, S.M.; GARCIA-TOUCHARD, A. & SOMERS, V.K. Sleep-disordered breathing and cardiovascular risk. *Sleep* 30:291-304, 2007.
- CAPLES, S.M.; WOLK, R. & SOMERS, V.K. Influence of cardiac function and failure on sleep-disordered breathing: evidence for a causative role. *J Appl Physiol*, 99:2433–2439, 2005.
- CARPAGNANO, G.E.; KHARITONOV, S.A.; RESTA, O.; FOSCHINO-BARBARO, M.P.; GRAMICCIONI, E. & BARNES, P.J. 8-Isoprostane, a marker of oxidative stress, is increased in exhaled breath condensate of patients with obstructive sleep apnea after night and is reduced by continuous positive airway pressure therapy. *Chest* 124:1386–1392, 2003.
- CARR A. & FREI B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J* 13: 1007–24, 1999.
- CHAN, H.S.; CHIU, H.F.; TSE, L.K & WOO, K.S. Obstructive sleep apnea presenting with nocturnal angina, heart failure, and near-miss sudden death. *Chest* 99:1023-5, 1991.
- CHESSON, A.L.; BERRY, R.B. & PACK, A. American Academy of Sleep Medicine; American Thoracic Society; American College of Chest Physicians. Practice parameters for the use of portable monitoring devices in the investigation of suspected obstructive sleep apnea in adults. *Sleep*. 26:907–913, 2003.
- CHISTOU, K.; MOULAS, N.A.; PASTAKA, C. & GOURGOUÇIANIS, K. Antioxidant capacity in Obstructive sleep apnea patients. *Sleep Med* 4:225-228, 2003.
- Çimen M.Y.B. Free radical metabolism in Human erythrocytes. *Clin Chim Acta* 390:1-11, 2008.
- COFTA, S.; WYSOCKA, E.; PIORUNEK, T.; RZYMKOWSKA, M.; BATURA, G.H. & TORLINSKI, L. Oxidative stress markers in the blood of person with different stages of obstructive sleep apnea syndrome. *J Physiol Pharmacol*, 59: 183-190, 2008.
- COUGHLIN, S.R.; MAWDSLEY, L.; MUGARZA, J.A.; CALVERLEY, P.M.A. & WILDING, J.P.H. Obstructive sleep apnoea is independently associated with an increased prevalence of metabolic syndrome. *Eur Heart J* 25:735-741, 2004.
- DEEDWANIA, P.; SINGH, V. & DAVIDSON, M.H. Low high-density lipoprotein cholesterol and increased cardiovascular disease risk: an analysis of statin clinical trials. *Am J Cardiol* 16;104, 2009.
- DELBOSC, S.; MORENA, M.; DJOUAD, F.; LEDOUCEN, C.; DESCOMPS, B. & CRISTOL, J.P. Statins, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors,

are able to reduce superoxide anion production by NADPH oxidase in THP-1-derived monocytes. *J Card Pharmacol* 40:611-617, 2002.

DRAGER, L.F.; BORTOLOTTI, L.A.; LORENZI, M.C.; FIGUEIREDO, A.C.; KRIEGER, E.M. & LORENZI-FILHO, G. Early signs of atherosclerosis in obstructive SLEEP APNEA. *AM J RESPIR CRIT CARE MED* 172:613-8, 2005.

DRUGOVSKAYA, L.; LAVIE, L. & LAVIE, P. Hirsh M. Activated CD8+ T-lymphocytes in obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 25:780-782, 2005.

DRUGOVSKAYA, L.; LAVIE, P. & LAVIE, L. Increased adhesion molecules expression and production of reactive oxygen species in leukocytes of sleep apnea patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 165:859-60, 2002.

DURAN, J.; ESNAOLA, S.; RUBIO, R. & IZTUETA, A. Obstructive sleep apnea-hypopnea and related clinical features in a population-based sample of subjects aged 30 to 70 yr. *Am J Respir Crit Care Med* 163:685– 689, 2001.

ECKERT, D.J.; JORDAN, A.S.; MERCHIA, P. & MALHOTRA, A. Central sleep apnea: Pathophysiology and treatment. *Chest* 131:595–607, 2007.

EHARA, S.; UEDA, M.; NARUKO, T.; HAZE, K.; ITOH, A.; OTSUKA, M.; KOMATSU, R.; MATSUO, T.; ITABE, H.; TAKANO, T.; TSUKAMOTO, Y.; YOSHIYAMA, M.; TAKEUCHI, K.; YOSHIKAWA, J. & BECKER, A.E. Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation*. 2001; 103:1955–1960, 2001.

FEARON, I.M. & FAUX, S.P. Oxidative stress and cardiovascular disease: novel tools give (free) radical insight. *J Mol Cell Cardiol* 47:372-81, 2009.

FLESCH, M.; MAACH, C.; CREMERS, B.; BAMAR, A.T.; SUDCAMP, H. & BOHM, M. Effect of β -blockers on free radical-induced cardiac contractile dysfunction, *Circulation* 100:346-353, 1999.

FLORES-MATEO, G.; CARRILLO-SANTISTEVE, P.; ELOSUA, R.; GUALLAR, E.; MARRUGAT, J.; BLEYS, J. & COVAS, M.I. Antioxidant Enzyme Activity and Coronary Heart Disease: Meta-analyses of Observational Studies. *Am J Epidemiol* 170:135-147, 2009.

FOGEL, R.B.; MALHOTRA, A.; PILLAR, G.; PITTMAN, S.D.; DUNAIF, A. & WHITE, D.P. Increased prevalence of obstructive sleep apnea syndrome in obese women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1175–1180, 2001.

FOSTER, G.; KUNA, S.T. & SANDERS, M. Sleep apnea in obese adults with type 2 diabetes: baseline results from the Sleep AHEAD study. *Sleep* 28, 2005.

FRIEDMAN, O. & LOGAN A.G. The price of obstructive sleep apnea-hypopnea: hypertension and other ill effects. *Am J Hypertens* 22:474-83, 2009.

GARCÍA, A. R.; SÁNCHEZ ARMENGOL, A.; LUQUE, C. E.; GARCÍA AGUILAR, D.; FALCÓN, A. R.; BERNAL, C.C. & CAPOTE, F. Blood uric acid levels in patients with sleep-disordered breathing. *Arch Bronconeumol* 42:492-500, 2006.

GENESTRA, M. Oxy radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cel Sig* 19: 1807–1819, 2007.

- GUPTA, N.; GILL, K. & SINGH, S. Paraoxonases: structure, gene polymorphism & role in coronary artery disease. *Indian J Med Res* 130:361-8, 2009.
- HALLIWELL, B & GUTTERIDGE, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd Ed, New York, Oxford University Press, 2007.
- HAYASHI, M.; FUJIMOTO, K.; URUSHIBATA, K.; UCHIKAWA, S.; IMAMURA, H. & KUBO K. Nocturnal oxygen desaturation correlates with the severity of coronary atherosclerosis in coronary artery disease. *Chest* 124:936-41, 2003.
- HENSLEY, K.; ROBINSON, K.A.; GABBAITA, S.P.; SALSMAN, S. & FLOYD R.A. Reactive Oxygen species, Cell Signaling, and Cell Injury. *Free Rad Biol Med*, 28:1456-1462, 2000.
- HUI, D.S.; CHOY, D.K.; WONG, L.K.; KO, F.W.; LI, T.S.; WOO, J. & KAY, R. Prevalence of sleep-disordered breathing and continuous positive airway pressure compliance: results in chinese patients with first-ever ischemic stroke. *Chest* 122:852-860, 2002.
- IBER, C.; ANCOLI-ISRAEL, S.; CHESSON, A. & QUAN, S.F. For the American Academy of Sleep Medicine. *The AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events: Rules, Terminology and Technical Specifications*. Westchester, III: American Academy of Sleep Medicine; 2007.
- IP, M.S.; LAM, B.; LAUDER, I.J.; TSANG, K.W.; CHUNG, K.F.; MOK, Y.W. & LAM, W.K. A community study of sleep-disordered breathing in middle-aged Chinese men in Hong Kong. *Chest* 119:62-9, 2001.
- IP, M.S.; LAM, B.; NG, M. M.; LAM, W.K., TSANG, K.W & LAM K.S. Obstructive sleep apnea is independently associated with insulin resistance. *Am J Respir Crit Care Med* 165:562-563, 2002.
- ITZHAKI, S.; DORCHIN, H.; CLARK, G.; LAVIE, L.; LAVIE, P. & PILLAR, G. The Effects of 1-year Treatment with a Herbst Mandibular Advancement Splint on Obstructive Sleep Apnea, Oxidative Stress, and Endothelial Function. *Chest* 131: 740-749, 2007.
- JAVAHERI, S. Sleep disorders in systolic heart failure: a prospective study of 100 male patients. The final report . *Int J Cardiol* 106:21-28, 2006.
- JAVAHERI, S.; PARKER, T.J.; LIMING, J.D.; CORBETT, W.S.; NISHIYAMA, H.; WEXLER, L. & ROSELLE G.A. Sleep apnea in 81 ambulatory male patients with stable heart failure. Types and their prevalences, consequences, and presentations. *Circulation* 97:2154-9, 1998.
- JOHNSON, R.J.& RIDEOUT, B.A. Uric acid and diet--insights into the epidemic of cardiovascular disease. *N Engl J Med* 350:1071-3, 2004.
- KANEDA, H.; TAGUCHI, J.; OGASAWARA, K.; AIZAWA, T. & OHNO, M. Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 162:221-5, 2002.
- KAO, T.W.; LU, I.S.; LIAO, K.C.; LAI, H.Y.; LOH, C.H. & KUO, H.K. Associations between body mass index and serum levels of C-reactive protein. *S Afr Med J* 99:326-30, 2009.

- KAPUR, V.; STROHL, K.P.; REDLINE, S.; IBER, C.; O'CONNOR, G. & NIETO J. Underdiagnosis of sleep apnea syndrome in U.S. communities. *Sleep Breath* 6:49–54, 2002.
- KARATEPE, M. Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC-UV. *LCGC North Am* 22: 362-365, 2004.
- KHURANA, R.; SIMONS, M.; MARTIN, J.F. & ZACHARY, I.C. Role of angiogenesis in cardiovascular disease: a critical appraisal.. *Circulation* 20;112:1813-1824, 2005.
- KIM, J.; IN, K.; KIM, J.; YOU, S.; KANG, K.; SHIM, J.; LEE, S.; LEE, J.; LEE, S.; PARK, C. & SHIN, C. Prevalence of sleep-disordered breathing in middle-aged Korean men and women. *Am J Respir Crit Care Med* 170:1108-13, 2004.
- KOBAYASHI, K.; NISHIMURA, Y.; SHIMADA, T.; YOSHIMURA, S.; FUNADA, Y.; SATOUCHI, M. & YOKOYAMA, M. Effect of continuous positive airway pressure on soluble CD40 ligand in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Chest* 129:632-637, 2006
- KOPFF, M.; KOWALCZYK, E. & KOPFF, A. Influence of selected cardiological drugs on oxidative status, *Pol J Pharmacol* 56:265–269, 2004.
- KUSHIDA, C.A.; LITTNER, M.R.; HIROSHKOWITZ, M. & MORGENTHALER T.I. Practice parameters for the use of continuous and bilevel positive airway pressure Devices to treat adult patients with sleep related Breathing Disorders. *Sleep* 29:375-380, 2006. (1)
- KUSHIDA, C.A.; LITTNER, M.R.; MORGENTHALER, T.; ALESSI, C.A.; BAILEY, D.; COLEMAN, J. JR.; FRIEDMAN, L.; HIRSHKOWITZ, M.; KAPEN, S.; KRAMER, M.; LEE-CHIONG, T.; LOUBE, D.L.; OWENS, J.; PANCER, J.P. & WISE, M. Practice parameters for the indications for polysomnography and related procedures: an update for 2005. *Sleep* 28:499-521, 2005.
- KUSHIDA, C.A.; MORGENTHALER, T.I.; LITTNER, M.R. ALESSI C.A.; BAILEY, D.; COLEMAN, J.; FRIEDMAN, L.; HIRSHKOWITZ, M.; KAPEN S.; KRAMER, M.; LEE-CHIONG, T.; OWENS, J. & PANCER, J.P. Practice Parameters for the Treatment of snoring and obstructive sleep apnea with oral appliances: An update for 2005. *Sleep*, 29:240-243, 2006. (2)
- KUTZING, M.K. & FIRESTEIN, B.L. Altered Uric Acid Levels and Disease States. *JPET* 324:1–7, 2008.
- LAVIE L. Obstructive sleep apnoea syndrome--an oxidative stress disorder. *Sleep Med Rev* 7:35-51, 2003.
- LAVIE L.; VISHNEVSKY A. & LAVIE P. Evidence for lipid peroxidation in obstructive sleep apnea. *Sleep* 27: 123 – 128, 2004.
- LAVIE, L. & LAVIE, P. Molecular mechanisms of cardiovascular disease in OSAHS: the oxidative stress link. *Eur Respir J* 33:1467-84, 2009.
- LEE, W.; NAGUBADI, S.; KRYGER, M.H. & MOKHLESI, B. Epidemiology of Obstructive Sleep Apnea: a Population-based Perspective. *Expert Rev Respir Med* 2:349-364, 2008.
- LEINUM, C. J.; DOPP, J. M. & MORGAN B. J. Sleep-Disordered Breathing and Obesity: Pathophysiology, Complications, and Treatment. *Nutr Clin Pract* 24: 675 – 687, 2009.

- LEUNG, R.S.; HUBER, M.A.; ROGGE, T.; MAIMON, N.; CHIU, K.L. & BRADLEY, T.D. Association between atrial fibrillation and central sleep apnea. *Sleep* 28:1543-6, 2005.
- LIBBY, P. & THEROUX, P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation* 111:3481-8, 2005.
- LIU, M.L.; YLITALO, K.; SALONEN, R., SALONEN, J.T. & TASKINEN, M.R. Circulating oxidized lowdensity lipoprotein and its association with carotid intimamedia thickness in asymptomatic members of familial combined hyperlipidemia families. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:1492–1497, 2004.
- LITTNER, M.R. Polysomnography and cardiorespiratory monitoring. In: Kushida, C.A. *Obstructive Sleep Apnea: diagnosis and treatment*. New York, Series: Sleep Disorders, 2007.
- LUSIS, A.J. Atherosclerosis, *Nature* 407:233–241, 2000.
- LÜTHJE, L. & ANDREAS, S. Obstructive sleep apnea and coronary artery disease. *Sleep Med Rev* 12:19-31, 2008.
- MADAMANCHI, N.R.; VENDROV, A. & RUNGE, M.S. Oxidative Stress and Vascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:29-38, 2005.
- MADSEN, T.E.; MUHLESTEIN, J.B.; CARLQUIST, J.F.; HORNE, B.D.; BAIR, T.L.; JACKSON, J.D.; LAPPE, J.M.; PEARSON, R.R. & ANDERSON, J.L. Serum uric acid independently predicts mortality in patients with significant, angiographically defined coronary disease. *Am J Nephrol* 25:45-49, 2005.
- MARSHALL, N.S.; WONG, K.K.; LIU, P.Y.; CULLEN, S.R.J.; KNUIMAN, M.W. & GRUNSTEIN, R.R. Sleep Apnea as an Independent Risk Factor for all-Cause Mortality: The Busselton Health Study. *Sleep*, 31: 1079-1085, 2008.
- MCMURRAY, J.J.; KJEKSHUS, J.; GULLESTAD, L.; DUNSELMAN, P.; HJALMARSON, A.; WEDEL, H.; LINDBERG, M.; WAAGSTEIN, F.; GRANDE, P.; HRADEC, J.; KAMENSKÝ, G.; KOREWICKI, J.; KUUSI, T.; MACH, F.; RANJITH, N. & WIKSTRAND, J. CORONA Study Group. Effects of statin therapy according to plasma high-sensitivity C-reactive protein concentration in the Controlled Rosuvastatin Multinational Trial in Heart Failure (CORONA): a retrospective analysis. *Circulation* 120:2188-96, 2009.
- MCNICHOLAS, W.T & KRIEGER, J. Public health and medicolegal implications of sleep apnoea. *Eur Respir J* 20: 1594–1609, 2002.
- MERHA, R.; BENJAMIN, E.J.; SHAHAR, E.; GOTTLIEB, D.J.; NAWABIT, R.; KIRCHNER, H.L.; SAHADEVAN, J. & REDLINE, S. Association of Nocturnal Arrhythmias with Sleep-disordered Breathing. *Am J Respir Crit Care Med*, 173: 910-916, 2006.
- MILLERON, O.; PILLIERE, R.; FOUCHER, A.; ROQUEFEUIL, F.; AEGERTER, P.; JONDEAU, G.; RAFFESTIN, BG. & DUBOURG, O. Benefits of obstructive sleep apnoea treatment in coronary artery disease: a long-term follow-up study. *Eur Heart J* 25:709-11, 2004.
- MOCATTA T.J.; PILBROW, A.P.; CAMERON, V.A.; SENTHILMOHAN, R.; FRAMPTON, C.M.; RICHARDS, A.M. & WINTERBOURN, C.C. Plasma concentrations

of myeloperoxidase predict mortality after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 49:1993-2000, 2007.

MOOE, T.; RABBEN, T.; WIKLUND, U.; FRANKLIN, K.A. & ERIKSSON P. Sleep-disordered breathing in men with coronary artery disease. *Chest* 109:659–663, 1996. (1)

MOOE, T.; RABBEN, T.; WIKLUND, U.; FRANKLIN, K.A. & ERIKSSON P. Sleep-disordered breathing in women: occurrence and association with coronary artery disease. *Am J Med* 101:251–256, 1996. (2)

MORGENTHALER, T.I.; KAPEN, S.; LEE-CHIONG, T.; ALESSI, C.; BOEHLECKE, B.; BROWN, T.; COLEMAN, J.; FRIEDMAN, L.; KAPUR, V.; OWENS, J.; PANCER, J. & SWICK, T. Standards of Practice Committee; American Academy of Sleep Medicine. Practice parameters for the medical therapy of obstructive sleep apnea. *Sleep* 29:1031-5, 2006.

MURRI, M.; ALCÁZAR-RAMÍREZ, J.; GARRIDO-SÁNCHEZ, L.; LINDE, F.; ALCAIDE, J.; CARDONA, F. & TINAHONES, F.J. Oxidative stress and metabolic changes after continuous positive airway pressure treatment according to previous metabolic disorders in sleep apnea-hypopnea syndrome patients. *Transl Res* 154:111-121, 2009.

NAGAHAMA, H.; SOEJIMA, M.; UENOMACHI, H. HIGASHI, Y.; YOTSUMOTO, K.; SAMUKAWA, T. & ARIMA T. Pulse wave velocity as an indicator of atherosclerosis in obstructive sleep apnea syndrome patients. *Intern Med* 43:527-528, 2004.

NARKIEWICZ, K.; MONTANO, N.; COGLIATI, C.; VAN DE BORNE, P.J.; DYKEN, M.E. & SOMERS, V.K. Altered cardiovascular variability in obstructive sleep apnea. *Circulation* 98:1071–1077, 1998. (1)

NARKIEWICZ, K.; VAN DE BORNE, P.J.; MONTANO, N.; DYKEN, M.E.; PHILLIPS, B.G. & SOMERS V.K. Contribution of tonic chemoreflex activation to sympathetic activity and blood pressure in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation* 97:943–945, 1998. (2)

National Cholesterol Education Panel, 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): Final Report, *Circulation* 106:3143–3421, 2002.

NETZER, N.C.; HOEGEL, J.J.; LOUBE, D.; NETZER, C.M.; HAY, B.; ALVAREZ-SALA, R. & STROHL, K.P. Sleep in Primary Care International Study Group. Prevalence of symptoms and risk of sleep apnea in primary care. *Chest* 124: 11406-1414, 2003.

OLDENBURG, O.; LAMP, B.; FABER, L.; TESCHLER, H.; HORSTKOTTE, D. & TOPFER, V. Sleep-disordered breathing in patients with symptomatic heart failure: a contemporary study of prevalence in and characteristics of 700 patients. *Eur J Heart Fail* 9:251–257, 2007.

OLSON, L.J. & SOMERS, V.K. Sleep apnea: implications for heart failure. *Curr Heart Fail Rep* 4:63–69, 2007.

OZTURK, L.; MANSOUR, B.; YUKSEL, M.; YALCIN, A.S.; CELIKOGLU, F. & GOKHAN, N. Lipid peroxidation and osmotic fragility of red blood cells in sleep-apnea patients. *Clin Chim Acta* 332: 83–88, 2003.

- PADAYATTY, S.J.; KATZ, A.; WANG, Y.; ECK, P.; KWON, O.; LEE, J.; CHEN, S.; CORPE, C.; DUTTA, A.; DUTTA, S.K. & LEVINE M. Vitamin C as an antioxidant: Evaluation of its role in disease Prevention. *J Am Coll Nutr* 22:18-35, 2003.
- PARK, A.M. & SUZUKI, Y.J. Effects of Intermittent hypoxia on oxidative stress-induced myocardial damage in mice. *Appl Physiol* 102:1806-1814, 2007.
- PARRA, O.; ARBOIX, A.; BECHICH, S.; GARCÍA-EROLE, L.; MONTSERRAT, J.M.; LÓPEZ, J.A.; BALLESTER, E.; GUERRA, J.M. & SOPEÑA, J.J. Time course of sleep-related breathing disorders in first-ever stroke or transient ischemic attack. *Am J Respir Crit Care Med* 161:375-380, 2000.
- PEARLSTEIN, D.P.; ALI, M.H.; MUNGAI, P.T.; HYNES, K.L.; GEWERTZ, B.L. & SCHUMACKER, P.T. Role of mitochondrial oxidant generation in endothelial cell response to hypoxia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:566-573, 2002.
- PEARSON, T. A.; MENSAH, G. A.; ALEXANDER, R. W.; ANDERSON, J. L.; CANNON III, R. O.; CRIQUI, M.; FADL, Y. Y.; FORTMANN, S. P.; HONG, Y.; MYERS, G. L.; RIFAI, N.; SMITH JR., S. C.; TAUBERT, K.; TRACY, R. P. & VINICOR, F. Centers for Disease Control and Prevention, American Heart Association. Markers of inflammation and cardiovascular disease. Application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* 107:499-511, 2003.
- PEKER, Y.; KRAICZI, H.; HEDNER, J.; LOTH, S.; JOHANSSON, A. & BENDE, M. An independent association between obstructive sleep apnoea and coronary artery disease. *Eur Respir J* 14:179-184, 1999.
- PETER, J.H.; KOEHLER, U.; GROTE, L. & PODSZUS, T. Manifestations and consequences of obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J*. 1995 8:1572-83, 1995.
- PHILLIPS, B. & MANNINO, D.M. Does insomnia kill? *Sleep* 28:965-971, 2005.
- PRABHAKAR, N.R.; KUMAR, G.K. & NANDURI, J. Intermittent hypoxia-mediated plasticity of acute O₂ sensing requires altered red-ox regulation by HIF-1 and HIF-2. *Ann N Y Acad Sci* 1177:162-8, 2009.
- PRASAD K. C-reactive protein (CRP)-lowering agents. *Cardiovasc Drug Rev* 24:33-50, 2006.
- PUNJABI, N.M & BEAMER, B.A. C-reactive protein is associated with sleep disordered breathing independent of adiposity. *Sleep* 30:29-34, 2007.
- RADER, D.J. Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. *J Clin. Invest* 116:3090-3100, 2006.
- REYES, A.J. Cardiovascular drugs and serum uric acid. *Cardiovasc Drugs Ther* 17:397-414, 2003.
- ROCHESTER CL, MOHSENIN V. Respiratory complications of stroke. *Semin Respir Crit Care Med* 23:248-60, 2002.
- RUTTANAUMPAWAN, P.; NOPMANEEJUMRUSLERS, C.; LOGAN, A.G.; LAZARESCU, A.; QIAN, I. & BRADLEY, T.D. Association between refractory hypertension and obstructive sleep apnea. *J Hypertens* 27:1439-45, 2009.

- RYAN, S.; NOLAN, G.M.; HANNIGAN, E.; CUNNINGHAM, S.; TAYLOR, C. & MCNICHOLAS, W.T. Cardiovascular risk markers in obstructive sleep apnoea syndrome and correlation with obesity. *Thorax* 62:509-14, 2007.
- SAHEBJANI, H. Changes in urinary uric acid excretion in obstructive sleep apnea before and after therapy with nasal continuous positive airway pressure. *Chest* 113:1604-8, 1998.
- SCHULZ, R.; SEEGER, W.; FEGBEUTEL, C.; HUSKEN, H.; BODEKER, RH.; TILLMANN, H. & GREBE, M. Changes in extracranial arteries in obstructive sleep apnoea. *Eur Resp J* 25:69-74, 2005.
- SEMENKOVICH, C.F. Insulin resistance and atherosclerosis. *J Clin Invest* 116:1813-1822, 2006.
- SERDAR, Z.; ASLAN, K.; DIRICAN, M.; SARANDÖL, E.; YEŞILBURSA, D. & SERDAR, A. Lipid and protein oxidation and antioxidant status in patients with angiographically proven coronary artery disease. *Clin Biochem* 39:794-803, 2006.
- SHAHAR, E.; WHITNEY, C.W.; REDLINE, S.; LEE, E.T.; NEWMAN, A.B.; JAVIER-NIETO, F.; O'CONNOR, G.T.; BOLAND, L.L.; SCHWARTZ, J.E. & SAMET, J.M. Sleep-disordered breathing and cardiovascular disease: cross-sectional results of the Sleep Heart Health Study. *Am J Respir Crit Care Med* 163:19-25, 2001.
- SHAMSUZZAMAN, A.S.; GERSH, B.J. & SOMERS, V.K. Obstructive sleep apnea: implications for cardiac and vascular disease. *JAMA* 290:1906-14, 2003.
- SHAMSUZZAMAN, A.S.; WINNICKI, M.; LANFRANCHI, P.; WOLK, R.; KARA, T.; ACCURSO, V. & SOMERS, V.K. Elevated C-reactive protein in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation* 105:2462-2464, 2002.
- SHARMA, S.K.; KUMPAWAT, S.; BANGA, A. & GOEL A. Prevalence and risk factors of obstructive sleep apnea syndrome in a population of Delhi, India. *Chest* 130:149-156, 2006.
- SHISHEHBOR, M.H.; ZHANG, R.; MEDINA, H.; BRENNAN, M.L.; BRENNAN, D.M.; ELLIS, S.G.; TOPOL, E.J. & HAZEN, S.L. Systemic elevations of free radical oxidation products of arachidonic acid are associated with angiographic evidence of coronary artery disease. *Free Radic Biol Med* 41:1678-83, 2006.
- SIN, D.D.; FITZGERALD, F.; PARKER, J.D.; NEWTON, G.; FLORAS, J.S. & BRADLEY, T.D. Risk factors for central and obstructive sleep apnea in 450 men and women with congestive heart failure. *Am J Respir Crit Care Med* 160:1101-1106, 1999.
- SOMERS, V. K.; WHITE, D. P.; AMIN, R.; ABRAHAM, W. T.; COSTA, F.; CULEBRAS, A.; DANIELS, S.; FLORAS, J.S.; HUNT, C.E & OLSON, L.J. 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* 118: 1080 – 1111, 2008.
- SOMERS, V.K.; DYKEN, M.E.; CLARY, M.P. & ABOUD, F.M. Sympathetic neural mechanisms in obstructive sleep apnea. *J Clin Invest* 96: 1897-1904, 1995.

- STEIROPOULOS, P.; KOTSIANIDIS, I.; NENA, E.; TSARA, V.; GOUNARI, E.; HATZIZISI, O.; KYRIAZIS, G.; CHRISTAKI, P.; FROUDARAKIS, M. & BOUROS, D. Long-term effect of continuous positive airway pressure therapy on inflammation markers of patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep* 32:537-43, 2009.
- SUZUKI, T.; NAKANO, H.; MAEKAWA, J.; OKAMOTO, Y.; OHNISHI, Y.; YAMAUCHI, M. & KIMURA H. Obstructive sleep apnea and carotid-artery intima-media thickness. *Sleep* 27:129-33, 2004.
- SUZUKI, Y.J.; AH-MEE, P.; JAIN, V. & DAY, R.M. Oxidative stress in obstructive sleep apnea: Need for continuous monitoring. *Free Rad Biol Med* 42: 895, 2007.
- SUZUKI, Y.J.; JAIN, V.; PARK, A. & DAY, R.M. Oxidative stress and oxidant signaling in obstructive sleep apnea and associated cardiovascular diseases. *Free Rad Biol Med* 40: 1683–1692, 2006.
- SVATIKOVA, A.; WOLK, R.; LERMAN, L.O.; JUNCOS, L.A.; GREENE, E.L.; MCCONNELL, J.P. & SOMERS, VK. Oxidative stress in obstructive sleep apnoea. *Eur Heart J* 26: 2435-9, 2005.
- SVATIKOVA, A.; WOLK, R.; SHAMSUZZAMAN, A.S.; KARA, T.; OLSON, E.J & SOMERS, V.K. Serum amyloid a in obstructive sleep apnea. *Circulation* 108:1451-4, 2003.
- TAHERI, S.; AUSTIN, D.; LIN, L.; NIETO, F.J.; YOUNG, T. & MIGNOT, E. Correlates of serum C-reactive protein (CRP)-no association with sleep duration or sleep disordered breathing. *Sleep* 30:991-6, 2007.
- TAN, K.; CHOW, W.S.; LAM, J.C.M.; LAM, B; BUCALA, R.; BETTERIDGE, J. & IP, M.S.M. Advanced Glycation endoproduits in nondiabetic patients with Obstructive sleep apnea. *Sleep* 29: 329-333, 2006.
- TANI, S.; WATANABE, I.; ANAZAWA, T.; KAWAMATA, H.; TACHIBANA, E.; FURUKAWA, K.; SATO, Y.; NAGAO, K.; KANMATSUSE, K.; KUSHIRO, T. Atherosclerosis Regression Investigators. Effect of pravastatin on malondialdehyde-modified low-density lipoprotein levels and coronary plaque regression as determined by three-dimensional intravascular ultrasound. *Am J Cardiol* 96:1089-94, 2005.
- TASALI, E.; VAN CAUTER, E. & EHRMANN, D.A. Relationships between sleep disordered breathing and glucose metabolism in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 91:36-42, 2006.
- THOMAS, R.J.; WEISS, M.D.; MIETUS, J.E.; PENG, C.K.; GOLDBERGER, A.L. & GOTTLIEB, D.J. Prevalent hypertension and stroke in the Sleep Heart Health Study: association with an ECG-derived spectrographic marker of cardiopulmonary coupling. *Sleep* 32:897-904, 2009.
- TÜRKOĞLU, U. M.; AKALIN, Z.; ILHAN, E.; YILMAZ, E.; BILGE, A.; NIŞANCI, Y. & UYSAL, M. Increased plasma malondialdehyde and protein carbonyl levels and lymphocyte DNA damage in patients with angiographically defined coronary artery disease. *Clin Biochem* 38:1059-65, 2005.
- UCHIDA K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med* 28:1685-96, 2000.

- UDWADIA, Z.F.; DOSHI, A.V.; LONKAR, S.G. & SINGH, C.I. Prevalence of sleep-disordered breathing and sleep apnea in middle-aged urban Indian men . *Am J Respir Crit Care Med* 169:168–173, 2004.
- UPSTON, M.; NIU, X.; BROWN, A.J.; MASHIMA, R.; WANG, H. & SENTHILMOHAN, R. Disease stage-dependent accumulation of lipid and protein oxidation products in human atherosclerosis, *Am. J. Pathol* 160:701–710, 2002.
- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M. & TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39:44-8, 2007.
- VICTOR VM, ROCHA M, SOLÁ E, BAÑULS C, GARCIA-MALPARTIDA K, HERNANDEZ-MIJARES A. Oxidative stress, endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Curr Pharm*, 15:2988-3002, 2009.
- VON KANEL, R. & DIMSDALE, J.E. Hemostatic alterations in patients with obstructive sleep apnea and the implications for cardiovascular disease. *Chest* 124:1956-67, 2003.
- VON KÄNEL, R.; LOREDO, J.S.; ANCOLI-ISRAEL, S. & DIMSDALE, J.E. Association between sleep apnea severity and blood coagulability: Treatment effects of nasal continuous positive airway pressure. *Sleep Breath* 10:139-46, 2006.
- WALI, S.O.; BAHAMMAM, A.S.; MASSAELI, H.; PIERCE, G.N.; ILISKOVIC, N.; SINGAL, P.K. & KRYGER, M.H. Susceptibility of LDL to oxidative stress in obstructive sleep apnea. *Sleep* 21:290-6, 1998.
- WARNHOLTZ, A.; WENDT, M. & MÜNZEL, T. When sleeping beauty turns ugly: mitochondria in hypoxia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:525-7, 2002.
- WASSERMAN, E.J & SHIPLEY, N.M. Atherothrombosis in acute coronary syndromes: mechanisms, markers, and mediators of vulnerability. *Mt Sinai J Med* 73:431-9, 2006.
- WEST, S.D.; NICOLL, D.J. & STRADLING, J.R. Prevalence of obstructive sleep apnoea in men with type 2 diabetes . *Thorax* 61:945–950, 2006.
- YAMAUCHI, M. & KIMURA, H. Oxidative stress in obstructive sleep apnea: putative pathways to the cardiovascular complications. *Antioxid Redox Signal* 10:755-68, 2008.
- YAMAUCHI, M.; NAKANO, H.; MAEKAWA, J.; OKAMOTO, Y.; OHNISHI, Y.; SUZUKI, T. & KIMURA, H. Oxidative Stress in Obstructive Sleep Apnea. *Chest* 127: 1674–1679, 2005.
- YILMAZ, MI.; BAYKAL, Y.; KILIC. M.; SONMEZ, A.; BULUCU, F.; AYDIN, A.; SAYAL, A. & KOCAR, I.H. Effects of statins on oxidative stress. *Biol Trace Elem Res* 98:119-27, 2004.
- YOUNG, T.; EVANS, L.; FINN, L. & PALTA, M. Estimation of the clinically diagnosed proportion of sleep apnea syndrome in middle-aged men and women. *Sleep* 20:705–706, 1997.
- 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* 328:1230–1235,1993.
- YOUNG, T.; SHAHAR, E.; NIETO, F.J.; REDLINE, S.; NEWMAN, A.B.; GOTTLIEB, D.J.; WALSLEBEN, J.A.; FINN, L.; ENRIGHT, P.& SAMET, J.M. Sleep Heart Health

Study Research Group. Predictors of sleep-disordered breathing in communitydwelling adults: the Sleep Heart Health Study. *Arch Intern Med* 162:893–900, 2002.

YOUNG, T.; SKATRUD, J. & PEPPARD, P.E. Risk factors for obstructive sleep apnea in adults. *JAMA* 291:2013–2016, 2004.

APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO

Associação entre extensão da doença aterosclerótica coronariana, estresse oxidativo e apnéias do sono

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

INFORMAÇÃO: O estudo “Associação entre extensão da doença aterosclerótica coronariana, estresse oxidativo e apnéias do sono” vai estudar a influência de distúrbios respiratórios do sono na produção de radicais livres e seus efeitos sobre as coronárias. Radicais livres são substâncias formadas a partir do oxigênio que podem fazer mal para o organismo. Os transtornos respiratórios do sono mais comuns são o ronco e as paradas respiratórias - ou apnéias - durante o sono. Eles fazem aumentar a produção de radicais livres, o coração acelerar e a pressão subir. Isso pode causar problemas nas coronárias. Nosso projeto pretende medir a relação das apnéias do sono e da doença coronária com exames de sangue que iremos realizar se o(a) senhor(a) consentir. Serão utilizados os dados obtidos no cateterismo com cineangiocoronariografia que o(a) senhor(a) fará a pedido do seu clínico e da polissonografia portátil que o(a) senhor(a) fará como voluntário(a). Além desses, se acrescentarão os exames de sangue, exames esses que não são realizados rotineiramente na avaliação cardiológica. Os exames de sangue procuram sinais de estresse oxidativo, um problema que surge quando o oxigênio diminui por algum tempo e depois volta, produzindo reações químicas que causariam problemas no coração. Se o(a) senhor(a) for voluntário(a), fará o exame de polissonografia portátil, exame esse que não é realizado rotineiramente na avaliação cardiológica e que consiste em usar durante a noite um pequeno aparelho que registra a respiração durante o sono e que permite verificar se ocorre roncar e paradas respiratórias.

RISCOS E DESCONFORTOS: Os exames de sangue não acarretam riscos adicionais na avaliação e no tratamento habitual dos distúrbios do coração. Não existirá qualquer desconforto para colher o sangue para o exame, pois no cateterismo, já existe uma agulha na artéria e outra na veia, por onde serão retirados 20 ml de sangue (um doador de sangue doa até 500 ml). A qualquer momento o voluntário poderá sair do estudo. A polissonografia portátil não acarreta riscos adicionais na avaliação e no tratamento habitual dos distúrbios do coração. Existirá apenas pequeno desconforto na noite do exame do sono, relacionado ao uso de uma cânula em frente ao nariz e um oxímetro no dedo ambos sem causar dor. Se as sondas saírem do lugar, o aparelho tocará um alarme que irá acordá-lo(a) para que coloque de volta os sensores. A qualquer momento o voluntário poderá encerrar o teste retirando o aparelho e devolvendo-o ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

BENEFÍCIOS: Conhecer melhor as possíveis relações entre geração de radicais livres os transtornos do sono e a doenças do coração resultará em melhores critérios para o diagnóstico médico. A doença das coronárias é comum. Com a sua colaboração, não só os cardíacos a serem examinados no futuro, mas também os voluntários que participarem do estudo e seus familiares poderão ser beneficiados com as descobertas.

CONFIDENCIALIDADE: Os pesquisadores comprometem-se a zelar pelo sigilo e anonimato das informações contidas em prontuários e bancos de dados pesquisados e também a zelar pela fidedignidade dos resultados obtidos das análises.

CONTATO: Quaisquer dúvidas ou descontentamentos com relação à participação no estudo podem ser resolvidos diretamente com a Dr. Denis Martinez pelo telefone nº 8402-7273

VOLUNTARIEDADE E POSSIBILIDADE DE ABANDONO: A participação no estudo ocorre de forma voluntária. Não existe qualquer imposição para que o(a) senhor(a) seja incluído. Mesmo quem não desejar participar do estudo terá assegurado o mesmo atendimento, sem quaisquer restrições. Além disso, todo o participante pode em qualquer fase da pesquisa abandonar o estudo e vetar a utilização de seus dados.

CUSTOS ADICIONAIS: A participação no estudo não acarretará ônus adicionais ao voluntário ou ao seu plano de saúde.

NOVAS INFORMAÇÕES: Fica assegurado aos participantes o fornecimento das novas informações geradas ao longo do estudo.

ACEITACÃO:

() **CONCORDO** em participar do estudo “**Associação entre estresse oxidativo, extensão da doença aterosclerótica coronariana e apnéias do sono**” e declaro que recebi uma via do presente termo.

Nome: _____ Data: / /
Assinatura: _____

Dr Denis Martinez - Pesquisador responsável

APÊNDICE 2 - FICHA DE COLETA DE DADOSNome: _____ **Identificação** _____

Endereço: _____ Cidade _____

Telefone residencial: _____ Celular: _____ Recado: _____

1 Data de nascimento: _____ 2 Pressão arterial: _____

3 Sexo: 1 () masculino 2 () feminino

4 Estado civil: 1 () casado 2 () solteiro 3 () separado 4 () viúvo

5 Cor da pele: 1 () branca 2 () negra 3 () parda 4 () amarela ou indígena

6 Profissão: _____

7 Anos de estudo: _____

8 n° de indivíduos na sua casa: _____

9 Renda familiar bruta: _____

10 Moléstias e Outras doenças graves ou crônicas? 1 () Sim 2 () Não 11 Qual(ais)?

11 Medicações em uso (quais? / frequência?)

12 Peso atual: _____ 13 Altura: _____ 14 IMC: _____ 15 Peso usual: _____

16 Toma bebida alcoólica? 1 () sim 2 () não. 17 Com que frequência? _____

18 Já fumou fumou? 1 () Sim 2 () Não. 19 Parou a quanto tempo(meses)? _____

Atividade Física

20 Pratica algum tipo de atividade física? 1 () 2 () não

21 Qual? _____

22 Frequência? _____ x por semana

**APÊNDICE 3 – FORMULÁRIO PREENCHIDO PELO PACIENTE APÓS
REALIZAÇÃO DA POLISSONOGRRAFIA PORTÁTIL**

Ontem à noite você bebeu álcool antes de dormir? _____
Ontem à noite você tomou remédio calmante antes de dormir? _____
A que horas você deitou? _____
A que horas você apagou a luz e fechou os olhos para dormir? _____
Quanto tempo acha que levou para adormecer? _____
Quantas vezes você acordou esta noite? _____
Como foi esta noite em relação à maioria de suas noites? _____
Igual, melhor ou pior? _____
Quantas horas acha que dormiu esta noite? _____
A que horas você saiu da cama pela manhã? _____
A que horas você acordou e não dormiu mais pela manhã? _____
Quantas vezes você saiu da cama e voltou a dormir esta noite? _____

APÊNDICE 4 - *CURRICULUM VITAE*

Klein, C

1 DADOS PESSOAIS

Nome: Cristini Klein

Nascimento: 24/09/1981, 28 anos

Local: Ivoti/RS/ Brasil

Endereço profissional: Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Centro de Terapia Intensiva - Adulto
Rua Ramiro Barcelos, 2350
Bairro Rio Branco
Porto Alegre, RS - Brasil
Telefone: (51) 3059-8000
E-mail: ckklein@hcpa.ufrgs.br

2 FORMAÇÃO

- 1997-1999 Curso Técnico enfermagem
Escola Santa Catarina, Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul Brasil
- 1999-2004 Graduação em Enfermagem – Ênfase em Terapia Intensiva
Centro Universitário FEEVALE, Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul,
Brasil.
- 2005-2006 Curso de Pós Graduação Lato Sensu Enfermagem em Cardiologia
Instituto de Cardiologia Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.
- 2008 (em curso) Curso de Pós Graduação Stricto Sensu em Biologia Celular e Molecular
UFRGS, Porto Alegre, Brasil.

3 PRÊMIOS E DISTINÇÕES

Klein C, Souza EM, Goldmeier S, Rabelo ER. Congresso Gaúcho de Cardiologia, Junho de 2007. Terceiro lugar categoria pôster. Qualificação da assistência de Enfermagem no Contexto da Insuficiência cardíaca: Validação de um questionário de Conhecimento para enfermeiros.

4 EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Função: Enfermeira Assistencial

Área de Atuação: Centro de Terapia Intensiva Adulto

Admissão: setembro de 2008 até o presente

Hospital Moinhos de Vento

Função: Enfermeira Assistencial

Área de Atuação: Centro de Tratamento Intensiva Adulto.

Admissão: junho de 2006

Saída: setembro de 2008

Escola Sinodal de Educação Profissional

Função: Professora

Área de atuação: Disciplina de Educação para saúde e supervisora de estágio no Hospital Centenário (São Leopoldo)

Admissão: junho 2006

Saída: janeiro de 2007

Hospital Regina

Função: Enfermeira assistencial

Área de atuação: Ambulatório adulto e Prontocárdio (emergências cardiológicas)

Unidade de internação clínica, cirúrgica e transplante de medula óssea, Unidade de Terapia Intensiva adulto.

Admissão: 1 de janeiro de 2005

Saída: julho de 2006

Hospital Regina

Função: Acadêmica de Enfermagem

Área de atuação: Unidade de Terapia Intensiva adulto e neonatal , Unidades Clínicas e cirúrgicas, ambulatório adulto e pediátrico e unidade pediátrica.

Admissão: Novembro de 2004.

Término do estágio e efetivação: 31 de dezembro de 2004.

Centro Universitário FEEVALE

Função: Técnico de Enfermagem

Área de Atuação: Ambulatório

Admissão: Maio de 2003

Saída: dezembro de 2004

Hospital Regina

Função: Técnica em Enfermagem.

Área de atuação: Unidade de Terapia Intensiva adulto

Admissão: março de 2000.

Saída: maio de 2003.

Prefeitura Municipal de Ivoti

FUNÇÃO: Monitora.

Área de atuação: Coordenação de grupo de orientação em saúde para 3ª. Idade.

Admissão: janeiro, 2002.

Saída: janeiro de 2003.

Prefeitura Municipal de Ivoti – Estágio extracurricular

Função: estagiária de enfermagem (graduação).

Área de atuação: Secretaria de Saúde.

Admissão: agosto, 1999.

Saída: Março, 2000.

5 RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

Klein C, Martinez D, Hackenhaar FS, Silveira FS, Medeiros TM, Wainstein M, Gonçalves SC, Benfato MS. Evidence for Carbonylation in Sleep Apnea. *Sleep Medicine* 10: S13, 2009. Apresentação oral

Klein C, Hackenhaar FS, Silveira FS, Medeiros TM, Benfato MS, Massierer D, Wainstein M, Gonçalves SC, Martinez D. The Relationship Between Sleep Apnea and Coronary Artery Disease Risk Factors . *Sleep Medicine* 10: S70, 2009. Apresentação oral

Masierer D, Klein C, Wainstein M, Fucks FD, Fuchs SC, Gonçalves SC, Martinez D, Benfato MS. A Questionnaire to Examine Coronary Artery Disease and High Risk for Sleep Apnea in Berlin. *Sleep Medicine* 10: S72, 2009. pôster

Cassol C, Fiori C, Klein C, Massierer I, Pires GNS, Rahmeier L, Lenz MC, Martinez D. Seasonal Variation of Sleep Disordered-Breathing events: Events from more than ten thousand polysomnographies. *Sleep Medicine* 10: S66, 2009. Pôster

Sabbadini L, Kochenborguer D, Fischer M, Fiori C, Klein C, Cassol C, Massierer I, Barbosa I, Mallmann C, Pacheco R., Rahmeier L, Kaminski R, Martinez D. Locus of Control and Knowledge About Sleep Disordered Breathing by Dental surgeons in Brazil. *Sleep Medicine* 10: S77, 2009. Pôster

Klein C, Hackenhaar FS, Suris FM, Medeiros TM, Martinez D, Benfato MS. Carbonyl Level in Patients with Coronary Artery Disease. VI Meeting Of SFRBM South American Group. Congress Book, pag 138 setembro, 2009.

Hackenhaar FS, Klein C, Suris FM, Medeiros TM, Martinez D, Benfato MS. Enzymatic Antioxidant Defences in the Association of Coronary Artery Disease and Obstructive Sleep Apnea Syndrome. VI Meeting Of SFRBM South American Group. Congress Book, pag 136 setembro, 2009.

Medeiros TM, Klein C, Hackenhaar FS, Suris FM, Alabarse PVG, Salomon TB, Martinez D, Benfato MS. Prohepcidin in Obstructive Sleep Apnea Syndrome. VI Meeting Of SFRBM South American Group. Congress Book, pag 137 setembro, 2009.

Schuller AK, Klein C, Hackenhaar FS, PVG Alabarse, Suris FM, Medeiros TM, Martinez D, Benfato MS. Malondialdehyde and Vitamin C Levels in Non-Smokers With Coronary Artery Disease . VI Meeting Of SFRBM South American Group. Congress Book, pag 161 setembro, 2009.

Araujo GN, Klein C, Fischer MK, Kaminski RS, Fiori CZ, Cassol C, Massierer D, Rahmeier L, Medeiros TM, Hackenhaar F, Benfato MS, Martinez D. 29^a. Semana Científica – HCPA, outubro 2009. Pôster

Medeiros TM, Klein C, Martinez D, Suris F, Hackenhaar FS, Alabarse PVG, Salomon TB, Benfato MS. Pró-Hepcidina na Síndrome da apnéia obstrutiva do sono. XXI Salão de Iniciação Científica – UFRGS. Outubro 2009. Apresentação oral

Klein C. Participação como palestrante da Atividade Monitorização neurointensivismo com o tema: Monitorização Hídrica eletrolítica. Congresso Sulbrasileiro de Medicina Intensiva. Porto Alegre, maio 2009.

Marcolin ML, Klein C, Wainstein M, Wainstein R, Ribeiro JP, Fucks FD, Martinez D, Benfato MS. Relação dos níveis de MDA e vitamina C na doença arterial Coronariana. XX Salão de Iniciação Científica – UFRGS. Outubro 2008. Apresentação oral

Hackenhaar FS, Klein C, Wainstein M, Wainstein R, Ribeiro JP, Fucks FD, Martinez D, Benfato MS. Atividade das enzimas antioxidantes glutathione Peroxidase-1 e Catalase em pacientes com Doença aterosclerótica Coronariana. XX Salão de Iniciação Científica – UFRGS. Outubro 2008. Apresentação oral

Medeiros TM, Klein C, Wainstein M, Wainstein R, Ribeiro JP, Fucks FD, Martinez D, Benfato MS. Associação entre Doença arterial Coronariana e Pró-Hepcidina. XX Salão de Iniciação Científica – UFRGS. Outubro 2008. Apresentação oral

Viscainchipy C, Klein C. Prevalência de ventriculites associadas ao uso de derivação ventricular externa: Proposta de um protocolo de cuidados. Congresso Americano de Terapia Intensiva, Uruguai, novembro 2007. Pôster

Klein C, Raup H, Martins M I M. Mães Fumantes versus RN de Baixo Peso. Anais II Semana de Enfermagem Centro Universitário FEEVALE, 2001. Pôster

Klein, C Maestri R. Estratificação de Risco para Doença arterial Coronariana nos Colaboradores de uma Instituição de Ensino. XVII Congresso de Cardiologia do Rio Grande do Sul, junho 2007. Pôster

Klein C, Souza EM, Goldmeier S, Rabelo ER. Conhecimento dos enfermeiros referentes aos cuidados e manejo da Insuficiência Cardíaca. Congresso de Cardiologia do Rio Grande do Sul, junho 2007. Pôster

Klein C. Assistência de Enfermagem ao paciente tetraplégico. Simpósio de Nutrição, Hospital Moinhos de Vento, agosto 2007. Participação mesa redonda.

Cristini K, Viscainchipy C. Salinização de cateter venoso periférico. Semana de Enfermagem do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, maio 2007. Pôster

Gobeti, M K, Vargas M A O, Klein C. Quando a morte torna-se um presente para vida: Um estudo de Caso. 27 Semana científica do Hospital de Clínicas Porto Alegre. Pôster

Klein C, Souza EM, Goldmeier S, Rabelo ER. Qualificação da assistência de Enfermagem

no Contexto da Insuficiência cardíaca: Validação de um questionário de Conhecimento para enfermeiros. Congresso Brasileiro de Cardiologia, setembro 2007. Apresentação Oral

ORIENTAÇÕES CONCLUÍDAS

Franciele Aparecida Gutierrez. Título: Aplicabilidade de um Protocolo de Enfermagem para Tratamento da Síndrome de Lyell. Novembro, 2009. Curso de Pós Graduação Lato Sensu em Enfermagem em Terapia Intensiva – Instituto de Educação e Pesquisa da Associação Hospitalar Moinhos de Vento.

Régis Chiarelli da Silva. Título: Nível de Ruído no Centro de Terapia Intensiva. Novembro, 2009. Curso de Pós Graduação Lato Sensu em Enfermagem em Terapia Intensiva – Instituto de Educação e Pesquisa da Associação Hospitalar Moinhos de Vento.

PRODUÇÃO ARTÍSTICA/ CULTURAL

Entrevista TV UFRGS – Relação entre Estresse Oxidativo, apnéia do Sono e Doença arterial Coronariana, agosto 2007

ANEXO 5 - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

ScholarOne Manuscripts

Page 1 of 1

**Antioxidants
& Redox Signaling**[Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log Out](#) | [Get Help Now](#)[Main Menu](#) → [Author Dashboard](#) → Submission ConfirmationSCHOLARONE™
ManuscriptsSubmission
Confirmation

You are logged in as Mara Benfato

Thank you for submitting your manuscript to *Antioxidants & Redox Signaling*.

Manuscript ID: ARS-2009-3062

Title: CARBONYL GROUPS: BRIDGING THE GAP BETWEEN SLEEP DISORDERED
BREATHING AND CORONARY ARTERY DISEASEAuthors: Klein, Cristini
Martinez, Denis
Hackenhaar, Fernanda
Medeiros, Tassia
Marcolin, Marina
Silveira, Fabíola
Wainstein, Marco
Gonçalves, Sandro
Benfato, Mara

Date Submitted: 17-Dec-2009

 Print  Return to Dashboard

ScholarOne Manuscripts™ v4.2.1 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2009. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.
[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)