

LUNARA DA SILVA FREITAS

**Avaliação dos MicroRNAs na Apneia Obstrutiva do Sono:
Implicações para a Criação de Biomarcadores e para o Risco
Cardiovascular**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Programa de Cardiologia
Orientador: Prof. Dr. Luciano Ferreira Drager

São Paulo

2018

LUNARA DA SILVA FREITAS

**Avaliação dos MicroRNAs na Apneia Obstrutiva do Sono:
Implicações para a Criação de Biomarcadores e para o Risco
Cardiovascular**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Programa de Cardiologia
Orientador: Prof. Dr. Luciano Ferreira Drager

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Freitas, Lunara da Silva

Avaliação dos microRNAs na apneia obstrutiva do sono : implicações para a criação de biomarcadores e para o risco cardiovascular / Lunara da Silva Freitas. -- São Paulo, 2018.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Cardiologia.

Orientador: Luciano Ferreira Drager.

Descritores: 1.MicroRNA 2.Apneia obstrutiva do sono 3.Biomarcadores 4.Doenças cardiovasculares 5.Hipóxia 6.Regulação da expressão gênica

USP/FM/DBD-144/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

*À meus pais, Lourdes e José,
por serem os grandes idealizadores deste sonho.*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus, que sempre demonstrou sua presença, dos pequenos detalhes aos grandes acontecimentos, sempre me cercando de anjos para me guiar.

Aos meus pais, meus maiores alicerces, que me ensinaram o amor, humildade, honestidade e a trabalhar duro acima de tudo, pessoas batalhadoras em quem eu me espelho para tudo em minha vida.

Minha irmã, minha flor, que me apoia e me aconselha com paciência e amor. Obrigada pelo sobrinho mais carinhoso e querido que eu poderia ter.

Obrigada Tiago, meu amor, amigo, parceiro, cúmplice de todas as empreitadas, pelo apoio incessante e incondicional mesmo diante dos desafios que a distância nos trouxe. O seu apoio me encorajou e me fez vencer cada dia.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Luciano F. Drager, que me acompanha desde o mestrado, por ter me guiado nessa jornada com grande empenho. Obrigada por todas as oportunidades que me proporcionou e por ter me confiado esta missão.

À Dra. Edilamar por me receber como aluna em seu laboratório, sempre tão gentil e por toda contribuição que foi, sem dúvida, imprescindível.

Agradeço em especial à amiga e ex-orientadora Dra. Maria Lilian Sales por ser a grande responsável pela minha jornada em São Paulo. Ela me encaminhou, abriu todas as portas e janelas e garantiu toda a estrutura para que eu seguisse em frente, mesmo quando nem eu mesma acreditava.

Aos Drs. Geraldo Lorenzi e Pedro Genta por serem profissionais admiráveis e por me permitirem compartilhar de seus ensinamentos.

A todos os colegas do laboratório do sono: Sofia Furlan, Daniel Queiroz, Fernanda Cruz, Sara Herculano, Sara Giampá, Érika Matsumura, Mayara Cabrini, Raquel Pedreno, Fabi Kayamore, e Raquel Hirata por compartilharem jornadas a fio de trabalho, pelo

companheirismo e pela parceria sempre preparados a ajudar, pelas risadas, almoços, conversas e discussões divertidas que trouxeram leveza e tornaram tudo mais especial. Agradeço também ao Franco Martins, Valéria Costa Hong, Adriana Lebckuchen, aos técnicos Fabiana e Paulo e à secretária Vanderléa pelas contribuições.

Agradeço à EEFÉ e aos colegas do laboratório de bioquímica e biologia molecular do exercício: André, Glória, Tiago, João, Clara, Úrsula, e todos os outros pelas grandes contribuições e por estarem sempre dispostos a me ajudar no grande desafio que foi a biologia molecular.

Aos meus grandes amigos de Ouro Preto e às *roommates* Helô, Vanessa e Bárbara pela amizade e por me receberem em São Paulo.

Agradeço à Dra. Gabriela Souza, profissional exemplar e grande pesquisadora, que me aconselhou com poucas palavras, muito carinho e bom senso, a tomar a grande decisão da minha vida.

Obrigada à cidade de São Paulo que, sem dúvida, me acolheu com carinho e me forjou como o ser humano e profissional que sou hoje e pelo resto da minha jornada.

Aos voluntários desta pesquisa, dedico meu afeto e gratidão por fazerem possível este trabalho.

Agradeço à CAPES e ao CNPq pelo financiamento.

Enfim, é imensa a gratidão que sinto, e que não cabe nesta tese, por todos que fizeram parte deste doutorado como uma grande equipe que tornou tudo possível.

Normalização Adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

“Science works on the frontier between knowledge and ignorance, not afraid to admit we don't know. There is no shame in that. The only shame is to pretend that we have all the answers.”

(Neil deGrasse Tyson)

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Apneia obstrutiva do sono (AOS): Dados epidemiológicos e impacto nas doenças cardiovasculares	1
1.2 Desafios na identificação de biomarcadores	4
1.3 MicroRNAs	5
1.3.1 Biogênese e mecanismo de ação dos microRNAs.....	6
1.3.2 MicroRNAs na hipóxia crônica	9
1.3.3 MicroRNAs na AOS.....	12
2 JUSTIFICATIVA	15
3 OBJETIVOS.....	16
3.1 Objetivo Principal	16
3.2 Objetivo Específico	16
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1 Sujeitos do estudo.....	17
4.2 Polissonografia	18
4.3 Antropometria e avaliação clínica.....	18
4.4 Amostras biológicas	20
4.4.1 Análise de miRNAs	21
4.4.1.1 Coleta do sangue e extração do miRNA.....	21
4.4.1.2 1ª etapa: análise de expressão dos miRNAs por <i>microarray</i>	21
Predição dos genes-alvo por análise <i>in Silico</i> :.....	24
4.4.1.3 2ª etapa: validação da expressão dos miRNAs por RT-qPCR.....	24

4.5 Análise estatística.....	30
5 RESULTADOS	31
5.1 Resultados da 1ª etapa: avaliação dos miRNAs por <i>microarray</i>	34
5.2 Resultados da 2ª etapa: avaliação dos miRNAs por RT-qPCR.....	38
6 DISCUSSÃO	44
7 CONCLUSÕES	53
8 PERSPECTIVAS	54
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
10 ANEXOS	66

Lista de Abreviações

3'-UTR	Região 3' não traduzida
AGO2	Argonauta 2
ALS	Esclerose amiotrófica lateral
ANOVA	Análise de variância
AOS	Apneia obstrutiva do sono
CAMs	Moléculas de adesão celular
cm	Centímetros
CPAP	Pressão positiva contínua da vias aéreas superiores
DAVID	Base de dados para anotação, visualização e descoberta integrada
DCV	Doenças cardiovasculares
DGCR8	Região crítica da síndrome Digorge 8
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ECG	Eletrocardiograma
EEG	Eletroencefalograma
EMG	Eletromiograma
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EOG	Eletro-oculograma
ErbB	Receptor do fator de crescimento epidermal
Fc γ R	Imunoglobulina gamma de alta afinidade Fc
FDR	Taxa de descoberta de falso-positivo
FGF	Fator de crescimento do fibroblasto
gr	Gramas
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HIF-1	Fator induzido pela hipóxia 1
Hsa	<i>Homosapiens</i>
hsCRP	Proteína C reativa ultrasensível
IAH	Índice de apneia/hipopneia por hora
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corporal

iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
KEGG	Enciclopédia Kyoto de genes e genoma
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
mg/dL	Miligramas por decilitros
miRNA/microRNA	Micro ácido ribonucleico
mir	Microrna
mm	Milímetros
mmHg	Milímetros de mercúrio
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
N ₂	Nitrogênio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO	Óxido nítrico
NO ₃ ⁻	Radical peroxinitrito
PPAR	Receptor proliferador de peroxissomo ativado
pré-miRNA	miRNA precursor
pri-miRNA	miRNA primitivo
PSG	Polissonografia
RanGTP	Proteína guanosine trifosfato nuclease relacionada a Ras
RISC	Complexo silenciador induzido por RNA
RNA	Ácido ribonucléico
rRNA	RNA ribossomal
RT-qPCR	Análise quantitativa da transcriptase reversa e reação em cadeia da polimerase em tempo real
TAC	Console de análise do transcriptoma
TGF-β	Fator de crescimento tumoral beta
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TRBP	Proteína de resposta da transativação de ligação ao RNA
tRNA	RNA transportador
u.a.	Unidades arbitrárias
VCAM-1	Moléculas de adesão celular 1
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular

VnCl4	Cloreto de vanádio
Wnt	Local de integração relacionado a Wingless
χ^2	Qui-quadrado de Pearson
XPO-5	Exportina-5
β MHC	Beta miosina de cadeia pesada

Lista de Tabelas

Tabela 1: Características de biomarcadores ideais (35).	4
Tabela 2: Compilação de miRNAs associados à hipóxia em células cancerígenas de acordo com alguns estudos.....	10
Tabela 3: Características dos sujeitos de acordo com os grupos de estudo.....	33
Tabela 4: miRNAs com diferença de expressão para cada comparação de grupos.	36
Tabela 5: Vias de sinalização e os respectivos miRNAs que regulam sua expressão organizados de acordo com os grupos.....	37
Tabela 6: Expressão relativa % dos miRNAs pela técnica de RT-qPCR, por grupo de estudo.....	38
Tabela 7: Análise de correlação entre a expressão dos miRNAs e diferentes marcadores de gravidade da AOS.....	42
Tabela 8: Preditores da expressão dos miR-1254 miR-320e em análise de regressão linear multivariada.	43

Lista de Figuras

Figura 1: Biogênese e mecanismo de ação dos miRNAs.	7
Figura 2: Montagem do monitor de impedância bioelétrica InBody S10®.	19
Figura 3: Fragmento da imagem gerada após leitura do chip microarray.	23
Figura 4: Esquema da reação química da transcriptase reversa e reação em cadeia da polimerase em tempo real.	25
Figura 5: Etapas da reação em cadeia da polimerase em tempo real e sua influência sobre a emissão de fluorescência.	27
Figura 6: Fluxograma de inclusão de pacientes.	32
Figura 7: <i>Hierarchical clustering</i> de microarray dos 63 miRNAs diferentemente expressos entre os grupos do estudo.	35
Figura 8: Dados individuais da expressão relativa % dos miR-4451 (A), miR-4253 (B) e miR-1254 (C) por grupo de estudo.	39
Figura 9: Dados individuais da expressão relativa % dos miR-320e (A), miR-29a (B) e miR-122-3p (C) por grupo de estudo.	40
Figura 10: Dados individuais da expressão relativa % dos miR-126-3p (A), miR-485-5p (B) e miR-939-5p (C) por grupo de estudo.	41

Resumo

Freitas LS. Avaliação dos microRNAs na apneia obstrutiva do sono: implicações para a criação de biomarcadores e para o risco cardiovascular [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

A apneia obstrutiva do sono (AOS) é uma condição clínica muito comum, embora frequentemente subdiagnosticada na prática clínica. Este distúrbio respiratório do sono está associado de forma independente a um aumento na morbidade e mortalidade cardiovascular. No entanto, os mecanismos deste risco cardiovascular aumentado não estão completamente esclarecidos e a susceptibilidade aos desfechos cardiovasculares pode variar entre os pacientes com AOS. Neste contexto, é necessário explorar potenciais biomarcadores que podem contribuir para o entendimento de mecanismos e potencialmente ajudar na estratificação de risco dos pacientes com AOS. Recentemente, os microRNAs (miRNAs), fitas simples de cerca de 22 nucleotídeos de RNA não codificantes que regulam pós-transcricionalmente a expressão de genes-alvos, foram descritos como potenciais biomarcadores para diversas condições clínicas. Múltiplos estudos têm demonstrado que existe a participação de miRNAs na regulação de processos como hipóxia, inflamação, angiogênese, lesão miocárdica, entre outros, que podem ter implicações para a AOS. Entretanto, estudos avaliando o perfil dos miRNAs em pacientes com AOS são escassos. O objetivo deste estudo foi o de avaliar o perfil de expressão dos miRNAs em pacientes com AOS comparando com os dados obtidos de participantes sem AOS (controle) pareados para idade, sexo e índice de massa corpórea (IMC). Excluímos pacientes com diabetes mellitus, hipertensão arterial, insuficiência cardíaca, doença renal crônica, fisicamente ativos, tabagistas, com histórico de alcoolismo, câncer prévio ou atual, outras doenças crônicas ou pacientes em uso de quaisquer medicações. Foram recrutados 48 indivíduos adultos do sexo masculino, sendo 6 controles (índice de apneia e hipopneia, IAH, <5 eventos/hora pela polissonografia noturna) e 42 pacientes com AOS divididos nos seguintes grupos: 12 com AOS leve (IAH entre 5 e 14,9 eventos/hora), 15 com AOS moderada (IAH entre 15 e 29,9 eventos/hora) e 15 com AOS grave (IAH \geq 30 eventos/hora). Além da avaliação clínica que incluiu dados demográficos e antropométricos, avaliação da composição corporal por bioimpedância e medida da pressão arterial, avaliamos o perfil dos miRNAs em sangue total periférico em duas etapas: 1) *microarray* em uma subamostra de 3 indivíduos de cada grupo (com o objetivo de verificar de forma ampla o perfil e a diferença de expressão dos miRNAs entre os grupos); 2) validação dos achados na 1ª etapa com seleção de vários miRNAs que participam da regulação de vias de sinalização relacionadas à fisiopatologia da AOS por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR). Os participantes apresentaram idade mediana de 35 (31-41) anos e IMC médio de $30,7 \pm 3,6$ kg/m². Não foram observadas diferenças entre os grupos quanto aos parâmetros antropométricos, medidas de composição corporal e pressão arterial. Na análise de *microarray*, identificamos 21 miRNAs diferentemente expressos, sendo 6 na comparação entre os grupos controle vs. AOS moderada (hsa-mir-122-5p, hsa-mir-939-5p, hsa-mir-4679, hsa-mir-224-3p, hsa-mir-485-5p, hsa-mir-3180); 12 na comparação entre controle vs. AOS grave (hsa-mir-503, hsa-mir-939-5p, hsa-mir-1254, hsa-mir-4253, hsa-mir-208a-3p, hsa-mir-320e, hsa-mir-552-3p, hsa-mir-1182, hsa-mir-3145-5p, hsa-mir-4451, hsa-mir-6510-5p, hsa-mir-6515-5p); e 4 na comparação entre AOS leve vs. grave (hsa-mir-302c-3p, hsa-mir-1265, hsa-mir-133a-5p,

hsa-mir-559). Na análise da RT-qPCR, os miR-1254 e miR-320e apresentaram um gradual aumento na expressão em paralelo ao aumento da gravidade da AOS. Na análise de regressão linear, o miR-1254 foi independentemente associado com a raça negra ($\beta=-61,3$; EP=28,4; $p=0,03$) e a AOS grave ($\beta=69,8$; EP=29,3; $p=0,02$). O miR-320e foi independentemente associado com a raça amarela ($\beta=-60,03$; EP=30,16; $P=0,047$), o IMC ($\beta=-7,6$; EP=2,3; $p=0,003$) e a AOS grave ($\beta=75,2$; EP=31,1; $p=0,02$). Em conclusão, a AOS grave está associada de forma independente com um aumento na expressão de miR-1254 e miR320e circulantes em homens. Considerando que estes miRNAs estão envolvidos na insuficiência cardíaca como biomarcadores prognósticos (miR-1254), na isquemia/reperfusão miocárdica (miR-320e) e na proliferação celular em alguns tipos de câncer (miR-1254 e miR-320e), estes achados podem contribuir não somente para a criação de biomarcadores precoces na AOS, mas também para ajudar no entendimento de como a AOS pode contribuir para o desenvolvimento da doença cardiovascular e mesmo de outras condições clínicas como o câncer.

Descritores: microRNA; apneia obstrutiva do sono; biomarcadores; doenças cardiovasculares; hipóxia; regulação da expressão gênica

Abstract

Freitas LS. *MicroRNAs assessment in obstructive sleep apnea: implications for biomarkers and for the cardiovascular risk* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

Obstructive Sleep Apnea (OSA) is a common clinical condition, but frequently underdiagnosed in clinical practice. This sleep disordered breathing is independently associated with increased cardiovascular morbidity and mortality. However, the precise mechanisms related to this increased cardiovascular morbimortality are not well established and the susceptibility to cardiovascular outcomes may vary among patients with OSA. In this context, it is necessary to explore potential biomarkers that can contribute to understand those mechanisms and potentially contribute to improve risk stratification in OSA patients. Recently, microRNAs (miRNAs), single strands of nearly 22 noncoding nucleotides that post-transcriptionally regulate target gene expression, were described as potential biomarkers in several clinical conditions. Multiple studies have demonstrated the active involvement of miRNAs in the regulation of several conditions like hypoxia, inflammation, angiogenesis, and myocardial injury, among others that may have implications for OSA. However, studies addressing miRNA profile in patients with OSA are scanty. The aim of this study was to assess miRNA expression profile in OSA subjects comparing data from no OSA subjects (control group) matched for age, sex, and body mass index (BMI). We excluded subjects with diabetes mellitus, hypertension, heart failure, physically active, smokers, excessive drinking, with previous or current diagnosis of cancer, chronic kidney disease, other chronic diseases or those under regular use of any medication. We recruited 48 male adult subjects as follows: 6 control subjects (apnea/hypopnea index, AHI, <5 events/hour by polysomnography) and 42 OSA subjects stratified in 3 groups: 12 with mild OSA (AHI between 5 and 14.9 events/hour), 15 with moderate OSA (AHI between 15 and 29.9 events/hour) and 15 with severe OSA (AHI \geq 30 events/hour). Beyond clinical evaluation which included assessment of demographic and anthropometric data, body composition by bioimpedance, and blood pressure, we measured miRNA from peripheral whole blood using two steps: 1) microarray in a subsample of 3 subjects from each group (allowing a broad assessment of miRNA profile) and 2) validation of the results derived from the first step, selecting several miRNAs involving the signaling pathways related to OSA using real time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Studied participants had a median age of 35 (31-41) years and mean BMI of 30.7 ± 3.6 kg/m². We did not find statistical differences regarding anthropometric, body composition, and blood pressure measurements. The microarray assessment identified 21 miRNAs differently expressed among groups: 6 in the comparison of control group vs. moderate OSA (hsa-mir-122-5p, hsa-mir-939-5p, hsa-mir-4679, hsa-mir-224-3p, hsa-mir-485-5p, hsa-mir-3180); 12 in the comparison of control group vs. severe OSA (hsa-mir-503, hsa-mir-939-5p, hsa-mir-1254, hsa-mir-4253, hsa-mir-208a-3p, hsa-mir-320e, hsa-mir-552-3p, hsa-mir-1182, hsa-mir-3145-5p, hsa-mir-4451, hsa-mir-6510-5p, hsa-mir-6515-5p); and 4 in the comparison of mild OSA vs. severe OSA (hsa-mir-302c-3p, hsa-mir-1265, hsa-mir-133a-5p, hsa-mir-559). RT-qPCR assessment showed that miR-1254 e miR-320e presented a gradual expression increase in parallel to the OSA severity. In the linear regression analysis, the miR-1254 was independently associated with Blacks ($\beta=-61.3$; EP=28.4; p=0.03) and severe OSA

($\beta=69.8$; EP=29.3; $p=0.02$). The miR-320e was independently associated with Asians ($\beta=-60.03$; EP=30.16; $P=0.047$), BMI ($\beta=-7.6$; EP=2.3; $p=0.003$), and severe OSA ($\beta=75.2$; EP=31.1; $p=0.02$). In conclusion, severe OSA is independently associated with increased expression of circulating miR-1254 and miR320e in men. Considering that these miRNAs are involved in heart failure as potential biomarkers of poor prognosis (miR-1254), myocardial ischemia/reperfusion (miR-320e) and cell proliferation in some cancer types (miR-1254 e miR-320e), our findings may contribute not only to develop early biomarkers in OSA, but also to understand the mechanisms by which OSA contributes to the development of cardiovascular diseases and even to other clinical conditions like cancer.

Descriptors: microRNA; sleep apnea, obstructive; biomarkers; cardiovascular diseases; hypoxia; gene expression regulation

1 INTRODUÇÃO

1.1 Apneia obstrutiva do sono (AOS): Dados epidemiológicos e impacto nas doenças cardiovasculares

A apneia obstrutiva do sono (AOS) é uma condição clínica caracterizada por obstruções repetitivas das vias aéreas superiores durante o sono com consequente redução da pressão intratorácica, dessaturações de oxigênio e fragmentação do sono (1). Quando definimos a AOS por um índice maior ou igual a 5 eventos/hora de sono, observamos que a AOS é muito frequente na população geral. Por exemplo, nos Estados Unidos da América, estima-se que 26% dos indivíduos em idade adulta sejam portadores da AOS (2). O estudo HypnoLaus (3), realizado na cidade de Lausanne/Suíça com 3043 adultos encontrou uma prevalência de AOS moderada a grave (um índice maior ou igual a 15 eventos/hora de sono) de 49,7% em homens e 23,4% em mulheres. Dados nacionais da cidade de São Paulo de 2010 mostraram que a AOS está presente em cerca de 38,2% da população adulta, sendo que 16,4% dos adultos estudados apresentaram AOS moderada a grave (4).

Entre os pacientes com doença cardiovascular (DCV) já estabelecida, a prevalência da AOS assume proporções frequentemente ainda maiores do que a descrita anteriormente na população geral. Isto pode ser parcialmente explicado pela maior frequência de fatores de risco comuns à AOS e à DCV, tais como a idade e o sobrepeso/obesidade. Por exemplo, a prevalência de AOS entre os pacientes hipertensos é estimada entre 30% a 56% (dependendo do critério utilizado), chegando a 83% nos casos de hipertensão arterial resistente ao tratamento (5–7). Em pacientes com insuficiência cardíaca e fibrilação atrial, a prevalência de AOS é cerca de 50% (8,9). Em 152 pacientes consecutivos com a Síndrome Metabólica, uma publicação do nosso grupo encontrou que cerca de 60% dos pacientes tinham AOS sendo que a imensa maioria dos pacientes não tinha suspeita ou o diagnóstico deste distúrbio do sono (10). Apesar da alta frequência da AOS tanto na população geral quanto em pacientes com DCV, o subdiagnóstico é muito frequente na prática clínica (11,12). As razões para este subdiagnóstico são múltiplas e incluem: a falta de conhecimento por parte dos médicos sobre a abordagem e importância dos distúrbios do

sono; dificuldade de acesso ao diagnóstico; sintomas inespecíficos ou ausência de sintomas típicos em parte significativa da população de pacientes com AOS (11).

A importância da AOS não se limita a ser frequente e prejudicar a qualidade de vida e do sono dos pacientes. Recentes estudos observacionais sugerem que a AOS está independentemente associada a um aumento da morbimortalidade cardiovascular, especialmente verificado principalmente nas formas mais graves da AOS (13–17). Dados derivados de estudos experimentais, translacionais e clínicos (18) sugerem que os potenciais efeitos deletérios dos distúrbios respiratórios do sono são múltiplos. As apneias e/ou hipopneias recorrentes causam hipóxia intermitente (uma das características mais importantes da AOS), aumento da pressão intratorácica negativa e microdespertares (19). Cronicamente, estes múltiplos eventos podem promover o aumento da atividade simpática, instabilidade da pressão arterial, disfunção endotelial, estresse oxidativo, inflamação, entre outros, sendo que estes fatores estão frequentemente interligados como discutido à seguir (19).

A disfunção endotelial é reconhecida como o comprometimento da vasodilatação endotélio-dependente e é um preditor precoce e independente de diversos desfechos cardiovasculares (20,21). Tal disfunção pode ser resultado de agressores mecânicos, na maioria das vezes causado pela hipertensão arterial. Outros fatores como hipercolesterolemia, diabetes e tabagismo provavelmente promovem injúria ao endotélio por mecanismos bioquímicos e estas alterações manifestam-se clinicamente por trombose e aterosclerose (22). No contexto da AOS, alguns componentes deste distúrbio do sono tais como a hipóxia intermitente, hipercapnia intermitente e a fragmentação do sono podem estar associados com a disfunção endotelial (23). Entre estes fatores, a hipóxia intermitente parece ser o fator causal preponderante, que contribui com o estresse oxidativo, inflamação, redução da biodisponibilidade do óxido nítrico, aumento de moléculas de adesão circulantes, hipercoagulabilidade, entre outros (24).

Adicionalmente, a AOS tem implicações na indução e propagação de vias inflamatórias que podem contribuir para o aumento da rigidez arterial e a progressão da aterosclerose, o que caracteriza o surgimento de grande parte das doenças vasculares (25–27). Estudos mostram que pacientes portadores de AOS apresentam níveis elevados de peróxidos e de lipídeos oxidados e que o tratamento da AOS com a pressão positiva contínua das vias aéreas superiores (CPAP) pode reduzir os níveis destas substâncias (23).

Em resposta ao estresse oxidativo exacerbado, um estudo sugeriu que a capacidade antioxidante sanguínea estava reduzida comparada a indivíduos sem AOS (28). É possível que as espécies reativas do oxigênio possam reduzir a disponibilidade do NO por afetar a ativação dos genes responsáveis pela expressão da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), enzima responsável pela produção de NO, apesar destes mecanismos ainda serem controversos. Além disso, há evidências de que as espécies reativas do oxigênio possam combinar-se ao NO inativando-o e produzindo o radical peroxinitrito (NO_3^-) (29).

O aumento da produção de ROS na AOS desencadeia a superexpressão de alguns genes que aumentam a liberação de mediadores inflamatórios como TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e IL-6 (interleucina 6) (25). Tais mediadores inflamatórios participam da ativação de células como linfócitos, leucócitos, monócitos, granulócitos e células endoteliais, favorecendo o aumento da inflamação.

Além da inflamação, aumento da produção de moléculas de adesão e prejuízo na biodisponibilidade do NO, a hipóxia intermitente ainda está envolvida na hipercoagulabilidade sanguínea contribuindo para a aterosclerose. Distúrbios de coagulação têm sido descritas em pacientes apneicos e incluem altas concentrações de fibrinogênio pela manhã, aumento da agregabilidade e hiperativação de plaquetas e fibrinólise reduzida (30,31). Estudo realizado por Toukh e colaboradores em 2012 (32) avaliou o perfil hemostático de pacientes com AOS grave. Os resultados mostraram que paciente com AOS grave apresentaram níveis elevados de fibrinogênio e função de plaquetas aumentada indicando estado de hipercoagulação. Após o tratamento, observou-se redução em dois fatores relacionados à hipercoagulabilidade, a força do coágulo e o índice de coágulo.

À despeito destas evidências, detalhes sobre os mecanismos pelos quais a AOS promove a doença cardiovascular permanecem ainda muito desconhecidos. Além disto, a susceptibilidade aos desfechos cardiovasculares pode variar entre os pacientes com AOS. Diante da importância que a AOS tem para o desenvolvimento da DCV, é importante prosseguir na elucidação dos mecanismos bem como o de explorar estratégias para a estratificação do risco cardiovascular nos pacientes com AOS. Neste contexto, é necessário explorar potenciais biomarcadores na AOS.

1.2 Desafios na identificação de biomarcadores

Biomarcador é definido como uma característica objetivamente mensurada, acurada e reprodutível, que pode ser utilizada como indicador de processos biológicos normais, processos patológicos ou respostas decorrentes de uma intervenção terapêutica (33,34). Os biomarcadores tem diversas aplicabilidades na detecção de doenças e monitoramento do estado de saúde, sendo: uso como ferramenta diagnóstica na identificação de doenças ou condições anormais; uso para o estagiamento das doenças ou classificação de sua extensão; uso como indicador de prognóstico; uso para predizer e monitorar respostas clínicas a intervenções (33). Biomarcadores ideais devem seguir algumas premissas (tabela 1).

Tabela 1: Características de biomarcadores ideais (35).

Características
1) Acessível por técnicas não-invasivas,
2) Quantificação por técnicas de baixo custo,
3) Específico para a doença ou condição estudada,
4) Extrapolável de modelos animais para humanos,
5) Indicador precoce da doença antes de sua manifestação,
6) Permite a estratificação da doença,
7) Permite avaliar a resposta da doença a intervenções.
8) Alta sensibilidade e especificidade

Do exposto acima, biomarcadores ideais reúnem características muito difíceis de serem obtidas como diversos marcadores dosados na prática clínica. Isto em parte justifica porque existem poucos biomarcadores disponíveis e amplamente utilizados que realmente contribuem para a estratificação de risco de doenças.

Uma grande parte dos biomarcadores em desenvolvimento são baseados em estruturas proteicas que determinam grandes desafios para sua utilização. Alguns deles envolvem a complexidade das proteínas na maioria das amostras biológicas (em especial o

sangue), modificações pós-translacionais aleatórias a que estão sujeitas, baixa abundância de muitas proteínas de interesse no soro e plasma, dificuldade da elaboração de agentes de captura confiáveis e de alta-afinidade. Todos estes desafios tornam a elaboração de biomarcadores proteicos de alto custo, com alto dispêndio de tempo e de difícil execução. Oligonucleotídeos sintéticos complementares podem ser detectados com boa especificidade na maioria dos casos, são de baixa complexidade e sofrem poucos processos de modificações pós-processamento. Além disso, podem ser detectados e quantificados por métodos simples de amplificação, apresentam perfis de expressão específicos em alguns tecidos e tem sua sequência conservada em diferentes espécies e humanos. Tudo isso torna esses oligonucleotídeos biomarcadores não-invasivos potencialmente ideais que refletem diversos processos fisiopatológicos no organismo (35).

Vários biomarcadores têm sido descritos na AOS como forma de explorar vias pelas quais a AOS aumenta o risco cardiovascular. Os que foram mais estudados são a interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e proteína C reativa ultrasensível (hsCRP) (36). Em diversos estudos sobre biomarcadores na AOS, os resultados ainda são inconclusivos e poucos apresentam resultados bem desenhados em populações relevantes (36). Além disso, vários destes biomarcadores estão sujeitos a alterações decorrentes de comorbidades tais como obesidade (37,38), que representa um estado de inflamação subclínica e poderia interferir na hsCRP, e nem todos os estudos são controlados para eliminar este efeito (36). Dentro deste contexto, novos biomarcadores precisam ser investigados e os microRNAs (miRNAs), pequenos oligonucleotídeo de aproximadamente 22 bases nitrogenadas, parecem ser promissores especialmente no prognóstico da AOS (39).

1.3 MicroRNAs

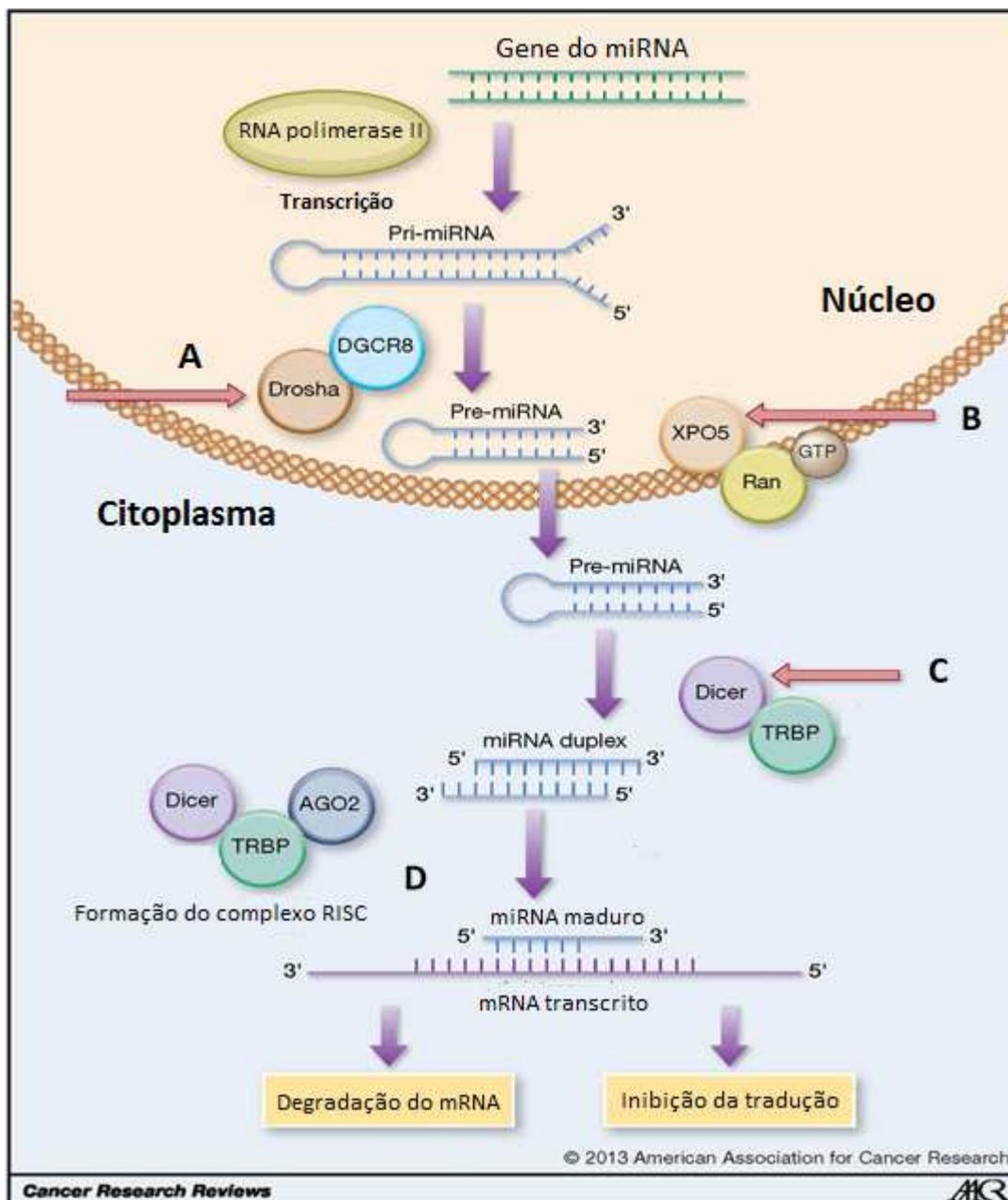
O advento do perfil transcricional usando *microarrays* de mRNA tem rendido importantes contribuições sobre a função dos diferentes tecidos, assim como a identificação de marcadores sistêmicos sob várias condições (40). Os miRNAs tem ganhado grande destaque pela regulação pós-transcricional (após a formação do mRNA a partir da cadeia de DNA, processo catalisado pela enzima RNA polimerase) a expressão de seus genes alvos (40,41).

Os miRNAs são moléculas de RNA de fita simples, (~22 nucleotídeos), não codificadores de proteínas, atuando principalmente na repressão da tradução de proteínas em plantas e animais, incluindo seres humanos. Foram inicialmente descritos por Lee e col. em 1993 (42) na espécie de nematódeo da família *Rhabditidae*, *Caenorhabditis elegans* e desde então o número de miRNAs descritos tem crescido exponencialmente de cerca de 150 em 2004 (43) a 2.578 na última versão do miRBase, *release 22.0* de março de 2018 (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences>). Os miRNAs regulam a atividade de mais de 30% do genoma animal (44) atuando como reguladores da maioria dos processos celulares fisiológicos e patológicos sendo descritos por participarem de um amplo espectro de doenças humanas incluindo o desenvolvimento, diferenciação, proliferação e morte celular, hematopoiese, secreção de insulina e outros hormônios, metabolismo, além de atuar na regulação de diversos tecidos (41,45–47).

1.3.1 Biogênese e mecanismo de ação dos microRNAs

Os miRNAs são inicialmente transcritos como miRNAs primários (pri-miRNA) pela ação da RNA polimerase II (Figura 1). O pri-miRNA é uma estrutura semelhante à um RNA codificante por conter estruturas como calda poli A e CAP 5'. Ele contém uma região de imperfeição de dupla-fita de RNA, conhecido como estrutura *hairpin* (~ 300 nucleotídeos) que dará origem ao miRNA maduro. O pri-miRNA sofre clivagem por uma enzima endonuclease do tipo 3 conhecida como Drosha e seu cofator DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*) (Figura 1, A), definindo uma das extremidades do miRNA maduro, e formando o miRNA precursor (pre-miRNA) que será transportado do núcleo para o citoplasma pela Exportina-5, dependente do cofator Ran-GTP (*Ran guanosine triphosphate*) (Figura 1, B). Seguindo o transporte para o citoplasma, os miRNAs são processados por outra endonuclease do tipo 3 conhecida como Dicer, que cliva a outra extremidade do miRNA, formando uma dupla fita de miRNA (Figura 1, C) (45,48). Finalmente, o miRNA é incorporado a um complexo de proteínas RISC (*RNA-induced silence complex*), mas apenas uma das fitas de miRNA permanece no complexo para controlar a expressão de genes ao nível pós-transcricional, e portanto, exercer seus efeitos regulatórios ligando-se à região 3' não traduzida (3'-UTR) dos mRNA alvo (45–47) (Figura 1, D).

Figura 1: Biogênese e mecanismo de ação dos miRNAs. Adaptado e traduzido de Mulrane et al., 2013 (49).



(A) No núcleo celular, os miRNAs são transcritos a partir de um gene pela ação da RNA polimerase II como miRNAs primários (pri-miRNA) que serão clivados por um complexo formado pela endonuclease Drosha e a proteína *Digeorge Syndrome Critical Region 8* (DGCR8) formando o miRNA precursor (pre-miRNA). (B) O pré-miRNA é transportado para o citoplasma pelo complexo Exportina-5/*Ras-related nuclear protein guanosin triphosphate* (XPO-5/RanGTP). (C) Seguindo o transporte para o citoplasma, os miRNAs são processados por outra endonuclease, Dicer/*trans-activation response RNA-binding protein* (TRBP), que cliva a outra extremidade do miRNA, formando uma dupla fita de miRNA. (D) miRNA é incorporado a um complexo de proteínas RISC [*RNA-induced silence complex* – Dicer/*argonaute 2* (AGO2)/TRBP], mas apenas uma das fitas da dupla fita de miRNA permanece no complexo para controlar a expressão de genes.

Esse mecanismo permite a redução dos níveis proteicos de seus genes alvo, raramente afetando o nível de expressão transcricional (50). A regulação pós-transcricional realizada pelos miRNAs na região 3`UTR depende do grau de complementaridade com o mRNA alvo, sendo que o pareamento completo com o alvo, mais comum em plantas, acarreta em degradação do mRNA, enquanto que o pareamento imperfeito, predominante nos mamíferos, leva a inibição da tradução proteica. Nesse caso, ocorre um pareamento completo apenas na região *seed*, entre o 2º e o 7º nucleotídeo do miRNA e seu mRNA alvo. A sequência *seed* é responsável pela especificidade do miRNA ao seu alvo e, portanto, a região que determina a efetivação do seu mecanismo de regulação negativa do gene (51). Devido ao fato dos miRNAs possuírem sequências pequenas e agirem sem a necessidade de pareamento completo, um único miRNA pode regular muitos mRNA alvos, podendo exercer funções totalmente diversas, além de cooperarem no controle de um único mRNA (50,52).

Os miRNAs são virtualmente produzidos por todos os tipos celulares. Alguns deles são altamente específicos a determinados tecidos e podem ser utilizados como biomarcadores (53–56) na detecção de alterações e injúria nestes tecidos (57). Essa detecção se torna mais simples quando o miRNA é liberado em algum fluido corporal (sangue, soro, plasma, saliva, urina) permitindo ser dosado de formas pouco invasivas. A presença de miRNAs na circulação sugere que essas moléculas devem cumprir funções biológicas importantes fora de seu compartimento celular em condições tanto fisiológicas quanto patológicas (58). Além do miRNA circulante refletir processos relevantes em tecidos ou órgãos remotos, eles também servirão como indicadores de doenças, envolvidos na regulação de inúmeros processos a longa distância. MiRNAs presentes no sangue periférico, incluindo soro, plasma, exossomos, corpos apoptóticos e células sanguíneas mononucleares, poderão funcionar como ferramentas rápidas de triagens populacionais e adicionar acurácia aos critérios de estratificação de doenças (59).

A alta estabilidade dos miRNAs, conferida principalmente por associação ao complexo RISC/Argonata2, permite sua detecção no soro ou plasma, mesmo em diferentes condições e também indica que eles são resistentes a digestão por ribonucleases séricas. A origem de miRNAs circulantes não associados a vesículas ainda não é clara, mas é associada a simples liberação passiva do conteúdo celular por necrose (59). MiRNAs também tem sido detectados em diferentes tipos de microvesículas incluindo corpos

apoptóticos, e exossomos (60–62). Os mecanismos celulares que regulam a biogênese do encapsulamento do miRNA em microvesículas ainda não foi totalmente esclarecido, mas a hipótese é de que ocorre por mecanismos específicos mediados por uma série de moléculas que atuam em uma rede regulatória, levando a formação e secreção dessas vesículas (59,63). Os miRNAs circulantes podem ainda ser detectados em células como macrófagos, monócito e megacariócitos. Alguns estudos mostram que miRNA encontrados em células sanguíneas também apresentam potencial para identificação de diversas doenças (64–67).

1.3.2 MicroRNAs na hipóxia crônica

Desde 2007, uma série de estudos demonstraram que miRNAs específicos estão envolvidos na resposta à hipóxia contribuindo para a repressão de genes biologicamente importantes (68–70). Diversos miRNAs já foram descritos como reguladores importantes em situações de hipóxia crônica. Seus níveis são rapidamente perturbados quando células e órgãos são expostos a hipóxia ou isquemia. Kulshreshtha e colaboradores em 2007 (71) mostraram evidências de que em culturas de células tumorais, alguns miRNAs como o miRNA-23, miRNA-24, miRNA-26, miRNA-27, miRNA-30 e miRNA-181 tem como alvos genes importantes da apoptose durante a hipóxia. Outro achado do mesmo estudo foi de que o miRNA-21, miRNA-23, miRNA-26, miRNA-106 e miRNA-107 contribuem para a interrupção do ciclo celular durante a privação de oxigênio. O mesmo grupo publicou estudo de revisão em 2008 (72), mostrando que diversos miRNA podem estar regulados positiva ou negativamente em situações de hipóxia (tabela 2).

Tabela 2: Compilação de miRNAs associados à hipóxia em células cancerígenas de acordo com alguns estudos. (adaptado de traduzido de Kulshreshtha, 2008) (72).

Regulados positivamente	Referência	Regulados negativamente	Referência
MiRNA-7	48	MiRNA-15b	35
MiRNA-15a	48	MiRNA-16	35
MiRNA-21	46	MiRNA-19a	48
MiRNA-23a	46	MiRNA-20a	35
MiRNA-23b	46	MiRNA-20b	35
MiRNA-24	46	MiRNA-26b	35
MiRNA-26a	46	MiRNA-29b	48
MiRNA-26b	46	MiRNA-30b	35
MiRNA-27a	46	MiRNA-30e-5p	48
MiRNA-30b	46, 48	MiRNA-101	48
MiRNA-30d	35	MiRNA-122a	48
MiRNA-93	46, 49	MiRNA-141	48
MiRNA-98	48	MiRNA-186	48
MiRNA-103	46	MiRNA-195	48
MiRNA-106a	46	MiRNA-197	48
MiRNA-107	46	MiRNA-224	35
MiRNA-125b	46	MiRNA-320	48
MiRNA-148a	48	MiRNA-374	48
MiRNA-148b	48	MiRNA-422b	48
MiRNA-151	35	MiRNA-424	48, 49
MiRNA-155	35	MiRNA-565	48
MiRNA-181a	46	Let-7-a	35
MiRNA-181b	35, 46	Let-7-c	35
MiRNA-181c	46	Let-7-d	35
MiRNA-188	35	Let-7-e	35
MiRNA-191	48	Let-7-f	35
MiRNA-192	46	Let-7-g	35
MiRNA-195	46		
MiRNA-200a	48		
MiRNA-210	35, 46, 48		
MiRNA-213	46		
MiRNA-214	48		
MiRNA-373	48		
MiRNA-429	48		
MiRNA-498	48		
MiRNA-563	48		
MiRNA-572	48		
MiRNA-628	48		
MiRNA-637	48		
Let-7-e	48		
Let-7-g	48		
Let-7-i	48		

Estudo citado: (68) Hua et al., 2006; (71) Kulshreshtha et al., 2007; (73) Hebert et al., 2007; (74) Donker et al., 2007. Let – nome referente a um dos primeiros miRNAs descritos. A nomenclatura foge à regra por motivos históricos.

O miRNA-21, miRNA-199a, miRNA-16, miRNA-126 e o miRNA-494 apresentaram papel crítico para a adaptação celular durante a hipóxia/isquemia. A expressão alterada de alguns miRNAs foi associada a algumas das mais importantes vias de sinalização do infarto e hipertrofia cardíaca incluindo o miRNA-208a, miRNA-208b, miRNA-499, miRNA-1, miRNA-133, miRNA-23a, miRNA199a, miRNA-29. Dentre os miRNAs envolvidos nestes eventos, o miRNA-1, miRNA-21, miRNA-24, miRNA-29, miRNA-92a, miRNA-126, miRNA-133, miRNA-320, miRNA199a, miRNA-208 e miRNA-195 estão especificamente associados à isquemia/reperfusão. Estes miRNAs tem sido associados a diversas funções incluindo programação celular, apoptose, expressão de canais de íons, regulação do ciclo celular, produção de eNOS (enzima responsável pela síntese de NO produzida pelas células endoteliais) e enzimas quinases de sobrevivência (75).

Um dos mais conhecidos miRNAs reguladores de processos biológicos na hipóxia é o miRNA-210. Vários estudos têm consistentemente demonstrado que sua indução é uma característica da resposta à hipóxia, tanto em células normais quanto em células cancerígenas (38,48,49). De modo interessante, o miRNA-210 é reconhecido como um importante alvo do fator induzido por hipóxia-1 (HIF-1) (71,78) e seu grau de expressão pode ser um reflexo da atividade do HIF-1 mesmo em circunstâncias de ativação normóxica deste fator de transcrição. Estudos mostram que o miRNA-210 está aumentado na maioria dos tumores com prognóstico desfavorável em pacientes com câncer, o que sugere que a superexpressão deste miRNA no tumor é a consequência direta da diminuição dos níveis de oxigênio no microambiente (70). Por outro lado, descobertas recentes mostraram que a suplementação com miRNA-210 no miocárdio aumenta a angiogênese na zona peri-infarto, reduz a apoptose e o tamanho do infarto resultando em melhora da função cardíaca após ligadura da artéria coronária (79). Dois de seus alvos incluem ephrin-A3 e proteína tirosina fosfatase nonreceptor tipo 1, que estão envolvidas na inibição da angiogênese e da apoptose, respectivamente. Um largo espectro de alvos do miRNA-210 foram identificados, com papéis no metabolismo mitocondrial relacionados ao estresse oxidativo, na angiogênese, no reparo do DNA e na sobrevivência celular (77).

O miRNA-21 é um importante regulador da apoptose em células do músculo cardíaco. Em ratos, sua expressão está reduzida de forma importante na região da isquemia e sua reposição reduz o tamanho do infarto por diminuir a apoptose celular (80). Alguns

pesquisadores também observaram redução da apoptose quando trataram cardiomiócitos isolados com miRNA-21 exógeno (81).

O miRNA-126 é um fator pró-angiogênico também relacionado a sobrevivência celular, específico das células endoteliais e altamente expresso pelo endotélio cardíaco. Ele limita os efeitos do gene Spred-1 que inibe a sinalização intracelular angiogênica, o que leva à formação de vasos sanguíneos por aumentar as propriedades angiogênicas de VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular) e do FGF (fator de crescimento do fibroblasto) (55,82). O miRNA-126 também regula a expressão da molécula de adesão de células vasculares 1 (VCAM-1), que permite a aderência de leucócitos às células endoteliais. A redução da expressão do miRNA-126 favorece a aderência de leucócitos ao endotélio levando à inflamação vascular (82). Um estudo que utilizou miócitos cardíacos de ratos cultivados sob condições de hipóxia (83) mostrou pela primeira vez que a expressão do miRNA-126 aumenta sob hipóxia o que poderia favorecer a ação do VEGF. A deleção do miRNA-126 na embriogênese de ratos resultou em defeitos no desenvolvimento vascular. Ratos deficientes em miRNA-126 mostraram atraso no brotamento angiogênico, hemorragia generalizada e letalidade embriogênica parcial (84).

As evidências de expressão de miRNA em um ambiente de hipóxia são baseadas, na maioria dos estudos, em modelos de hipoxemia crônica observado em processos envolvendo, por exemplo, neoplasias e doença coronariana crônica. Há evidências de que até mesmo a frequência da exposição à hipóxia intermitente apresenta efeitos metabólicos diferentes (85). A AOS é caracterizada pela hipóxia intermitente e, provavelmente, os mecanismos envolvidos em ambos processos sejam diferentes. Neste sentido, explorar processos regulados por miRNAs na hipóxia intermitente da AOS pode ser uma estratégia valiosa no melhor entendimento da fisiopatologia da AOS.

1.3.3 MicroRNAs na AOS

O estudo de análise dos miRNAs no contexto da AOS ainda é muito escasso. Em 2015, Sánchez-de-la-Torre e colaboradores (86) identificaram o perfil de miRNAs plasmáticos que poderia prever a redução da pressão arterial no tratamento da AOS com CPAP em 38 pacientes com hipertensão resistente. Utilizando *microarray* para avaliar a expressão de miRNAs circulantes específicos do sistema cardiovascular, pesquisadores mostraram que a combinação dos miRNA-378a-3p, miRNA-486-5p e o miRNA-100-5

teve um bom poder discriminatório para predizer a redução da pressão arterial ao tratamento com CPAP.

Outro estudo publicado recentemente por Khalyfa e colaboradores (60) investigou o papel dos miRNAs no efeito da hipóxia intermitente como causadora de disfunção de células endoteliais *in vitro*. Para isso os pesquisadores extraíram exossomos plasmáticos de 10 homens saudáveis submetidos a 3 situações: D0 – exposição ao ar ambiente; D4 - hipóxia intermitente por 4 dias, 6 horas/dia e D8 – 4 dias de recuperação. Os exossomos extraídos, que são vesículas extracelulares circulantes contendo miRNA que podem ser enviados a outras células, foram incubados juntamente com uma cultura de células endoteliais. Uma análise exploratória por *microarray* mostrou que 6 miRNAs (miR-4649-3P, miR-4436b-5p, miR-483-3p, miR-1202, miR-4505) apresentaram sua expressão alterada após 4 dias de hipóxia intermitente e essas alterações foram quase que completamente normalizadas após 4 dias de recuperação. Dessa forma, os pesquisadores encontraram aumento da expressão de moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) e redução da expressão da eNOS nas células endoteliais o que sugeriu aumento da permeabilidade e disfunção celular.

Em estudo semelhante publicado também em 2016, Khalyfa e colaboradores (61) avaliaram dados de 128 crianças divididas em portadoras de AOS com e sem disfunção endotelial, obesas com e sem disfunção endotelial e controles saudáveis para investigar como miRNAs de exossomos circulantes se diferenciam em relação ao perfil de função endotelial. O estudo mostrou que os exossomos plasmáticos de crianças com disfunção endotelial, tanto obesas quanto apneicas, induzem alterações estruturais e funcionais no endotélio vascular *in vitro* e *in vivo*. Entre os miRNAs exossomais diferentemente expressos, a expressão do miR-630 esteve reduzida e este se caracterizou, portanto, como um fator importante na disfunção endotelial. A restauração dos níveis do miR-630 reverteu perturbações na célula endotelial a níveis normais, mostrando que esse miRNA mediou um mecanismo que está seletivamente alterado em crianças com risco cardiovascular aumentado.

Li e colaboradores desenvolveram trabalhos (87,88) com o propósito de identificar miRNAs expressos de formas diferentes entre 3 indivíduos com AOS e 3 controles saudáveis. Eles identificaram 104 miRNAs com expressão diferenciada entre os dois grupos sendo 10 superexpressos e 94 com expressão reduzida. Utilizando análise de

bioinformática, uma rede de coexpressão regulatória foi elaborada envolvendo 23 destes miRNAs como miR-485-5p, miR-107, miR-574-5p, miR-127-3p, miR-199-3p e miR-139-3p (87). Em outra abordagem (88), Li et al., com dados de 52 indivíduos saudáveis e 64 com AOS, sugeriram que o miR-664a-3p apresenta potencial como biomarcador para aterosclerose por apresentar correlação com o aumento da espessura da camada íntima-média da carótida em pacientes com AOS.

À despeito destas evidências, os trabalhos que avaliaram o perfil de miRNAs na AOS apresentam diferenças metodológicas em relação ao presente estudo como: presença de co-morbidades como a hipertensão arterial (86), indivíduos saudáveis magros submetidos a hipóxia intermitente em ambiente controlado por relativo curto período de tempo (60), estudo em crianças (61), número irrisório de participantes (87) e diferenças significativas entre os grupos como idade e parâmetros metabólicos (88). Sendo assim, o presente estudo pretende abordar de forma sistematizada o potencial papel relativo da AOS na expressão dos miRNAs em adultos.

2 JUSTIFICATIVA

Com base na descrição dos estudos citados anteriormente, diversas evidências sugerem que a ação dos miRNAs é muito importante para a manutenção da homeostase sistêmica e local, uma vez que estão envolvidos especificamente na regulação de diversos processos celulares como proliferação, diferenciação, migração celular, inflamação e apoptose. Como consequência, os miRNAs podem contribuir diretamente para a fisiopatologia das DCV. Diante da alta prevalência da AOS, do frequente subdiagnóstico e por representar um potencial risco cardiovascular independente da obesidade (89), torna-se imperativo explorar potenciais marcadores que podem servir tanto para sugerir a presença da AOS em uma população como prever eventos cardiovasculares nestes pacientes. Em paralelo, propor a criação de alvos terapêuticos para reduzir o risco cardiovascular e pela ausência de estudos com este perfil metodológico torna o presente estudo relevante e com grande potencial clínico.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Principal

Identificar o perfil dos miRNAs com expressão diferenciada nos pacientes com diferentes gravidades da AOS, comparando estes dados a de um grupo controle pareado para idade e IMC e composição corporal.

3.2 Objetivo Específico

Correlacionar as alterações do padrão de expressão destes miRNAs com os marcadores de gravidade da AOS, sendo: índice de apneia/hipopneia por hora categorizada em 4 grupos, saturação mínima de O₂ e o percentual do tempo de saturação do O₂ <90%.

Hipóteses

- 1) O perfil de expressão dos miRNA é diferente nos indivíduos com AOS, particularmente nas formas mais graves, quando comparados aos indivíduos sem AOS.
- 2) As alterações do padrão de expressão dos miRNAs tem correlação com marcadores de gravidade da AOS.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Sujeitos do estudo

Todos os voluntários convidados a participar do estudo foram informados quanto à natureza, objetivo e riscos deste estudo e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido. Incluímos participantes do sexo masculino com idade entre 18 e 65 anos. Os critérios de exclusão foram: tabagismo atual ou história de tabagismo há menos de 1 ano, consumo de álcool maior que 4 vezes por semana, indivíduos com predominância de apneias centrais ou mistas, diabetes mellitus, hipertensão, uso crônico de medicações, diagnóstico de doenças neurológicas, insuficiência coronariana, insuficiência cardíaca descompensada, doença pulmonar crônica (obstrutiva ou restritiva), doença renal, IMC maior que 40 kg/m² e prática de atividade física regular. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, sob o número de protocolo CAAE: 26431314-8.0000.0068.

Recrutamos indivíduos com ou sem sintomas de AOS avaliados por questionário de Berlim (90) e Escala de sonolência de Epworth (91). O questionário de Berlim é utilizado para definir o risco de desenvolver AOS por avaliar sintomas e sinais que fazem parte do diagnóstico da mesma. Apresenta questões divididas em três categorias, sendo: características do ronco e pausas na respiração presenciadas, sonolência diurna excessiva, presença de hipertensão e obesidade que, em conjunto, determinam uma pontuação que define se paciente possui risco alto ou baixo para AOS. Alto risco para a AOS foi caracterizado quando pelo menos duas categorias fossem positivas (90). A Escala de sonolência de Epworth é uma escala subjetiva que avalia o grau de sonolência diurna do paciente. Ela apresenta 8 perguntas e para cada uma o paciente deve atribuir uma nota de 0 a 3 para indicar a chance de cochilar. O indivíduo foi considerado com alto grau de sonolência quando apresentasse pontuação ≥ 11 (91). Após esta avaliação, os indivíduos foram submetidos à polissonografia noturna (item a seguir) para diagnóstico da AOS ou exclusão deste diagnóstico no caso dos indivíduos controle.

4.2 Polissonografia

Todos os participantes incluídos neste estudo foram submetidos inicialmente à polissonografia noturna completa (PSG) realizada no Laboratório do Sono, InCor, FMUSP. Os exames foram feitos no aparelho EMBLA, utilizando os seguintes parâmetros eletrofisiológicos: eletroencefalograma (EEG): C3-A2, C4-A1, O1-A2, O2-A1; eletro-oculograma (EOG) (2 canais); eletromiograma (EMG) submentoniano e tibial anterior; sensor de ronco; fluxo aéreo (2 canais), medido por termistor oronasal e cânula de pressão nasal; cintas torácica e abdominal; eletrocardiograma (ECG); detector de posição; saturação de oxigênio e pulso. Os registros da polissonografia foram analisados conforme recomendações da *American Academy of Sleep Medicine*, manual versão 2.2 de 2015 (92).

A apneia foi definida como a redução $\geq 90\%$ do fluxo aéreo observada pelo termistor por mais que 10 segundos, sendo subclassificada como central ou obstrutiva baseada na presença ou ausência de esforço respiratório, respectivamente. Classificou-se um evento como apneia mista quando houve ausência de esforço respiratório no início do evento, seguido pelo surgimento de esforços respiratórios na segunda porção do evento. A hipopneia foi definida por uma redução do fluxo nasal observada pela cânula maior ou igual a 30% por mais que 10 segundos, seguida de queda da saturação de oxigênio $\geq 3\%$ ou seguida de microdespertar (93). O diagnóstico de AOS foi definido quando o indivíduo tivesse IAH ≥ 5 eventos/hora. Os indivíduos do grupo controle apresentam IAH < 5 eventos/hora, grupo AOS leve IAH ≥ 5 e < 15 eventos/hora, grupo AOS moderada IAH ≥ 15 e < 30 eventos/hora e grupo AOS grave IAH ≥ 30 eventos/hora.

4.3 Antropometria e avaliação clínica

Após o diagnóstico de AOS, os indivíduos foram submetidos à avaliação antropométrica onde foram registradas as medidas de altura, peso, circunferência da cintura, do quadril e do pescoço. O peso foi mensurado utilizando-se balança digital, marca Caumaq Ltda., de plataforma com precisão de 100 g. A altura foi obtida com estadiômetro acoplado à balança de precisão de 0,5 cm estando o indivíduo com o mínimo de roupas, pés unidos e a cabeça posicionada de modo que a parte inferior da órbita ocular estivesse no mesmo plano do orifício externo do ouvido (plano de Frankfurt). A leitura foi feita no milímetro mais próximo no momento em que o esquadro que acompanha a haste vertical

tocou a cabeça do indivíduo em inspiração e apneia forçada. A cintura foi aferida no ponto médio entre o último arco costal e a crista ilíaca. Já a o quadril foi aferido ao nível de maior protuberância posterior dos glúteos. Foram mensuradas com o indivíduo em posição ereta, abdome relaxado, braços estendidos lateralmente ao longo do corpo, pés um pouco afastados e peso igualmente distribuído entre os dois membros inferiores. A relação cintura-quadril foi calculada dividindo-se a média das medidas da cintura pela média das medidas do quadril. Todas as circunferências foram coletadas em triplicata com fita métrica flexível e não extensível comum com precisão de 1 mm. Todas as medidas anteriormente citadas foram aferidas seguindo-se protocolo padrão recomendado pela Organização Mundial da Saúde (94,95). A circunferência do pescoço foi mensurada na altura da cartilagem cricóidea (96).

Avaliamos o percentual de gordura corporal por impedância bioelétrica tetrapolar utilizando o monitor InBody modelo S10[®] (Biospace Co. Ltd. Factory, Korea) (Figura 2).

Figura 2: Montagem do monitor de impedância bioelétrica InBody S10[®]. Fonte: <http://uk.inbody.com/inbody-s10/>



Os indivíduos foram avaliados em posição supina, com os eletrodos adequadamente posicionados diretamente sobre a pele de acordo com o manual do equipamento. A medida foi realizada após jejum de 8 horas, bexiga vazia, o mínimo de vestimenta e nenhum objeto metálico próximo ao corpo. Os voluntários não praticaram nenhuma atividade física vigorosa 24 horas antes da avaliação.

Seguindo as recomendações das Diretrizes Americanas, (97) foram realizadas no mínimo duas medidas da pressão arterial com o paciente sentado após 5 minutos de repouso. Um intervalo mínimo de 1 minuto foi respeitado entre as medidas. A pressão arterial final foi a média das duas medidas. Se a diferença entre a 1ª e a 2ª medida for >5mmHg, medidas adicionais (até 5) foram realizadas e a média das múltiplas medidas foi considerada. Para diminuir o efeito de artefatos e limitações na medida da pressão arterial tais como o arredondamento do valor da pressão arterial, utilizou-se esfigmomanômetros digitais Omron (modelo HEM-742INT, Omron Dalian Co., Ltd; Dalian, China) com manguito adequado à circunferência do braço.

4.4 Amostras biológicas

Amostras de soro foram colhidas para dosagem do perfil lipídico, glicemia e marcador inflamatório proteína C reativa ultrasensível (hsCRP). Métodos de análise enzimáticos foram utilizados nas dosagens de glicose (kit comercial *Glucose HK Gen.3*, Cobas© Systems/Roche Diagnostics GmbH, Alemanha), colesterol total (kit comercial *Cholesterol Gen.2*, Cobas© Systems/Roche Diagnostics GmbH, Alemanha), triglicérides (kit comercial *Triglycerides*, Cobas© Systems/Roche Diagnostics GmbH, Alemanha), e HDL (kit comercial *HDL-Cholesterol Plus 3rd generation*, Cobas© Systems/Roche Diagnostics GmbH, Alemanha); métodos eletroquimioluminométricos foram utilizados nas dosagens de insulina (kit comercial *Insulin*, Elecsys and Cobas© Systems/Roche Diagnostics GmbH, Alemanha); imunoturbidimetria ultrasensível foi empregado na dosagem de hsCRP (kit comercial *C-Reactive Protein Gen.3*, Cobas© Systems/Roche Diagnostics GmbH, Alemanha); LDL e VLDL foram calculados por fórmula de Friedewald enquanto que o colesterol não-HDL foi calculado pela subtração do colesterol HDL do colesterol total. Além disso, sangue total foi colhido e utilizado para as análises dos miRNAs como descrito a seguir.

4.4.1 Análise de miRNAs

4.4.1.1 Coleta do sangue e extração do miRNA

A coleta de sangue foi feita utilizando-se o tubo PAXgene[®], (Becton Dickinson and Co., USA), com capacidade de 2,5 mL de sangue total seguindo-se as instruções de coleta e armazenamento do fabricante. Cada tubo PAXgene[®] de coleta de sangue periférico total contém 6,9 mL de uma solução que estabiliza e purifica o RNA total (incluindo os miRNAs). Essa solução apresenta um reagente que lisa as células do sangue e imediatamente estabiliza o miRNA intracelular para preservar o perfil da expressão gênica. Sabe-se que a estabilização do miRNA é crítica para confiáveis análises posteriores da expressão gênica. Sem a estabilização, a degradação do miRNA e a expressão de transcritos podem ocorrer imediatamente depois de o sangue ser coletado. Amostras de sangue coletadas no tubo PAXgene[®] pode ser seguramente estocado ou transportado em temperatura ambiente 15 a 25°C por até 72 horas, de 2 a 8°C por até 5 dias, ou de -20 a -70°C por pelo menos 50 meses sem mostrar nenhuma mudança significativa na integridade do miRNA ou mudanças nos níveis dos transcritos.

Cada amostra de sangue coletada deveria conter uma concentração mínima de 25 ng/μl de miRNA extraído dos leucócitos sanguíneos (monócitos, neutrófilos, células T, células B) e megacariócitos. Utilizou-se para extração do miRNA total o PAXgene Blood miRNA Kit (Qiagen, USA). A concentração das amostras de miRNA total foi quantificada usando o espectrofotômetro Nanodrop[®] (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

A análise da expressão dos miRNAs foi feita em 2 etapas: 1) perfil de expressão da amostra por análise de *microarray* e 2) validação da expressão dos miRNAs diferentemente expressos na 1ª etapa por técnica de RT-qPCR (*real time quantitative polymerase chain reaction*).

4.4.1.2 1ª etapa: análise de expressão dos miRNAs por *microarray*

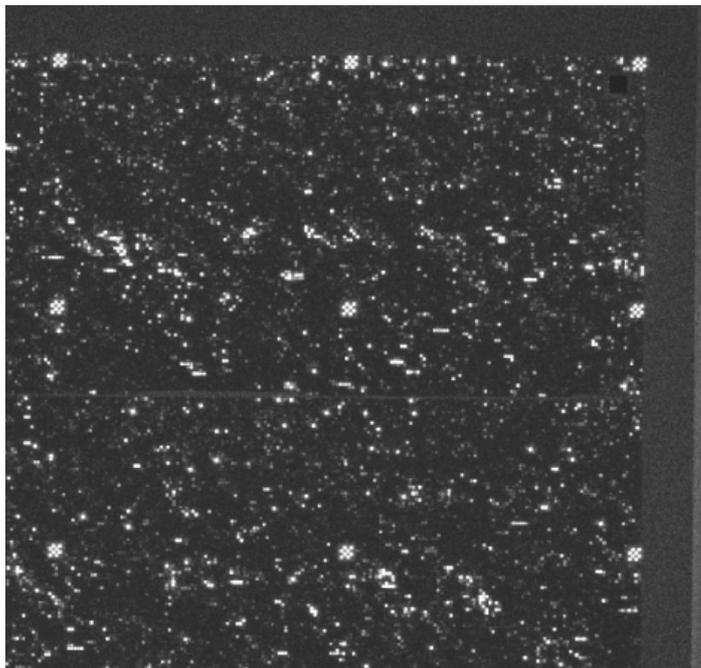
Para a análise de *microarray* foi feita uma subamostragem na qual selecionou-se 3 indivíduos de cada um dos 3 grupos com AOS e 3 indivíduos do grupo controle. A seleção foi feita de modo que as médias de IMC e idade das subamostras fossem pareadas entre os grupos. Portanto, os 3 indivíduos selecionados de cada grupo apresentam características

estatisticamente semelhantes, totalizando 12 indivíduos, que também eram representativos do restante dos indivíduos de cada grupo.

A análise do miRNA por *microarray* foi feita a partir de 2,5 mL de sangue total dos 12 indivíduos da subamostra utilizando o *Affymetrix® GeneChip® miRNA Array* versão 4.0 (Thermo Fisher Scientific Inc, USA) que apresenta probes de 2.578 miRNAs maduros de humanos. No *chip* cada probe consiste de um nucleotídeo modificado quimicamente que codifica segmentos complementares ao miRNA alvo e um segmento espaçador de propilenoglicol para estender o segmento codificante a partir do substrato. O *microarray* abrange todos os miRNAs transcritos disponíveis na última versão do sistema *Sanger miRBase (Release 21.0)*.

Resumidamente, realizamos todas as etapas de preparação da amostra utilizando kit de acordo com instruções do fabricante. Paralelamente a esta preparação, executou-se o ELOSA para confirmar a reação de marcação da fita de miRNA com a calda poli-A e a *Biotin-labeled 3 DNA*. Após a confirmação da reação, a amostra foi inserida no *chip* que vai para o forno de hibridização *overnight*. No segundo dia de experimentos foi feita a etapa de lavagem e estabilização utilizando o equipamento *GeneChip® Fluidics Station 450* e, em seguida, a leitura do *array* foi executada utilizando-se o equipamento *GeneChip® Scanner 3000 7G*. Na etapa de leitura ocorreu o escaneamento do *microarray* e a geração de uma imagem da fluorescência formada por cada miRNA ligado ao seu nucleotídeo correspondente. A intensidade do brilho da fluorescência determina uma maior ou menor expressão do miRNA (Figura 3).

Figura 3: Fragmento da imagem gerada após leitura do chip microarray.



Foram analisadas as expressões de miRNAs relacionados a hipóxia, aumento da atividade simpática, instabilidade da pressão arterial, disfunção endotelial, angiogênese, desequilíbrio metabólico, inflamação, apoptose, entre outros envolvidos na fisiopatologia da AOS. A expressão dos genes e confirmação dos miRNAs encontrados com expressão diferenciada na etapa do *microarray* foram realizados pela técnica de Transcriptase Reversa e Reação quantitativa em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR).

Os dados gerados após a etapa de escaneamento foram analisados inicialmente pelo *software Expression Console* versão 1.4.1.46, de fornecido gratuitamente pela empresa *Affymetrix*. Este *software* subtrai inicialmente o *background* normalizando os sinais para balancear as intensidades dos fluoróforos de forma que a razão de expressão diferencial pudesse ser calculada. Em seguida os dados foram transferidos para outro *software* também fornecido pela mesma empresa, o *Transcriptome Analysis Console* (TAC) para a obtenção dos valores de expressão de cada miRNA em cada uma das amostras expressos em sinal (\log_2). A análise feita neste *software* foi a *Gene Level Differential Expression Analysis* para *microarray* miRNA 4.0.

A avaliação da diferença de expressão dos miRNAs entre os grupos do estudo foi feita pelo cruzamento de todas as possíveis combinações entre eles, sendo controle vs. AOS leve, controle vs. AOS moderada, controle vs. AOS grave; AOS leve vs. AOS

moderada, AOS leve vs. AOS grave e AOS moderada vs. AOS grave. Os parâmetros e seus pontos de corte utilizados foram ANOVA *one way* não-pareada com $p < 0,01$; *fold change* >1 ou <-1 ; *false Discovery rate* (FDR) $< 0,35$. *Fold change* determina a dimensão da expressão de um miRNA e se esta aumentou (se o valor é positivo) ou diminuiu (se o valor é negativo) em relação à um grupo de comparação. Já o FDR é definido como a proporção de falsos positivos entre os dados considerados significantes (98). Por exemplo, se o FDR foi de 0,10, aceita-se 10% de resultados falsos positivos.

Predição dos genes-alvo por análise *in Silico*:

A predição dos genes-alvo dos miRNAs foi realizada inicialmente com uma busca para cada miRNA por meio do site *miRWalk 2.0* (99) a fim de encontrar os genes preditos como alvo para cada um dos miRNAs. Das 12 bases de dados (miRWalk, MicroT4, miRanda, miRBridge, miRDB, miRMap, miRNAMap, PICTAR2, PITA, RNA22, RNA hybrid, Targetscan) de identificação de alvos para miRNAs disponíveis no *miRWalk*, o alvo deveria ser previsto por pelo menos 8 delas, sendo uma delas obrigatoriamente o Targetscan. A lista de genes gerada foi então submetida a base de dados biológicos DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) *Bioinformatics resources 6.7* que por meio de uma análise funcional (*Functional Annotation Chart*) utilizando a base de dados KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) identificou os mais relevantes termos biológicos ou vias de sinalização associados a lista de genes.

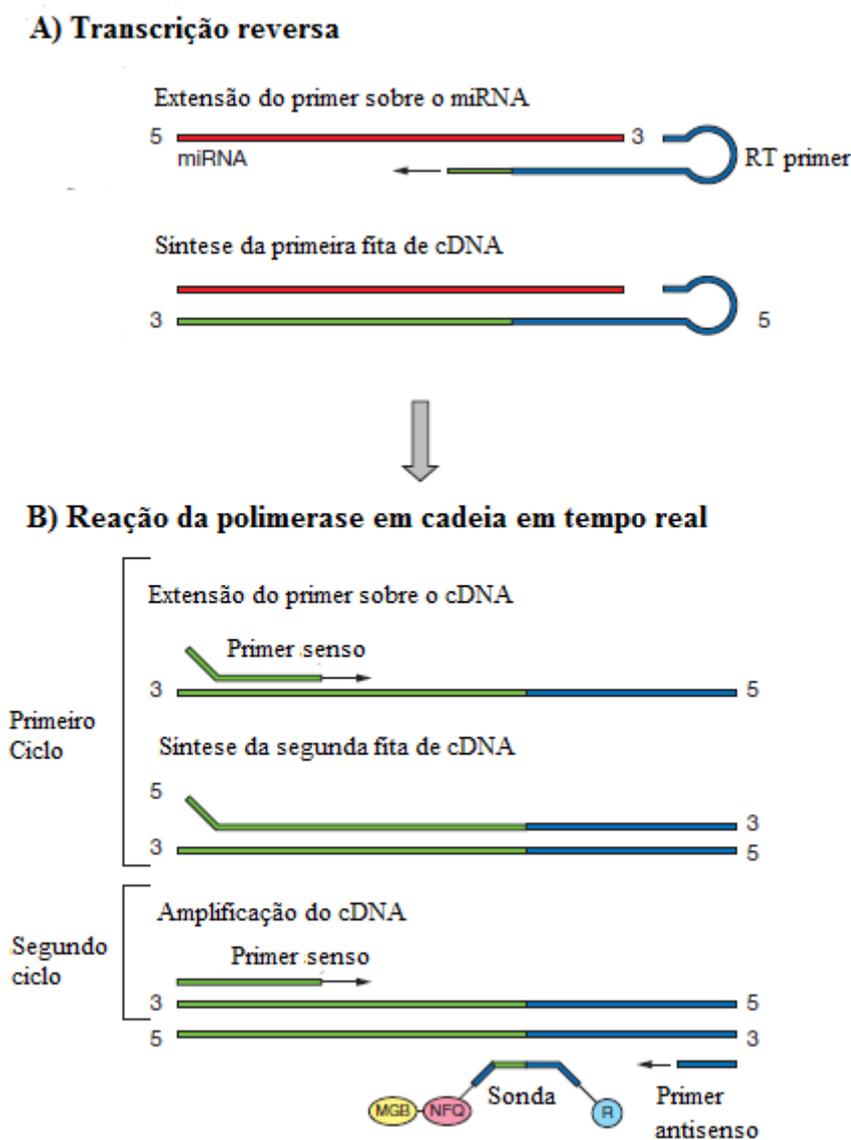
4.4.1.3 2ª etapa: validação da expressão dos miRNAs por RT-qPCR

Após a avaliação da expressão por *microarray*, os miRNAs foram selecionados para a confirmação da expressão. O critério para decisão de quais seriam confirmados foi baseado na quantidade de vias de sinalização encontradas na análise *in Silico* (item anterior) que fazem parte da fisiopatologia da AOS.

RT-qPCR permite monitorar o progresso da reação em cadeia da polimerase em tempo real, sendo que os dados da amplificação são coletados ao longo do processo e não somente no final da reação. Quanto maior o número de cópias do ácido nucléico alvo no início da reação, mais precocemente observa-se o aumento da fluorescência. Os sistemas de RT-qPCR evoluíram pela introdução de sondas ou *probes* ligados a substâncias fluorogênicas que utilizam a atividade da enzima *Taq DNA polymerase*. A primeira etapa

para execução da reação é a transcrição reversa para geração do DNA complementar (cDNA) a partir da amostra contendo miRNAs (figura 4, A). Em seguida, o cDNA formado foi usado na reação da reação em cadeia da polimerase para amplificação e quantificação (figura 4, B).

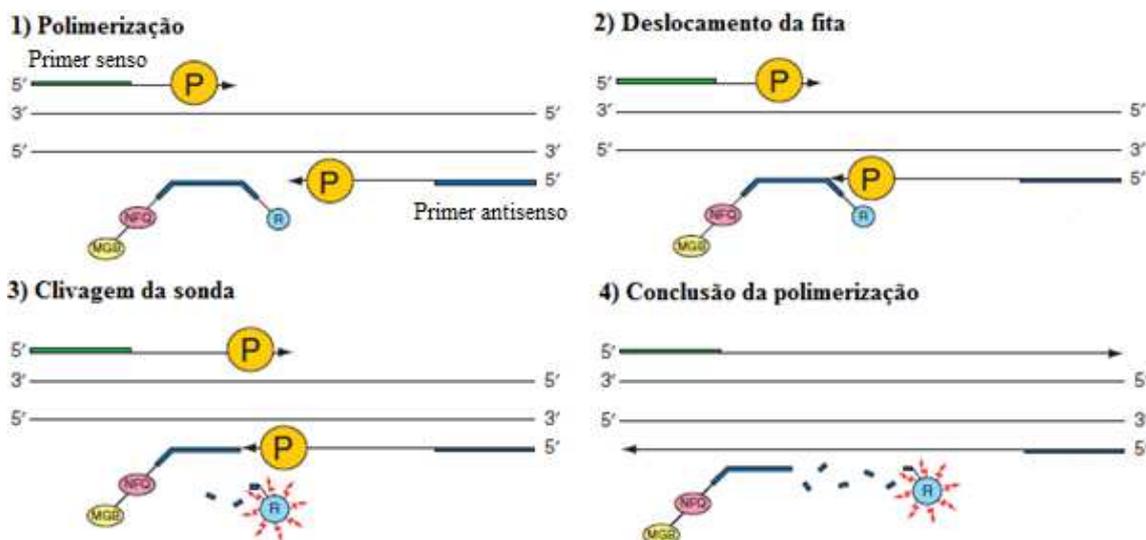
Figura 4: Esquema da reação química da transcriptase reversa e reação em cadeia da polimerase em tempo real.



Traduzido e adaptado de *Taqman® Small RNA Assays Protocol*. A – Transcrição reversa do miRNA em DNA complementar (cDNA) a partir do *primer* de transcrição reversa (RT *primer*) e B – Reação em cadeia da polimerase em tempo real para amplificação do DNA alvo e ação da sonda ligada ao corante repórter (R) na porção 5' e do *quencher* não emissor de fluorescência (NFQ) e da molécula *minor groove binder* (MGB).

A reação química *Taqman*[®] utiliza *probes* fluorogênicos para a detecção de um produto específico da RT-qPCR a medida que ele se acumula. O processo ocorre da seguinte maneira (figura 5): 1) Uma sonda de oligonucleotídeo é construída contendo um corante (*dye*) repórter fluorescente ligado na terminação 5' e um corante *quencher* na terminação 3' da molécula. Enquanto a sonda está intacta, a proximidade entre o *quencher* e o repórter reduz drasticamente a fluorescência emitida pelo repórter pela transferência de energia de ressonância de fluorescência através do espaço. 2) Se a sequência alvo está presente, a sonda se ligará paralelamente a ela enquanto a nuclease *Taq DNA polymerase* atua na extremidade 5' extendendo o *primer* e iniciando a formação da nova fita do DNA alvo. 3) A clivagem da sonda ocorre no momento em que a nuclease alcança a extremidade da sonda onde se encontra o repórter separando-o do *quencher* e permitindo a emissão do sinal da fluorescência. 4) Além disso, a nuclease remove a sonda da fita alvo, permitindo a continuidade da extensão do *primer* até o fim da fita *template*. Moléculas repórteres adicionais são clivadas de suas respectivas sondas a cada ciclo, resultando num aumento da intensidade da fluorescência proporcional à quantidade de cópias produzidas (figura 5).

Figura 5: Etapas da reação em cadeia da polimerase em tempo real e sua influência sobre a emissão de fluorescência.



Traduzido e adaptado de *Taqman[®] Small RNA Assays Protocol*. 1) Uma sonda de oligonucleotídeo é construída contendo um corante repórter (R) e um corante *quencher* (NFQ) na terminação 3'. Enquanto a sonda está intacta, a proximidade entre o *quencher* e o repórter reduz drasticamente a fluorescência emitida pelo repórter. 2) Se a sequência alvo está presente, a sonda se ligará paralelamente a ela enquanto a polymerase (P) atua na extremidade 5' estendendo o *primer* e iniciando a formação da nova fita do DNA alvo. 3) A clivagem da sonda ocorre no momento em que a nuclease alcança a extremidade da sonda onde se encontra o repórter separando-o do *quencher* e permitindo a emissão do sinal da fluorescência. 4) A nuclease remove a sonda da fita alvo, permitindo a continuidade da extensão do *primer* até o fim da fita *template* e impedindo a sonda de obstruir a reação. MGB – *minor groove binder*, molécula que atua na estabilidade do *quencher* a altas temperaturas.

A síntese do cDNA (*complementary deoxyribonucleic acid*) pela transcrição reversa é necessária para a realização da RT-qPCR. Este foi sintetizado a partir do RNA total de uma alíquota de cada amostra diluída até a concentração de 10 ng/ μ L utilizando *primers* específicos para cada miRNA. A reação foi feita seguindo-se o protocolo *Taqman microRNA Assay* (Applied Biosystems, CA, USA) com 1 μ L/reação da amostra a 10 ng/ μ L adicionado a *master mix* contendo dNTPs (*deoxynucleotides phosphate*) 100 mM (0,15 μ L/reação), *multiscribe reverse transcriptase* 50U/mL (1,0 μ L/reação), *reverse transcription buffer* 0X (1,5 μ L/reação) – tampão para a enzima, inibidor de RNase 20U/ μ L (0,19 μ L/reação), água livre de nuclease (4,16 μ L/reação) e o RT primer (3,0 μ L/reação) contendo volume final total de 15 μ L/reação. A reação reversa para formação do cDNA foi realizada em um termociclador inicialmente a 16 °C por 30 minutos, 42 °C

por 30 minutos, 85 °C por 5 minutos e, por fim, as amostras foram mantidas a 4 °C até a estocagem a -20 °C.

A próxima etapa foi a RT-qPCR para validação da expressão dos miRNAs. Inicialmente, para um volume final de 20 µL/reação, foi feita uma *mix* contendo 10 µL/reação de *Taqman*[®] 2X Universal PCR máster mix II (no AmpErase UNG), 1,0 µL/reação de *Taqman*[®] 20X microRNA Assay, 7,67 µL/reação de água livre de nucleasse e 1,33 µL/reação do produto resultante da etapa anterior. O corante repórter utilizado na reação foi o FAM[™] dye ligado a terminação 5' da sonda e um *nonfluorescent quencher* na terminação 3', que por não emitir fluorescência, permite a detecção mais acurada da fluorescência do repórter. Associado ao *quencher* está a molécula *minor groove binder*, que permite o desenho de sondas menores que suportam temperaturas maiores (figura 7). O experimento foi feito em duplicata para cada amostra adicionada a uma placa tipo *fast* com 96 poços de 1,0 mL (*MicroAmp*[™] Fast Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems) e a reação foi realizada no equipamento 7500 *fast Real-Time PCR System* que utilizou *software* de análise v. 2.0.6. Os parâmetros de incubação para a reação foram: 50 °C por 2 minutos, ativação enzimática a 95 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de PCR a 95 °C por 15 segundos (desnaturação) e 60 °C por 60 segundos (anelamento e amplificação). Utilizou-se o mesmo *software* para leitura do sinal de fluorescência e cálculo do Ct (*threshold cycle*), que corresponde ao número de ciclos de amplificação necessários para que o sinal de fluorescência ultrapasse o limiar de detecção da técnica. O Ct é inversamente proporcional à quantidade de ácido nucléico na amostra. Isso significa que quanto maior o número de ciclos necessários para a detecção do miRNA, menor sua quantidade na amostra. O valor de Ct de cada amostra foi comparado ao valor de expressão do controle interno U6 snRNA (*small nuclear RNA*) para cálculo do Δ Ct. Mudanças na expressão dos miRNAs foram calculadas pela diferença do Δ Ct entre os grupos ($\Delta\Delta$ Ct). A expressão relativa dos miRNAs foi calculada utilizando-se o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (100). Este método proposto por Livak & Schmittgen, 2001 é uma maneira conveniente de analisar mudanças relativas na expressão gênica em experimentos de RT-qPCR comparando a um grupo de referência. Os dados foram, então apresentados em percentual de expressão em relação ao grupo de referência.

Os resultados obtidos pela técnica de RT-qPCR são sensíveis a variações experimentais que podem surgir nas diferentes etapas do processo. A confiabilidade dos

resultados demanda uma normalização apropriada para minimizar variações que podem mascarar ou exagerar mudanças de expressão significativas. A utilização de genes como controles endógenos, que são considerados invariáveis na comparação entre indivíduos doentes e saudáveis, é a forma mais comum de normalização dos dados da expressão de miRNAs provenientes da RT-qPCR (101,102). A escolha do controle foi feita baseada em diversos estudos que também utilizaram o U6 snRNA (35,56,103–105), incluindo um estudo que avaliou células endoteliais sobre o estresse de hipóxia/reoxigenação (106).

4.5 Análise estatística

Todas as análises foram feitas sem o conhecimento do grupo ao qual o paciente foi alocado.

Os dados foram analisados inicialmente de forma descritiva (variáveis antropométricas, dados da polissonografia, exames laboratoriais, análise da função endotelial, percentual de expressão dos miRNAs). As variáveis categóricas foram expressas em n (%) e a comparação entre os grupos do estudo foi feita usando teste qui-quadrado de Pearson (χ^2) ou exato de Fisher quando adequado. O teste de Shapiro-Wilk foi aplicado na avaliação da normalidade das variáveis contínuas. Estas foram representadas por média \pm desvio padrão, ou erro padrão para a expressão dos miRNAs, ou mediana e intervalo interquartil de acordo com o tipo de distribuição dos dados. Para a comparação dos 4 grupos (grupo controle sem AOS, AOS leve, AOS moderada e AOS grave) utilizamos o teste ANOVA *one way* não-pareada ou Kruskal-Wallis de acordo com a distribuição da variável.

Na análise por *microarray* também utilizamos o teste ANOVA *oneway* não-pareada, com $p < 0,01$; *fold change* > 1 ou < -1 ; *false Discovery rate* (FDR) $< 0,35$. Os parâmetros utilizados para avaliar a importância de cada via enriquecida obtida na análise *in Silico* foram o *fold enrichment*, *false discovery rate* (FDR), valor de P pelo teste exato de *Fischer* e a correção de Bonferroni.

Utilizou-se o teste correlação de Spearman, para comparar o grau de expressão de cada miRNAs com marcadores de gravidade da AOS: IAH, saturação mínima e tempo de saturação $< 90\%$. Análise de regressão linear foi empregada para avaliar a associação multivariada entre a expressão dos miRNAs e a AOS representada em 4 grupos, sendo: grupo controle (IAH < 5 eventos/hora), AOS leve (IAH entre 5 e 14,9 eventos/hora), AOS moderada (IAH entre 15 e 29,9 eventos/hora) e AOS grave (IAH ≥ 30 eventos/hora) com as covariáveis idade, IMC e raça. Os miRNAs que apresentaram valor de $p < 0,2$ na comparação entre 4 grupos (tabela 6) foram utilizados como variáveis dependentes na análise de regressão linear. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Todas as análises foram feitas utilizando-se *software* IBM[®] SPSS, v. 25.0 (SPSS, Chicago, Illinois, USA).

5 RESULTADOS

O recrutamento de pacientes foi realizado entre Setembro de 2014 e Julho de 2016. Foram convocados 119 indivíduos do sexo masculino para avaliação dos sintomas de AOS e critérios de inclusão/exclusão. Destes, 71 foram excluídos por recusa ou por apresentarem algum critério de exclusão. Detalhes no processo de recrutamento e causas de exclusões estão reportados na figura 6. Os 48 indivíduos restantes foram incluídos. Três pacientes que apresentaram baixo risco para a AOS, mas na PSG tinham IAH ≥ 5 eventos/h foram incluídos no grupo AOS leve.

Os indivíduos em geral eram jovens e com excesso de peso pela classificação do IMC. Não foram observadas diferenças entre os grupos quanto aos parâmetros antropométricos e de composição corporal (IMC, % gordura corporal, gordura visceral, circunferência da cintura, relação cintura/quadril, circunferência do pescoço), medidas da pressão arterial, risco para AOS assim como não houve diferenças entre os parâmetros bioquímicos (Glicose, colesterol total, HDL, LDL, hsCRP), exceto por um aumento significativo nos níveis de triglicérides (Tabela 3).

Na avaliação dos parâmetros polissonográficos (IAH, saturação média, saturação mínima e % de tempo de saturação menor que 90%) observou-se diferenças esperadas entre os grupos. O risco para AOS avaliado pelo questionário de Berlim não mostrou diferença entre os grupos do estudo. (Tabela 3).

Figura 6: Fluxograma de inclusão de pacientes. IMC – índice de massa corporal. CPAP – pressão contínua positiva das vias aéreas. AOS – apneia obstrutiva do sono.

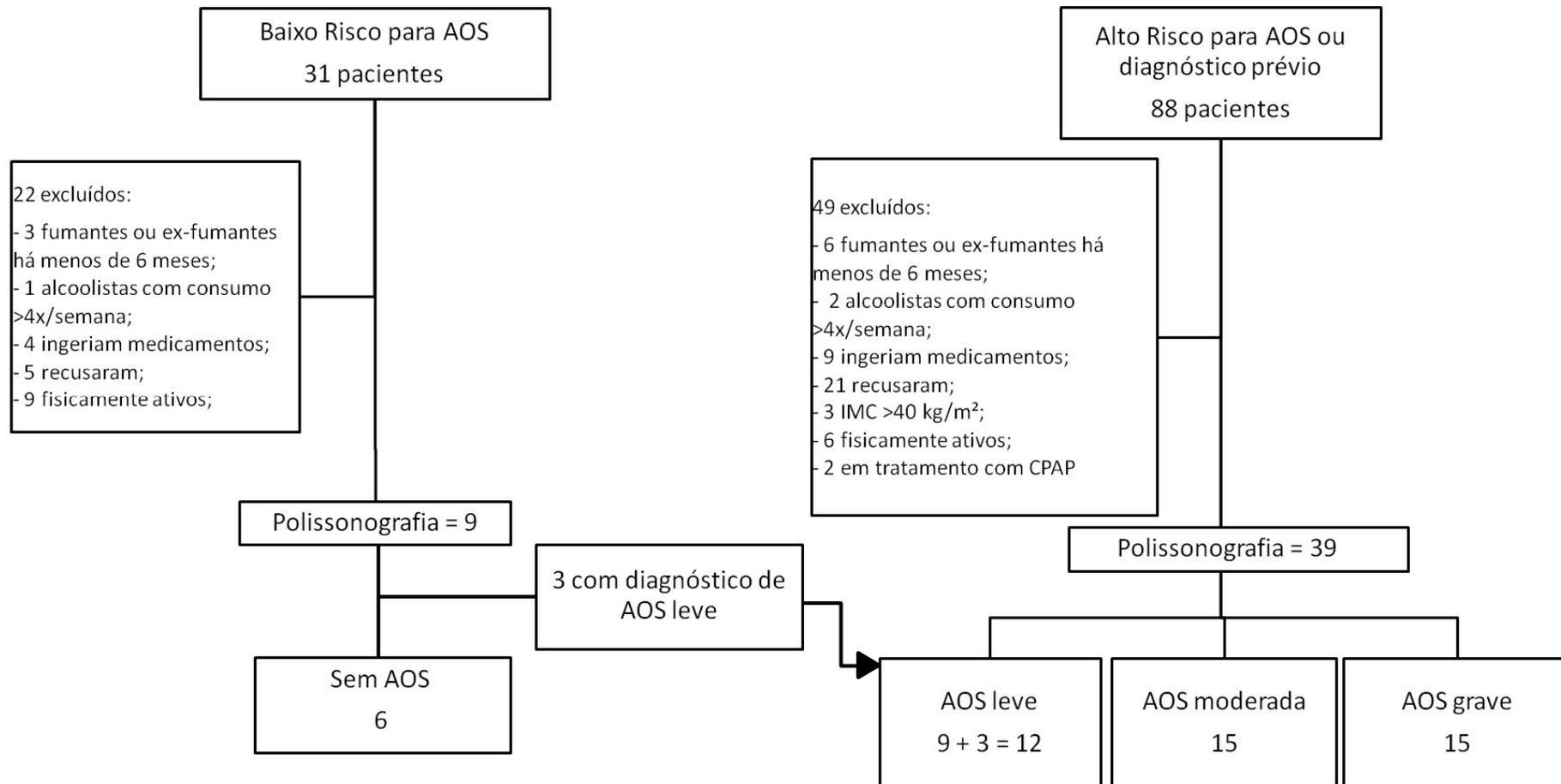


Tabela 3: Características dos sujeitos de acordo com os grupos de estudo.

Variáveis	Total n=48	Controle n=6	Leve n=12	Moderada n=15	Grave N=15	P
Idade (anos)*	35 (31-41)	31 (28-37)	35 (31-39)	35 (29-44)	36 (33-46)	0,37
Raça (n, %)						
Caucasiana	30 (62,5)	4 (66,7)	9 (75,0)	10 (66,7)	7 (46,7)	
Negra	5 (10,4)	1 (16,7)	1 (8,3)	2 (13,3)	1 (6,7)	0,47
Parda	11 (22,9)	1 (16,7)	1 (8,3)	2 (13,3)	7 (46,7)	
Amarela	2 (4,2)	0 (0,0)	1 (8,3)	1 (6,7)	0 (0,0)	
IMC (kg/m²)	30,7 ± 3,6	31,8 ± 2,5	30,9 ± 4,4	30,5 ± 4,3	30,4 ± 2,7	0,88
Gordura corporal (%)*	30 (24-35)	36 (29-39)	25 (23-30)	29 (25-36)	30 (23-34)	0,19
Gordura visceral (cm²)	123,6 ± 35,6	142,2 ± 27,7	120,3 ± 45,7	123,5 ± 37,1	118,8 ± 28,0	0,59
C. cintura (cm)*	103 (99-112)	109 (103-115)	101 (99-110)	102 (92-114)	103 (99-112)	0,51
RCQ	0,96 ± 0,05	0,98 ± 0,03	0,95 ± 0,04	0,96 ± 0,05	0,96 ± 0,05	0,81
C. pescoço (cm)*	41,5 (40,0-43,0)	41 (39-43)	42 (39-45)	41 (40-43)	42 (41-43)	0,71
PAS (mmHg)	126 ± 8	125 ± 9	125 ± 8	128 ± 10	124 ± 6	0,44
PAD (mmHg)	82 ± 8	81 ± 8	80 ± 6	85 ± 9	81 ± 7	0,35
Glicose (mg/dL)*	91 (87-95)	89 (85-95)	94 (87-102)	91 (86-94)	89 (86-97)	0,49
Insulina (mU/L)*	13 (11-21)	10 (5-16)	14 (12-25)	15 (10-24)	12 (11-18)	0,33
HDL (mg/dL)	40 ± 8	45 ± 6	38 ± 8	41 ± 8	40 ± 10	0,36
LDL (mg/dL)	123 ± 22	110 ± 15	121 ± 24	123 ± 24	129 ± 22	0,37
Triglicérides (mg/dL)*	130 (99-184)	74 (47-122)	145 (127-223) ^a	136 (84-186)	118 (98-223)	0,04
hsCRP (mg/dL)*	0,25 (0,09-0,36)	0,31 (0,22-0,66)	0,12 (0,08-0,26)	0,21 (0,09-0,34)	0,27 (0,05-0,37)	0,22
Parâmetros do sono						
Alto risco AOS (n, %)	27 (56)	2 (33)	6 (50)	9 (60)	10 (66,7)	0,53
Score de Epworth*	9 (5-13)	6 (5-11)	9 (4-10)	6 (5-12)	14 (10-18) ^b	0,006
Epworth ≥ 11 ¥	19 (39,6)	1 (16,7)	2 (16,7)	5 (33,3)	11 (73,3)	0,01
IAH (eventos/h)*	20,7 (9,8-31,8)	4,2 (2,8-4,8)	9,8 (8,3-11,2) ^{a,c,d}	21,5 (18,1-28,2) ^{a,b,d}	37,0 (31,8-79,0) ^{a,b,c}	<0,001
Eficiência do sono %*	90 (80-94)	89 (80-94)	91 (79-96)	91 (81-95)	86 (77-92)	0,36
TTS (horas)	6,6 ± 0,8	6,8 ± 0,9	6,4 ± 0,8	6,8 ± 0,7	6,4 ± 0,7	0,45
N1 (% TTS)*	6,5 (3,0-10,8)	5,5 (1,8-6,3)	4,0 (3,0-9,3)	7,0 (3,0-11,0)	10,0 (5,0-14,0)	0,07
N2 (% TTS)	58,5 ± 9,8	54,0 ± 3,6	58,4 ± 13,2	57,6 ± 7,1	61,3 ± 10,7	0,47
N3 (% TTS)*	12,0 (14,5-20,0)	21,0 (16,5-23,8)	16,0 (10,5-22,3)	14,0 (12,0-18,0)	13,0 (8,0-20,0)	0,24
REM (% TTS)	15,9 ± 5,7	19,3 ± 2,0	16,3 ± 5,6	16,8 ± 5,2	13,3 ± 6,5	0,13
Saturação média (%)*¥	94 (93-95)	95 (94-96)	94 (93-95)	93 (93-95)	93 (92-94)	0,009
Saturação mínima (%)*	85 (79-89)	91 (89-92)	88 (86-89) ^a	86 (82-89)	77 (73-82) ^{a,b,c}	<0,001
% Tempo saturação >90%*	0,0 (0,0-3,8)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-3,0)	8,0 (3,0-15,0) ^{a,b,c}	<0,001

IMC – índice de massa corporal. RCQ – relação cintura/quadril. PAS – pressão arterial sistólica. PAD – pressão arterial diastólica. AOS – apneia obstrutiva do sono. HDL – lipoproteína de alta densidade. LDL – lipoproteína de baixa densidade. hsCRP – proteína C reativa ultrasensível. IAH – índice de apneias/hipopneias por hora. N1 – fase 1 do sono; N2 – fase 2 do sono; N3 – fase 3 do sono. REM – movimentos rápidos dos olhos ou fase 4 do sono. TTS – tempo total de sono. * Dados apresentados em mediana (intervalo interquartil). Os demais dados em média ± desvio padrão ou n (%). A variável Alto risco AOS foi mensurada utilizando-se questionário de Berlim. a - diferente do grupo controle; b – diferente do grupo AOS leve; c – diferente do grupo AOS moderada; c – diferente do grupo AOS grave. ¥ Não foi possível identificar as diferenças.

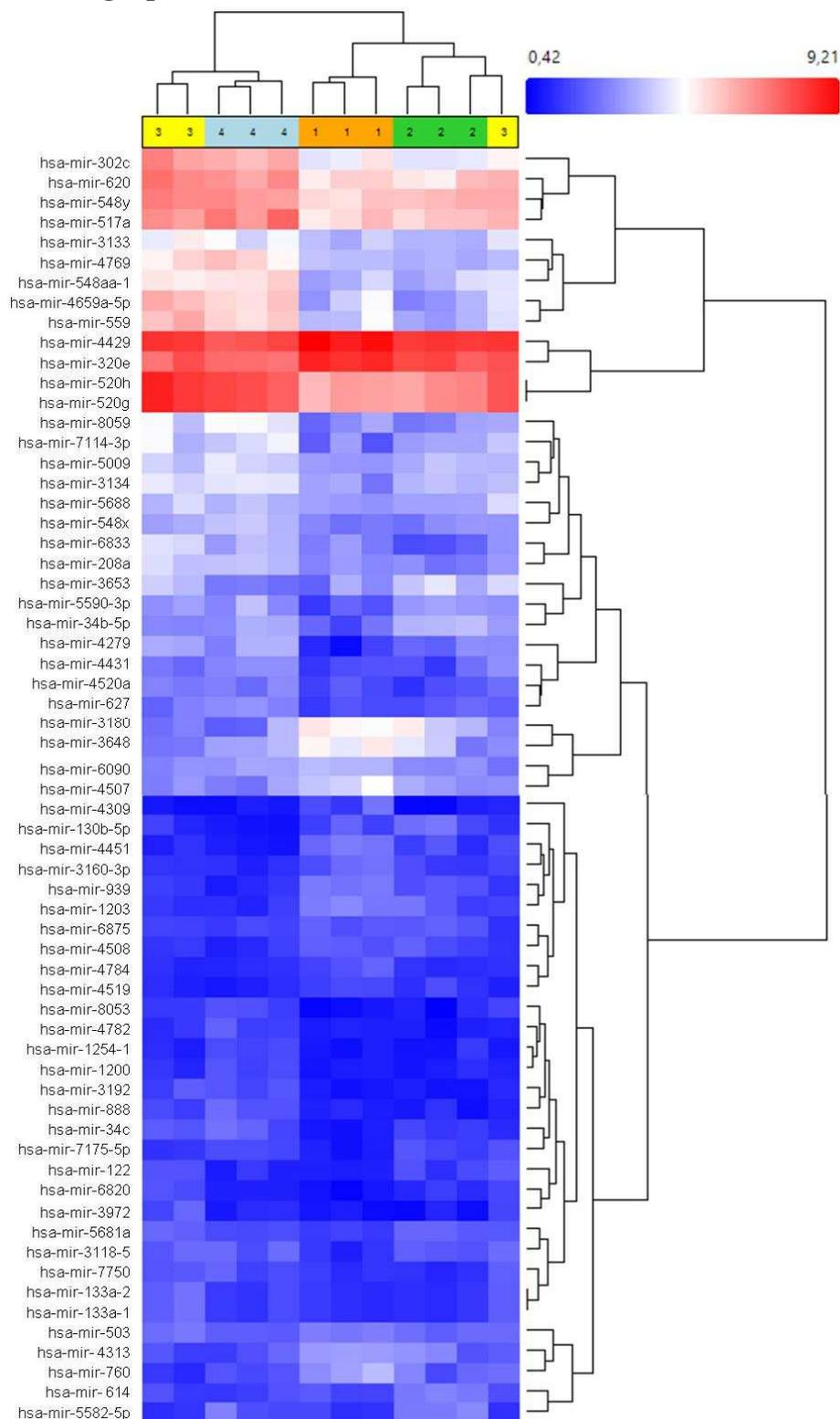
5.1 Resultados da 1ª etapa: avaliação dos miRNAs por *microarray*

A primeira etapa foi realizada com uma subamostra de 12 indivíduos que foram subdivididos em 4 grupos. A seleção foi feita de forma que os grupos fossem pareados por idade (Controle: 34 ± 6 anos; AOS leve: 33 ± 6 anos; AOS moderada: 33 ± 5 anos; AOS grave 32 ± 3 anos; $p = 0,99$) e IMC (Controle: $30,2 \pm 2,6$ kg/m²; AOS leve: $31,9 \pm 2,5$ kg/m²; AOS moderada: $30,1 \pm 2,2$ kg/m²; AOS grave: $31,0 \pm 2,7$ kg/m²; $p = 0,81$).

Dos 2.578 miRNAs humanos presentes no chip de *microarray*, 63 apresentaram expressão diferente entre os grupos considerando os seguintes critérios: diferença significativa entre os grupos com $p < 0,01$ (ANOVA *one way*, não-pareada), *fold change* < -1 ou > 1 em todas as possíveis combinações de 2 grupos (Figura 7). O valor FDR variou entre 0,09 e 0,53 considerando a expressão dos 4 grupos em conjunto.

Quando se comparou os grupos em duplas, considerando $FDR < 0,35$, *fold change* < -1 ou > 1 , $p < 0,01$ encontrou-se 21 miRNAs diferentemente expressos (tabela 4). A comparação entre o grupo controle vs. AOS moderada mostrou 4 miRNAs subexpressos e 2 superexpressos. Já a comparação com grupo de indivíduos com AOS grave apresentou 8 miRNAs subexpressos e 4 superexpressos. Comparando-se o grupo com AOS leve vs. AOS grave, encontrou-se 1 miRNA subexpressos e 3 superexpresso. As comparações entre o grupo controle vs. AOS leve, AOS leve vs. moderada e AOS moderada vs. AOS grave não mostraram nenhum miRNA com expressão diferente considerando os parâmetros anteriormente citados (Tabela 4).

Figura 7: Hierarchical clustering de microarray dos 63 miRNAs diferentemente expressos entre os grupos do estudo.



A escala de cores indica a intensidade do sinal (\log_2). Cada coluna representa 1 indivíduo da análise sendo o grupo 1 em laranja – controle (n=3), 2 em verde – AOS leve (n=3), 3 em amarelo – AOS moderada (n=3) e 4 em azul – AOS grave n=3. Hsa – *Homo sapiens*. Mir – microRNA.

Tabela 4: miRNAs com diferença de expressão para cada comparação de grupos.

Fatores Comparados (Fator 1 vs. fator 2)	miRNA	Sinal (log2) Fator 1	Sinal (log2) Fator 2	Fold Change	FDR	P
Controle vs. Moderada	hsa-mir-122-5p	0,99	1,85	1,81	0,217	0,000128
	hsa-mir-939-5p	2,54	1,36	-2,27	0,217	0,000131
	hsa-mir-4679	1,65	2,71	2,08	0,217	0,000091
	hsa-mir-224-3p	1,15	0,76	-1,31	0,275	0,000249
	hsa-mir-485-5p	2,87	1,65	-2,34	0,313	0,000331
	hsa-mir-3180	5,00	2,68	-4,99	0,230	0,000174
Controle vs. Grave	hsa-mir-503	2,60	2,04	-1,47	0,334	0,000539
	hsa-mir-939-5p	2,54	1,12	-2,67	0,334	0,000690
	hsa-mir-1254	0,83	1,69	1,81	0,338	0,000869
	hsa-mir-4253	2,15	3,29	2,19	0,227	0,000051
	hsa-mir-208a-3p	3,41	4,92	2,85	0,227	0,000069
	hsa-mir-320e	8,52	7,37	-2,22	0,329	0,000328
	hsa-mir-552-3p	0,96	0,74	-1,16	0,329	0,000323
	hsa-mir-1182	3,36	1,74	-3,08	0,334	0,000756
	hsa-mir-3145-5p	2,10	3,09	1,99	0,255	0,000116
	hsa-mir-4451	2,42	0,83	-3,01	0,275	0,000166
	hsa-mir-6510-5p	3,94	2,46	-2,79	0,329	0,000447
hsa-mir-6515-5p	2,18	1,58	-1,52	0,334	0,000694	
Leve vs. Grave	hsa-mir-302c-3p	4,36	6,21	3,59	0,328	0,000099
	hsa-mir-1265	2,90	2,23	-1,59	0,328	0,000070
	hsa-mir-133a-5p	1,10	2,55	2,73	0,348	0,000263
	hsa-mir-559	3,32	5,59	4,81	0,348	0,000240

As demais comparações não mostraram nenhum miRNA diferentemente expresso. FDR- false discovery rate. Valores P calculados utilizando teste t de Student. Valores de *fold change* positivos indicam aumento da expressão e valores negativos, redução em relação ao fator 1. Hsa – *homo sapiens*. Mir – microRNA.

As vias enriquecidas encontradas no DAVID que estiveram reguladas pelos miRNAs presentes na tabela 4 e suas características encontram-se descritas nos anexos. Os miRNAs miR-503, miR-6510-5p, miR-6515-5p e miR-133a-5p não participaram da análise de vias enriquecidas no DAVID por não apresentarem genes-alvo previstos por pelo menos 8 bases de dados. A tabela 5 mostra a influência dos miRNAs resultantes da análise *in Silico* sobre cada um das vias enriquecidas.

Tabela 5: Vias de sinalização e os respectivos miRNAs que regulam sua expressão organizados de acordo com os grupos.

Vias de sinalização	miRNAS																	
	Controle vs. moderado					Controle vs. grave					Leve vs. grave							
	hsa-miR-122-5p	hsa-miR-939-5p	hsa-miR-4679	hsa-miR-224-3p	hsa-miR-485-5p	hsa-miR-3180	hsa-miR-939-5p	hsa-miR-1254	hsa-miR-4253	hsa-miR-208a-3p	hsa-miR-320e	hsa-miR-552-3p	hsa-miR-1182	hsa-miR-3145-5p	hsa-miR-4451	hsa-miR-302c-3p	hsa-miR-1265	hsa-miR-559
Glioma																		
Câncer colorretal																		
Sinalização de Wnt																		
Vias de câncer																		
Sinalização do Cálcio																		
Sinalização da neurotrofina																		
Carcinoma de célula basal																		
Sinalização da MAPK																		
Melanoma																		
Orientação do axônio																		
Câncer de próstata																		
Moléculas de adesão celular (CAMs)																		
Melanogênese																		
Leucemia mielóide crônica																		
Regulação da actina do citoesqueleto																		
Esclerose lateral amiotrófica (ALS)																		
Ritmo circadiano																		
Infecção por <i>Vibrio cholerae</i>																		
Reabsorção do sódio regul. Aldosterona																		
Adesão focal																		
Câncer de pulmão de células maiores																		
Sistema de sinaliz. do fosfatidilinositol																		
Interação de receptor citocina-citocina																		
Câncer de pulmão de células pequenas																		
Leucemia mieloide aguda																		
Sinalização de quimiocina																		
Junção aderente																		
Sinalização de ErbB																		
Sinalização do TGF- β																		
Sinalização da insulina																		
Fagocitose mediada por Fc γ R																		
Endocitose																		
Potenciação de longo termo																		
Câncer endometrial																		
Câncer de tireóide																		
Biossíntese de O-glicana																		
Sinalização da p53																		
Sinalização da adipocitocina																		
Câncer pancreático																		
Proteólise mediada pela ubiquitina																		
Sinalização da PPAR																		

Wnt - *Wingless-type MMTV integration site family*. MAPK - *Mitogen Activated Protein Kinase*. ErbB - *Epidermal growth factor receptor*. TGF- β - *Tumoral growth factor- β* . ErbB - *Epidermal growth factor receptor*. Fc γ R - *High affinity immunoglobulin gamma Fc*. PPAR - *Peroxisome proliferator-activated receptor*. Hsa - *homo sapiens*. Mir - *microRNA*.

5.2 Resultados da 2ª etapa: avaliação dos miRNAs por RT-qPCR

Após a realização da análise *in Silico*, alguns miRNAs que participam da regulação de vias de sinalização relacionadas à fisiopatologia da AOS foram selecionados: miR-939-5p, miR-208a-3p, miR-485-5p, miR-122-5p, miR-1254, miR-4253, miR-320e, miR-552-3p, miR-1182, miR-3145-5p e miR-4451. Além disso, selecionamos o miR-126-3p e o miR-29a que não apareceram na avaliação por *microarray* mas são reconhecidos por serem especificamente expressos pelo endotélio, relacionados à angiogênese e às doenças cardiovasculares (55,83,105,107,108). As vias de sinalização consideradas para esta seleção foram: sinalização de cálcio (miR-122-5p, miR-939-5p, miR-485-5p, miR-1254, miR-4253, miR-552-3p, miR-1182), moléculas de adesão celular (miR-122-5p, miR-939-5p, miR-485-5p), junção aderente (miR-208a-3p), reabsorção do sódio e regulação da aldosterona (miR-122-5p, miR-939-5p, miR-485-5p, miR-1254, miR-4253, miR-552-3p), sinalização de TGF- β (miR-939-5p, miR-208a-3p, miR-320e) e sinalização da insulina (miR-939-5p, miR-1254). Os miRNAs miR-552-3p, miR-1182, miR-208a-3p e miR-3145-5p apresentaram amplificação indeterminada em todas as amostras. Uma das amostras do grupo AOS grave apresentou concentração de miRNA menor que 10ng/ μ L e, por isso, foi excluída da análise. (tabela 6 e figuras 8, 9 e 10).

Tabela 6: Expressão relativa % dos miRNAs pela técnica de RT-qPCR, por grupo de estudo.

miRNA	Total N=47	Controle N=6	Leve N=12	Moderada N=15	Grave N=14	P
miR-4451	142,0 \pm 17,8	100 \pm 25,1	153,4 \pm 32,4	155,2 \pm 45,1	82,6 \pm 22,1	0,81
miR-4253	232,6 \pm 28,0	100 \pm 19,5	236,3 \pm 45,4	289,0 \pm 60,6	225,7 \pm 51,4	0,25
miR-1254	141,6 \pm 11,0	100 \pm 22,2	118,0 \pm 10,7	141,0 \pm 15,7	180,2 \pm 28,2	0,09
miR-320e	183,7 \pm 16,2	100 \pm 17,5	172,9 \pm 25,4	181,9 \pm 30,0	230,9 \pm 33,7	0,10
miR-29a	125,3 \pm 13,6	100 \pm 21,5	107,8 \pm 23,2	139,7 \pm 27,0	136,0 \pm 28,6	0,72
miR-122-5p	113,0 \pm 20,5	100 \pm 70,6	178,2 \pm 62,1	77,1 \pm 12,5	101,3 \pm 28,6	0,30
miR-126-3p*	117,9 \pm 18,3	100 \pm 13,8	127,2 \pm 30,0	133,0 \pm 60,9	110,0 \pm 33,3	0,92
miR-485-5p**	117,6 \pm 9,0	100 \pm 27,4	92,3 \pm 13,0	129,9 \pm 15,7	136,5 \pm 18,3	0,23
miR-939-5p	110,8 \pm 8,1	100 \pm 20,3	106,3 \pm 13,9	117,7 \pm 15,1	112,0 \pm 17,1	0,92

Dados representados em percentual de expressão. Média \pm EP. IAH: índice de apneia/hipopneia por hora. *Grupo controle, n = 6; AOS leve, n = 6; AOS moderada, n = 6; AOS grave, n = 5.

**Grupo AOS moderada, n = 14.

Figura 8: Dados individuais da expressão relativa % dos miR-4451 (A), miR-4253 (B) e miR-1254 (C) por grupo de estudo. Barras horizontais representam média e intervalo de confiança de 95%.

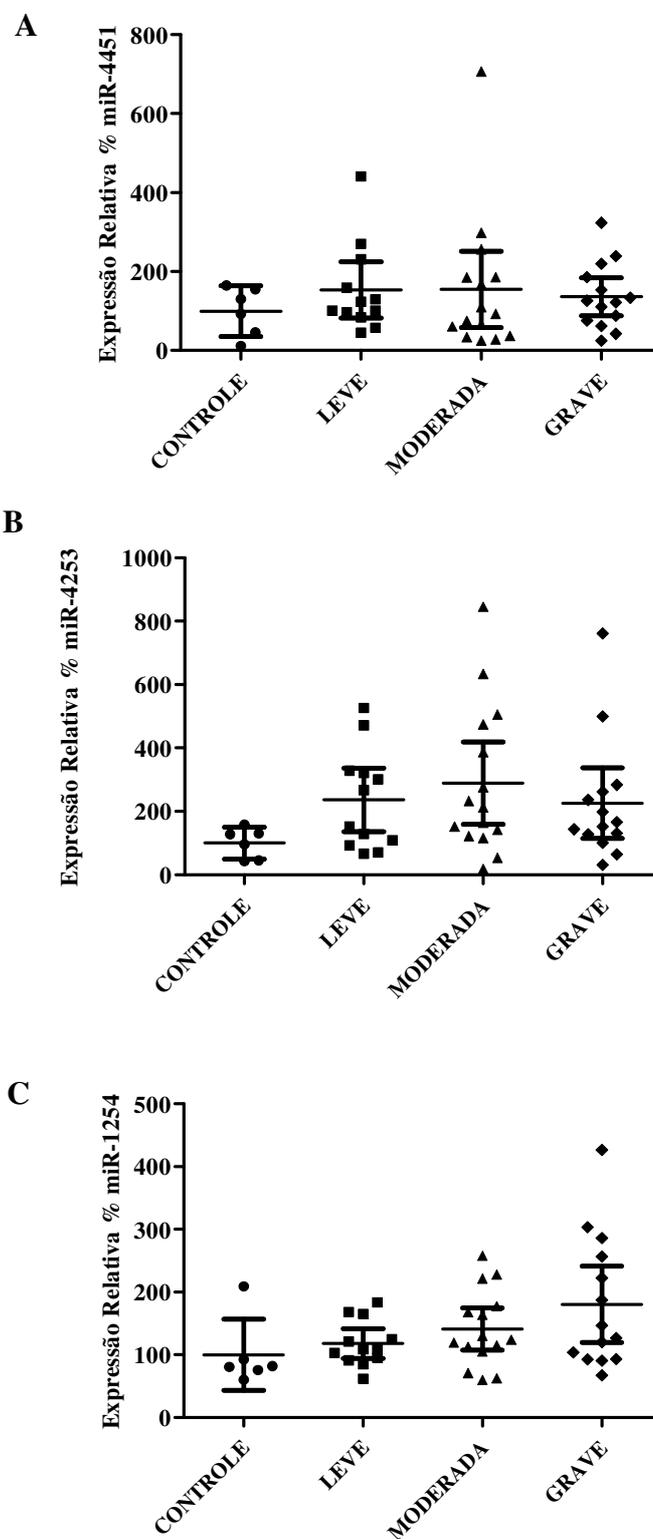


Figura 9: Dados individuais da expressão relativa % dos miR-320e (A), miR-29a (B) e miR-122-3p (C) por grupo de estudo. Barras horizontais representam média e intervalo de confiança de 95%.

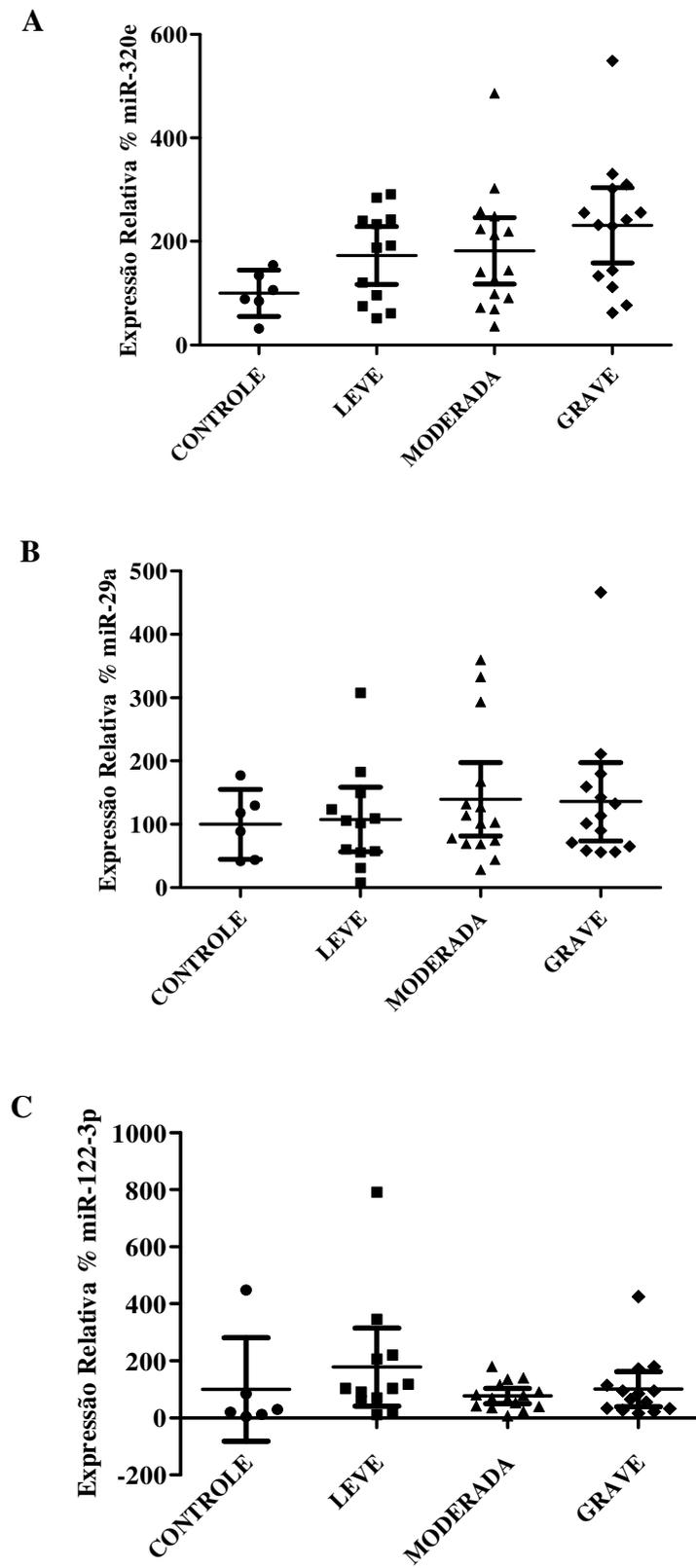
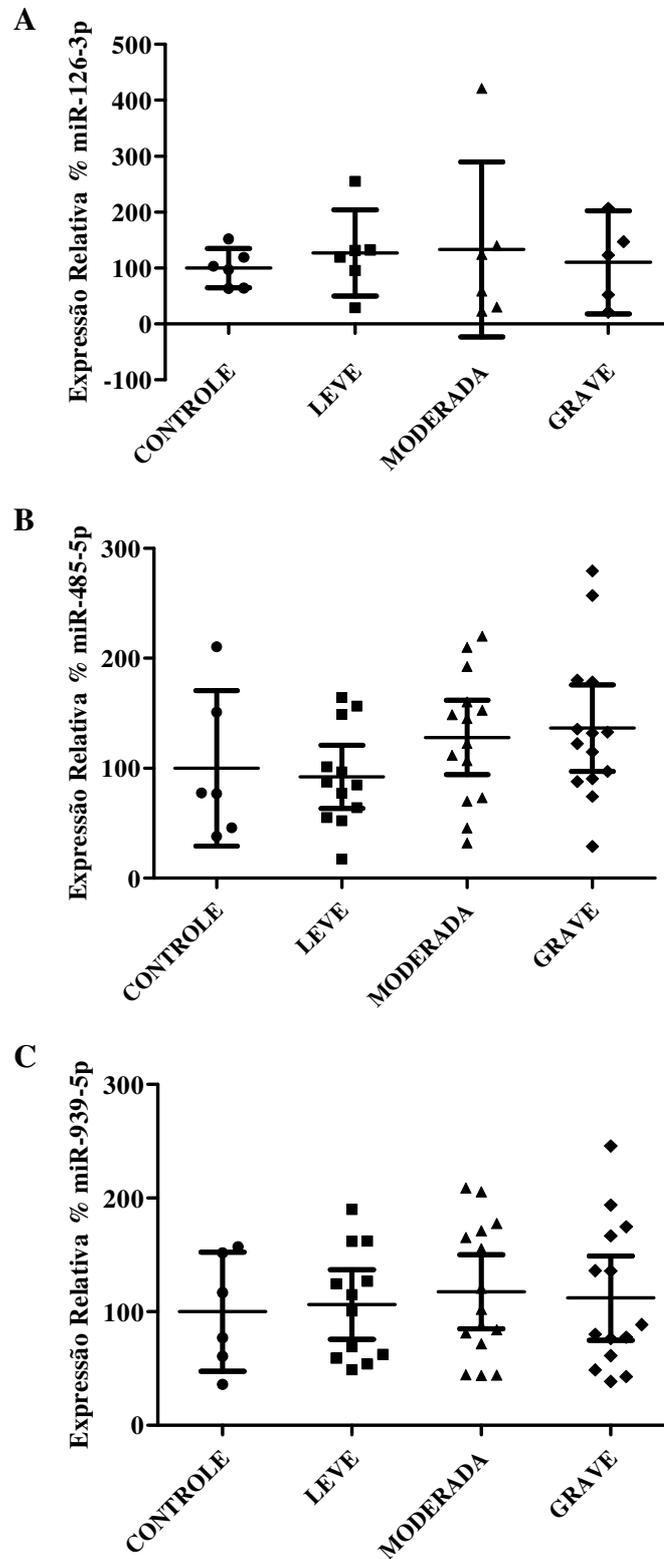


Figura 10: Dados individuais da expressão relativa % dos miR-126-3p (A), miR-485-5p (B) e miR-939-5p (C) por grupo de estudo. Barras horizontais representam média e intervalo de confiança de 95%.



Na tabela 7 estão reportadas as correlações pelo método de Spearman entre os marcadores de gravidade da AOS e os miRNAs testados na segunda fase. Entre os marcadores selecionados para a regressão linear (ver adiante) podemos observar que o miR-1254 não teve correlação com nenhum dos três marcadores de gravidade da AOS. Já o miR-320e apresentou correlação inversa com a saturação mínima de O₂. Como nota, o miR-122-5p mostrou correlação inversa com o IAH, e o miR-126-3p com o % do tempo de saturação de O₂ < 90% (tabela 7).

Tabela 7: Análise de correlação entre a expressão dos miRNAs e diferentes marcadores de gravidade da AOS.

miRNA	IAH (eventos/hora)		Saturação mínima (% O ₂)		% tempo de saturação <90%	
	r _s	P	r _s	P	r _s	P
miR-4451	0,29	0,05	-0,02	0,91	0,002	0,99
miR-4253	-0,22	0,15	-0,06	0,68	-0,18	0,24
miR-1254	0,03	0,84	-0,14	0,37	0,01	0,94
miR-320e	-0,03	0,86	-0,31	0,03	0,22	0,14
miR-29a	0,009	0,95	-0,15	0,31	0,15	0,32
miR-122-5p	-0,32	0,03	-0,08	0,60	-0,07	0,66
miR-126-3p	-0,23	0,28	0,12	0,58	-0,51	0,01
miR-485-5p	-0,009	0,95	-0,28	0,06	0,17	0,25
miR-939-5p	0,04	0,78	-0,11	0,48	-0,14	0,35

r_s - coeficiente de correlação de Spearman. IAH – índice de apneia/hipopneia por hora.

Como mencionado anteriormente, os miR-1254 e miR-320e apresentaram p<0,2 (tabela 6) e foram, por isso, designados como variáveis dependentes para análise de regressão linear não ajustada com a AOS e ajustada para idade, IMC e raça. A regressão linear multivariada mostrou uma relação positiva entre o aumento da gravidade da AOS e aumento da expressão do miR-1254 e do miR-320e. Apesar disso, a raça negra parece exercer uma influência inversa na expressão do miR-1254 e, no caso do miR-320e, relação também inversa para raça amarela e IMC (tabela 8).

Tabela 8: Preditores da expressão dos miR-1254 miR-320e em análise de regressão linear multivariada.

Variável	miR-1254			miR-320e		
	β	EP	P	β	EP	P
Grupo						
AOS grave	69,84	29,24	0,017	75,17	31,07	0,016
AOS moderada	32,90	28,79	0,253	35,05	30,59	0,252
AOS Leve	6,88	29,17	0,814	34,10	30,99	0,271
Controle		Referência			Referência	
Raça						
Amarela	-13,24	44,04	0,764	-60,03	30,16	0,047
Parda	-27,26	23,15	0,239	-18,84	24,59	0,444
Negra	-61,34	28,39	0,031	-1,32	46,79	0,977
Branca		Referência			Referência	
Idade	-0,74	1,32	0,574	1,67	1,40	0,233
IMC	-4,07	2,43	0,094	-7,61	2,58	0,003

β – coeficiente de regressão. EP – erro padrão

6 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o perfil de expressão dos miRNAs circulantes em indivíduos com AOS e comparou a um grupo de indivíduos do mesmo sexo com perfil similar à idade, IMC e gordura corporal. Identificamos expressões diferenciadas de 21 miRNAs entre os grupos, de um perfil de mais de 2.570 na análise de *microarray*. Onze foram selecionados para validação da expressão pela RT-qPCR de acordo com sua importância na regulação de vias relacionadas às doenças cardiovasculares. Destes 11, conseguimos confirmar a expressão de 7 miRNAs. Também decidimos quantificar outros 2 miRNAs, o miR-126-3p e o miR-29a por serem reconhecidamente importantes para a regulação de vias de sinalização ligadas à hipóxia e ao desenvolvimento das doenças cardiovasculares (55,83,107,108). Após toda análise exploratória, dois miRNAs se destacaram: o miRNA-1254 e o miRNA-320e. Na análise de regressão linear o miR-1254 foi independentemente associado com a raça negra e a AOS grave. O miR-320e foi independentemente associado com a raça, o IMC e também a AOS grave. Embora nosso estudo tenha sido desenhado com enfoque nas doenças cardiovasculares estes achados podem ajudar a esclarecer a associação da AOS com outras doenças, entre elas o câncer, como discutiremos adiante. Além disso esse estudo reforça o conceito de que é nas formas graves da AOS onde temos um sinal biológico relevante que possa contribuir para as consequências descritas acima.

Estudos anteriores abordaram diversas moléculas como possíveis biomarcadores para AOS (109). A principal limitação é a pouca especificidade que estes apresentam. Por exemplo, níveis elevados de IL-6, TNF- α e hsCRP foram descritos na AOS mas uma das limitações é a presença de fatores de confusão que poderiam justificar o aumento destes marcadores, como a obesidade (36). Existem alguns fatores de confusão como condição inflamatória subclínica comum na obesidade (37,38), que poderiam explicar essas alterações. O presente estudo compreendeu pacientes com IMC e gordura corporal semelhantes. Não detectamos diferenças nos níveis de hsCRP entre os grupos (Tabela 3). Similarmente, a mesma observação pode ser aplicada a outros parâmetros metabólicos comumente mensurados na prática clínica, como glicose e níveis de colesterol. Neste contexto, os miRNAs parecem ser biomarcadores mais promissores para a AOS pela alta especificidade diante de alguns estímulos e doenças (35). Dentro do

princípio e desafios de estudar biomarcadores potencialmente ideais na AOS, este estudo explorou o uso de miRNAs circulantes na AOS tendo um grupo apropriado para comparação. A opção pela escolha dos miRNAs foi baseada no fato de que muitos deles tem sua expressão modificada por um importante fator preponderante da AOS, a hipóxia (62,71,76,83). Além disto, alguns destes miRNAs possuem ações mais específicas, portanto com potencial de apresentarem menor influência de outros fatores na expressão. Entre os principais achados, um dos miRNAs que foram independentemente associado com a AOS grave foi o miR-1254. Este miRNA (sequência AGCCUGGAAGCUGGAGCCUGCAGU), cujo gene codificador fica localizado no cromossomo 10, região q21.3, foi descrito recentemente (109) e ainda não apresenta funções muito definidas. Além disso, o tecido que dá origem a sua presença na circulação e um possível órgão-alvo ainda não estão claros. O miR-1254 foi encontrado superexpresso no plasma de pacientes com dispneia tanto por insuficiência cardíaca quanto dispneia por outras causas, quando comparados a indivíduos saudáveis (109). Um estudo de coorte (110), publicado recentemente com dados de mais de 2200 indivíduos, mostrou que o miR-1254 foi um bom preditor de pior prognóstico para o paciente com insuficiência cardíaca, apesar de não ser superior a outros já estabelecidos como idade, função renal e hemoglobina. Em outro estudo também de coorte (111) bastante semelhante, pesquisadores investigaram perfil de miRNAs circulantes que poderiam atuar como biomarcadores para a insuficiência cardíaca e para pior prognóstico. A expressão aumentada do miR-1254 apresentou associação, apesar de limítrofe (*hazard ratio*: 1,22; IC 95%: 1,00–1,50), com mortalidade e rehospitalização. Na área da Oncologia, a superexpressão do miR-1254 foi associada a proliferação celular no câncer de pulmão (112–114) por inibir o gene SFRP1 (*secreted frizzled related protein 1*), responsável por modular a sinalização dos genes Wnt e β -catenina, que participam do crescimento e proliferação celular (115). Recentemente, estudos tem demonstrado que a AOS pode estar intimamente associada ao aumento das propriedades invasivas e proliferativas de tumores sólidos (116). Estes achados tem potencialmente implicância para a AOS, uma vez que estudos epidemiológicos recentes mostraram que a AOS está associada com o aumento da agressividade e mortalidade do câncer (117,118), sendo que a hipóxia intermitente pode ser o fator determinante (119,120). Está bem estabelecido que a hipóxia intermitente promove a formação excessiva de espécies reativas do O₂ e produtos inflamatórios que potencialmente podem

danificar ou alterar a estrutura e função de proteínas, lipídeos e DNA (116). Nossos achados sugerem que a superexpressão do miR-1254 poderia participar deste processo. Dessa forma, novos estudos são necessários para avaliar se o aumento da expressão do miR-1254 na AOS pode participar na modulação do câncer na AOS ou estar associada a um pior prognóstico neste contexto.

Outro miRNA circulante que se destacou na nossa análise foi o miR-320e, com expressão aumentada de forma independente na AOS grave. Este miRNA (sequência AAGCUGGGUUGAGAAGG) apresenta seu gene codificador localizado no cromossomo 19, região q13.32. O miR-320e é membro de uma família de miRNA, além do miR-320a, miR-320b, miR-320c, miR-320d. As famílias de miRNAs possuem membros com estruturas moleculares muito semelhantes e, possivelmente, funções também semelhantes (121). De fato, alguns estudos mostraram que, em conjunto, estes miRNAs poderiam regular uma mesma via de sinalização ou condição clínica (122,123). Estudos experimentais mostraram um papel importante do miR-320 na regulação de processos relacionados à injúria de isquemia/reperfusão do miocárdio (124–126). Em dois estudos (125,126), Song et al., 2014 e 2016, mostraram que a inibição do miR-320 protege o ventrículo esquerdo do remodelamento após isquemia/reperfusão por suprimir vias pró-apoptóticas e aumentar a sinalização anti-apoptótica. Estudos relacionando especificamente à expressão do miRNA-320e com doenças cardiovasculares são insuficientes. Um estudo experimental realizado com indivíduos portadores de miocardiopatia hipertrófica encontrou expressão aumentada deste miRNA nos animais com a doença em relação aos animais saudáveis (127). Outro estudo (128) avaliou expressão de miRNAs circulantes como biomarcadores para o acidente vascular cerebral agudo em humanos. O miR-320e mostrou expressão significativa, porém, reduzida entre os pacientes com acidente vascular agudo. Pela escassez de evidências, ainda é necessária a realização de estudos experimentais para mostrar o papel específico do miR-320e em situações de isquemia/reperfusão ou hipóxia intermitente. Existem evidências indicando que a hipóxia intermitente decorrente da AOS desencadearia uma série de mecanismos adaptativos, chamados de condicionamento isquêmico (129,130). Estudos experimentais mostraram que animais submetidos a hipóxia intermitente apresentaram aumento da angiogênese capilar, melhora da performance e limitação da dilatação do ventrículo esquerdo, além de redução da fibrose cardíaca após 7 dias de infarto do

miocárdio (131). Este benefício foi observado também em períodos pós-infarto maiores (132,133). O aumento da circulação coronariana colateral é um fator com grande potencial para explicar o condicionamento isquêmico. De fato, indivíduos com AOS apresentavam maior desenvolvimento de circulação coronariana colateral quando comparados a indivíduos sem AOS em um estudo (134) e ainda, apresentam menor injúria cardíaca em outras investigações (129,135). Apesar destas evidências, o possível papel cardioprotetor da AOS deve ser avaliado com cautela. Estudos mostraram impacto negativo da AOS sobre o prognóstico pós-infarto agudo do miocárdio (136,137). Na área oncológica, o miR-320e foi recentemente indicado como importante biomarcador para o câncer colorretal e sua superexpressão esteve relacionada com pior prognóstico em pacientes com câncer em estágios II e III (138). Além disso, a superexpressão do miR-320e foi associada com pior resposta terapêutica em pacientes tratados com medicamentos quimioterápicos (138). Mesmo os demais componentes da família miR-320 foram considerados importantes biomarcadores para esta doença pelo fato de influenciarem a proliferação celular do tumor (122). Curiosamente, todos os membros estiveram com expressão diminuída no câncer colorretal, com exceção do miR-320e, fato que concorda com o estudo citado anteriormente (138). A implicação destes achados para o contexto da AOS vem de um estudo de caso-controle que mostrou, de maneira consistente, uma associação desta doença com um aumento do risco para o câncer colorretal (139). As chances de detecção do câncer colorretal avançado entre os pacientes com AOS foi aproximadamente três vezes maior que o grupo controle pareado para idade, sexo, IMC e tabagismo.

Além da expressão dos miR-1254 e miR-320e ter sido associada à AOS grave de forma independente, a raça negra e amarela, respectivamente, pareceram exercer também uma influência significativa sobre eles. Poucos estudos consideraram a influência da raça sobre a expressão de miRNAs (140–142). Em dois deles, envolvendo pacientes com câncer colorretal, outros miRNAs (miR-203, miR-21, miR-181b (141) e miR-182 (140)) estiveram relacionados com pior prognóstico e menor tempo de sobrevivência em indivíduos de raça negra. No caso do miR-320e, um aumento no IMC também apresentou potencial para explicar redução da expressão deste miRNA. Um estudo de base populacional (143) mostrou que diversos miRNAs circulantes estão relacionados ao IMC, apesar de não haverem relatos específicos do miR-320e. Segundo o estudo, a maioria destes miRNAs encontrados na

circulação e associados ao IMC são produzidos pelo fígado, refletindo injúria hepática quando aumentados na circulação, ou doença hepática não-alcoólica, comum em indivíduos obesos. Nenhum estudo relacionou a expressão do miR-320e a doenças hepáticas, mas o miR-320 foi citado em alguns deles, mostrando expressão alterada em diferentes casos de doenças hepáticas alcoólicas e não alcoólicas (144–146). Novos estudos são necessários para avaliar a influência e a importância da raça e do IMC na expressão dos miRNAs

Conforme apresentado na introdução, diversos miRNAs estão alterados em condições de hipóxia crônica (item 1.3.2, página 9). Poucos estudos demonstraram os efeitos da hipóxia intermitente especificamente no contexto da AOS (60,62,86–88). As diferenças de expressão gênica frente aos estímulos de hipóxia crônica e intermitente parecem ser distintas mas ainda não estão totalmente elucidadas (147). Embora não avaliamos condições clínicas associadas à hipóxia crônica no nosso estudo, a análise comparativa com achados da literatura são consistentes com este conceito. De fato, vários miRNAs descritos na hipóxia crônica não foram selecionados na nossa análise sistematizada em duas etapas para validação dos nossos achados. Por exemplo, o miR-208a-3p não foi detectado na validação da expressão por RT-qPCR, apesar de apresentar expressão aumentada (*Fold change* de 2,85) na análise por *microarray*. O miRNA-208a-3p, que é produzido especificamente pelo músculo cardíaco e esquelético, conhecido como *myomir* (148,149), participa do surgimento da hipertrofia cardíaca decorrente de estresse do músculo (que pode ser causado por sobrecarga do músculo cardíaco) levando a fibrose ventricular e redução da capacidade de contratilidade. O mecanismo ocorre pelo aumento da expressão do gene β MHC (*β miosin heavy chain*) mediado pelo miRNA-208a-3p (103). Acreditamos que este miRNA poderia ser um preditor em potencial para determinar injúria cardíaca subclínica decorrente do estresse de hipóxia-reoxigenação da AOS, assim como ocorre com a troponina ultra-sensível tipo I (150). Uma provável explicação para a não confirmação dessa expressão aumentada é de que, de fato, este miRNA é normalmente detectado em casos de lesão cardíaca, como no infarto agudo do miocárdio (151) e o estímulo da AOS, envolvendo hipóxia intermitente com perfusão presente, poderia não ser suficiente para promover o aumento da expressão deste miRNA. De forma interessante, um estudo de coorte (111) realizado com pacientes portadores de insuficiência cardíaca encontrou taxas de detecção do miR208a-3p muito baixas, impossibilitando sua utilização

como biomarcador para a doença. Outro miRNA que apresentou expressão bastante reduzida em nosso estudo pela análise de *microarray* foi o miR-939-5p. Estudos mostram que o miR-939-5p tem como alvos diversos genes que codificam mediadores pró-inflamatórios como a IL-6, VEGF, TNF- α e a óxido nítrico sintase 2 mostrando que a redução da expressão desse miRNA pode estar relacionada a um aumento da inflamação (104,152). Pela análise *in Silico*, observamos que este miRNA é responsável por regular 3 genes na via de sinalização da reabsorção do sódio regulada pela aldosterona, além de outras vias importantes como a via de sinalização do cálcio, via de sinalização de TGF- β (que estão relacionadas com a angiogênese), via de sinalização da insulina e da proteína p53, conhecida como supressora tumoral por controlar a proliferação celular (153). A proteína p53 está ainda associada ao mecanismo adaptativo do músculo cardíaco à hipertrofia. A sobrecarga de pressão sobre o coração induz acúmulo da p53 que inibe a atividade da HIF-1 e que, por sua vez, prejudica a angiogênese e a função sistólica. A inibição do acúmulo da p53 levou à restauração da disfunção cardíaca (154). Por outro lado, estudo recente mostrou que o miR-939-5p apresenta atividade antiangiogênica (155). Pacientes portadores de doença arterial coronariana, que tinham a expressão desse miRNA aumentada, tiveram menos formação de circulação colateral coronariana. Ele prejudicou a integridade vascular e reprimiu a angiogênese por ter como alvo direto a γ -catenina (155). No nosso estudo, o padrão de expressão reduzido do miR-939-5p foi observado quando comparamos o grupo controle vs. AOS moderada e controle vs. AOS grave, porém, observamos uma semelhança entre os grupos pela validação na fase 2, RT-qPCR, fase considerada crucial para a seleção de miRNAs que tenham potencialmente relevância clínica. Estes exemplos sugerem que diferenças na sinalização de miRNAs são distintos na hipoxia crônica versus intermitente e reforça os desafios na elucidação de biomarcadores específicos para o contexto da AOS.

Apesar de identificados dois miRNAs envolvidos com a AOS, uma avaliação crítica da interpretação e significado destes achados merece ser realizada: 1) Na comparação entre os grupos, tanto o miR-1254 quanto o miR-320e apresentaram o aumento progressivo de expressão de acordo com a comparação entre os 4 grupos estudados. Eles foram selecionados (de forma pré-especificada no protocolo) usando critério flexível de valor de p ($< 0,2$) para que pudessem entrar na análise de regressão linear. No entanto, a análise individual da expressão dos dois miRNAs selecionados sugere

uma grande variabilidade com sobreposição de valores entre os grupos (figuras 8 e 9). Essa variabilidade foi observada mesmo considerando o grande cuidado e preocupação na seleção de cada caso, no sentido de diminuir os efeitos da variabilidade comumente observada em estudo com seres humanos; 2) De acordo com a tabela 7, não observamos correlações ou tivemos correlações fracas entre os miRNAs e os marcadores de gravidade da AOS, como IAH, saturação mínima de O₂ e % do tempo de saturação de O₂ <90%. Pode ser que outros marcadores como a fragmentação do sono ou a associação dos componentes da AOS tenham uma importância maior que os parâmetros estudados; 3) A presença de miRNAs na circulação, seja livres no soro, plasma ou contidos em microvesículas, corpos apoptóticos ou exossomos, trouxe uma grande promessa para o entendimento da fisiopatologia e diagnóstico de diversas doenças. Muitos estudos tem utilizado miRNAs circulantes como biomarcadores (58,65,156). No entanto, a origem e o significado dos RNAs circulantes, como no presente estudo, ainda não estão totalmente elucidados (157). A presença de miRNAs específicos de determinados tecidos na circulação podem refletir alterações decorrentes de apoptose ou necrose celular (59). Um exemplo clássico de miRNA tecido-específico é o miR-126. Ele é produzido especificamente por células endoteliais, mas pode ser encontrados em corpos apoptóticos na circulação, funcionando como sinalização parácrina durante a aterosclerose (157,158). O presente estudo não abordou a origem dos miR-1254 e miR-320e nem o significado de sua presença na circulação. Mais estudos são necessários para determinar se a presença deles no sangue pode refletir precocemente, por exemplo, lesões em órgãos-alvo; 4) Finalmente, outro ponto crítico a ser considerado é que a presente investigação, que tem um caráter exploratório, não permite fazer nenhuma inferência sobre se estes miRNAs oferecem valores adicionais, além do uso de marcadores mais simples como a própria gravidade da AOS. À despeito de todas as considerações acima, este estudo explora de forma sistematizada potenciais vias pelas quais a AOS pode contribuir para importantes doenças que sofrem a influência da regulação dos miRNAs.

O presente estudo apresenta pontos positivos e limitações que serão descritos a seguir. Dentre os pontos positivos podemos citar que o projeto utilizou a polissonografia para o diagnóstico da AOS naqueles indivíduos com alto risco e, também, os que apresentaram baixas suspeitas para a doença foram submetidos ao exame, para garantir que fossem alocados ao grupo certo. Outro ponto de destaque é o cuidado e rigor na seleção de

voluntários, de forma que estes fossem do mesmo sexo e semelhantes quanto a idade, o IMC e outros parâmetros corporais. Esse cuidado na seleção garantiu a eliminação de eventuais fatores de confusão que pudessem dificultar a interpretação do potencial papel da AOS. Os participantes não apresentavam nenhum tipo de intervenção medicamentosa, nem a prática de atividade física que poderiam também afetar a expressão dos miRNAs. Além disso, os dados coletados de cada paciente foram analisados sem o conhecimento ao grupo ao qual o indivíduo pertencia baseado nos dados da polissonografia. Por último, outro ponto de destaque já mencionado anteriormente, a análise dos miRNAs foi feita de forma sistematizada, em duas etapas: Primeiro, nosso objetivo foi conhecer o perfil de expressão dos miRNAs em paciente com AOS em diferentes graus (leve, moderada e grave) comparando a um grupo controle, sem exposição à doença. Essa análise exploratória, na qual pretendíamos conhecer como a piora no grau da doença poderia afetar a expressão dos miRNAs, nos levou a concluir que a expressão dos miRNAs era semelhante nos grupos AOS moderada e AOS grave. Em seguida, submetemos os miRNAs com expressão mais importante à análise de RT-qPCR, para validar de forma quantitativa essa expressão, garantindo resultados fidedignos. Entre as limitações (além das considerações feitas no parágrafo anterior) podemos citar: 1) O tamanho da amostra adotada pode ser considerado pequeno, embora dentro do tamanho amostral observado em estudos que avaliam a expressão dos miRNA em humanos. De fato, diversos estudos que utilizaram as mesmas técnicas para quantificar miRNAs, também utilizaram amostras pequenas (86,87,109) pelo alto custo que elas apresentam. A rigidez empregada na seleção de voluntários para o estudo pode, em parte, ter diminuído o efeito do tamanho da amostra; 2) Infelizmente, por questões éticas, técnicas e financeiras, não foi possível realizar a análise de todos os 21 miRNAs selecionados na 1ª etapa, nem realizamos análises funcionais com o objetivo de validar a expressão de genes alvos, por exemplo em tecidos específicos como endotélio ou tecido muscular cardíaco. A análise funcional pode ser feita, por exemplo, pela transfecção de um miRNA sintético em uma cultura de células e, em seguida, avaliar mudanças na expressão gênica. Outra limitação relacionada às análises biomoleculares foi a fonte de miRNAs. Eles foram extraídos de células do sangue e ainda não existe um consenso na literatura se esse tipo de análise reflete toda gama de possíveis miRNAs circulantes; 3) Os resultados alcançados neste estudo, por serem de indivíduos do sexo masculino sem comorbidades (exceto obesidade) e sem o uso de medicações, não podem ser extrapolados

para todos os pacientes com AOS; 4) Por tratar-se de um estudo transversal, não é possível fazer inferências sobre causalidade.

7 CONCLUSÕES

Por meio de uma análise exploratória de mais de 2500 miRNAs, o presente estudo identificou e validou dois miRNAs independentemente associados com a AOS grave (miR-1254 e o miR-320e). Estes miRNAs estão envolvidos com processos relacionados a insuficiência cardíaca e a injúria causada por isquemia/reperfusão. Além disso, uma gama considerável de estudos mostraram que estes miRNAs podem ter implicações para o surgimento e pior prognóstico do câncer.

A análise de correlação mostrou que o miR-1254 não se relacionou com nenhum dos marcadores de gravidade da AOS. Já o miR-320e correlacionou-se de forma significativa com a saturação mínima de O₂.

8 PERSPECTIVAS

Estudos observacionais são importantes para criar perspectivas para estudos com delineamento de maior complexidade. Uma possível abordagem futura seria a realização de estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* utilizando mimetizadores dos miR-1254 e miR320e ou exossomos extraídos de pacientes portadores de AOS. Isso permitiria observar os efeitos destes miRNAs em culturas de células ou tecidos provenientes de modelos experimentais na expressão de genes-alvos relacionados à hipóxia (HIF-1), angiogênese (VEGF) e à proliferação celular (Wnt/ β -catenina). A forma de avaliação dos miRNAs poderia envolver não só células sanguíneas, mas também soro ou plasma e, na abordagem experimental, tecidos como músculo cardíaco e endotélio.

Um estudo do tipo randomizado tratando indivíduos portadores de AOS com CPAP ou placebo seria também uma forma de investigar como os miR-1254 e miR320e e seus alvos estariam expressos na ausência dos estímulos proveniente da AOS como hipóxia intermitente, fragmentação do sono, aumento da pressão intratorácica e aumento da atividade simpática e ajudar a inferir causalidade.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sleep-Related Breathing Disorders in Adults : Recommendations for Syndrome Definition and Measurement Techniques in Clinical Research. 1999;22(5).
2. Peppard PE, Young T, Barnet JH, Palta M, Hagen EW, Hla KM. Increased prevalence of sleep-disordered breathing in adults. *Am J Epidemiol.* 2013;177(9):1006–14.
3. Heinzer R, Vat S, Marques-Vidal P, Marti-Soler H, Andries D, Tobback N, et al. Prevalence of sleep-disordered breathing in the general population: THE HypnoLaus study. *Lancet.* 2015;3(4):310–8.
4. Tufik S, Santos-Silva R, Taddei JA, Bittencourt LRA. Obstructive Sleep Apnea Syndrome in the Sao Paulo Epidemiologic Sleep Study. *Sleep Med.* 2010;11(5):441–6.
5. Sjöström C, Lindberg E, Elmasry a, Hägg a, Svärdsudd K, Janson C. Prevalence of sleep apnoea and snoring in hypertensive men: a population based study. *Thorax.* 2002;57(7):602–7.
6. Drager LF, Genta PR, Pedrosa RP, Nerbass FB, Gonzaga CC, Krieger EM, et al. Characteristics and predictors of obstructive sleep apnea in patients with systemic hypertension. *Am J Cardiol.* 2010;105(8):1135–9.
7. Logan AG, Perlikowski SM, Mente A, Tisler A, Tkacova R, Niroumand M, et al. High prevalence of unrecognized sleep apnoea in drug- resistant hypertension. *J Hypertens J Hypertens.* 2001;19(19):2271–7.
8. Sin D, Fitzgerald F, Parker J, Newton G, Floras J, Bradley T. Risk Factors for Central and Obstructive Sleep Apnea in 450 Men And Women with Congestive Heart Failure. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160:1101–6.
9. Gami A, Pressman G, Caples S. Association of atrial fibrillation and obstructive sleep apnea. *Circulation.* 2004;110:364–7.
10. Drager LF, Lopes HF, Maki-Nunes C, Trombetta IC, Toschi-Dias E, Alves MJNN, et al. The impact of obstructive sleep apnea on metabolic and inflammatory markers in consecutive patients with metabolic syndrome. *PLoS One.* 2010;5(8):1–8.
11. Costa LE, Uchôa CHG, Harmon RR, Bortolotto LA, Lorenzi-Filho G, Drager LF. Potential underdiagnosis of obstructive sleep apnoea in the cardiology outpatient setting. *Heart.* 2015;101(16):1288–92.
12. Kapur V, Strohl KP, Redline S, Iber C, O'Connor G, Nieto J. Underdiagnosis of sleep apnea syndrome in U.S. communities. *Sleep Breath.* 2002;6(2):49–54.
13. Marin JM, Carrizo SJ, Vicente E, Agusti AG. Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study. *Lancet.* 2005;365:1046–53.
14. Yaggi HK, Concato J, Kernan WN, Lichtman JH, Brass LM, Mohsenin V. Obstructive Sleep Apnea as a Risk Factor for Stroke and Death. *N Engl J Med.* 2005;353(19):2034–41.

15. Young T, Finn L, Peppard PE, Szklo-Coxe M, Austin D, Nieto FJ, et al. Sleep Disordered Breathing and Mortality: Eighteen-Year Follow-up of the Wisconsin Sleep Cohort. *Sleep*. 2008;31(8):1071–8.
16. Marshall NS, Wong KKH, Liu PY, Cullen SRJ, Knuiman MW, Grunstein RR. Sleep apnea as an independent risk factor for all-cause mortality: the Busselton Health Study. *Sleep*. 2008;31(8):1079–85.
17. Punjabi NM, Caffo BS, Goodwin JL, Gottlieb DJ, Newman AB, O'Connor GT, et al. Sleep-disordered breathing and mortality: A prospective cohort study. *PLoS Med*. 2009;6(8):1–9.
18. Drager LF, Polotsky VY, O'Donnell CP, Cravo SL, Lorenzi-Filho G, Machado BH. Translational approaches to understanding metabolic dysfunction and cardiovascular consequences of obstructive sleep apnea. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2015;309(7):H1101–11.
19. Bradley TD, Floras JS. Obstructive sleep apnea and its cardiovascular consequences. *Lancet*. 2009
20. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. 1992;340(8828):1111–5.
21. Reddy KG, Nair RN, Sheehan HM, Hodgson JM. Evidence that selective endothelial dysfunction may occur in the absence of angiographic or ultrasound atherosclerosis in patients with risk factors for atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 1994 Mar 15;23(4):833–43.
22. Poredos P. Endothelial dysfunction in the pathogenesis of atherosclerosis. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2001;7(4):276–80.
23. Gozal D, Kheirandish-Gozal L. Cardiovascular morbidity in obstructive sleep apnea: Oxidative stress, inflammation, and much more. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177(4):369–75.
24. Lavie L. Obstructive sleep apnoea syndrome - An oxidative stress disorder. *Sleep Med Rev*. 2003;7(1):35–51.
25. Minoguchi K, Yokoe T, Tazaki T, Minoguchi H, Tanaka A, Oda N, et al. Increased Carotid Intima-Media Thickness and Serum Inflammatory Markers in Obstructive Sleep Apnea. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Sep 1;172(5):625–30.
26. Drager LF, Bortolotto LA, Figueiredo AC, Krieger EM, Lorenzi-Filho G. Effects of continuous positive airway pressure on early signs of atherosclerosis in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176(7):706–12.
27. Drager LF, Bortolotto LA, Lorenzi MC, Figueiredo AC, Krieger EM, Lorenzi-Filho G. Early signs of atherosclerosis in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172(5):613–8.
28. Christou K, Moulas AN, Pastaka C, Gourgoulisanis KI. Antioxidant capacity in obstructive sleep apnea patients. *Sleep Med*. 2003 May;4(3):225–8.
29. Williams IL, Wheatcroft SB, Shah a M, Kearney MT. Obesity, atherosclerosis and the vascular endothelium: mechanisms of reduced nitric oxide bioavailability in obese humans. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002;26:754–64.

30. von Känel R, Loredó JS, Ancoli-Israel S, Dimsdale JE. Association between sleep apnea severity and blood coagulability: Treatment effects of nasal continuous positive airway pressure. *Sleep Breath*. 2006;10(3):139–46.
31. Fava C, Montagnana M, Favalaro EJ, Guidi GC, Lippi G. Obstructive sleep apnea syndrome and cardiovascular diseases. *Semin Thromb Hemost*. 2011;37(3):280–97.
32. Toukh M, Pereira EJ, Falcon BJ, Liak C, Lerner M, Hopman WM, Iscoe S, Fitzpatrick MF OM. CPAP reduces hypercoagulability, as assessed by thromboelastography, in severe obstructive sleep apnoea. *Respir Physiol Neurobiol*. 2012;183(3):218–23.
33. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. Vol. 69, *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2001.
34. Strimbu K, Tavel J a. What are Biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*. 2010;5(6):463–6.
35. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*. 2010;56(11):1733–41.
36. De Luca Canto G, Pachêco-Pereira C, Aydinöz S, Major PW, Flores-Mir C, Gozal D. Biomarkers associated with obstructive sleep apnea: A scoping review. Vol. 23, *Sleep Medicine Reviews*. 2015. p. 28–45.
37. Deng T, Lyon CJ, Bergin S, Caligiuri MA, Hsueh WA. Obesity, Inflammation, and Cancer. Vol. 11, *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2016. 421-449 p.
38. Sutherland JP, Mckinley B, Eckel RH. The Metabolic Syndrome and Inflammation. *Metab Syndr Relat Disord*. 2004;2(2):82–104.
39. Khalyfa A, Gileles-Hillel A, Gozal D. The Challenges of Precision Medicine in Obstructive Sleep Apnea. *Sleep Med Clin*. 2016;11(2):213–26.
40. Gharib SA, Khalyfa A, Abdelkarim A, Bhushan B, Gozal D. Integrative miRNA-mRNA profiling of adipose tissue unravels transcriptional circuits induced by sleep fragmentation. *PLoS One*. 2012;7(5):1–8.
41. Han M, Toli J, Abdellatif M. MicroRNAs in the cardiovascular system. *Curr Opin Cardiol*. 2011;26(3):181–9.
42. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843–54.
43. Griffiths-Jones S. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res*. 2004;32:D109-11.
44. Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007;23:175–205.
45. Thum T. MicroRNA therapeutics in cardiovascular medicine. *EMBO Mol Med*. 2012;4(1):3–14.
46. Urbich C, Kuehbacher A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res*. 2008;79(4):581–8.
47. Van-Rooij E, Olson EN. MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutics targets. *J Clin Invest*. 2007;117(9).

48. Czech B, Hannon GJ. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes Benjamin. *Nat Rev Genet.* 2011;12:19–31.
49. Mulrane L, McGee SF, Gallagher WM, O'Connor DP. miRNA dysregulation in breast cancer. *Cancer Res.* 2013;73(22):6554–62.
50. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(5):376–85.
51. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell.* 2005;120(1):15–20.
52. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. In: James C. Carrington, editor. *PLoS Biology* [Internet]. Public Library of Science; 2005. p. 0404–18.
53. Volinia S, Calin GA, Liu C-G, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci.* 2006;103(7):2257–61.
54. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific MicroRNAs from mouse. *Curr Biol.* 2002;12(9):735–9.
55. Fish JE, Santoro MM, Morton SU, Yu S, Yeh RF, Wythe JD, et al. miR-126 Regulates Angiogenic Signaling and Vascular Integrity. *Dev Cell.* 2008;15(2):272–84.
56. Callis TE, Pandya K, Hee YS, Tang RH, Tatsuguchi M, Huang ZP, et al. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J Clin Invest.* 2009;119(9):2772–86.
57. Laterza OF, Lim L, Garrett-Engele PW, Vlasakova K, Muniappa N, Tanaka WK, et al. Plasma microRNAs as sensitive and specific biomarkers of tissue injury. *Clin Chem.* 2009;55(11):1977–83.
58. Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One.* 2008;3(9):1–7.
59. Di Stefano V, Zaccagnini G, Capogrossi MC, Martelli F. MicroRNAs as peripheral blood biomarkers of cardiovascular disease. *Vascul Pharmacol.* 2011;55(4):111–8.
60. Khalyfa A, Zhang C, Khalyfa AA, Foster GE, Beaudin AE, Andrade J, et al. Effect on Intermittent Hypoxia on Plasma Exosomal miRNA Signature and Endothelial Function in Healthy Adults. *Sleep.* 2016.
61. Khalyfa A, Kheirandish-Gozal L, Khalyfa A, Philby M, Alonso-Álvarez M, Mohammadi M, et al. Circulating Plasma Extracellular Microvesicle miRNA Cargo and Endothelial Dysfunction in OSA Children. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016;in Press:1–65.
62. Khalyfa A, Zhang C, Khalyfa A, Beaudin A, Andrade A, Poulin M, et al. Circulating Exosomal MicroRNA Signature In Young Healthy Adults Subjects Exposed To Intermittent Hypoxia And Following Normoxic Recovery. In 2016. p. A4612.
63. Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM. Circulating MicroRNAs: Novel biomarkers and

- extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circ Res.* 2012;110(3):483–95.
64. Schultz NA, Dehlendorff C, Jensen B V., Bjerregaard JK, Nielsen KR, Bojesen SE, et al. MicroRNA biomarkers in whole blood for detection of pancreatic cancer. *JAMA.* 2014;311(4):392–404.
 65. Meder B, Keller A, Vogel B, Haas J, Sedaghat-Hamedani F, Kayvanpour E, et al. MicroRNA signatures in total peripheral blood as novel biomarkers for acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* 2011;106(1):13–23.
 66. Hoekstra M, van der Lans CAC, Halvorsen B, Gullestad L, Kuiper J, Aukrust P, et al. The peripheral blood mononuclear cell microRNA signature of coronary artery disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;394(3):792–7.
 67. Pritchard CC, Kroh E, Wood B, Arroyo JD, Dougherty KJ, Miyaji MM, et al. Blood cell origin of circulating microRNAs: A cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prev Res.* 2012;5(3):492–7.
 68. Hua Z, Lv Q, Ye W, Wong CKA, Cai G, Gu D, et al. Mirna-directed regulation of VEGF and other angiogenic under hypoxia. *PLoS One.* 2006;1(1):1–13.
 69. Guimbellot JS, Erickson SW, Mehta T, Wen H, Page GP, Sorscher EJ, et al. Correlation of microRNA levels during hypoxia with predicted target mRNAs through genome-wide microarray analysis. *BMC Med Genomics.* 2009;2:15.
 70. Camps C, Buffa FM, Colella S, Moore J, Sotiriou C, Sheldon H, et al. Hsa-miR-210 is induced by hypoxia and is an independent prognostic factor in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14(5):1340–8.
 71. Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, Garzon R, Alder H, Agosto-Perez FJ, et al. A MicroRNA Signature of Hypoxia. *Mol Cell Biol.* 2007;27(5):1859–67.
 72. Kulshreshtha R, Davuluri R V, Calin G a, Ivan M. A microRNA component of the hypoxic response. *Cell Death Differ.* 2008;15(4):667–71.
 73. Hebert C, Norris K, Scheper MA, Nikitakis N, Sauk JJ. High mobility group A2 is a target for miRNA-98 in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer.* 2007;6:5.
 74. Donker RB, Mouillet JF, Nelson DM, Sadovsky Y. The expression of Argonaute2 and related microRNA biogenesis proteins in normal and hypoxic trophoblasts. *Mol Hum Reprod.* 2007;13(4):273–9.
 75. Salloum FN, Yin C, Kukreja RC. Role of miRs in Cardiac Preconditioning. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2010;56(6):581–8.
 76. Pulkkinen K, Malm T, Turunen M, Koistinaho J, Yla-Herttuala S. Hypoxia induces microRNA miR-210 in vitro and in vivo. Ephrin-A3 and neuronal pentraxin 1 are potentially regulated by miR-210. *FEBS Lett.* 2008;582(16):2397–401.
 77. Devlin C, Greco S, Martelli F, Ivan M. MiR-210: More than a silent player in hypoxia. *IUBMB Life.* 2011;63(2):94–100.
 78. Fasanaro P, Alessandra YD, Stefano V Di, Melchionna R, Romani S, Pompilio G, et al. microRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine-kinase ligand Ephrin-A3. *J Biol Chem.* 2008;283:15878–83.

79. Hu S, Huang M, Li Z, Jia F, Ghosh Z, Lijkwan MA, et al. MicroRNA-210 as a novel therapy for treatment of ischemic heart disease. *Circulation*. 2010;122:S124–31.
80. Dong S, Cheng Y, Yang J, Li J, Liu X, Wang X, et al. MicroRNA Expression Signature and the Role of MicroRNA-21 in the Early Phase of Acute Myocardial Infarction. *J Biol Chem*. 2009;284(43):29514–25.
81. Sayed D, He M, Hong C, Gao S, Rane S, Yang Z, et al. MicroRNA-21 Is a Downstream Effector of AKT That Mediates Its Antiapoptotic Effects via Suppression of Fas Ligand. *J Biol Chem*. 2010;285(26):20281–90.
82. Scott E, Loya K, Mountford J, Milligan G, Baker AH. MicroRNA regulation of endothelial homeostasis and commitment - Implications for vascular regeneration strategies using stem cell therapies. *Free Radic Biol Med*. 2013;64:52–60.
83. Shi H, Chen L, Wang H, Zhu S, Dong C, Webster KA, et al. Synergistic induction of miR-126 by hypoxia and HDAC inhibitors in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;430:827–32.
84. Fish JE, Srivastava D. MicroRNAs: opening a new vein in angiogenesis research. *Sci Signal*. 2009;2(52):1–7.
85. Carreras A, Kayali F, Zhang J, Hirotsu C, Wang Y, Gozal D. Metabolic effects of intermittent hypoxia in mice: steady versus high-frequency applied hypoxia daily during the rest period. *AJP Regul Integr Comp Physiol*. 2012;303(7):R700–9.
86. Sanchez-De-La-Torre M, Khalyfa A, Sanchez-De-La-Torre A, Martinez-Alonso M, Martinez-Garcia MA, Barcel?? A, et al. Precision Medicine in Patients With Resistant Hypertension and Obstructive Sleep Apnea Blood Pressure Response to Continuous Positive Airway Pressure Treatment. *J Am Coll Cardiol*. 2015;66(9):1023–32.
87. Li K, Wei P, Qin Y, Wei Y. MicroRNA expression profiling and bioinformatics analysis of dysregulated microRNAs in obstructive sleep apnea patients. *Medicine*. 2017;96(34):e7917.
88. Li K, Chen Z, Qin Y, Wei Y. MiR-664a-3p expression in patients with obstructive sleep apnea. *Medicine*. 2018;97(6):e9813.
89. Drager LF, Togeiro SM, Polotsky VY, Lorenzi-Filho G. Obstructive sleep apnea: A cardiometabolic risk in obesity and the metabolic syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(7):569–76.
90. Netzer NC, Stoohs RA, Netzer CM, Clark K, Strohl KP. Using the Berlin Questionnaire To Identify Patients at Risk for the Sleep Apnea Syndrome. *Ann Intern Med*. 1999;131(7):485–91.
91. Johns MW. A new method for measuring daytime sleepiness: The Epworth Sleepiness Scale. *Sleep J Sleep Res Sleep Med*.;14(6):540–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1798888>
92. Berry RB, Brooks R, Gamaldo CE, Harding SM, Lloyd RM, Marcus CL, et al. The AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events: Rules, Terminology and Technical Specifications. Illinois: American Academy of Sleep Medicine; 2015.

93. Iber C, Ancoli-Israel S, Chesson Jr AL, Quan SF. The AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events: Rules, Terminology and Technical Specifications. 1^a. American Academy of Sleep Medicine. 2007.
94. World Health Organization. Obesity: Preventing And Managing The Global Epidemic. 1999.
95. World Health Organization. WHO STEPS Surveillance Manual: the WHO STEPwise approach to chronic disease risk factor surveillance. World Health Organization, Geneva. 2005. 1-453 p.
96. Laakso M, Matilainen V, Keinanen-Kiukaanniemi S. Association of neck circumference with insulin resistance-related factors. *Int J Obes*. 2002;26:873–5.
97. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Bohm M, et al. Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Blood Press*. 2013;1–86.
98. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc*. 1995;57(1):289–300.
99. Dweep H, Gretz N. miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nat Methods*. 2015;12(8):697–697.
100. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.
101. Lardizábal MN, Nocito AL, Daniele SM, Ornella LA, Palatnik JF, Veggi LM. Reference genes for real-time PCR quantification of micrnas and messenger RNAs in rat models of hepatotoxicity. *PLoS One*. 2012;7(5).
102. Benes V, Castoldi M. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods*. 2010;50(4):244–9.
103. van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson J a, Hill J, Olson EN. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*. 2007;316(5824):575–9.
104. McDonald MK, Ramanathan S, Touati A, Zhou Y, Thanawala RU, Alexander GM, et al. Regulation of proinflammatory genes by the circulating microRNA hsa-miR-939. *Sci Rep*. 2016;6:1–11.
105. Cheng XW, Wan YF, Zhou Q, Wang Y, Zhu HQ. MicroRNA-126 inhibits endothelial permeability and apoptosis in apolipoprotein E-knockout mice fed a high-fat diet. *Mol Med Rep*. 2017;16:3061–8.
106. Wang J, Chen S, Ma X, Cheng C, Xiao X, Chen J, et al. Effects of endothelial progenitor cell-derived microvesicles on hypoxia/reoxygenation-induced endothelial dysfunction and apoptosis. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;1–9.
107. Wang J, Wang Y, Wang Y, Ma Y, Lan Y, Yang X. Transforming growth factor β -regulated microrna-29a promotes angiogenesis through targeting the phosphatase and tensin homolog in endothelium. *J Biol Chem*. 2013;288(15):10418–26.
108. Liu C, Zhong Q, Huang Y. Elevated plasma miR-29a levels are associated with increased carotid intima-media thickness in atherosclerosis patients. *Tohoku J Exp Med*. 2017;241(3):183–8.

109. Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, De Windt LJ, Van Der Wal AC, Kok WE, et al. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. *Circ Res*. 2010;106(6):1035–9.
110. Bayes-Genis A, Lanfear DE, de Ronde MWJ, Lupón J, Leenders JJ, Liu Z, et al. Prognostic value of circulating microRNAs on heart failure-related morbidity and mortality in two large diverse cohorts of general heart failure patients. *Eur J Heart Fail*. 2018;20:67–75.
111. Boven N V, Kardys I, Vark LC V, Akkerhuis KM, de Ronde MW, Khan MA, et al. Serially measured circulating microRNAs and adverse clinical outcomes in patients with acute heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2018;20:89–96.
112. Li H, Yang T, Shang D, Sun Z. miR-1254 promotes lung cancer cell proliferation by targeting SFRP1. *Biomed Pharmacother*. 2017;92:913–8.
113. Foss KM, Sima C, Ugolini D, Neri M, Allen KE, Weiss GJ. MiR-1254 and miR-574-5p: Serum-based microRNA biomarkers for early-stage non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2011;6(3):482–8.
114. Peng H, Wang J, Li J, Zhao M, Huang SK, Gu YY, et al. A circulating non-coding RNA panel as an early detection predictor of non-small cell lung cancer. *Life Sci*. 2016;151:235–42.
115. Ezan J, Leroux L, Barandon L, Dufourcq P, Jaspard B, Moreau C, et al. FrzA/sFRP-1, a secreted antagonist of the Wnt-Frizzled pathway, controls vascular cell proliferation in vitro and in vivo. *Cardiovasc Res*. 2004;63(4):731–8.
116. Gozal D, Farré R, Javier Nieto F. Putative links between sleep apnea and cancer from hypotheses to evolving evidence. *Chest*. 2015;148(5):1140–7.
117. Martínez-García MÁ, Martorell-Calatayud A, Nagore E, Valero I, Selma MJ, Chiner E, et al. Association between sleep disordered breathing and aggressiveness markers of malignant cutaneous melanoma. *Eur Respir J*. 2014;43(6):1661–8.
118. Nieto FJ, Peppard PE, Young T, Finn L, Hla KM, Farré R. Sleep-disordered breathing and cancer mortality: Results from the Wisconsin Sleep Cohort Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186(2):190–4.
119. Rofstad EK, Gaustad JV, Egeland TAM, Mathiesen B, Galappathi K. Tumors exposed to acute cyclic hypoxic stress show enhanced angiogenesis, perfusion and metastatic dissemination. *Int J Cancer*. 2010;127(7):1535–46.
120. Lee SLC, Rouhi P, Jensen LD, Zhang D, Ji H, Hauptmann G, et al. Hypoxia-induced pathological angiogenesis mediates tumor cell dissemination, invasion, and metastasis in a zebrafish tumor model. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106(46):19485–90.
121. Griffiths-Jones S, Bateman A, Marshall M, Khanna A, Eddy SR. Rfam: An RNA family database. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(1):439–41.
122. Tadano T, Kakuta Y, Hamada S, Shimodaira Y, Kuroha M, Kawakami Y, et al. MicroRNA-320 family is downregulated in colorectal adenoma and affects tumor proliferation by targeting CDK6. *World J Gastrointest Oncol*. 2016;8(7):532.
123. Arai T, Fuse M, Goto Y, Kaga K, Kurozumi A, Yamada Y, et al. Molecular pathogenesis of interstitial cystitis based on microRNA expression signature: miR-320 family-regulated molecular pathways and targets. *J Hum Genet*. 2018

124. Ren XP, Wu J, Wang X, Sartor MA, Qian J, Jones K, et al. MicroRNA-320 is involved in the regulation of cardiac ischemia/reperfusion injury by targeting heat-shock protein 20. *Circulation*. 2009;119(17):2357–66.
125. Song C-L, Liu B, Diao H-Y, Shi Y-F, Li Y-X, Zhang J-C, et al. The Protective Effect of MicroRNA-320 on Left Ventricular Remodeling after Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in the Rat Model. *Int J Mol Sci*. 2014;15(10):17442–56.
126. Song C-L, Liu B, Diao H-Y, Shi Y-F, Zhang J-C, Li Y-X, et al. Down-regulation of microRNA-320 suppresses cardiomyocyte apoptosis and protects against myocardial ischemia and reperfusion injury by targeting IGF-1. *Oncotarget*. 2016;7(26):39740–57.
127. Weber K, Rostert N, Bauersachs S, Wess G. Serum microRNA profiles in cats with hypertrophic cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem*. 2015;402(1–2):171–80.
128. Wang W, Sun G, Zhang L, Shi L, Zeng Y. Circulating MicroRNAs as novel potential biomarkers for early diagnosis of acute stroke in humans. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2014;23(10):2607–13.
129. Shah N, Redline S, Yaggi HK, Wu R, Zhao CG, Ostfeld R, et al. Obstructive sleep apnea and acute myocardial infarction severity: Ischemic preconditioning? *Sleep Breath*. 2013;17(2):819–26.
130. Aronson D, Lavie L, Lavie P. Does OSA Upregulate Cardioprotective Pathways to an Ischemic Insult? *Chest*. 2018;153(2):339–48.
131. Xu WQ, Yu Z, Xie Y, Huang GQ, Shu XH, Zhu Y, et al. Therapeutic effect of intermittent hypobaric hypoxia on myocardial infarction in rats. *Basic Res Cardiol*. 2011;106(3):329–42.
132. Zong P, Setty S, Sun W. Intermittent hypoxic training protects canine myocardium from infarction.. 2004;229:806–12.
133. Neckář J, Ošťádal B, Kolář F. Myocardial infarct size-limiting effect of chronic hypoxia persists for five weeks of normoxic recovery. *Physiol Res*. 2004;53(6):621–8.
134. Ben Ahmed H, Boussaid H, Longo S, Tlili R, Fazaa S, Baccar H, et al. Impact of obstructive sleep apnea in recruitment of coronary collaterality during inaugural acute myocardial infarction. *Ann Cardiol Angeiol*. 2015;64(4):273–8.
135. Sánchez-de-la-Torre A, Soler X, Barbé F, Florés M, Maisel A, Malhotra A, et al. Cardiac Troponin Values in Patients With Acute Coronary Syndrome and Sleep Apnea: A Pilot Study. *Chest*. 2018;153(2):339–48.
136. Buchner S, Satz A, Debl K, Hetzenecker A, Luchner A, Husser O, et al. Impact of sleep-disordered breathing on myocardial salvage and infarct size in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2014;35(3):192–9.
137. Lee C-H, Khoo S-M, Chan MY, Wong H-B, Low AF, Phua Q-H, et al. Severe obstructive sleep apnea and outcomes following myocardial infarction. *J Clin sleep Med JCSM Off Publ Am Acad Sleep Med*. 2011;7(6):616–21.
138. Perez-Carbonell L, Sinicropo FA, Alberts SR, Oberg AL, Balaguer F, Castells A, et al. MiR-320e is a novel prognostic biomarker in colorectal cancer. *Br J Cancer*.

- 2015;113(1):83–90.
139. Lee S, Kim BG, Kim JW, Lee KL, Koo DL, Nam H, et al. Obstructive sleep apnea is associated with an increased risk of colorectal neoplasia. *Gastrointest Endosc.* 2017;85(3):568–573.e1.
 140. Li E, Ji P, Ouyang N, Zhang Y, Wang XY, Rubin DC, et al. Differential expression of miRNAs in colon cancer between African and Caucasian Americans: Implications for cancer racial health disparities. *Int J Oncol.* 2014;45(2):587–94.
 141. Bovell LC, Shanmugam C, Putcha BDK, Katkoori VR, Zhang B, Bae S, et al. The prognostic value of MicroRNAs varies with patient race/ethnicity and stage of colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2013;19(14):3955–65.
 142. Wang T, Zhang X, Obijuru L, Laser J, Aris V, Lee P, et al. A Micro-RNA Signature Associated with Race, Tumor Size, and Target Gene Activity in Human Uterine Leiomyomas. *Genes, Chromosom cancer*. 2007;46:336–47.
 143. Ameling S, Kacprowski T, Chilukoti RK, Malsch C, Liebscher V, Suhre K, et al. Associations of circulating plasma microRNAs with age, body mass index and sex in a population-based study. *BMC Med Genomics.* 2015;8(1):1–9.
 144. Szabo G, Bala S. MicroRNAs in Liver Diseases. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol Adv.* 2013;1–11.
 145. Bala S, Marcos M, Szabo G. Emerging role of microRNAs in liver diseases. *World J Gastroenterol.* 2009;15(45):5633–40.
 146. Estep M, Armistead D, Hossain N, Elarainy H, Goodman Z, Baranova A, et al. Differential expression of miRNAs in the visceral adipose tissue of patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2010;32:487–97.
 147. Fan CH, Iacobas DA, Zhou D, Chen QF, Lai JK, Gavrialov O. Gene expression and phenotypic characterization of mouse heart after chronic constant or intermittent hypoxia. *Physiol Genomics.* 2005;22:292–307.
 148. Boštjančič E, Zidar N, Štajer D, Glavač D. MicroRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-208 are dysregulated in human myocardial infarction. *Cardiology.* 2010;115(3):163–9.
 149. Callis TE, Wang DZ. Taking microRNAs to heart. *Trends Mol Med.* 2008;14(6):254–60.
 150. Einvik G, Røsjø H, Randby A, Namtvedt SK, Hrubos-Strøm H, Brynildsen J, et al. Severity of Obstructive Sleep Apnea is Associated with Cardiac Troponin I Concentrations in a Community-based Sample: Data from the Akershus Sleep Apnea Project. *Sleep.* 2014;37(6):1111–6.
 151. Wang G-K, Zhu J-Q, Zhang J-T, Li Q, Li Y, He J, et al. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J.* 2010;31(6):659–66.
 152. Guo Z, Shao L, Zheng L, Du Q. miRNA-939 regulates human inducible nitric oxide synthase posttranscriptional gene expression in human hepatocytes. *Pnas.* 2012;109(15):5826–5831.
 153. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Curtis C. Human Cancers. *Science.* 1991;253:49–53.

154. Sano M, Minamino T, Toko H, Miyauchi H, Orimo M, Qin Y, et al. p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. *Nature*. 2007;446(7134):444–8.
155. Hou S, Fang M, Zhu Q, Liu Y, Liu L, Li X. MicroRNA-939 governs vascular integrity and angiogenesis through targeting γ -catenin in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;484(1):27–33.
156. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*. 2008;18(10):997–1006.
157. Kosaka N, Yoshioka Y, Hagiwara K, Tominaga N, Katsuda T, Ochiya T. Trash or Treasure: Extracellular microRNAs and cell-to-cell communication. *Front Genet*. 2013;4:1–8.
158. Zerneck A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal*. 2009;2(100).

10 ANEXOS

Anexo 1: Termos biológicos enriquecidos nos quais constam os genes-alvo preditos para os 6 miRNAs resultantes da comparação entre os grupos controle e AOS moderada.

Vias de sinalização	Nº de genes	%	P	Fold Enrichment	FDR	Bonferroni
Glioma	17	1,185	0,00011	2,964	0,134	0,019
Câncer colorretal	19	1,324	0,00042	2,484	0,513	0,072
Sinalização de Wnt	27	1,882	0,00096	1,964	1,167	0,156
Vias de câncer	46	3,206	0,00274	1,540	3,320	0,385
Sinalização do Cálcio	28	1,951	0,00433	1,747	5,191	0,536
Sinalização da neurotrofina	21	1,463	0,00763	1,860	8,981	0,742
Carcinoma de célula basal	12	0,836	0,00931	2,396	10,853	0,809
Sinalização da MAPK	37	2,578	0,00943	1,522	10,986	0,813
Melanoma	14	0,976	0,01047	2,166	12,131	0,845
Orientação do axônio	21	1,463	0,01174	1,788	13,502	0,876
Câncer de próstata	16	1,115	0,01328	1,974	15,140	0,906
Moléculas de adesão celular (CAMs)	21	1,463	0,01495	1,747	16,889	0,930
Melanogênese	17	1,185	0,01580	1,886	17,772	0,940
Leucemia mielóide crônica	14	0,976	0,01636	2,050	18,337	0,946
Regulação da actina do citoesqueleto	30	2,091	0,01869	1,532	20,680	0,965
Esclerose lateral amiotrófica (ALS)	11	0,767	0,01916	2,279	21,152	0,967
Ritmo circadiano	5	0,348	0,02477	4,224	26,514	0,988
Infecção por <i>Vibrio cholerae</i>	11	0,767	0,02742	2,157	28,928	0,993
Reabsorção do sódio regulada pela Aldosterona	9	0,627	0,02867	2,411	30,044	0,994
Adesão focal	27	1,882	0,03979	1,475	39,270	0,999
Câncer de pulmão de células maiores	10	0,697	0,05221	2,034	48,241	1,000
Sistema de sinalização do fosfatidilinositol	12	0,836	0,06888	1,781	58,381	1,000
Interação de receptor citocina-citocina	32	2,230	0,07342	1,341	60,804	1,000
Câncer de pulmão de células pequenas	13	0,906	0,07556	1,700	61,902	1,000
Leucemia mieloide aguda	10	0,697	0,07607	1,894	62,162	1,000
Sinalização de quimiocina	24	1,672	0,08068	1,410	64,414	1,000
Junção aderente	12	0,836	0,08646	1,712	67,066	1,000
Sinalização de ErbB	13	0,906	0,09300	1,641	69,849	1,000

Nº de genes - quantidade de genes relacionados à via de sinalização. % - nº de genes envolvidos/nº total de genes. FDR (*False Discovery Ratio*). O termo *fold enrichment* corresponde a quantas vezes o nº de genes encontrado para cada via é maior que o nº de genes esperado para esta via. Quanto maior mais enriquecida é a via. Valor *P* modificado calculado a partir do teste exato de Fisher. Quanto menor, mais enriquecida é a via. Wnt - *Wingless-type MMTV integration site family*. MAPK - *Mitogen Activated Protein Kinase*. ErbB - *Epidermal growth factor receptor*.

Anexo 2: Termos biológicos enriquecidos nos quais constam os genes-alvo preditos para os 9 miRNAs resultantes da comparação entre os grupos controle e AOS grave.

Vias de sinalização	Nº de genes	%	P	Fold Enrichment	FDR	Bonferroni
Sinalização de Wnt	27	1,931	0,00014	2,218	0,173	0,025
Junção aderente	17	1,216	0,00032	2,738	0,393	0,055
Esclerose lateral amiotrófica (ALS)	12	0,858	0,00275	2,808	3,328	0,386
Sinalização do Cálcio	26	1,860	0,00338	1,832	4,069	0,450
Sistema de sinalização do fosfatidilinositol	14	1,001	0,00548	2,346	6,529	0,622
Vias de câncer	40	2,861	0,00761	1,512	8,954	0,741
Sinalização do TGF- β	15	1,073	0,00891	2,138	10,409	0,795
Glioma	12	0,858	0,01074	2,362	12,425	0,852
Sinalização da insulina	20	1,431	0,01101	1,837	12,715	0,859
Câncer colorretal	14	1,001	0,01575	2,067	17,717	0,940
Fagocitose mediada por Fc γ R	15	1,073	0,01871	1,958	20,701	0,965
Melanogênese	15	1,073	0,02595	1,879	27,601	0,990
Endocitose	23	1,645	0,03755	1,550	37,508	0,999
Leucemia mieloide aguda	10	0,715	0,04029	2,138	39,653	0,999
Reabsorção do sódio regulada pela Aldosterona	8	0,572	0,04275	2,420	41,530	1,000
Potenciação de longo termo	11	0,787	0,04368	2,006	42,226	1,000
Orientação do axônio	17	1,216	0,05281	1,634	48,646	1,000
Câncer endometrial	9	0,644	0,05386	2,147	49,343	1,000
Melanoma	11	0,787	0,05610	1,922	50,792	1,000
Leucemia mielóide crônica	11	0,787	0,07596	1,819	62,106	1,000
Infecção por <i>Vibrio cholerae</i>	9	0,644	0,07714	1,993	62,696	1,000
Câncer de tireóide	6	0,429	0,07854	2,566	63,384	1,000
Sinalização de ErbB	12	0,858	0,08758	1,711	67,561	1,000
Biossíntese de O-Glicana	6	0,429	0,08834	2,480	67,889	1,000
Sinalização da p53	10	0,715	0,09270	1,824	69,727	1,000
Câncer de próstata	12	0,858	0,09916	1,672	72,272	1,000

Nº de genes - quantidade de genes relacionados à via de sinalização. % - nº de genes envolvidos/nº total de genes. FDR (*False Discovery Ratio*). O termo *fold enrichment* corresponde a quantas vezes o nº de genes encontrado para cada via é maior que o nº de genes esperado para esta via. Quanto maior mais enriquecida é a via. Valor *P* modificado calculado a partir do teste exato de Fisher. Quanto menor, mais enriquecida é a via. Wnt - *Wingless-type MMTV integration site family*. TGF- β - *Tumoral growth factor- β* . ErbB - *Epidermal growth factor receptor*. Fc γ R - *High affinity immunoglobulin gamma Fc*.

Anexo 3: Termos biológicos enriquecidos nos quais constam os genes-alvo preditos para os 3 miRNAs resultantes da comparação entre os grupos AOS leve e AOS grave.

Vias de sinalização	Nº de genes	%	P	Fold Enrichment	FDR	Bonferroni
Sinalização de Wnt	17	2,128	0,00073	2,590	0,865	0,100
Câncer colorretal	12	1,502	0,00088	3,287	1,043	0,120
Sinalização da neutrofina	14	1,752	0,00252	2,598	2,946	0,305
Melanogênese	12	1,502	0,00340	2,789	3,953	0,387
Vias de câncer	24	3,004	0,01384	1,684	15,234	0,866
Leucemia mielóide crônica	9	1,126	0,01501	2,761	16,419	0,887
Orientação do axônio	12	1,502	0,02314	2,140	24,240	0,966
Sinalização da adipocitocina	8	1,001	0,02473	2,747	25,690	0,973
Reabsorção do sódio regulada pela Aldosterona	6	0,751	0,03053	3,367	30,765	0,988
Sinalização da insulina	12	1,502	0,03109	2,045	31,240	0,989
Câncer de pâncreas	8	1,001	0,03499	2,557	34,447	0,994
Câncer de próstata	9	1,126	0,03768	2,327	36,578	0,996
Sinalização da MAPK	19	2,378	0,03930	1,637	37,837	0,997
Junção aderente	8	1,001	0,04775	2,391	44,015	0,999
Endocitose	14	1,752	0,05434	1,751	48,445	1,000
Proteólise mediada pela ubiquitina	11	1,377	0,07176	1,847	58,644	1,000
Sinalização da PPAR	7	0,876	0,07660	2,334	61,130	1,000
Sinalização de ErbB	8	1,001	0,08125	2,116	63,389	1,000
Carcinoma de célula basal	6	0,751	0,08775	2,510	66,344	1,000

Nº de genes - quantidade de genes relacionados à via de sinalização. % - nº de genes envolvidos/nº total de genes. FDR (*False Discovery Ratio*). O termo *fold enrichment* corresponde a quantas vezes o nº de genes encontrado para cada via é maior que o nº de genes esperado para esta via. Quanto maior mais enriquecida é a via. Valor *P* modificado calculado a partir do teste exato de Fisher. Quanto menor, mais enriquecida é a via. Wnt - *Wingless-type MMTV integration site family*. MAPK - *Mitogen Activated Protein Kinase*. PPAR - *Peroxisome proliferator-activated receptor*. ErbB - *Epidermal growth factor receptor*.

