

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS PUCRS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

MARCADORES DE LESÃO CEREBRAL E
SÍNDROME DAS APNÉIAS-HIPOPNEÍAS OBSTRUTIVAS DO SONO EM
INDIVÍDUOS OBESOS MÓRBIDOS

Leandro Giacometti da Silva

Orientador
Renato Dutra Dias

Porto Alegre, Julho de 2006

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCIÊNCIAS PUCRS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

MARCADORES DE LESÃO CEREBRAL E
SÍNDROME DAS APNÉIAS-HIPOPNÉIAS OBSTRUTIVAS DO SONO EM
INDIVÍDUOS OBESOS MÓRBIDOS

Leandro Giacometti da Silva

Orientador
Renato Dutra Dias

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da PUCRS como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre

Porto Alegre, Julho de 2006

Existe somente uma verdade
inquestionável:
a de que não existem verdades
inquestionáveis.

(Millor Fernandes)

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus familiares pelo apoio;

Agradeço à minha companheira pela paciência;

Agradeço ao meu amigo Orientador e Norte Científico por toda a sua disposição em ensinar;

Agradeço a Deus por poder estar agradecendo a tudo isso.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Laboratório 26 do Departamento de Bioquímica da UFRGS, especialmente aos Professores Doutores Diogo Onofre Souza e Luiz Valmor Portela.

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
1. APRESENTAÇÃO DO TEMA	8
1.1. OBESIDADE MÓRBIDA.....	8
1.1.1 <i>Histórico</i>	8
1.1.2 <i>Índice de Massa Corporal</i>	8
1.1.3 <i>Síndrome plurimetabólica</i>	9
1.1.4 <i>Impacto da doença</i>	10
1.2. SÍNDROME DAS APNÉIAS-HIPOPNEÍAS OBSTRUTIVAS DO SONO (SAHOS)	11
1.3. MARCADORES BIOQUÍMICOS.....	13
1.3.1 <i>S100B</i>	14
1.3.2 <i>Enolase Neurônio-específica (NSE)</i>	15
2. REFERENCIAS	17
3. OBJETIVOS	21
3.1. <i>Objetivo Geral</i>	21
3.2. <i>Objetivos Específicos</i>	21
ARTIGO CIENTÍFICO	22

RESUMO

Embasamento teórico e objetivos: a síndrome das apnéias-hiponéias obstrutivas do sono (SAHOS) é uma comorbidade associada à obesidade mórbida principalmente em função da grande circunferência do pescoço. Dependendo da sua gravidade, a SAHOS pode interferir na homeostasia de inúmeros sistemas, como por exemplo o sistema nervoso central (SNC). A enolase neurônio-específica (NSE) e a proteína S100B, proveniente do astrócito, são considerados marcadores sensíveis para lesão cerebral. Nesse estudo avaliamos os níveis séricos de S100B e NSE com o intuito de marcar possíveis injúrias causadas pela SAHOS ao SNC.

Pacientes e métodos: nós estudamos dados provenientes de 25 pacientes obesos mórbidos portadores de SAHOS e realizamos a coleta de sangue antes e após o exame polissonográfico (PSG) para a dosagem das proteínas S100B e NSE. Também foram analisados dados relativos a depressão e sonolência diurna excessiva.

Resultados: Os valores de S100B foram maiores após [0,029 (0,010-0,199)] em comparação com antes [0,010 (0,010-0,025)] µg/l da PSG (P=0,002). Os valores são expressos em mediana e IQ25-IQ75. Os valores de NSE não mostraram diferenças significativas entre antes e depois do sono.

Conclusões: o estudo mostra variações significativas em níveis de S100B quando comparados antes e depois exame polissonográfico.

Unitermos: síndrome das apnéias-hiponéias obstrutivas do sono; S100B; NSE; lesão cerebral; polissonografia; índice de apnéia-hipopnéia.

ABSTRACT

Background: obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome (OSAHS) is considered a comorbidity associated to morbid obesity mainly due to the large neck circumference. Depending on its severity, OSAHS can interfere in many systems homeostasis as, for example, central nervous system (CNS). Neuron Specific enolase (NSE) and S100B protein provenient from astrocytes, are considered sensible cerebral injury biochemical markers. We evaluated in this study, serum S100B and NSE levels, with the objective to mark possible cerebral injuries of OSAHS over CNS.

Methods: this is a transversal study with data provenient from 25 OSAHS morbid obese patients. Blood samples were collected before and after polisomnographic exam for S100B and NSE protein dosage. We also analyzed data provenient from depression and excessive daytime sleepiness.

Results: S100B levels were higher after [0,029 (0,010-0,199) than before [0,010 (0,010-0,025)] PSG (P=0,002). S100B levels are expressed in median and IQ25-IQ75. NSE levels did not show significative diferences between after and before PSG.

Conclusions: Study shows significative S100B level variations when compared after and before PSG. This suggests that there is a CNS astrocyte reaction because of possible cerebral hypoxemy in OSAHS morbidly obese patients.

Uniterms: Obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome; S100B; NSE; cerebral injury; polisomnography; apnea-hypopnea index.

1. APRESENTAÇÃO DO TEMA

1.1.OBESIDADE MÓRBIDA

1.1.1 Histórico

A obesidade é uma das mais antigas enfermidades metabólicas que se tem notícia. Imagens e esculturas com mais de 20 mil anos já representavam pessoas obesas. Obesidade glútea e abdominal está presente em pinturas e esculturas da Idade da Pedra. A abordagem científica da obesidade foi instituída pelo filósofo e médico italiano Santório em 1568. Ele introduziu o método quantitativo para avaliar o peso corporal. Inventou inúmeros tipos de balanças e realizou os primeiros experimentos metabólicos no estudo do peso corporal. No século XVII, Sydenham, também chamado de “Hipócrates moderno”, catalogou a obesidade propriamente como doença (1).

Em 1926 foi publicado no *The Lancet* um artigo relatando a experiência de companhias de seguro com pessoas obesas. Nesta publicação foi mostrada uma sobrevida menor em indivíduos que apresentavam circunferência abdominal maior que a torácica. Também foi determinado um cálculo de peso ideal, cujo exemplo era um homem de 45 anos, com 1,80 metros de altura que deveria ter 70 kg de peso (10kg menos que os centímetros que excedessem a 1 metro de altura). Esta idéia persiste até os dias de hoje na população em geral (2).

1.1.2 Índice de Massa Corporal

Atualmente, utiliza-se o índice de massa corporal (IMC) para determinar a relação do peso com a estrutura corporal do indivíduo. Este índice foi definido pelo astrônomo belga Quetelet, razão pela qual também pode ser chamado de “Índice de Quetelet”. O IMC é calculado pelo peso do indivíduo dividido pelo quadrado da sua altura (peso/altura²). Ele reflete a carga corporal, ou seja, quantos quilos o indivíduo

carrega por cada m² de corpo. Este índice não discrimina a massa magra da massa gorda e nem o peso ósseo. Apesar dessas falhas, é aceito pela maioria das instituições do mundo para avaliar o excesso de peso e a obesidade, provavelmente por sua simplicidade e praticidade. As demais medidas de peso corporal utilizadas não refletem exatamente o aumento ou diminuição de gordura e são, na maioria das vezes, um reflexo muito aproximado da variação do IMC (3).

Baseada no IMC, a Organização Mundial da Saúde (OMS) definiu uma tabela relacionando níveis de IMC, classificação da obesidade e risco de doenças relacionadas como mostra a tabela.

IMC (kg/m ²)	Classificação de Obesidade	Risco de Doenças
<= 18,5	Baixo Peso	Aumentado
18,5 – 24,9	Normal	Médio
25 – 29,9	Sobrepeso	Aumentado
30 – 34,9	Obesidade Classe I	Moderado
35 – 39,9	Obesidade Classe II	Severo
>= 40	Obesidade Classe III (mórbida)	Muitíssimo elevado

Fonte: Adaptada de Monteiro JC.(3)

A partir de então, se estudou cada vez mais a relação de peso corporal com a prevalência e incidência de doenças. Foi observado que, no nível de peso considerado como normal, há menor incidência de doenças (3).

1.1.3 Síndrome plurimetabólica

Atualmente, sabe-se que a obesidade é fator de risco independente para várias doenças, entre elas a esteatose hepática, que já está sendo reconhecida como sendo a manifestação hepática da síndrome metabólica. A síndrome metabólica é caracterizada por um grupo de fatores de riscos metabólicos que ocorrem numa pessoa. Tais fatores

são: obesidade central, dislipidemia (triglicérides elevados e/ou colesterol HDL baixo), resistência à insulina ou intolerância à glicose, síndrome das apnéias-hipopnéias obstrutivas do sono (SAHOS), estado pró-trombótico (fibrinogênio elevado), hipertensão arterial sistêmica (HAS) e estado pró-inflamatório (proteína C reativa sérica elevada) (3).

As causas predisponentes conhecidas para esta síndrome são o excesso de peso, a obesidade, a inatividade física e os fatores genéticos. Pessoas com síndrome metabólica têm riscos maiores para doença coronariana, outras doenças obstrutivas arteriais (acidente vascular cerebral e doença vascular periférica) e diabetes melito tipo 2 (DM). Os fatores biológicos que determinam esta situação não são completamente esclarecidos e parecem ser complexos (3).

1.1.4 Impacto da doença

Nos EUA, 60% da população apresenta excesso de peso e 30% é classificada como obesa. Estima-se a ocorrência de 400 mil óbitos por ano relacionados à obesidade neste país. O custo anual da doença é de aproximadamente 92,6 bilhões de dólares, correspondendo a 9,1% dos gastos com a saúde. Indivíduos obesos tem 11% mais gastos com a saúde quando comparados a pessoas de peso normal (4). Um estudo norte americano mostra que a expectativa de vida entre obesos diminui 22%, o que implica, em média, menos 12 anos de vida (5).

A Organização Mundial da Saúde em colaboração com a *International Obesity Task Force* e a *International Association for Study of Obesity*, estimam que haja no mundo em torno de 1,7 bilhões de pessoas com excesso de peso ou obesas, e que as formas mais graves de obesidade estejam crescendo mais rápido do que o restante da epidemia (6). Há estimativas de que, entre os obesos mórbidos (IMC ≥ 35 kg/m² com comorbidades ou IMC ≥ 40 kg/m²), a mortalidade seja de 4,5% ao ano (7).

Um dos mais respeitados estudos nesta área, o Swedish Obese Subjects (SOS), definiu o aumento dramático da obesidade no mundo, impondo sofrimento aos pacientes e altos custos ao sistema de saúde pelas comorbidades que a acompanham. A cirurgia gástrica foi apontada como a terapêutica mais indicada para a redução do peso, com melhores resultados na manutenção desta redução ao longo do tempo, em comparação a outras formas de tratamento. O tratamento cirúrgico é a alternativa terapêutica para obesos mórbidos, a qual apresenta uma relação risco-benefício superior aos tratamentos convencionais para a resolução das patologias associadas (7).

1.2. SÍNDROME DAS APNÉIAS-HIPOPNÉIAS OBSTRUTIVAS DO SONO (SAHOS)

O fator de risco mais significativo para a Síndrome das Apnéias-Hipopnéias Obstrutivas do Sono (SAHOS) é a obesidade. A incidência da SAHOS entre pacientes obesos mórbidos é de 70% a 75%, 12 a 30 vezes maior em comparação a população em geral. Estudos clínicos e laboratoriais em indivíduos obesos mostram uma incidência de SAHOS entre 42% e 48 % em homens e 8% a 38% entre mulheres. Pelo menos 60% a 70% dos pacientes com SAHOS são obesos (8).

Em indivíduos obesos mórbidos, uma característica comum é a circunferência do pescoço aumentada em comparação a não obesos, sendo este um sinal indicativo de obesidade central, fator intimamente associado à Síndrome das Apnéias-Hipopnéias Obstrutivas do Sono (SAHOS). Assim, um elevado índice de massa corporal e a presença de características clínico/físicas específicas podem aumentar a probabilidade de SAHOS, porém geralmente não são suficientes, por si somente, para o diagnóstico correto da síndrome (9). Achados subjetivos baseados no exame clínico apresentam uma sensibilidade de 60% e uma especificidade de 63%. Dessa forma, diagnóstico específico

da SAHOS geralmente requer um estudo da arquitetura do sono (polissonografia), padrão ouro para o diagnóstico (10,11).

A SAHOS é caracterizada por obstruções periódicas incompletas ou totais da via aérea superior durante o sono, causando cessações intermitentes da respiração (apnéias), ou reduções no fluxo de ar que percorre a via aérea (hipopnéias). Quanto a sua prevalência, estudos da SAHOS abordando sonolência diurna mostram uma incidência de 2% em mulheres de meia idade e 4 % em homens de meia idade. A prevalência é ainda maior (9% para mulheres e 24% para homens) quando considerado somente o índice de apnéia/hipopnéia (IAH) de 5 ou acima como um indicativo de doença respiratória relacionada ao sono (12).

A SAHOS é identificada pela presença de, pelo menos, 5 apnéias obstrutivas, hipopnéias ou ambas, por pelo menos uma hora enquanto o paciente está dormindo (18). A SAHOS é comumente dividida em três categorias de acordo com sua severidade: leve (IHA >5, mas < 15 eventos por hora); moderada (IHA = 15 – 30 eventos por hora) e severa (= > 30 eventos por hora) (13).

Um evento de apnéia é definido, em adultos, como a cessação do fluxo de ar por 10 ou mais segundos, geralmente caracterizando completa obstrução da via aérea superior. Uma hipopnéia é comumente definida como, pelo menos, uma redução de 30% do fluxo de ar por pelo menos 10 segundos, associada a uma redução em 4 % da saturação sanguínea de oxigênio. Esses quadros refletem uma redução transitória do fluxo aéreo, causada por um aumento na restrição das vias aéreas (13).

O custo econômico da SAHOS não tratada é estimado em bilhões de dólares nos países desenvolvidos como os Estados Unidos (14). Em média, pacientes com SAHOS utilizam com mais frequência os serviços de saúde antes do diagnóstico da síndrome, quando comparados com sujeitos controle sem SAHOS (15). Os efeitos a longo prazo

da SAHOS incluem hipertensão(16), doença cardiovascular (17), acidente vascular cerebral (18) e alta taxa de mortalidade (19), além da sensação de sono não-restaurador, sonolência diurna excessiva, fadiga, diminuição da libido, cefaléia e alterações de humor como ansiedade, dificuldade de concentração, irritabilidade, apatia e depressão (13).

1.3. MARCADORES BIOQUÍMICOS

Outra maneira para analisarmos as conseqüências dos distúrbios causados pela SAHOS sobre o sistema nervoso central(SNC), é o estudo de marcadores neuroquímicos provenientes do metabolismo das células da glia, mais precisamente dos astrócitos, o que pode revelar lesões e danos ao tecido nervoso.

As células da glia não são meramente estruturas da arquitetura neuronal sem função na integração do sinal, mas sim elementos participativos com os neurônios em todas as funções essenciais do cérebro. Por exemplo, durante o desenvolvimento humano, a glia direciona a migração dos neurônios e projeções neuríticas através da produção de fatores tróficos, matriz extracelular e moléculas de adesão. Ela modula o microambiente intercelular através da obtenção e transporte de efetores químicos, substratos metabólicos, hormônios e íons. Também pode influenciar na diferenciação e na morfologia dos neurônios e modula a atividade neuronal e número e eficiência das sinapses. A glia ainda é responsável pela manutenção/indução das características da barreira hemato-encefálica e mielinização, pela regulação da amplitude e duração dos sinais neurotransmissores através da presença de canais iônicos, receptores de neurotransmissão, neuropeptídeos e transportadores. Finalmente, a glia serve como um suporte imunológico para o cérebro, respondendo a lesões, patógenos ou corpos estranhos a partir de respostas inflamatórias, críticas para a defesa (21).

Existem três tipos de células da glia: células de Schwann e oligodendrócitos, responsáveis pela mielinização dos axônios neuronais dos sistemas nervoso periférico e central, respectivamente; e os astrócitos, os quais estão associados com neurônios, porém não produzem mielina. Dentre outras funções, os astrócitos são os responsáveis por responder a doenças e lesões através da limpeza de metabólitos celulares, secreção de fatores tróficos e formação de cicatrizes celulares nos neurônios. O nome astrócito refere-se à sua forma estrelada, encontrada em cortes histológicos(22, 23).

1.3.1 S100B

Uma das respostas astrocitária a injúrias cerebrais agudas e crônicas é um nível aumentado da proteína S100B sérica e no fluido cerebrospinal. A S100B foi primariamente isolada em cérebro bovino há quase 40 anos atrás e definida “S100” por sua solubilidade parcial em uma solução saturada 100% de sulfato de amônio. As proteínas S100 são caracterizadas pela presença de dois sítios ligantes Ca^{2+} . A S100B é um membro da grande família de mais de 20 diferentes proteínas que mostram seqüências de aminoácidos e estruturas semelhantes(24, 25).

As proteínas S100B exibem distintas expressões teciduais e celulares específicas, localizações subcelulares, modificações pós-translacionais e afinidades a ligações metálicas. Uma variedade de atividades bioquímicas *in vitro* relacionadas a funções potenciais intracelulares, tem sido descritas para as proteínas S100B, incluindo modulação das atividades enzimáticas, fosforilação protéica, integridade e dinâmica citoesquelética, e homeostasia do cálcio; interação com fatores de transcrição, e papel na excitotoxicidade, ciclo de regulação celular e metástases. No entanto, são nas funções extracelulares da proteína S100B onde encontramos as relevantes particularidades para a compreensão do papel dessa proteína na regulação e modulação de achados neuropatológicos após insultos ao sistema nervoso central. A produção elevada de

S100B pela ativação da glia (gliose reativa), o potencial para a geração de respostas neuro-inflamatórias e a disfunção ou morte de neurônios em respostas à S100B, justificam uma possível explicação molecular para o número de pesquisas sugerindo que S100B poderia ser um marcador diagnóstico ou prognóstico para a avaliação de lesão cerebral (26, 27). Dessa forma, independente da sua função, os níveis periféricos de S100B tem sido utilizados como marcadores de lesão cerebral ou de respostas astrocitárias à lesão neuronal (28, 29) e como marcadores da eficácia de estratégias de neuroproteção.

1.3.2. Enolase Neurônio-específica (NSE)

Outro marcador bioquímico estudado desde o início da década de 1980 e que, em pesquisas, tem se mostrado uma ferramenta útil para marcar muitos tipos de lesões do sistema nervoso central, é a enolase neurônio-específica ou “*neuron-specific enolase*” (NSE). Os níveis de NSE nos fluidos biológicos devem ser definidos por um parâmetro de grande utilidade para a avaliação de lesão em tecido nervoso no cérebro.

NSE é uma enzima da cadeia glicolítica, sendo a isoforma $\gamma\gamma$ predominantemente neuronal. Como a proteína NSE não é secretada fisiologicamente, os aumentos em seus níveis periféricos estão especificamente relacionados com a lesão neuronal (30)

Níveis elevados de NSE no fluido espinal são observados no trauma craniano, após acidentes vasculares cerebrais, estágios precoces da doença de Creutzfeldt-Jacob e no Mal de Alzheimer. Em pacientes com acidente vascular cerebral, as concentrações de NSE podem refletir a extensão das lesões. Medidas sucessivas dos níveis de NSE no plasma e/ou fluido cerebrospinal devem auxiliar no julgamento sobre o prognóstico como, por exemplo, de pacientes com tumores intracranianos (31, 32).

Dessa forma, S100B e NSE podem ser considerados marcadores sensíveis de lesão cerebral a partir do momento em que seus níveis estejam aumentados no fluido cerebrospinal e/ou no sangue em lesões crônicas e agudas ao sistema nervoso central. S100B é uma proteína ligante de cálcio fisiologicamente produzida e liberada por astrócitos, enquanto NSE é uma enzima da cadeia glicolítica, sendo a isoforma $\gamma\gamma$ predominantemente neuronal. A especificidade dessas proteínas podem ser utilizadas para entender o envolvimento de diferentes tipos de células cerebrais em condições patológicas. Um aumento nos níveis de NSE indica dano neuronal, enquanto um aumento em S100B pode refletir ambos, danos na glia ou reações astrocíticas à lesão nervosa (astrogliose reativa), a qual pode apresentar propriedades neuroprotetoras (37,38,39).

Em um estudo anterior, Jordan et al mostra, em uma comparação pré-pós sono com pacientes portadores de SAHOS, a existência de variações não detectáveis de marcadores de lesão cerebral, enquanto em uma recente pesquisa, Carla WB et al mostra níveis aumentados dos marcadores após o sono(40, 41). Dessa forma, a presente pesquisa tem por objetivo estudar a relação entre os marcadores bioquímicos de lesão nervosa e a SAHOS, uma vez que apenas duas pesquisas realizaram tais relações, especialmente em indivíduos em indivíduos obesos mórbidos.

2. REFERENCIAS

01. Repetto G. Histórico da Obesidade. In: Halpern A, Matos AFG, Suplicy HL, Editores. Obesidade. São Paulo: Lemos; 1998. p.3-13.
02. Monteiro JC. Obesidade: diagnóstico, métodos e fundamentos. In: Halpern A, Matos AFG, Suplicy HL, Editores. Obesidade. São Paulo: Lemos; 1998. p.31-54
03. National Business Group on Health. Obesity in adults. [capturado 2005 Nov 7]:[2p.] Disponível em: <http://www.businessgrouphealth.org/services/obesity.cfm>
04. Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E et al (2004). Bariatric Surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA.*;292:1724-37
05. IAOS/International Association for the Study of Obesity. Call for obesity review as overweight numbers reach 1.7 billion. [capturado 2005 Nov 7]:[5p] Disponível em <http://www.iotf.org/media/iotfmar17.htm>
06. Mac Donald KG, Jr., Long SD, Swanson MS, et al. The gastric bypass operation reduces the progression and mortality of non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Gastrointest Surg.* 1997;1:213-20.
07. Sjostrom CD. Surgery as an intervention for obesity. Results from the Swedish obese subjects study. *Growth Horm IGF Res.* 2003;13 Suppl A:S22-6
08. Kyzer S, Charuzi I (1998). Obstructive Sleep Apnea in the Obese. *World J. Surg.*, 22, 998-1001
09. American Academy of Sleep Medicine (2001). Sleep related breathing disorders in adults: recommendations for syndrome definition and measurement techniques in clinical research. *Sleep* ;22:667-89.
10. Hoffstein V, Szali JP.(1993). Predictive value of clinical features in diagnosing obstructive sleep apnea. *Sleep*;16:118-22.
11. Asher Qureshi, Robert D. Ballard.(2003). Obstructive sleep apnea. *Journal Allergy Clinical Immunology* ; 112: 643 – 51
12. Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Weber S, Badr S. (1993): The occurrence of sleep disordered breathing among middle aged adults. *New England Journal Medicine* ;328:1230-5.
13. Caples SM, Gami AS, Somers VK (2005): Obstructive sleep apnea. *Ann Intern Med*;142:187-97.
14. Wake up America: a national sleep alert. Vol 2. Bethesda, Md: National Commission on Sleep Disorders Research; 1995.

15. Smith R, Ronald J, Delaive K, Walld R, Manfreda J, Kryger MH. (2002). What are obstructive sleep apnea patients being treated for prior to this diagnosis? *Chest* ;121:164-72.
16. Peppard PE, Young T, Palta M, Skatrud J. (2000). Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *New England Journal Medicine*;342:1378-84.
17. Schafer H, Kochler U, Ewig S, Hasper E, Tasci S, Luderitz B.(1999). Obstructive sleep apnea as a marker of coronary artery disease. *Cardiology*;92:79-84.
18. Hermann DM, Bassetti CL.(2003). Sleep-disordered breathing and stroke. *Current Opinative Neurology*;16:87-90.
19. Lavie P, Herer P, Peled R, Berger I, Yoffe N, Zomer J, et al.(1995). Mortality in sleep apnea patients: a multivariate analysis of risk factors. *Sleep*;18:149-57.
20. Martinez D. In: PALOMBINI, Bruno C. et al. Doenças das vias aéreas: Uma Visão Clínica Integradora
21. P. Bezzi and A. Volterra (2001). A neuron-glia signalling network in the active brain, *Current Opinative Neurobiology*; 11 , 387–394.
22. Fields RD, Graham BS(2002). New Insights into Neuron-Glia Communication. *Science*, 18, October vol 298, 556-562.
23. Haydon PG. (2001)Glia: Listening and Talking to the Synapse. *Nature Reviews* March vol 2, 185-195.
24. C.W. Heizmann, G. Fritz and B.W. Schäfer (2002). S100 Proteins: Structure, Functions and Pathology, *Frontiers in Bioscience*. 7 , 1356–1368.
25. B.W. Moore (1965). A soluble protein characteristic of the nervous system, *Biochemical Biophysical Research* 19 , 739– 744.
26. R. Donato (2001). S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Internal Journal Biochemical Celular Biology*; 33 , 637–668.
27. Donato, R., (2003). Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microscopy Research and Technique* 60 (6), 540–551
28. Linda J. Van Eldika and Mark S. Wainwright (2003). The Janus face of glial-derived S100B:Beneficial and detrimental functions in the brain. *Restorative Neurology and Neuroscience* 21, 97–108

29. Royds JA, Timperley WR, Taylor CB.(1981). Levels of enolase and other enzymes in the cerebrospinal fluid as indices of pathological changes. *Journal Neurology Neurosurgery Psychiatry*;44:1129-1135.
30. Scama H, Delafosse B, Steinberg R, et al.(1982). Neuron specific enolase as a marker of neuronal lesions during various comas in man. *Neurochemics Int* ;4:405-411.
31. Persson L, Hardemark HG, Gustafsson J, et al.(1987). S-100 protein and neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid and serum: markers of cell damage in human central nervous system. *Stroke* ;18:911-918.
32. E. Kaiser, R. Kuzmits, P. Pregant, O.(1989). Burghuber and W. Worofka. Clinical biochemistry of neuron specific enolase. *Clinica Chimica Acta*, 183, 13-32
33. Deitmer, J.W., (2001). Strategies for metabolic exchange between glial cells and neurons. *Respiration Physiology* 129 (1–2), 71–81.
34. Busnello J.V. (2006) Acute and chronic electroconvulsive shock in rats: Effects on peripheral markers of neuronal injury and glial activity, *Life Sciences* 78, 3013–3017
35. Bouzier-Sore, A.K., Serres, S., Canioni, P., Merle, M., (2003). Lactate involvement in neuron-glia metabolic interaction: (13) C-NMR spectroscopy contribution. *Biochimie* 85 (9), 841–848.
36. Pellerin, L., (2005). How astrocytes feed hungry neurons. *Molecular Neurobiology* 32 (1), 59–72.
37. L.V. Portela, J.C. Brenol, R. Walz, M. Bianchin, A.B. Tort, U.P. Canabarro, S. Beheregaray, J.A. Marasca, R.M. Xavier, E.C. Neto, C.A. Gonçalves, D.O. Souza (2002) Serum S100B levels in patients with lupus erythematosus: preliminary observation. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*. 9, 164–166.
38. A.P. Schmidt, A.B. Tort, O.B. Amaral, A.P. Schmidt, R. Walz, J. Vettorazzi-Stuckzynski, S.H. Martins-Costa, J.G. Ramos, D.O. Souza, L.V. Portela, L.V. (2004). Serum S100B protein in pregnancy-related hypertensive disorders: a case-control study. *Clinical Chemistry* 50, 435–438.
39. U.E. Pleines, M.C. Morganti-Kossmann, M. Rancan, H. Joller, O. Trentz, T. Kossmann (2001). S-100 beta reflects the extent of injury and outcome, whereas neuronal specific enolase is a better indicator of neuroinflammation in patients with severe traumatic brain injury. *Journal Neurotrauma* 18, 491–498.
40. W. Jordan, J. Hagedohm, J. Wiltfang, G. Laier-Groeneveld, H. Tumani, A.Rodenbeck, E. Ruther, G. Hajak (2002). Biochemical markers of cerebrovascular injury in sleep apnoea syndrome. *Eur Respir J*; 20: 158–164

41. Braga CW, Martinez D, Portella LV, Wofchuck S, Souza DO (2006). S100B and NSE serum levels in obstructive sleep apnea syndrome.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Determinar a existência de associação entre a concentração plasmática dos marcadores neuroquímicos S100B, NSE e distúrbio clínicos em pacientes obesos mórbidos portadores da síndrome das apnéias-hipopnéias obstrutivas do sono.

3.2. Objetivos Específicos

- Verificar a presença de distúrbio depressivo e de sonolência excessiva em pacientes obesos mórbidos portadores de apnéia do sono na fase pré-operatória da cirurgia da obesidade;
- Avaliar os níveis das proteínas S100B e NSE em pacientes obesos mórbidos portadores da síndrome das apnéias-hipopnéias obstrutivas do sono;
- Verificar a validade diagnóstica para SAHOS da relação entre marcadores bioquímicos de lesão cerebral e distúrbios depressivos e de sonolência diurna excessiva.

ARTIGO CIENTÍFICO

Serum S100B but not NSE levels are increased in Morbidly Obese Individuals affected by Obstructive Sleep Apnea-Hypopnea Syndrome

Leandro Giacometti da Silva, M.s., P.T.^{1,4}

Cláudio Corá Mottin, MD, PhD¹

Diogo Onofre Souza, MD, PhD²

Luiz Valmor Portela²

Carolina Boeira Vargas, P.T.¹

Alexandre Vontobel Padoin, MD¹

Deniz Martinez, MD, PhD³

Renato Dutra Dias, MD, PhD⁴

¹*Centro da Obesidade Mórbida, Hospital São Lucas da PUCRS (COM HSL/PUCRS)*

²*Departamento de Bioquímica – UFRGS*

³*Clínica do Sono – Porto Alegre/RS/Brazil*

⁴*Faculdade de Biociências - PUCRS*

- Address for correspondence:

Leandro Giacometti da Silva, M.s., P.T.

Av. Ipiranga 6690/302

Porto Alegre, RS, Brazil

ZIP 90610-000

e-mail: legiaco@terra.com.br

Phone: + 55 51 84447202

Fax: + 55 51 33360890

ABSTRACT

Background: Obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome (OSAHS) is considered a comorbidity associated with morbid obesity, mainly due to the large neck circumference. Depending on its severity, OSAHS can interfere in many homeostasis systems, for example, the central nervous system (CNS). Neuron specific enolase (NSE) and S100B protein derived from astrocytes, are considered sensitive biochemical markers of cerebral injury. We evaluated serum S100B and NSE levels in this study with the aim of detecting possible cerebral injury as a consequence of OSAHS.

Methods: This was a transverse study with data from 25 morbidly obese patients with OSAHS. Blood samples were collected before and after polysomnographic examination to determine S100B and NSE protein levels. We also analyzed data evaluating depression and excessive daytime sleepiness.

Results: S100B levels were higher after [0.029 (0.010-0.199) compared to before [0.010 (0.010-0.025)] PSG (P=0.002). S100B levels were expressed as means and IQ25-IQ75. NSE levels did not show significant differences before and after PSG.

Conclusions: Our study shows a significant increase in S100B level after PSG compared to before. This suggests that there is a CNS astrocyte reaction because of possible cerebral hypoxemia in morbidly obese patients with OSAHS.

Key words: Obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome; S100B; NSE; cerebral lesion; polysomnography; apnea-hypopnea index.

1. INTRODUCTION

Obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome (OSAHS) is common in the middle-aged population, and obesity is an important etiologic factor in its pathogenesis. It was demonstrated to be an important independent predictor of psychosocial morbidity in subjects with severe obesity.¹ The incidence of OSAHS among morbidly obese patients is 12 to 30-fold higher than in the general population and one important characteristic of the morbid obesity condition is the presence of central obesity, which means large belly and neck circumferences.² Especially related to having a thick neck is the high incidence of OSAHS.¹⁻³

OSAHS is defined by the occurrence of at least 5 obstructive apneas, hypopneas, or both per hour while the patient is sleeping, and classified by the apnea-hypopnea index (AHI). There are 3 levels of severity: mild (AHI = 5 to 15 events per hour); moderate (AHI = 15 to 30 events per hour); and severe (AHI = >30 events per hour).³ An apnea is defined in adults as the cessation of airflow for 10 or more seconds, whereas hypopnea is the reduction (at least 30 %) in airflow for 10 or more seconds associated with a 4% decrease in oxygen saturation.³ Repeated sleep apnoeic episodes may lead to behavioral and brain morphological alterations in patients with OSAHS. Accordingly, excessive sleepiness and impairment in the cognitive function are common daytime symptoms.⁴ Furthermore, abnormal morphology of the brain frontal cortex, cerebellum and hippocampus has been identified in these patients by imaging techniques.^{5,6}

More recently, studies have been performed aiming to determine consequences of OSAHS on the central nervous system (CNS) through the measurement of serum

neurobiochemical markers, more specifically S100B protein and neuron specific enolase (NSE).^{7,8} S100B is a calcium binding protein predominantly found in cytosol of astrocytes, reaching the extracellular space through secretion or due to astrocytic lesion. Extracellular functions of S100B are particularly relevant to understanding the potential role of this protein in modulating neuropathological outcomes after brain insults. Increased production of S100B by glial activation (reactive gliosis) and/or lesion may account for a number of studies suggesting that S100B could be a diagnostic and/or prognostic marker in brain injury assessment.^{9,10} NSE is a glycolytic pathway enzyme, which the $\gamma\gamma$ isoform is predominantly found in neuronal tissue. Since NSE is not physiologically secreted, increases in its peripheral levels have been specifically related to neuronal injury, as reported in traumatic brain, injury stroke and epileptic seizures.^{11,12}

The purpose of this study was to evaluate if serum levels of the neurobiochemical markers S100B and NSE are altered in morbid obese patients with OSAHS.

2. PATIENTS AND METHODS

2.1 Patients

Clinical and laboratory assessment was performed in 25 patients (15 women and 10 men) with morbid obesity clinically evaluated in the Hospital São Lucas da PUCRS, Porto Alegre, Brazil, in the pre-operative phase for obesity surgery. Patients included in this study were morbidly obese individuals presenting OSAHS clinical complaints such as excessive daytime sleepiness (EDS).⁴ Exclusion criteria were previous treatment for OSAHS and cognitive incapacity with regard to the comprehension of the consent form and questionnaires related to the study.

Patients agreed to participate in the study and signed an informed consent form. This study was approved by the Research Ethics Committee of Hospital São Lucas da PUCRS, Porto Alegre, Brazil.

2.2 Protocol

Morbidly obese patients with clinical complaints of OSAHS were invited to join the study. On the polysomnogram (PSG) day, it was conducted the following procedure:

- Presentation of a Informed consent submission, specifying the study objectives and author contacts
- Clinical assessment, Beck Depression Inventory,¹³ Epworth Sleepiness Scale (EDS evaluation).¹⁴
- Venous blood sample (5.0 ml) drawn by a trained professional (nurse or physician), before PSG, around 9 p.m.
- Overnight PSG.
- Another blood sample drawn after PSG (around 7 a.m.)

Soon after sampling, blood sample was centrifuged at 5000 rpm for 10 min, the serum was separated and stored at -70 °C for further S100B and NSE measurements.

2.3 Sleep analysis

PSG was recorded from 2300 to 700, following international guidelines,¹⁵ in a polygraph (BrainNet, EMSA, Rio de Janeiro, Brazil). It consisted of electroencephalogram (EEG) (C3-A2 and C4-A1), right and left electrooculogram (EOG), electrocardiogram (ECG) and electromyogram (EMG) of the submental and anterior tibialis muscles. Respiratory parameters were assessed by inductance plethysmography (Respirtrace, AMI, NY) with thoracic and abdominal belts, calibrated with isovolume maneuver and nasal airflow measured by means of a pressure transducer connected to a nasal cannula. A pulse oximeter with a finger probe was used to

continuously measure arterial oxyhemoglobin saturation (Protec, Brazil). Body positions and movements were detected by position sensor and video monitoring. All recordings were made by trained technicians following standard procedures and stored in a computer system. Apneas were defined as reductions in tidal volume and/or airflow to below 10% of baseline for 10 seconds or longer; hypopneas were defined as reductions in tidal volume and/or airflow to below 50% of baseline for 10 seconds or longer, accompanied by at least 3% desaturation or at least a three-second arousal.¹⁵

2.4. S100B and NSE measurements

2.4.1. S100B

Measurements of S100B were performed in a Lumat LB9507 luminometer (EG and G Berthold) using the immunoluminescent assay kit LIA-mat Sangtec 100 (BYK-Sangtec, Germany), which uses an antibody labeled with isoluminol. S100B standard curve was linear up to 20 µg/l and the coefficient of variation for duplicates in all range levels of standards and samples was within 5%. S100B levels are expressed as µg/l (mean ± S.D.).⁷ The samples were carried out together in the same experiment.

2.4.2. NSE

NSE was measured using an electrochemiluminescent assay. It consists of a double sandwich assay that uses an anti-NSE antibody labeled with ruthenium, which is the luminescent molecule. Reactions and quantification were performed with Elecsys-2010 (Roche Diagnostics Corporation®). NSE is expressed as ng/ml (mean ± S.D.). The coefficient of variation was less than 5% for samples and standards.⁷ The samples were carried out together in the same experiment.

3. STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analysis was performed using the SPSS 12.0 package. Continuous variables were expressed as means and standard deviation or medians and

percentile/interquartile range, depending on estimated normality. Categorical data were expressed as relative and absolute frequency.

The Mann-Whitney test was used to compare continuous variables between test groups. The paired t-test or Wilcoxon test was used for comparison of continuous variables with repetitive measures, depending on whether or not a non-parametric technique was required. Spearman's correlation coefficient was used to determine correlations between continuous variables. Fisher's exact test was used for comparison between categorical variables. We used scatter plots and box plots for correlations.

4. Results

Table 1 shows characteristics of the subjects and data related to clinical laboratory evaluation.

Clinical depression was evaluated by Beck Depression Inventory¹³ and excessive daytime sleepiness was evaluated by the Epworth Sleepiness Scale.¹⁴

Serum NSE level (Table 2) did not show any significant variation both just before and just after sleep. However, there was a significant increase in serum S100B levels after sleep, comparing with the values before ($P=0.002$; Table 2 and Fig. 1).

S100B levels were undetectable (below 0.02 $\mu\text{g/l}$) in 15 patients (60%) before and in 7 patients (28%) after the sleep. This difference was statistically significant ($P=0.045$). This difference in S100B levels (ΔS100B) was calculated to determine correlations with the variables studied. There was no correlation between ΔS100B and BMI, Beck Depression Inventory and mean oxygen saturation.

Figure 2 shows ΔS100B correlations with AHI, minimum O_2 saturation (min O_2 sat) and EDS. There was no statistically significant correlation between ΔS100B levels and AHI ($p_s = 0.180$), a negative correlation between ΔS100B levels and minimum

oxygen saturation levels ($p_s = 0.358$) and a positive correlation between $\Delta S100B$ levels and EDS ($p_s = 0.597$)

We used a group categorization of AHI, EDS and minimum oxygen saturation indexes related to $\Delta S100B$, as shown in Figure 3. Categorizing AHI with a cut-off point of 30, there was a significant difference between AHI<30 and AHI>30 groups after sleep for absolute mean values of S100B levels ($P=0.021$) and for $\Delta S100B$ ($P=0.029$), but not before sleep. Categorizing minimum oxygen saturation with a cut-off point of 75%, we did not find significant differences between >75% and < 75% minimum oxygen saturation groups when compared to $\Delta S100B$ ($P=0.152$). Categorizing the EDS scale with a cut-off point of 8, we found significant differences between EDS<8 and EDS>8 groups for S100B absolute mean levels after sleep ($P=0.001$) and for $\Delta S100B$ ($P<0.001$), but not before sleep.

5. Discussion:

OSAHS is a common clinical and laboratorial syndrome associated to morbid obesity, showing positive long term results after surgery.¹⁶⁻¹⁸ Excessive daytime sleepiness, sleep fragmentation and depression have been described as common symptoms in patients with OSAHS.^{5,6} Moreover, evidences have pointing that OSAHS may lead to brain neuronal damage.^{7,8} In this study, serum NSE and S100B levels, used as peripheral markers of brain injury, were measured in morbidly obese patients with OSAHS submitted to overnight PSG evaluation. Serum samples were taken after and before PSG. NSE levels presented no significant differences when compared before to after sleep, whereas the level of S100B were significantly higher after sleep ($P=0.002$). Both serum NSE and S100B levels have been used in clinical and experimental investigations aiming to understand the involvement of the neural cells neurons and

astrocytes in pathological conditions.¹⁹⁻²¹ Increase of NSE levels indicates neuronal damage, whereas increase in S100B may reflect either glial damage or astrocytic reactions to neural injury (reactive astrogliosis).²²

Intermittent hypoxia during sleep results in decreased blood oxygen saturation levels (hypoxemia) and neuronal injury by mechanisms not completely elucidated. Neuroimaging and neuropsychological findings have demonstrated usefulness targeting the evaluation of neuropathologic effects that occur following hypoxia in patients with OSAHS.^{23,24} Besides, measurement of peripheral brain markers could provide an additional strategy trying to detect hypoxic brain damage in OSAHS. Previous works with non obese patients have presented contradictory findings about S100B in OSAHS. Jordan et al. (2002) observed no difference between controls and patients just before and after sleep. Braga et al.(2006) showed significant differences in serum S100B level in OSAHS patients compared to controls after sleep . Probably ethnics difference, medications, cerebral areas affected or associated comorbidities could account for this disparity.

Although neuronal death is frequently reported either in humans with OSAHS as in animal models,²⁵ the serum levels of neuronal marker NSE has not been able to indicate this brain damage.²⁶ Otherwise, brain astrocytes have very close morphological and functional relationship with neurons. High concentrations of S100B may induce neuronal cell death by apoptosis through nitric oxide release from astrocytes.²⁷ Conversely S100B may exert trophic effects during developmental period and it is also able to decrease glutamate excitotoxicity, both effects being observed in low concentrations.^{28,29} Searching for physiological relevance of increasing S100B level in OSAHS patients, we observed in our study that it may reflect an astrocytic response trying to protect neuronal integrity once NSE level remains normal. However, the

combination between serum S100B and NSE measurements with neuroimaging and spectroscopic evaluations could provide a more specific response regarding these issues.

Morbidly obese patients are more prone to have OSHAS although functional impairment of the upper airway dilating muscles is also particularly important in the development of this pathology.² Cerebrovascular diseases and neuropsychiatry disorders are frequent comorbidities associated with obesity.² In non obese subjects these pathologies may cause S100B release by astrocytes.^{23,27} Whereas serum S100B was increased in non obese depressive patients.^{30,31} Here in our study, we found association among depression and increase S100B level in our morbidly obese patients (results section). However, given that the reported symptoms of depression and anxiety in the current study were in the mild range for both groups, it is unlikely that they contributed to the observed increased S100B.

Our study showed that there is a moderate correlation between Δ S100B and minimum oxygen saturation. S100B could therefore indicate a cerebral hypoxic insult. We also showed an association between increased Δ S100B and EDS, indicating a clinical characteristic related to the pathology.

Experimental evidence has pointed to the putative influence of adipose tissue in the serum S100B level. In vitro stimulation of adipose tissue by epinephrine triggers S100B release.³² It is important to take into account a possible influence of adipose tissue of morbidly obese subjects in the blood concentration of S100B protein although no association was reported up to now in human studies. This is one supporting reason for S100B and NSE serum levels assessment in OSAHS post-operative patients after massive weight loss, which is already under investigation in our group.

In conclusion, we observed that there is significant difference in S100B but not NSE between after compared to before sleep levels in morbidly obese OSAHS patients.

This appointment could lead us to relate an astrocytic reaction to hypoxemic indexes caused by sleep hypopneas or apneas, but not neuron death. On the other hand, high S100B levels are considered toxic to the CNS, what chronically could harm neuronal tissue.

6. REFERENCES

1. Fritscher LG, Mottin CC, Canani S, Chatkin JM. Obesity and obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome: the impact of bariatric surgery. *Obes Surg*. 2007;17:95-9
2. Peiser, J, Lavie, P, Ovnat A, Charuzi I. Sleep apnea syndrome in the morbidly obese as an indication for weight reduction surgery. *Ann Surg* 1984; 100:112-15,.
3. Caples SM, Gami AS, Somers VK. Obstructive sleep apnea. *Ann Intern Med* 2005;142:187-97.
4. Naegele B, Thouvard V, Pepin JL, Levy P, Bonnet C, et al.. Deficits of cognitive executive functions in patients with sleep apnea syndrome. *Sleep* 1995; 18: 43–52.
5. Macey PM, Henderson LA, Macey KE, Alger JR, Frysinger RC, et al. Brain morphology associated with obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 1382–1387.
6. Morrell MJ, McRobbie DW, Quest RA, Cummin AR, Ghiassi R, et al. Changes in brain morphology associated with obstructive sleep apnea. *Sleep Med* 2003; 4: 451–454.
7. Braga CW et al. S100B and NSE serum levels in obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep Med* 2006; 12: 1–5.;
8. Jordan W, Hagedohm J, Wiltfang J, et al. Biochemical markers of cerebrovascular injury in sleep apnoea syndrome. *Eur Respir J* 2002; 20:158–64.
09. Van Eldik LJ, Wainwright MS. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci* 2003;21: 97–108.
10. Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech* 2003;60:540–51.
11. Kayser E, Kaiser R, Kuzmits P, et al. Clinical biochemistry of neuron specific enolase. *Clin Chim Acta* 1989;183:13–32.
12. Busnello J.V. Acute and chronic electroconvulsive shock in rats: Effects on peripheral markers of neuronal injury and glial activity. *Life Sci* 2006; 78: 3013–17.
13. Beck AT, Ward CH, Mendelson M, Mock J, Erbaugh J. An inventory for measuring depression. *Arch Gen Psychiatry* 1961;4:561-71.
14. Johns MW. A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale. *Sleep* 1991;14(6):540-5.

15. Rechtschaffen A, Kales AA. A manual of standardized terminology, techniques, and scoring system for sleep stages of human subjects. Washington, DC: Public Health Service; 1968.
16. Guardiano SA, Scott JA, Ware C, Schechner SA. The long-term results of gastric bypass on indexes of sleep apnea. *Chest* 2003; 124: 1615-19.
17. Rasheid S, Banasiak M, Gallagher SF et al. Gastric bypass is an effective treatment for obstructive sleep apnea in patients with clinically significant obesity. *Obesity Surgery* 2004; 13: 58-61.
18. Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E et al. Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2004;292:1724-37.
19. Mazzini G, Schaf D, Oliveira AR, Goncalves CA, Souza DO, Portela LV. The ischemic rat heart releases S100B. *Life Sci* 2005;77:882-89.
20. Willoughby KA; Kleindienst A; Müller C; Chen T; . Muir JK; Ellis EF. S100B protein is released by in vitro trauma and reduces delayed neuronal injury. *J Neurochem* 2004; 91: 1284-91.
21. Rothermundt M, Peters M, Prehn J, Arolt V. S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Techn* 2004;60: 614 – 32
22. Herrmann M, Vos P, Wunderlich MT, de Bruijn CH, Lamers KJ. Release of glial tissue-specific proteins after acute stroke: a comparative analysis of serum concentrations of protein S- 100B and glial fibrillary acidic protein, *Stroke* 2000;31: 2670–2677.
23. Gale SD, Hopkins RO. Effects of hypoxia on the brain: Neuroimaging and neuropsychological findings following carbon monoxide poisoning and obstructive sleep apnea. *J Int Neurops Soc* 2004; 10: 60–71.
24. Halbower AC, Degaonkar M, Barker PB, Earley CJ, Marcus CL, Smith PL, Prahme MP, Mahone EM. Childhood Obstructive Sleep Apnea Associates with Neuropsychological Deficits and Neuronal Brain Injury. *Plos Med.* 2006; 3(8):301.
25. Morrell MJ, McRobbie DW, Quest RA, Cummin AR, Ghiassi R, et al. Changes in brain morphology associated with obstructive sleep apnea. *Sleep Med* 2003; 4: 451–454.
26. Pleines UE, Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Joller H, Trentz O, Kossmann T. S-100 beta reflects the extent of injury and outcome, whereas neuronal specific enolase is a better indicator of neuroinflammation in patients with severe traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 2001; 18: 491–498.

27. Hu J, Ferreira A, Van Eldik LJ. S100beta induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes. *J Neurochem* 1997 ;69(6):2294-301
28. Tramontina F, Conte S, Gonçalves D, Gottfried C, Portela LV, Vinade L, Salbego C, Gonçalves CA. Developmental changes in S100B content in brain tissue, cerebrospinal fluid, and astrocyte cultures of rats *Cell Mol Neurobiol.* 2002; 22(3):373-8.
29. Tramontina F, Tramontina AC, Souza DF, Leite MC, Gottfried C, Souza DO, Wofchuk ST, Gonçalves CA. Glutamate uptake is stimulated by extracellular S100B in hippocampal astrocytes. *Cell Mol Neurobiol.*; 2006,26(1):81-6.
30. Arolt V, Peters M, Erfurth A, Wiesmann M, Missler U, Rudolf S, Kirchner H, Rothermundt M. S100B and response to treatment in major depression: a pilot study. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2003 ;13(4):235-9.
31. Hetzel G, Moeller O, Evers S, Erfurth A, Ponath G, Arolt V, Rothermundt M. The astroglial protein S100B and visually evoked event-related potentials before and after antidepressant treatment. *Psychopharmacol* 2005;178(2-3):161-6.
32. Sriram K, Benkovic SA, Miller DB, O'Callaghan JP. Obesity exacerbates chemically induced neurodegeneration. *Neuroscience.* 2002;115(4):1335-46.

7. Tables and Figures

8.1 Table and figure legends

Table 1

* Median IQ25-IQ75. BMI = body mass index; Beck= Beck Depression Inventory; EDS= Excessive daytime sleepiness; AHI= apnea-hypopnea index.

Table 2

* Median IQ25-IQ75; NSE= Neuron specific enolase; Δ S100B= change in S100B.

Figure 1

S100B levels before and after PSG.

Figure 2

Correlations between Δ S100B and AHI, and min O₂ sat and EDS.

Figure 3

Group categorization and comparison between Δ S100B and AHI, and min O₂ sat and EDS.

Table1

Variable	Mean \pm SD
Age (years)	39.92 \pm 8.63
BMI (kg/m ²)	47.86 \pm 8.75
Beck Depression Inventory	12.52 \pm 8.44
EDS (Epworth Sleepiness Scale)	12.08 \pm 5.41
AHI* (events/hour)	36 (8.5-74.5)
Min sat O ₂ (%)	72.36 \pm 14.02
Mean sat O ₂ (%)	91.04 \pm 4.25

Table 2

Variable	Mean \pm SD	P
NSE before PSG	9.40 \pm 2.23	0.22
NSE after PSG	8.66 \pm 2.91	
S100 before PSG	0.010 (0.010-0.025)	0.002
S100 after* PSG	0.029 (0.010-0.199)	
Δ S100B *	0.019 (0-0.154)	-

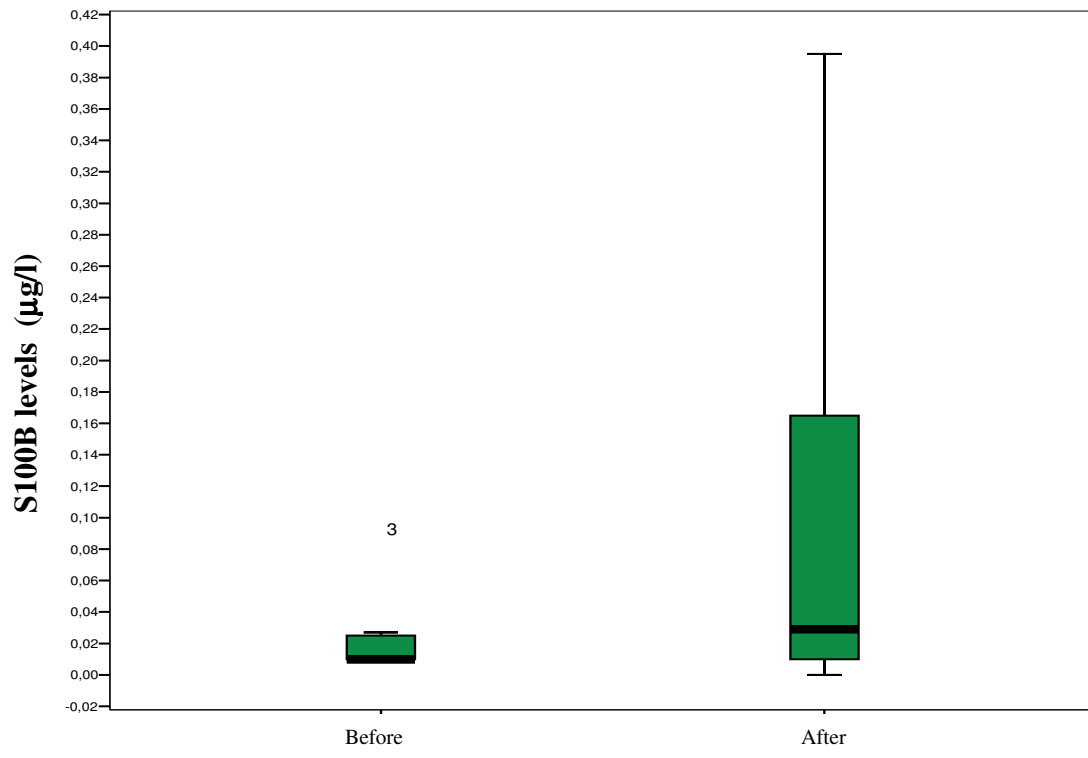


Figure 1

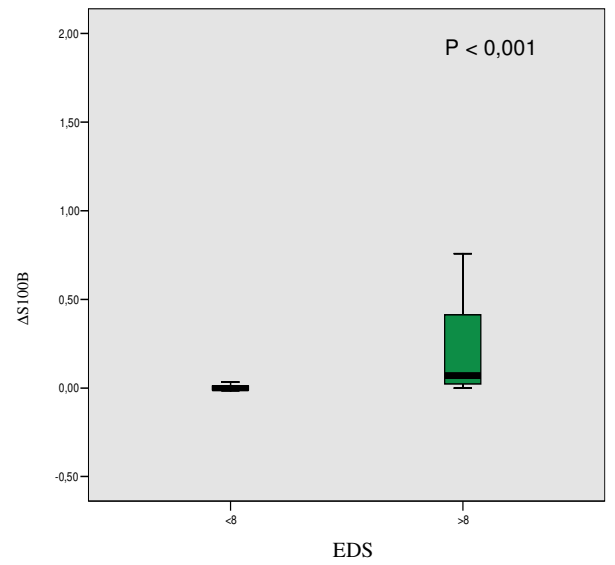
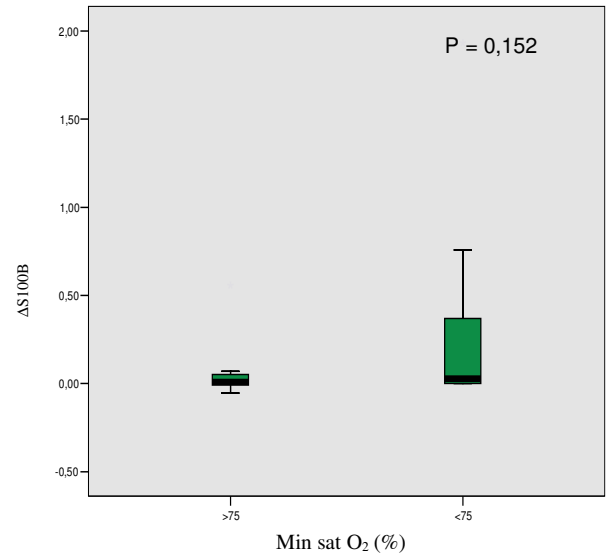
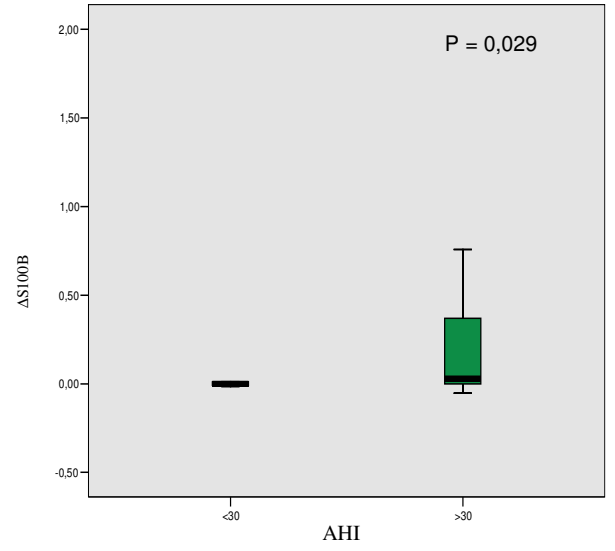
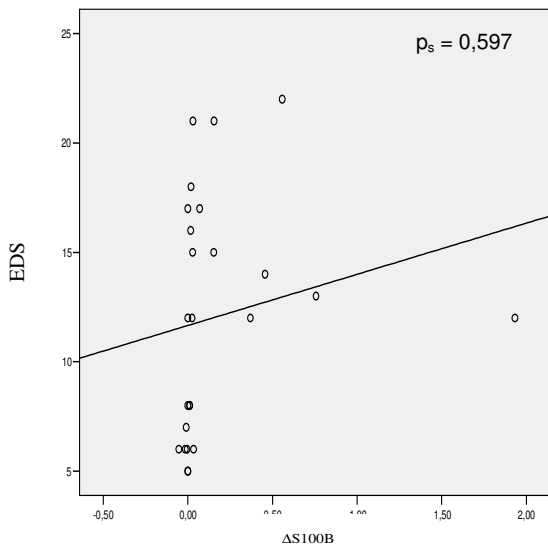
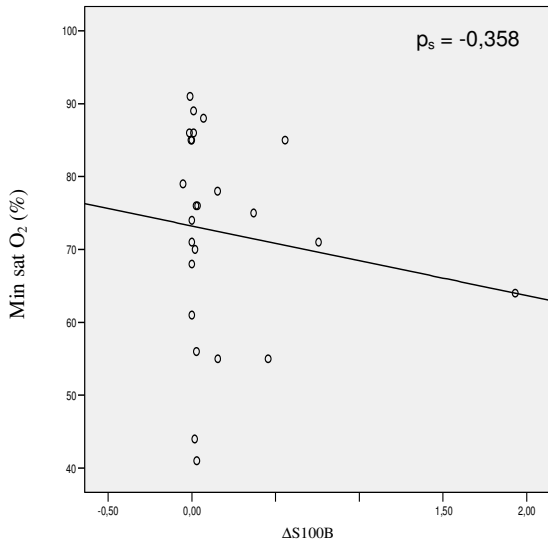
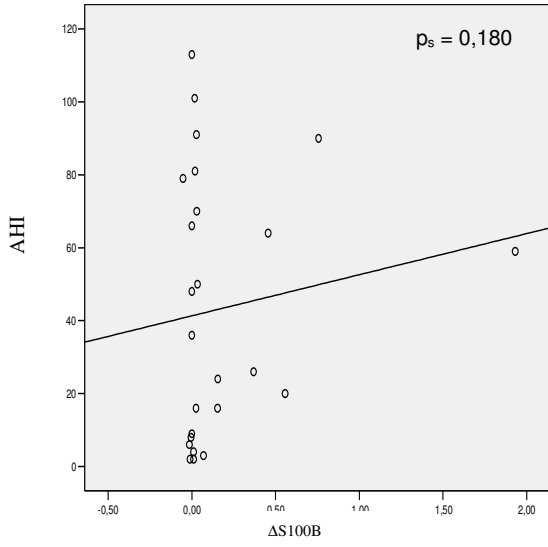


Figure 2

Figure 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo visou analisar as relações existentes entre os marcadores bioquímicos de lesão cerebral S100B e NSE e a síndrome das apneias-hipopneias obstrutivas do sono.

Algumas pesquisas recentemente publicadas sobre o assunto nos mostram a importância dessa investigação no intuito da comprovação do dano cerebral relacionado à SAHOS e da descoberta de uma ferramenta de simples aplicabilidade e de mais fácil alcance para indivíduos que não tenham acesso ao padrão ouro diagnóstico (polissonografia), auxiliando assim na busca dos tratamentos mais eficazes com relação à patologia.

No entanto, as pesquisas realizadas previamente nos mostram resultados controversos. Jordan et al., em 2002 no *European Respiratory Journal*, não encontrou diferenças nos marcadores pré e pós PSG, sugerindo que estes seriam sensíveis somente para marcar lesões graves como isquemia severa e trauma crânio-encefálico, e não lesões menores como as encontradas na SAHOS. Já Carla Braga et al, publicado em 2006 na revista *Sleep Medicine*, mostra uma diferença significativa nos níveis dos marcadores de lesão cerebral entre um grupo com SAHOS e outro controle, porém esta pesquisa não avaliou níveis pré PSG, não podendo assim realizar as comparações pré e pós-sono.

Nossos resultados mostram uma diferença significativa entre níveis pré e pós-sono para o marcador S100B ($P=0,002$). O mesmo não aconteceu para NSE ($P=0,22$), não havendo um comportamento padrão. Com base nesses resultados, podemos sugerir uma reação astrocitária (astroglíose reativa) com o objetivo de proteção neuronal, uma vez que o marcador da reação astrocitária mostra alterações e o marcador de lesão diretamente neuronal não varia, não revelando injúria propriamente dita. Outros

resultados importantes são as correlações entre as variações de S100B (Δ S100B) e saturação mínima de oxigênio (correlação moderada $p_s= 0,358$) e sonolência diurna excessiva (correlação forte $p_s= 0,597$). Isto nos mostra a relação da variação de S100B com um quadro laboratorial e outro clínico. Outros resultados interessantes são a comparação da categorização de grupos para IAH, SDE e saturação mínima de oxigênio em relação a Δ S100B, onde encontramos diferenças importantes nos grupos IAH>30 e IAH<30 ($P=0,029$), o que relaciona gravidade da patologia e Δ S100B. Outra importância na categorização dos grupos é a diferença entre EDS>8 e EDS<8 ($P<0,001$), mostrando a relação ente sonolência e Δ S100B.

Estes resultados nos levam a acreditar na relação entre a variação do marcador S100B antes e após o sono em indivíduos obesos mórbidos portadores da síndrome de apnéias-hipopnéias obstrutivas do sono. Porém, dados importantes como a relação do aumento do marcador e o sofrimento do tecido cardíaco (o que pode acontecer em uma crise hipoxêmica noturna) e a necessidade da comparação dos resultados com um suposto grupo controle devem ser salientados de forma a motivar novos estudos, estando este último já sob investigação em nosso grupo.

CONCLUSÕES:

- O estudo sugere que o tecido neuronal seja protegido pelo astrócito, uma vez que existiu uma variação importante da proteína S100B comparando níveis pré e pós sono e a proteína NSE não mostrou importantes variações;
- Considerando as correlações realizadas, a variação de S100B pode caracterizar um quadro clínico (sonolência diurna excessiva) e laboratorial (saturacao mínima de oxigênio), podendo esses dados auxiliarem no diagnóstico da síndrome das apnéias-hipopnéias obstrutivas do sono
- Indivíduos que apresentam maior IAH e SDE apresentam maiores variações de S100B, conforme encontrado na categorização dos grupos.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos nesse trabalho indicam a necessidade de futuras investigações sobre o assunto em função de:

- resultados prévios controversos;
- a interferência de outros tecidos na produção sérica dos marcadores;
- a necessidade de comparação com um grupo controle sem SAHOS, uma vez que possa existir a influencia de um ciclo circadiano envolvendo a produção desses marcadores.

Este último tópico encontra-se sob investigação em nosso grupo.