

**CAMILA BAE UNEDA**

**Estudo da expressão gênica da musculatura da parede lateral  
da faringe de pacientes apneicos e não apneicos**

**Versão Corrigida**

(Resolução CoPGr 6018/11 de 01 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo**

**2024**

**CAMILA BAE UNEDA**

**Estudo da expressão gênica da musculatura da parede lateral  
da faringe de pacientes apneicos e não apneicos**

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

Programa de Otorrinolaringologia

Orientador: Prof. Dr. Michel Burihan Cahali

Coorientadora: Profa. Dra. Suely Kazue  
Nagahashi Marie

**Versão Corrigida**

(Resolução CoPGr 6018/11 de 01 de novembro de 2011. A versão original está  
disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2024

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Uneda, Camila Bae

Estudo da expressão gênica da musculatura da parede lateral da faringe de pacientes apneicos e não apneicos / Camila Bae Uneda; Michel Burihan Cahali, orientador; Suely Kazue Nagahashi Marie, coorientador. -- São Paulo, 2024.

Tese (Doutorado) -- Programa de Otorrinolaringologia. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2024.

1. Transcriptoma 2. RNA-Seq 3. Músculos faríngeos  
4. Apneia obstrutiva do sono I. Cahali, Michel Burihan, orient. II. Marie, Suely Kazue Nagahashi, coorient. III. Título

USP/FM/DBD-098/24

Responsável: Daniela Amaral Barbosa, CRB-8 7533

Aos filhos que se tornaram anjos  
prematuramente e à Eva, nossa fonte  
de esperança renovada.

## AGRADECIMENTOS

---

---

Agradeço primeiramente a **Deus**, por Sua infinita bondade, por me fortalecer e sempre me conduzir pelos melhores caminhos.

Ao professor e orientador **Dr. Michel Burihan Cahali** pela oportunidade, confiança, dedicação e ensinamentos desde o fellow em medicina do sono e, principalmente, durante o desenvolvimento desta tese.

À professora e coorientadora **Dra. Suely Kazue Nagahashi Marie** por disponibilizar seu tempo, laboratório e equipe, por sua enorme experiência científica e conhecimento compartilhados, que viabilizaram o desenvolvimento desta tese.

Ao professor, também orientador, **Dr. Luiz Ubirajara Sennes** pela oportunidade, auxílio irrestrito, compreensão, conhecimento compartilhado e dedicação ao desenvolvimento desta tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao **Dr. Bruno Bernardo Duarte**, que deu início aos estudos que possibilitaram a execução desta tese, pela paciência, ensinamentos, apoio e conhecimento compartilhado durante o fellow e durante o programa de pós-graduação.

Aos alunos, colegas e pesquisadores do laboratório de investigação em neurologia (**LIM-15**), em especial: **Eliene, Adaliana e Stella**, pela colaboração e ensinamentos durante o desenvolvimento da tese.

À minha mãe, **Angela**, minha maior incentivadora. Aquela que sempre mais confiou em meu potencial. Agradeço por ser exemplo de garra, força e determinação.

Ao meu pai, **Antonio Carlos**, por ser sempre exemplo de sensatez e lucidez. Sua orientação e apoio incondicional foram alicerces para toda minha jornada de vida e acadêmica.

Ao meu marido, **Luis Felipe**, pelo suporte e compreensão diariamente dispensados. Pelo apoio e dedicação incondicional por mim e por nossa família. Por sua presença ao meu lado nos momentos mais difíceis de nossas vidas e também nos mais alegres. É uma honra e alegria imensurável dividir a vida com você.

À minha irmã, **Livia**, meu cunhado, **Renan**, e minha sobrinha, **Maria Luísa**, por estarem presentes e sempre disponíveis mesmo à distância e por tantas alegrias compartilhadas.

À minha querida família em Niterói, meus sogros, **Ada** e **Fernando**, meus cunhados, **Leandro** e **Daniella** e sobrinhos, **Maria Eduarda** e **João Victor**, agradeço o acolhimento, o incentivo e suporte recebidos.

Aos professores **Gilberto Formigoni** e **Alexandre Nakasato** pelo acolhimento durante o ano de fellowship em medicina do sono. Por serem, junto ao prof. **Michel Cahali**, os melhores exemplos de tudo que sei e sou dentro da especialidade. Tenho muito orgulho por ter sido formada por um time como o de vocês.

Aos amigos e companheiros do período do fellow: **Mariana**, **Viviane**, **Cássio**, **Bruno**, **Marcela**, **Thaís** e aos preceptores, residentes e fellows da ORL FMUSP de 2019 por todo suporte e amizade.

Aos professores **Geraldo Lorenzi-Filho**, **Pedro Genta**, **Rosa Hasan**, **Letícia Soster** e **Alexandre Pinto de Azevedo**, que também me acolheram como parte do time da residência de medicina do sono no ano de 2019 e por todo conhecimento compartilhado.

Às amigas, companheiras de residência médica, **Juliana** e **Larissa**, por terem sido suporte e incentivo e por permanecerem sempre presentes e na torcida pelo meu sucesso.

Aos mestres, amigos e companheiros do Hospital Naval Marcílio Dias: **Daniella, Nilce, Lana, Alonço, Cláudia, Luiz, Felipe, Elisa, Alexandre, Chalfun, Camilo, Bernardo, Caroline, Thompson, Nayadja, Fabrícia, Juliana, Isabela, Cora, Laura, Natashi, Sara** e tantos outros que passaram por minha trajetória durante a formação como otorrinolaringologista e que contribuíram para o meu amor pela especialidade e para despertar a paixão pela medicina do sono.

Às amigas, que também são família, **Louise, Santuzza, Luiza e Lorena**, agradeço por terem participado da formação de muito do que sou hoje e por se fazerem sempre presentes em todos os acontecimentos mais importantes da minha vida, apesar da distância física.

À amiga de faculdade e da vida, **Thácia**, e às profissionais **Ana Paula, Ana Cláudia e Margareth**, que me acompanharam durante os momentos de maior dificuldade e me auxiliaram na manutenção da saúde mental, sendo escuta, apoio e direcionamento que me possibilitaram a conclusão dessa tese.

À equipe da ORL FMUSP, em especial: **Márcia, Marileide e Lucivânia** por todo o auxílio e prestatividade durante o período de fellow e de pós-graduação.

Aos demais amigos e familiares, aos alunos e pacientes que confiaram em mim durante toda a minha trajetória acadêmica, meu sincero agradecimento.

Por fim, agradeço à **Catarina**, primeira filha gerada e amada, que tão cedo nos deixou para se tornar um anjo, mas que tanto me ensinou e transformou durante sua breve passagem por aqui.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.*

*Marthin Luther King*



## RESUMO

---

---

Uneda CB. Estudo da expressão gênica da musculatura da parede lateral da faringe de pacientes apneicos e não apneicos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2024.

**INTRODUÇÃO:** A Apneia Obstrutiva do Sono (AOS) é uma doença complexa que resulta da interação de fatores genéticos e ambientais. É um distúrbio prevalente, caracterizado por colapsos recorrentes da via aérea durante o sono. O papel da musculatura da faringe na etiologia da doença é significativo, porém os aspectos genéticos envolvidos precisam ser melhor elucidados. Este estudo objetiva explorar o transcriptoma dos músculos da parede lateral da faringe, tecido diretamente envolvido nos colapsos das vias aéreas, para identificar genes diferencialmente expressos (GDEs) em indivíduos com apneia em comparação com controles e roncadores primários. **CASUÍSTICA E MÉTODOS:** Amostras de músculos da parede lateral da faringe foram coletadas de pacientes com AOS, roncadores e controles. Análise de RNA-Seq foi realizada para identificar GDEs. Ferramentas de bioinformática foram empregadas para elucidar os processos biológicos associados aos genes hiperexpressos e hipoexpressos na AOS. **RESULTADOS:** A análise identificou 1.476 GDEs na AOS em comparação aos controles. Dentre esses, 660 apresentaram-se com expressão mais exacerbada e 85 estão relacionados aos principais processos biológicos encontrados nas análises de enriquecimento: resposta imune, angiogênese, remodelamento da matriz extracelular e regulação do tônus muscular. Os genes com expressão mais suprimida foram um total 385 e 82 deles estão envolvidos nos principais processos biológicos encontrados nas análises de enriquecimento atuando na defesa contra o estresse oxidativo e na estrutura e contração muscular. **CONCLUSÕES:** Os genes hiperexpressos na AOS indicam respostas adaptativas, com o objetivo de manter a função muscular apesar do contexto de injúria tecidual. No entanto, a ativação sustentada dessas vias pode levar a uma inflamação crônica e reparo tecidual e resultar em comprometimento da função dessa musculatura. Por outro lado, os genes hipoexpressos indicam um comprometimento do metabolismo, da defesa contra o estresse oxidativo, da integridade estrutural, capacidade de recuperação e da função contrátil dos músculos, o que aumenta a susceptibilidade desse tecido às lesões. Esses achados sugerem vias moleculares que apontam para a disfunção muscular da faringe e contribuem com a fisiopatologia da AOS. A análise da expressão gênica dos músculos da parede lateral da faringe avança a compreensão atual da fisiopatologia da AOS e sugere um papel significativo da miopatia nos mecanismos envolvidos no desenvolvimento e agravamento da doença. Esses achados abrem caminho para novas estratégias de tratamento direcionadas, embora mais pesquisas ainda sejam necessárias para compreender totalmente as complexas interações envolvidas.

**Palavras-chave:** Transcriptoma. RNA-Seq. Músculos faríngeos. Apneia obstrutiva do sono.

## ABSTRACT

---

---

Uneda CB. Gene expression analysis of the lateral pharyngeal wall muscles of apneic and non-apneic subjects [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2024.

**INTRODUCTION:** Obstructive Sleep Apnea (OSA) is a prevalent sleep disorder characterized by upper airway collapse, leading to sleep fragmentation and intermittent hypoxia. Despite extensive research, the underlying mechanisms, especially at the genetic level, remain incompletely understood. This study focuses on exploring the transcriptome of lateral pharyngeal wall muscles, tissue directly involved in airway collapses, to identify differentially expressed genes (DEGs) in apneic compared to controls. **METHODS:** Tissue samples from lateral pharyngeal walls were collected from OSA patients, snorers, and controls. RNA-Seq analysis was performed to identify DEGs. Bioinformatics tools were employed to elucidate biological processes associated with upregulated and downregulated genes in OSA. **RESULTS:** Analysis identified 1,476 DEGs in OSA, revealing upregulation of genes mainly related to immune response, angiogenesis, and extracellular matrix remodeling while downregulated genes were mainly associated to oxidative stress defense, and muscle's structure and contraction. **DISCUSSION AND CONCLUSIONS:** Upregulated genes in OSA point towards adaptive responses, attempting to maintain muscle function despite the context of injury. However, sustained activation of these pathways might lead to chronic inflammation and impaired tissue repair. Meanwhile, downregulated genes indicate compromised metabolism, structural integrity, recovery capacity and contractile function making muscles even more susceptible to injuries. By dissecting the intricate gene expression patterns in lateral pharyngeal wall muscles, this research advances our understanding of OSA pathophysiology, and suggests that myopathy at the pharyngeal level is a crucial point involved in onset and worsening of the disease. These findings pave the way for innovative and targeted treatment strategies hoping for better patient outcomes, although further research is warranted to fully comprehend the complex interactions involved.

**Keywords:** Transcriptome. RNA-Seq. Pharyngeal muscles. Obstructive sleep apnea.

# LISTAS

---

---

## FIGURAS

- Figura 1** - Fluxograma de seleção de genes hiper e hipoexpressos ..... 51
- Figura 2** - Gráfico de barras da plataforma de bioinformática Webgestalt com os processos biológicos dos genes hipoexpressos em apneicos quando comparados aos controles..... 52
- Figura 3** - Diagrama de venn dos genes hipoexpressos distribuídos de acordo com o processo biológico..... 53
- Figura 4** - Heatmap com genes hipoexpressos no grupo de apneicos em comparação com os controles ..... 55
- Figura 5** - STRING dos genes hipoexpressos em apneicos em relação aos controles..... 56
- Figura 6** - Gráficos tipo boxplot de genes hipoexpressos cujo valor de p é significativo para a comparação entre todos os grupos: controles, roncadores e apneicos ..... 57
- Figura 7** - Gráfico de barras da plataforma de bioinformática Webgestalt com os processos biológicos dos genes hiperexpressos em apneicos quando comparados aos controles..... 63
- Figura 8** - Diagrama de venn dos genes hiperexpressos distribuídos de acordo com o processo biológico..... 64
- Figura 9** - Heatmap com os genes hiperexpressos envolvidos nos principais processos biológicos distribuídos por grupos ..... 66
- Figura 10** - STRING dos genes hiperexpressos em apneicos em relação aos controles..... 67
- Figura 11** - Gráficos tipo boxplot de genes hiperexpressos cujo valor de p é significativo para a comparação entre todos os grupos: controles, roncadores e apneicos ..... 68
- Figura 12** - STRING de todos os principais GDE na comparação entre AOS e CTRL e os respectivos processos biológicos relacionados..... 73
- Figura 13** - Modelo proposto do ciclo da fisiopatologia da AOS baseado na miopatia da musculatura da faringe de acordo com os achados genômicos e histopatológicos..... 77

## TABELAS

- Tabela 1** – Resumo das alterações histológicas dos tecidos palatais e da parede lateral da faringe já descritas na literatura .....35
- Tabela 2** - Dados da casuística.....50
- Tabela 3** - Tabela de distribuição dos GDE hipoexpressos de acordo com processo biológico após análise em diagrama de venn .. ....53
- Tabela 4** - Tabela de distribuição dos GDE hiperexpressos de acordo com processo biológico após análise em diagrama de venn .. ....64
- Tabela 5** - Resumo dos principais GDE na comparação entre AOS e CTRL e seus processos biológicos relacionados.....72

## ABREVIATURAS E SIGLAS

AOS –	apneia obstrutiva do sono
ATP –	adenosina trifosfato
CAPPesq -	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CPAP –	aparelho de pressão positiva contínua
CSF –	constritor superior da faringe
CTRL -	controles
DNA –	ácido desoxirribonucleico
FC –	fold change (medida da expressão gênica)
GDE –	genes diferencialmente expressos
GDNF –	fator neurotrófico derivado da linhagem de células gliais
HIF-1 $\alpha$ –	fator induzível por hipóxia 1 alfa
IAH –	índice de apneia e hipopneia
IMC –	índice de massa corporal
logFC –	log de <i>fold change</i>
miRNA -	microRNA
PF –	palatofaríngeo
PHD2 –	enzima hidroxilase de prolil-4
PLF –	parede lateral da faringe
PSG –	polissonografia
RERA	esforço respiratório relacionado a despertar
RNA –	ácido ribonucleico
RNASeq –	sequenciamento de RNA
RONC -	roncadores
SED –	sonolência excessiva diurna
SNP –	polimorfismo de nucleotídeo único
VAS –	via aérea superior

## GENES

ACTC1 –	actina, alfa músculo cardíaco 1
ACTN2 –	actina alfa 2
ADAM29 –	desintegrina e metaloproteinase metalopeptidase domínio 29
Adrb2 -	receptor B2 adrenérgico
AGT –	angiotensinogênio
AKR1B10 -	aldo-ceto redutase família 1 membro B10
AOX1 –	aldeído oxidase 1
APOE –	Apolipoproteína
APP –	proteína precursora de amiloide beta
AR –	receptor de andrógeno
CCL2 –	quimiocina da família CC ligante 2
CD40 –	molécula CD40
CD40LG –	ligante de CD40
coh-1 –	proteína contendo domínio Rad21_REC8
CRP –	proteína C reativa
CRYAB –	alfa-b cristalina
CXCL1 –	ligante 1 de quimiocina, ou fractalquina
CYP4B1 –	citocromo P450 família 4 subfamília B membro 1
EDN1 –	endotelina 1
EGLN1 –	fator de indução de hipóxia da família EGL-9 1
FADS1 –	dessaturase de ácidos graxos 1
FLRT2 –	proteína transmembrana 2 rica em leucina e fibronectina
FOS –	proto-oncogene Fos, subunidade do fator de transcrição AP-1
FTO –	dioxigenase dependente de alfa-cetoglutarato
GDNF –	fator neurotrófico derivado de célula glial
GPX3 –	glutaciona peroxidase 3
HLA-F –	complexo principal de histocompatibilidade, classe I, F
HTR2A –	receptor de serotonina
IDH3A –	isocitrato desidrogenase (NAD(+)) 3 subunidade catalítica alfa
IFI6 –	proteína induzível por interferon alfa 6
IFI27 –	proteína induzível por interferon alfa 27

IFIT3 –	proteína induzida por interferon com repetições tetratricopeptídeo 3
IFIT2 –	proteína induzida por interferon com repetições tetratricopeptídeo 2
IFIT1 –	proteína induzida por interferon com repetições tetratricopeptídeo 1
IGF-1 –	fator de crescimento semelhante à insulina 1
IL1R2 –	receptor 2 de interleucina-1
LAMA2 –	subunidade alfa 2 da laminina
LDB3 –	domínio de ligação LIM 3
LPAR1 –	receptor de ácido lisofosfatídico
MAOA –	monoamina oxidase A
MAPK3 –	proteína-quinase 3 ativada por mitógeno
MMP9 –	metalopeptidase 9 da matriz
MX1 –	dinamina MX como GTPase 1
MX2 –	dinamina MX como GTPase 2
MYLPP –	cadeia leve de miosina, fosforilável, músculo esquelético rápido
MYOM1 –	miomesina 1
MYOM2 –	miomesina 2
NO –	óxido nítrico
nos1 –	óxido nítrico sintetase 1 (não humano)
NOS1 –	óxido nítrico sintetase (humano)
NPR2 –	receptor 2 de peptídeo natriurético
NRG1 –	neurorregulina 1
OAS3 –	2'-5'-oligoadenilato sintetase 3
PDLIM5 –	domínio PDZ e LIM 5
PLEK –	plecstrina
PLIN5 –	perilipina 5
POMC –	pró-opiomelanocortina
PPARG –	receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo
PPARGC1B –	coativador beta 1 de receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo
PRL –	prolactina
PTGER3 –	receptor de prostaglandina E
PTGS2 –	prostaglandina-endoperóxido sintase 2, ou COX-2

RSAD2 –	domínio radical S-adenosil metionina contendo 2
SLC18A3 –	membro A3 da família 18 de carreadores de soluto
SLC2A2 –	membro 2 da família 2 de carreador de soluto
SLC6A14 –	membro 14 da família 6 de carreadores de soluto
SORBS1 –	domínio sorbina e SH3 contendo 1
SP140 –	proteína nuclear 140
SPEG -	proteína quinase expressa preferencialmente em músculo estriado
SST –	somatostatina
STAT1 –	transdutor de sinal e ativador da transcrição 1
TGFB1 –	fator de crescimento transformador beta 1
TNF –	fator de necrose tumoral
UCP1 –	proteína de desacoplamento 1

## SÍMBOLOS

%	percentual
<	menor que
=	igual a
cm	centímetro
kg	kilograma
m <sup>2</sup>	metro quadrado
°	graus Celsius
>	maior que



# SUMÁRIO

---

---

1 INTRODUÇÃO .....	18
2 OBJETIVO .....	23
2.1 Objetivo Primário .....	23
2.2 Objetivos Secundários .....	23
3 REVISÃO DE LITERATURA .....	25
3.1 Aspectos Anatômicos da AOS .....	25
3.1.1 A Via Aérea Superior .....	25
3.1.2 A Faringe .....	26
3.2 Aspectos Histológicos da AOS .....	30
3.2.1 Alterações da Musculatura .....	30
3.2.2 Outras Alterações Histológicas .....	33
3.3 Aspectos Genéticos da AOS .....	36
3.3.1 Estudos Genéticos .....	37
3.3.2 Estudos Genômicos e Proteômicos .....	38
3.3.3 Fenótipos intermediários .....	41
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	42
4.1 Aspectos Éticos .....	43
4.2 Casuística .....	43
4.2.1 Critérios de Inclusão .....	44
4.2.2 Critérios de Exclusão .....	45
4.3 Métodos .....	45
4.3.1 Avaliação Pré-Coleta das Amostras .....	45
4.3.2 Obtenção das Amostras .....	46
4.3.3 Preparação e Armazenamento das Amostras .....	46
4.3.4 Extração do RNA, Avaliação da Qualidade, Preparo das Bibliotecas e Sequenciamento .....	46
4.3.5 Análise de Dados e Bioinformática .....	47
5 RESULTADOS .....	49
5.1 Genes Hipoexpressos em Apneicos .....	52
5.1.1 A atuação dos GDE hipoexpressos na AOS .....	58
5.2 Genes Hiperexpressos em Apneicos .....	63
5.2.1 A atuação dos GDE hiperexpressos na AOS .....	69
6 DISCUSSÃO .....	74
7 CONCLUSÕES .....	81
REFERÊNCIAS .....	83
ANEXOS .....	105
Anexo 1 - Aprovação CAPPesq 1 .....	106
Anexo 2 - Aprovação CAPPesq2 .....	107
Anexo 3 - Artigo científico e comprovante de submissão .....	114

# INTRODUÇÃO

---

## 1 INTRODUÇÃO

Apneia Obstrutiva do Sono (AOS) é um distúrbio respiratório caracterizado por repetidos episódios de colapso da via aérea superior (VAS) durante o sono <sup>(1)</sup>. É uma doença de prevalência crescente e que acomete, aproximadamente, um a cada três (32,8%) dos habitantes da cidade de São Paulo, de acordo com o maior estudo epidemiológico realizado no país <sup>(2)</sup>. O Brasil ocupa o terceiro lugar no ranking dos países com maior número de pessoas acometidas pela doença, atrás somente da China e dos Estados Unidos da América <sup>(3)</sup>.

Um achado comum dos mais diversos estudos de prevalência da AOS é que indivíduos do gênero masculino são mais acometidos com uma razão de aproximadamente 2 ou 3:1 <sup>(4)</sup>. Homens apresentam uma VAS mais colapsável devido às diferenças anatômicas que apresentam: uma faringe de maior comprimento e um palato mole mais extenso em comparação com as mulheres <sup>(5)</sup>.

O diagnóstico da AOS se dá com a realização de um estudo de sono, ou polissonografia (PSG), que resulte em um índice de apneia e hipopneia (IAH) maior que 5/h, na presença de sintomas associados, ou, com um IAH maior que 15/h, mesmo na ausência de quaisquer sintomas. O IAH também é o principal critério utilizado na classificação de gravidade da doença, que é considerada grave sempre que encontrado um índice maior que 30/h. Outras características importantes a serem consideradas, com relação à gravidade da doença, são: o padrão de dessaturações e a saturação mínima de oxi-hemoglobina observados durante a noite do estudo <sup>(6,7)</sup>.

Supõe-se que a AOS seja uma doença de evolução progressiva, que inicia com quadro de ronco primário (queixas de ronco e resultado normal no estudo do sono – IAH<5/h) e que evolui de forma contínua para a síndrome de resistência das VAS (presença de episódios de restrição do fluxo de ar

conhecidos como RERA, que não configuram apneias ou hipopneias mas que resulta em sono fragmentado por despertares) e, posteriormente, para AOS propriamente dita iniciando com quadros mais leves que evoluem de forma contínua e gradual para quadros moderados e graves. Porém, a evolução natural da doença e a sua progressão contínua ainda necessitam de estudos mais robustos <sup>(8,9)</sup>.

Como consequências da doença, podem ocorrer: sonolência excessiva diurna, aumento do risco cardiovascular e metabólico, risco de acidentes de trânsito e de trabalho, prejuízos cognitivos e neurológicos, distúrbios de humor, além de prejuízos conjugais e sociais. Dessa forma, resulta em grande impacto na saúde e qualidade de vida dos indivíduos acometidos. A combinação de sua alta prevalência com as diversas possíveis consequências fazem da AOS um relevante problema de saúde pública <sup>(10-13)</sup>.

Desde que publicados os primeiros relatos do distúrbio respiratório do sono, ainda na década de 70 <sup>(14)</sup>, os esforços se voltaram para o entendimento de sua fisiopatologia e inúmeros estudos foram realizados acerca do tema. Alguns dos mecanismos envolvidos na patogênese da doença que já estão bem estabelecidos são: as variações anatômicas da VAS, a ação dos músculos dilatadores da faringe, o funcionamento do centro de controle ventilatório <sup>(15,16)</sup> e o limiar para despertar <sup>(16)</sup>. Porém, até o momento, as causas da doença e seus mecanismos subjacentes permanecem com pontos a serem mais bem esclarecidos.

A AOS é uma doença com características hereditárias <sup>(17)</sup>. Os sinais de que há componentes genéticos e hereditários envolvidos na AOS foram inicialmente observados a partir de relatos de casos de familiares de primeiro grau há mais de 04 décadas <sup>(18)</sup>. Os estudos de aspectos genéticos de doenças complexas, como a AOS, vêm crescendo nos últimos anos e têm o potencial de ajudar no entendimento da patogênese da doença <sup>(19)</sup>. Porém, o fato de se tratar de uma doença complexa, com múltiplos fenótipos e fatores de risco envolvidos, contribui para que pouco se tenha avançado na descoberta de genes específicos envolvidos no desenvolvimento dessa condição <sup>(20)</sup>.

Alguns estudos já demonstraram que a AOS possui uma espécie de “assinatura molecular”, ou seja: um padrão de genes ou proteínas expressos relacionados ao estado da doença. A análise do perfil de expressão gênica de um tecido, além de colaborar para o melhor entendimento da patogênese da doença, tem, por consequência, o potencial de ser utilizada em diversos momentos da prática clínica, quais sejam: prevenção, diagnóstico, prognóstico e tratamento <sup>(21)</sup>. Poderia indicar, por exemplo, preditores que sinalizam quais indivíduos são mais propensos a evoluir com maior morbidade ou os que apresentam mais chances de responder ou aderir a um determinado tipo de tratamento.

Um ponto relevante a respeito dos estudos de análise da expressão gênica, é a escolha de quais células ou tecidos de onde serão obtidas as amostras para a extração do material genético <sup>(22)</sup>. Na AOS, alguns estudos já foram realizados com amostras de saliva, urina e sangue <sup>(23–25)</sup>, que são os materiais de mais fácil acesso e que poderiam ser fonte para a identificação de possíveis biomarcadores, por exemplo <sup>(21)</sup>. Raros são os estudos genéticos que foram conduzidos com análise de tecidos palatais <sup>(26)</sup> e, ainda mais raros, os realizados com análise da musculatura faríngea e, especificamente, da parede lateral da faringe (PLF) <sup>(27,28)</sup>.

É sabido que pacientes apneicos tendem a apresentar menor área seccional da luz da faringe <sup>(29)</sup>. Porém, somente a redução de espaço do lúmen faríngeo é insuficiente para explicar a ocorrência dos colapsos <sup>(30)</sup>. O funcionamento da musculatura das paredes da faringe é uma condição essencial para a manutenção de uma via aérea pérvia e, sem o adequado controle neuromuscular, o espaço faríngeo isoladamente tem pouco significado <sup>(31)</sup>.

Por muitos anos os músculos mais estudados na AOS foram os dilatadores da faringe, principalmente o músculo genioglosso. Hoje, há evidências robustas de que a PLF e a musculatura que a compõe são as estruturas cruciais nos eventos obstrutivos. Os apneicos possuem uma PLF mais colapsável e mais espessa que o normal, e é, portanto, a principal estrutura

anatômica envolvida no estreitamento e na ocorrência de apneias e hipopneias encontradas na AOS <sup>(32-35)</sup>.

Este estudo tem como objetivo avaliar a expressão gênica da musculatura da PLF, composta, majoritariamente, pelos músculos constritor superior da faringe (CSF) e palatofaríngeo (PF), por ser esse o tecido diretamente envolvido na redução da via aérea e nos eventos obstrutivos de pacientes apneicos. Presumimos que a musculatura da PLF, apresente alterações na sua expressão gênica que estejam envolvidas no comprometimento da sua participação efetiva na sustentação da VAS e que favoreçam a ocorrência dos colapsos da faringe.

## **OBJETIVO**

---

---

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO**

Verificar se há genes diferencialmente expressos (GDE) na musculatura da parede lateral da faringe de pacientes apneicos em comparação aos controles que possam estar relacionados à fisiopatologia da AOS.

### **2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS**

Verificar se a expressão de genes relacionados à contratilidade muscular está alterada em apneicos quando comparada com a dos controles;

Verificar se a expressão de genes relacionados à inflamação está alterada em apneicos quando comparada com a dos controles;

Verificar se a expressão de genes relacionados à resposta ao dano e reparo tecidual está alterada em apneicos quando comparada com a dos controles.



# **REVISÃO DE LITERATURA**

---

---

## 3 REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 ASPECTOS ANATÔMICOS DA AOS

#### 3.1.1 A Via Aérea Superior

A VAS se estende das narinas até as pregas vocais <sup>(36)</sup> e é o local onde ocorrem funções primordiais, como: aquecimento e umidificação do ar inspirado, início do caminho para a olfação, proteção das vias aéreas inferiores contra a aspiração, defesa ou barreira inicial contra infecções e a complexa coordenação da deglutição, respiração e fala <sup>(15)</sup>.

Diferente do que se vê em outras espécies de mamíferos, o osso hioide em humanos não está acoplado à coluna vertebral <sup>(37)</sup>. Essa é uma das modificações encontradas na VAS da espécie humana e que permitiram a mobilidade necessária para o desenvolvimento da fala, mas que, em contrapartida, a tornaram mais vulnerável ao colapso <sup>(15)</sup>.

Pacientes apneicos possuem algumas diferenças anatômicas encontradas em suas VAS que aumentam sua colapsabilidade quando comparadas com as de pacientes sadios. Estudos realizados com o auxílio de exames de imagem para avaliar a área seccional e o volume da via aérea nos apneicos mostraram que esses pacientes apresentam VAS mais estreita que os não apneicos, mesmo durante a vigília. Os estudos mostram, ainda, que a via aérea dos apneicos, não é somente menor em área e volume como, também, apresenta configuração geométrica distinta sendo a VAS de pessoas sadias maior no sentido laterolateral enquanto a de apneicos apresenta conformação circular ou, quando elíptica, maior eixo no sentido anteroposterior <sup>(33,38,39)</sup>.

Alguns dos fatores que podem alterar a configuração da via aérea e aumentar o risco de AOS são a conformação óssea craniofacial e a configuração das partes moles adjacentes. Não é tarefa fácil, porém, determinar precisamente quais são as alterações dos tecidos moles do entorno da faringe responsáveis

por estreitar a VAS e favorecer a ocorrência da doença. É importante lembrar ainda que algumas das alterações encontradas podem ser, na verdade, uma consequência da doença. A presença de edema, por exemplo, pode reduzir a luz faríngea e resultar em maior colapsabilidade, porém, ao mesmo tempo, pode ser um resultado do trauma na região provocado pelo ronco e pelos repetidos colapsos <sup>(36)</sup>.

O fato bem estabelecido é que as alterações anatômicas da VAS são um ponto crucial na fisiopatologia da doença <sup>(40)</sup>. As principais alterações que podem ser encontradas estão expostas a seguir:

- A configuração circular ou elíptica da luz faríngea, com maior eixo no sentido anteroposterior e estreitamento laterolateral;
- Alterações esqueléticas: hipoplasia ou retroposicionamento da maxila e/ou mandíbula e osso hioide em posição mais caudal;
- Alterações de partes moles: macroglossia, edema ou hipertrofia da úvula, da musculatura dos pilares amigdalianos ou do palato mole, congestão dos vasos sanguíneos, hipertrofia do tecido linfóide (tonsilas lingual, palatina ou faríngea), aumento da gordura parafaríngea e o comprimento mais longo da faringe <sup>(41)</sup>.

### 3.1.2 A Faringe

Em humanos, a faringe está presente em toda a extensão da VAS. É um tubo miofascial que conecta as cavidades nasal e oral com a laringe e o esôfago e pode ser dividida em três segmentos:

- Nasofaringe: se encontra posteriormente à cavidade nasal e tem os ossos esfenoide e occipital como limite superior e o palato mole como seu limite inferior.
- Orofaringe: se encontra imediatamente posterior à cavidade oral e tem o palato mole como limite superior e a borda superior da epiglote como limite inferior.

- Hipofaringe: se estende da borda superior da epiglote até a cartilagem cricoide, na altura das cordas vocais <sup>(33)</sup>.

É na faringe onde ocorrem os eventos respiratórios obstrutivos do sono: apneias (colapso total) e hipopneias (colapso parcial). A área mais propensa aos colapsos, apesar de haver divergências na literatura, está no segmento da orofaringe, mais precisamente nos níveis retropalatal (também conhecido como velofaringe) e retroglossal, onde há maior abundância de tecidos moles <sup>(15,36)</sup>.

Como mencionado anteriormente, a faringe é o ponto crítico de vulnerabilidade da VAS pois, além da coluna vertebral, que oferece suporte para a sua parede posterior, há pouca ou nenhuma estrutura rígida de sustentação ao longo de sua extensão. Dessa forma, a manutenção da patência da luz faríngea depende, significativamente, da ação da musculatura de suas paredes para contrabalancear a pressão negativa intraluminal durante a respiração <sup>(34,42,43)</sup>. As características dessa musculatura serão detalhadas a seguir.

### **3.1.2.1 O papel da musculatura da faringe**

Os músculos da VAS relacionados à faringe podem ser divididos de acordo com a anatomia e suas funções em quatro grupos distintos:

- Músculos extrínsecos da língua: genioglosso, hioglosso e estiloglosso.
- Músculos palatais: elevador do véu palatino, tensor do véu palatino, palatoglosso, palatofaríngeo e o músculo da úvula;
- Músculos de controlam a posição do osso hioide: genioioideo, miloioideo, estiloioideo, esternoioideo, omoioideo e tireoioideo;
- Músculos constritores da faringe: superior, médio e inferior <sup>(42)</sup>.

A ação combinada dessa musculatura é capaz de alterar o formato e o tônus da via aérea <sup>(44,45)</sup>.

Durante a vigília, a atividade muscular faríngea na sustentação de suas paredes e manutenção da patência de sua luz é desempenhada sem grandes

dificuldades, porém, durante o sono, ocorre a redução fisiológica da atividade muscular e atenuação dos reflexos que protegem a via aérea <sup>(15,42)</sup>. Em decorrência da queda do tônus muscular, observa-se uma redução das dimensões da VAS <sup>(36)</sup>.

Em indivíduos saudáveis, a musculatura é capaz de garantir a patência da via aérea mesmo com a mencionada redução das dimensões da faringe durante o sono. Todavia, naqueles indivíduos que já apresentam algum prejuízo anatômico em suas vias aéreas superiores, há um risco aumentado de colapso e, conseqüentemente, de AOS <sup>(42)</sup>.

Durante a inspiração, é observada uma maior atividade muscular principalmente nos músculos palatoglosso, palatofaríngeo e levantador do véu palatino. Em posição supina, também se observa aumento da atividade dos músculos palatoglosso e palatofaríngeo. Esse aumento da atividade muscular enrijece e amplia a via aérea para contrabalancear a pressão negativa intratorácica durante a inspiração e a influência da gravidade na posição supina <sup>(43)</sup>.

Já foi observado em estudo prévio que o tônus e a atividade muscular de músculos da via aérea nos apneicos estão aumentados em comparação com os controles, mesmo durante a vigília. Tal fato pode corresponder a um mecanismo compensatório necessário para manter pérvia uma via aérea mais estreita <sup>(46)</sup> ou que a ação desses músculos seja menos efetiva. Os músculos da faringe exercem um papel crucial na manutenção da patência da via aérea mesmo quando em estado de repouso <sup>(15)</sup>.

### **3.1.2.2 A parede lateral da faringe**

A PLF é composta por mucosa, musculatura das lojas tonsilares (constritor superior, palatoglosso, palatofaríngeo) tonsilas palatinas e gordura parafaríngea <sup>(36)</sup>.

O estreitamento observado na via aérea dos apneicos se deve, predominantemente, à redução do espaço laterolateral da faringe. Em indivíduos

sadios, o lúmen faríngeo apresenta configuração elíptica com o maior eixo no sentido laterolateral. Já os apneicos, apresentam, principalmente ao nível retropalatal, um lúmen faríngeo com configuração circular, ou, quando elíptica, com maior eixo no sentido anteroposterior. Esse achado ocorre como um resultado da projeção medial das paredes laterais desses pacientes para o lúmen faríngeo <sup>(41)</sup>.

A redução do espaço laterolateral da luz faríngea nos apneicos se deve ao espessamento da própria PLF. Já foi observado, que esse espessamento é independente do volume da gordura parafaríngea ou da distância intermandibular, e pode ser atribuído, portanto, à espessura da própria musculatura que a compõe <sup>(33)</sup>. O aumento da espessura da PLF é considerado um fator de risco independente para o desenvolvimento da doença, mesmo após o controlar para variáveis como o índice de massa corporal (IMC) e a circunferência cervical e está, portanto, intimamente relacionado à patogênese do distúrbio <sup>(35)</sup>.

O papel da musculatura da PLF no colapso da via aérea em pacientes com AOS é evidenciado não só pelo aumento de sua espessura, reduzindo a luz faríngea e favorecendo a ocorrência dos colapsos, mas também pela significativa melhora que pode ser observada em pacientes submetidos a tratamentos cirúrgicos que abordam especificamente a musculatura dessa região, como a faringoplastia lateral, por exemplo <sup>(31)</sup>. Essa melhora não era alcançada com técnicas cirúrgicas cujo foco estava na abordagem da linha média e na ressecção de tecidos moles redundantes, como a uvulopalatofaringoplastia, técnica pioneira que foi muito popularizada no tratamento do ronco e AOS <sup>(47)</sup>.

As características dos principais músculos que compõe a PLF estão detalhadas abaixo:

- Palatofaríngeo (PF):
  - O músculo palatofaríngeo traciona as paredes da faringe medialmente e para cima durante a deglutição, porém também apresenta atividade relacionada a respiração;

- Em indivíduos sadios e apneicos, durante a vigília, já foi demonstrada atividade fásica relacionada à inspiração. Essa atividade é maior quando os indivíduos apresentam respiração nasal e em posição supina;
- Quando em pressão negativa, a atividade dessa musculatura aumenta, como uma resposta compensatória. É um músculo que pode modular a resistência do fluxo inspiratório ou expiratório <sup>(44)</sup>
- Constritor superior da faringe (CSF):
  - Desempenha um papel essencial na deglutição e nas modificações da conformação da via aérea necessárias para a fala, mas também está ativo durante a respiração profunda;
  - Em humanos, apresenta basicamente atividade tônica, quando em condições normais. Porém, diante de hipóxia ou hipercapnia, é recrutado;
  - Sua atividade diante de condições basais e com respiração normal é mais frequente na expiração <sup>(44)</sup>.

## 3.2 ASPECTOS HISTOLÓGICOS DA AOS

### 3.2.1 Alterações da Musculatura

A função da musculatura esquelética em mamíferos é determinada por vários tipos de fibras musculares. A rapidez da geração de força, a resistência à fadiga e o metabolismo de energia dependem do tipo de fibra muscular <sup>(48)</sup>.

A musculatura esquelética da faringe necessita ser resistente à fadiga devido a necessidade contínua de manter a tonicidade para a sustentação das paredes faríngeas e a manutenção de uma via aérea pérvia durante a respiração contrabalanceando a pressão negativa intratorácica <sup>(49)</sup>.

As fibras musculares podem se modificar na dependência da demanda funcional e essas modificações incluem hipertrofia, alteração na proporção dos

tipos de fibras musculares aumentando ou reduzindo a resistência à fadiga. Há estudos que mostram que também pode haver uma mudança do tipo de fibras musculares na presença de denervação ou de estimulação elétrica <sup>(49,50)</sup>.

Nos pacientes apneicos, o trauma mecânico provocado pelo ronco e pelos colapsos repetidos ao longo da noite, a hipoxemia intermitente e outros fatores podem levar a inflamação e danos teciduais na VAS. Esses danos podem levar a fadiga muscular e alterações na estrutura das fibras musculares, que são a base histológica para a disfunção da atividade muscular da faringe <sup>(36,51,52)</sup>.

Algumas alterações já encontradas no músculo palatofaríngeo de pacientes apneicos são: atrofia, hipertrofia, alterações no tamanho das células, desarranjo das fibras e proliferação de tecido conjuntivo. Os traumas mecânicos e a hipóxia podem levar a denervação periférica resultando em atrofia e apoptose. As alterações patológicas encontradas levam a um aumento da espessura da musculatura da parede lateral da faringe e predispõe à obstrução <sup>(51)</sup>. Outras alterações foram observadas em tecidos palatais e úvula, como: hiperplasia e/ou hipertrofia da musculatura e mais interposição de gordura <sup>(53,54)</sup>.

No estudo publicado em 2013, foi observado um aumento da proporção de fibras MHC-IIa em pacientes com apneia moderada a grave em comparação com os controles. Sugerem que possa haver uma transformação de fibras musculares resultante das repetidas contrações intensas ao longo da noite que poderiam ser comparadas a um exercício físico extenuante (*endurance*). Há a teoria de que as fibras são geneticamente determinadas e que os pacientes com mais fibras tipo II já as teriam de forma congênita sendo a causa da doença, e a outra teoria é a da transformação adaptativa compensatória <sup>(51)</sup>.

Em um estudo comparativo de biópsia de músculo palatofaríngeo de apneicos e controles foi observado que nos músculos de pacientes apneicos foram encontradas características relacionadas a denervação como: maior variação do diâmetro das fibras com presença de fibras atroficas, de tamanho normal e hipertróficas bem como variação da morfologia dessas fibras apresentando-se ora mais arredondadas ora anguladas. As dimensões das fibras musculares de pacientes normais apresentaram distribuição gaussiana,



enquanto, em apneicos, apresentaram dois ou mais picos com distribuição não-gaussiana. A média do tamanho das fibras, todavia, não foi divergente entre controles e apneicos, podendo-se concluir que a presença de fibras hipertróficas contrabalanceia a presença de fibras atróficas <sup>(55)</sup>.

Posteriormente, Friberg e col. analisaram histologicamente o músculo palatofaríngeo de pacientes normais e apneicos e acrescentaram um grupo de pacientes roncadores no intuito de avaliar se há uma progressão da doença de roncadores para apneicos. Observaram que há aumento significativo das alterações morfológicas, incluindo sinais de lesão neurológica já nos pacientes roncadores e que o grau de anormalidades encontradas nas fibras musculares apresentou correlação significativa com o percentual de tempo de sono com respiração obstrutiva periódica. Esses achados, corroboraram a hipótese de uma progressão natural da doença e que o trauma mecânico ocasionado pelo ronco possa ser uma das causas das alterações encontradas <sup>(56)</sup>.

Ainda nesse estudo, não foi identificada diferença na proporção do tipo de fibra muscular entre os grupos (normal/roncador/apneico) <sup>(56)</sup>. E esse achado está de acordo com o encontrado por Séries et al, quando realizou estudo comparando a musculatura da úvula e genioglosso entre apneicos e roncadores <sup>(57)</sup>. Porém diverge do encontrado por Smirne e col. que encontrou predomínio de fibras do tipo II em músculo constritor da faringe de roncadores, porém predomínio de fibras do tipo I nos controles <sup>(49)</sup>.

Recentemente, um outro grupo estudou o músculo palatofaríngeo de indivíduos sadios e apneicos e observou que pacientes com AOS apresentam fibras musculares mais desordenadas, com menor área de fibras musculares e mais de tecido conjuntivo e que essas características são diretamente proporcionais à piora do IAH enquanto nos indivíduos sadios, as fibras musculares apresentavam diâmetro uniforme, um arranjo organizado, morfologia arredondada ou poligonal, ausência de sinais de atrofia e pouca quantidade de tecido conjuntivo no seu entorno. Encontraram ainda que conforme o IAH aumenta, há redução da proporção de fibras do tipo I e aumento da proporção

de fibras do tipo II. A redução de fibras tipo I pode causar fadiga muscular e favorecer o colapso <sup>(48)</sup>.

A hipóxia resulta em aumento da apoptose e autofagia. Uma das principais características da AOS é a hipóxia intermitente <sup>(48)</sup>. Um estudo apontou que há maior incidência de apoptose nos apneicos que nos controles. Além disso, identificou que quanto maior a gravidade da AOS, maior a apoptose. A expressão de Bax, uma proteína pró-apoptótica, está aumentada nos apneicos e aumenta gradualmente dos controles para os com apneia leve, moderada e grave. Porém, ao se analisar a via de sinalização por expressão de p38 e via MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), foi visto que essa via não parece estar relacionada ao processo de autofagia e apoptose observado em apneicos.

As características e a eficiência da regeneração da musculatura esquelética dependem do tipo de injúria sofrida e do tipo de fibra muscular. A regeneração após injúria por congelamento ou cardiotoxinas, por exemplo, não se segue de substituição do músculo por tecido fibroso <sup>(48)</sup>.

### 3.2.2 Outras Alterações Histológicas

Ainda em 1991, Woodson e col. publicaram sinais de degeneração de nervos e axônios, fibrose intersticial, congestão e dilatação vascular e hipertrofia de glândulas mucosas na úvula e palato mole <sup>(54)</sup>. Também já foram descritas alterações das características metabólicas e histoquímicas em estudos prévios realizados com tecidos da orofaringe. Em 1996, foi descrito que o músculo da úvula apresenta atividade glicolítica, glicogenolítica e atividade de enzimas anaeróbicas aumentada nos pacientes apneicos em comparação com roncoadores <sup>(57)</sup>. Outro estudo, também publicado em 1996, identificou sinais de inflamação, caracterizada pela presença de infiltração de células plasmáticas e edema intersticial na mucosa da úvula de pacientes apneicos <sup>(58)</sup>.

Friberg e col. descreveram uma densidade aumentada de nervos sensitivos terminais na mucosa do palato mole de pacientes apneicos indicando lesão de nervos aferentes <sup>(59)</sup>. O mesmo grupo, posteriormente, encontrou sinais de microcirculação alterada na mucosa dos pacientes apneicos e sugeriu que

houvesse lesão progressiva de controles para roncoadores e apneicos de nervos aferentes <sup>(60)</sup>. Em 2004, Boyd e col. encontraram achados que sugeriram que a infiltração celular e os sinais de denervação não afetavam somente a mucosa, mas também a musculatura da VAS nos pacientes apneicos <sup>(61)</sup>.

Em 2011, ao se analisar a matriz extracelular e sua relação com o músculo palatofaríngeo, foi observado aumento gradual de colágeno e fibras elásticas de acordo com a gravidade da AOS. Também foi observado aumento de MMP-2 e MMP-9 no citoplasma e no endomísio com a progressão da doença além de corpúsculos residuais no citoplasma, indicando envelhecimento celular precoce <sup>(62)</sup>.

No estudo realizado por Dantas et al., em 2012, observou-se que pacientes com AOS apresentam aumento da quantidade de colágeno tipo 1 na matriz extracelular do músculo constritor superior da faringe. Essa modificação da proporção de colágeno torna o tecido mais rígido e pode implicar em um atraso do relaxamento da musculatura na transição da expiração para inspiração e participar da gênese dos eventos obstrutivos na AOS <sup>(63)</sup>.

A tabela 1 reúne as principais alterações histológicas da musculatura e dos tecidos palatais e da parede lateral da faringe já descritas na literatura.

**Tabela 1** – Resumo das alterações histológicas dos tecidos palatais e da parede lateral da faringe já descritas na literatura

ASPECTOS HISTOLÓGICOS DA VAS NA APNEIA OBSTRUTIVA DO SONO		
ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DA MUSCULATURA	MÚSCULO	REFERÊNCIA
Hipertrofia e/ou hiperplasia Mais gordura intramuscular	Úvula	Stauffer, 1989
Hiperplasia Predomínio de fibras tipo II	MCSF	Smirne, 1991
Ruptura, degeneração e atrofia e/ou hipertrofia das fibras musculares	Úvula	Woodson, 1991
Atrofia e hipertrofia Alteração na morfologia das fibras Agrupamento de tipo de fibras musculares	PF	Edstrom, 1992
Sem diferença na proporção de fibras musculares tipo I e tipo II Mais fibras tipo IIA que tipo IIB	Úvula e GG	Sériès, 1996
Sinais de lesão neurológica Sem diferença na proporção de fibras musculares tipo I e tipo II	PF	Friberg, 1998
Atrofia e hipertrofia Desarranjo de fibras Alterações no tamanho das fibras Proliferação de tecido conjuntivo Predomínio de fibras tipo II (MHC-IIa)	PF	Shi, 2013
Apoptose Dessaranjo de fibras Menor área de fibras musculares e mais tecido conjuntivo Redução da proporção de fibras tipo I com aumento de fibras tipo II	PF	Dong, 2020
OUTRAS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS	LOCAL	REFERÊNCIA
Degeneração de nervos e axônios Fibrose Intersticial Congestão e dilatação vascular Hipertrofia de glândulas mucosas	Úvula e Palato Mole	Woodson, 1991
Atividade glicolítica, glicogenolítica e de enzimas anaeróbias aumentada	Úvula	Sériès, 1996
Infiltração de células plasmáticas e edema intersticial	Mucosa da Úvula	Sekosan, 1996
Densidade aumentada de nervos sensitivos	Mucosa do Palato Mole	Friberg, 1997
Microcirculação alterada na mucosa	Mucosa do Palato Mole	Friberg, 1998
Infiltração celular e sinais de denervação	Mucosa e Musculatura do Palato e Pilares Amigdalianos	Boyd, 2004
MEC com aumento de colágeno e fibras elásticas Aumento de MMP-2 e MMP-9 no citoplasma e no endomísio Corpúsculos residuais no citoplasma - envelhecimento precoce	MEC do PF	Molina, 2011
Aumento de colágeno tipo I	MEC do MCSF	Dantas, 2012
Hiperplasia de fibras de colágeno e sinais de denervação	PF	Dong, 2020

MCSF = músculo constritor superior da faringe; PF = músculo palatofaríngeo; GG = músculo genioglosso; MHC = myosin heavy chain; MEC = matriz extracelular; MMP = metaloproteinase.

### 3.3 ASPECTOS GENÉTICOS DA AOS

A primeira contribuição genética para o sono fisiológico foi descrita em 1930 <sup>(64)</sup>. O envolvimento genético já foi encontrado na fisiologia de diversas características relacionadas ao sono. Os parâmetros relacionados ao sono relatados como hereditários, são: cronotipo <sup>(20,65)</sup>, duração do sono <sup>(20,65)</sup>, padrão eletroencefalográfico <sup>(20,65)</sup>, respostas neurocomportamentais à privação do sono <sup>(20,65)</sup>, insônia <sup>(65)</sup>, parassonias <sup>(65)</sup>, síndrome das pernas inquietas <sup>(65)</sup>, as síndromes de hipoventilação central congênita <sup>(20)</sup> e a própria AOS <sup>(20,65)</sup>.

Nos últimos anos, houve avanços nas metodologias para a descoberta de polimorfismos de susceptibilidade genética de diversas condições. As descobertas genéticas relacionadas a AOS ficaram defasadas, se comparadas às de outras doenças crônicas <sup>(66)</sup>.

Há evidências crescentes de que fatores genéticos e a sua interação com fatores ambientais resultem no desenvolvimento da AOS. As diferenças étnicas estão bem estabelecidas no que diz respeito à prevalência de AOS, bem como evidências de estudos baseados em agregação familiar ou em gemelaridade e a associação de alterações craniofaciais bem estabelecidas, que também indicam a existência de uma base genética para a AOS <sup>(67)</sup>.

A AOS é uma doença geneticamente complexa. Não segue um padrão mendeliano de herança e resulta da interação de múltiplos fatores genéticos e ambientais <sup>(66)</sup>. Na patogênese da AOS, é provável o envolvimento de múltiplos genes, onde diversas alterações com pequeno ou moderado efeito genético, determinem a hereditariedade da doença. Alguns fenótipos associados a AOS, como obesidade central e morfologia craniofacial com características obstrutivas também tem, por si só, suas próprias heranças genéticas complexas <sup>(67)</sup>.

Apesar das evidências já encontradas, pouco se avançou no que diz respeito às bases genéticas da AOS <sup>(64)</sup>. Pode-se afirmar que os fatores genéticos desempenham um papel importante na fisiopatologia dos distúrbios do sono, porém, por ser uma doença complexa, multifatorial e com diversos fatores

de risco associados é muito improvável que uma única predisposição genética seja responsável por todos os traços relacionados a AOS <sup>(20)</sup>.

Assim como em outras doenças complexas, como hipertensão arterial e diabetes mellitus, a AOS provavelmente tem uma base poligênica e dependente de um ambiente favorável para que se manifeste <sup>(64)</sup>. Dos fatores de risco já conhecidos (obesidade, anormalidades craniofaciais e gênero masculino, por exemplo), aproximadamente 40% são hereditários <sup>(20,68)</sup>. E a obesidade, sozinha, pode explicar 40% da variação genética na AOS <sup>(69)</sup>.

Recentemente, as técnicas de estudos genéticos, genômicos e proteômicos passaram a ser aplicadas no entendimento da AOS. Os estudos genéticos envolvem famílias ou estudos de determinadas populações, já os estudos transcriptômicos, envolvem o estudo da expressão de RNA enquanto os estudos proteômicos, incluem os níveis de expressão proteica e serão mais bem explorados a seguir <sup>(70)</sup>.

### 3.3.1 Estudos Genéticos

A existência de agregação familiar para a AOS já foi descrita algumas vezes na literatura. Os primeiros estudos relataram casos de irmãos, de gêmeos ou de membros da mesma família e, posteriormente, diversos estudos tipo caso-controle passaram a ser realizados para embasar a suspeita de que familiares de pacientes portadores de AOS estão sob maior risco de desenvolver a doença também <sup>(17,18,71-74)</sup>.

Tanto a transmissão intergeracional quanto a intrageracional já foram observadas <sup>(73)</sup>. Hoje, sabe-se que a prevalência de AOS em familiares de primeiro grau varia de 21-84% <sup>(20)</sup> e que o risco aumenta progressivamente com o aumento do número de membros afetados da família <sup>(71)</sup>. Também já foi observado que o risco aumentado para ronco e apneia nesses familiares permanece mesmo após o controle para fatores como obesidade, idade e gênero <sup>(17)</sup>.

Uma das principais características herdáveis associada a AOS, é o padrão craniofacial e as alterações de partes moles relacionadas à VAS <sup>(75)</sup>. Em 2006, Schwab e col. realizaram um estudo tipo caso controle com o auxílio de ressonância nuclear magnética para avaliar a agregação familiar para o tamanho das partes moles da VAS e demonstrou que o volume aumentado da língua, da PLF e das partes moles em geral exibem um padrão de agregação familiar mesmo após ajustar para gênero, etnia, idade, gordura visceral do pescoço e dimensões faciais <sup>(76)</sup>.

### 3.3.2 Estudos Genômicos e Proteômicos

Apesar da já sabida hereditariedade, ainda não foi possível identificar um locus gênico com significância estatística em análise genômica ampla <sup>(20)</sup>. Alguns loci candidatos e variações de genes já foram reportados em estudos individuais, como: apolipoproteína E (*APOE*), proteína C reativa (*CRP*), fator neurotrófico derivado de célula glial (*GDNF*), receptor de serotonina (*HTR2A*), receptor de ácido lisofosfatídico (*LPAR1*), plecstrina (*PLEK*), receptor 3 de prostaglandina E (*PTGER3*), fator de necrose tumoral (*TNF*), coativador beta 1 de receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo (*PPARGC1B*), neurorregulina 1 (*NRG1*) e dioxigenase dependente de alfa-cetoglutarato (*FTO*) <sup>(20)</sup>.

Há genes encontrados que apresentam plausibilidade biológica pois estão envolvidos em processos de inflamação, sinalização de hipóxia e vias de sinalização de sono. Apesar disso, é uma área com limitações e carente de avanços pois a maior parte dos estudos foram realizados com amostras pequenas e não foram replicados <sup>(20)</sup>.

Um estudo que avaliou o padrão de expressão gênica das células mononucleares do sangue periférico de apneicos asiáticos em comparação com controles, identificou alguns GDE como possíveis biomarcadores para avaliar o risco de AOS: desintegrina e metaloproteinase metalopeptidase domínio 29 (*ADAM29*), proteína transmembrana 2 rica em leucina fibronectina (*FLRT2*), e membro A3 da família 18 de carreadores de soluto (*SLC18A3*) <sup>(77)</sup>.

Outro estudo realizado também com sangue periférico de pacientes roncoadores e com sonolência excessiva diurna (SED) divididos em grupos de apneicos e não apneicos observou que os níveis de expressão de endotelina 1 (*EDN1*) e *TNF* alfa estão associados à ocorrência de AOS <sup>(78)</sup>.

Ainda sobre a avaliação da expressão gênica em sangue periférico, em 2021 foi publicado um estudo que avaliou a “assinatura” da expressão gênica em apneicos e os efeitos após o tratamento com aparelho de pressão positiva contínua na via aérea (CPAP) e foi observado que um número significativo de genes relacionados a imunidade estavam hipoexpressos mas que após três meses de tratamento os níveis de expressão foram normalizados <sup>(23)</sup>.

Recentemente, foi publicado um estudo que identificou 4 genes obtidos a partir de análise de banco de dados da *Gene Expression Omnibus* (GEO) e que mostrou que genes hipoexpressos em tecido adiposo subcutâneo de apneicos tem potencial para serem biomarcadores de AOS. São eles: fator neurotrófico derivado da linhagem de células gliais (*GDNF*), membro 2 da família 2 de carreador de soluto (*SLC2A2*), prolactina (*PRL*) e somatostatina (*SST*) <sup>(79)</sup>.

Alguns genes envolvidos na regulação do apetite, na distribuição da deposição de gordura e na termogênese: pró-opiomelanocortina (*POMC*), proteína contendo domínio Rad21\_REC8 (*coh-1*), membro 14 da família 6 de carreadores de soluto (*SLC6A14*), receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo (*PPARG*), proteína de desacoplamento 1 (*UCP1*) e *APOE* também já foram aventados como possivelmente envolvidos na patogênese da AOS <sup>(70)</sup>. Estudos em ratos já mostraram que as diferenças nos corpos carotídeos estão envolvidas no controle genético da duração e ritmicidade dos eventos respiratórios. A responsividade diante de hipóxia e hipercapnia em ratos tem componente genético e os genes candidatos são óxido nítrico sintetase 1 (*nos1*) e o receptor B2 adrenérgico (*Adrb2*) <sup>(70)</sup>.

Algumas metanálises já foram realizadas porém não foi alcançada significância estatística <sup>(20)</sup>, exceto para o polimorfismo do promotor de *TNF* alfa (em europeus e indianos) e para um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no gene *LPAR1* (em afro-americanos e europeus), que demonstrou associação



genômica ampla relacionado à gravidade da AOS com base no IAH. O *LPAR1* é um gene que desenvolve um papel pró-inflamatório e é expresso no córtex cerebral, pode estar relacionado ao controle da via aérea ou aos traços craniofaciais <sup>(65)</sup>.

Alguns genes já foram apontados como candidatos para sinalizar a associação de AOS com angina instável: proteína precursora de amiloide beta (*APP*), proteíno-quinase 3 ativada por mitógeno (*MAPK3*), metalopeptidase 9 da matriz (*MMP9*), molécula CD40 (*CD40*) e ligante de CD40 (*CD40LG*); enquanto outros na associação de AOS com infarto do miocárdio: *PPARG*, *MMP9*, angiotensinogênio (*AGT*) e fator de crescimento transformador beta 1 (*TGFB1*) <sup>(80)</sup>.

Também já existem estudos que avaliaram fatores envolvidos na regulação da expressão gênica em apneicos, como os microRNA (miRNA) e o padrão de metilação. Avaliaram as diferenças de expressão de miRNAs do sangue periférico, sendo a combinação *miRNA-106a/miRNA-186* a mais estável entre os candidatos a reguladores endógenos na AOS <sup>(81)</sup>. E estudos que demonstraram haver um grupo de miRNAs diferencialmente expressos entre apneicos e não apneicos e que o padrão de expressão se modifica após o tratamento com CPAP <sup>(82)</sup>. Já foi encontrada, também, diferença na expressão do padrão de miRNA na musculatura da VAS de pacientes apneicos além das diferenças encontradas no plasma <sup>(27)</sup>.

Um estudo de análise da metilação do DNA identificou que a hipometilação do receptor 2 de interleucina-1 (*IL1R2*) e do receptor de andrógeno (*AR*) pode ser um importante determinante da severidade da doença e que a hipometilação do receptor 2 de peptídeo natriurético (*NPR2*) e hipermetilação da proteína nuclear 140 (*SP140*) podem servir como biomarcadores para a vulnerabilidade para SED na AOS <sup>(83)</sup>.

Os padrões de expressão gênica, microRNA, metilação do DNA e SNPs são os aspectos menos estudados no que diz respeito aos mecanismos subjacentes da fisiopatologia da AOS. A necessidade de encontrar bons

biomarcadores é crescente e os estudos dos reguladores epigenéticos são promissores <sup>(84,85)</sup>.

### 3.3.3 Fenótipos intermediários

Além da diversidade de fatores de risco envolvidos e que já possuem suas próprias bases genéticas envolvidas, não há um único fenótipo para essa doença, que engloba uma grande diversidade de fatores fenotípicos distintos <sup>(64)</sup>. Foi observada, então, a necessidade de se passar a dividir os pacientes apneicos em subgrupos distintos de acordo com seus fenótipos intermediários <sup>(86)</sup> e endótipos, como são chamados atualmente <sup>(87)</sup>, para que seja possível melhorar a qualidade dos estudos genômicos.

Os principais fenótipos envolvidos no que diz respeito aos aspectos hereditários são a morfologia craniofacial, obesidade, sonolência, controle da VAS e o controle ventilatório <sup>(88)</sup>. Sabe-se pouco sobre as bases genéticas envolvidas no prejuízo mecânico e anatômico envolvido na patogênese da doença, mas ainda menos é sabido a respeito das bases genéticas envolvidas na alteração do controle central do tônus da musculatura durante o sono <sup>(70)</sup>.

As principais limitações são determinar o tecido de onde retirar as amostras de RNA ou de proteínas expressas e como interpretar os achados. Os tecidos possíveis, além de sangue e urina, são: gordura, músculo, fígado (para os submetidos a cirurgia bariátrica) ou outras estruturas da VAS removidas durante cirurgias. Outra dificuldade está na interpretação dos achados e na forma de análise: comparar doentes com controles ou comparar pacientes antes e depois do tratamento? Como determinar causa ou consequência? <sup>(70)</sup>

Como resultado, as informações obtidas de estudos genéticos, genômicos e proteômicos até o momento tem sua utilidade limitada na prática clínica <sup>(70)</sup>. Como a AOS é uma doença comum e complexa, que inclui múltiplos fenótipos, mais pesquisas são importantes para melhor compreender a fisiopatologia da doença e identificar os traços genéticos poderá ser útil na estratificação de risco e no desenvolvimento de novas terapêuticas na prática de uma medicina mais personalizada <sup>(20)</sup>.

# **MATERIAL E MÉTODOS**

---

---

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Este é um estudo exploratório que foi realizado com material coletado entre dezembro de 2011 e setembro de 2016 pela equipe do Ambulatório de Medicina do Sono do Departamento de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo por ocasião do desenvolvimento de outra tese de doutorado cujo objetivo foi a análise histológica dos tecidos <sup>(89)</sup>.

### 4.1 ASPECTOS ÉTICOS

A coleta do material utilizado nesse estudo foi aprovada pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) sob o protocolo de número 0698/11 em sessão datada de 14 de dezembro de 2011 e publicada no dia 16 de dezembro de 2011.

O estudo atual foi submetido à nova apreciação da CAPPesq e aprovado sob o parecer de número 5.447.891 na data de 03 de junho de 2022.

### 4.2 CASUÍSTICA

Foram coletados fragmentos de musculatura faríngea de 28 pacientes. Desses, 17 foram alocados no grupo de portadores de AOS grave (IAH>30/h), 07 pacientes foram alocados no grupo de roncadores/AOS leve (IAH<15/h) e os últimos 04 pacientes foram alocados no grupo de controles (IAH<5/h e sem histórico de ronco).

Todos os indivíduos cujas amostras de musculatura foram coletadas eram do gênero masculino e maiores de 18 anos. Todos os indivíduos

apresentavam amígdalas normotróficas (graus 1 ou 2 de Bródsky). De cada indivíduo, foram obtidas duas amostras de músculo, sendo uma de músculo palatofaríngeo e outra de músculo constritor superior da faringe, sempre à direita do paciente.

Para o estudo da expressão gênica dessa musculatura, foram selecionadas algumas das amostras previamente coletadas de acordo com os critérios mencionados abaixo:

#### **4.2.1 Critérios de Inclusão**

Objetivamos obter amostras para as análises das diferenças da expressão gênica de forma que as características de cada grupo fossem distintas do ponto de vista do distúrbio ventilatório do sono, porém próximas nas demais características, como idade e IMC:

##### ***a. Grupo de Apneia Obstrutiva do Sono (AOS)***

- Ser portador de AOS grave (IAH > 30/h);
- Saturação mínima de oxi-hemoglobina < 85%
- Índice de massa corporal (IMC) < 30kg/m<sup>2</sup>
- Idade entre 18 e 55 anos
- História positiva para ronco

##### ***b. Grupo de Roncadores/AOS leve (RONC)***

- Polissonografia tipo 1 com IAH < 15/h
- Saturação mínima de oxi-hemoglobina > 85%
- IMC < 30kg/m<sup>2</sup>
- Idade entre 18 e 55 anos
- História positiva para ronco

##### ***c. Grupo de Controles (CTRL)***

- Polissonografia tipo 1 com IAH<5/h
- Nadir de oxigênio > 90%
- IMC<30kg/m<sup>2</sup>
- Idade entre 18 e 55 anos
- História negativa para ronco

#### 4.2.2 Critérios de Exclusão

Os critérios de exclusão utilizados para a seleção das amostras para a extração e análise da expressão gênica foram os mesmos para todos os grupos e estão descritos abaixo:

- Ausência de material em quantidade e qualidade satisfatória para a extração de RNA;
- Amostras de indivíduos com IMC ou idade mais distintos dos demais (extremos).

### 4.3 MÉTODOS

#### 4.3.1 Avaliação Pré-Coleta das Amostras

Todos os indivíduos incluídos no estudo por ocasião da coleta das amostras foram submetidos a avaliação clínica e estudo de polissonografia do tipo I.

Para as polissonografias, foram utilizados os polissonógrafos EMBLA S4000 – analisado pelo software *RemLogic* 1.3 e *BrainWave* III – analisado pelo software *BW Analysis*. Todos os exames foram analisados e laudados pelo mesmo médico especialista. Foram adotados os critérios recomendados pelo manual da Academia Americana de Medicina do Sono (AASM) versão 2.0 para a leitura, estagiamento e marcação de eventos.

### 4.3.2 Obtenção das Amostras

Todas as amostras foram obtidas durante procedimento cirúrgico realizado para o tratamento de AOS, ronco ou amigdalite caseosa crônica. Os pacientes apneicos ou roncadores, foram submetidos à cirurgia de faringoplastia lateral, enquanto os pacientes não-apneicos, foram submetidos à cirurgia de amigdalectomia <sup>(89)</sup>.

O material estudado (músculos constritor superior da faringe e palatofaríngeo) foi obtido no intraoperatório, por meio da remoção de um fragmento dos músculos sempre ao lado direito dos pacientes. É importante salientar que a coleta do fragmento muscular ocorreu em um músculo cuja manipulação já é prevista nas cirurgias, sendo incluídos nas suturas das amigdalectomias e seccionados nas faringoplastias <sup>(89)</sup>.

### 4.3.3 Preparação e Armazenamento das Amostras

O material coletado tinha dimensões de aproximadamente 0,4cm de largura, 0,8 cm de comprimento e 0,4 cm de espessura, e foi transportado em gaze levemente umedecida com solução fisiológica 0,9% e congelados em tempo menor que 3 horas em tambores com nitrogênio líquido (aproximadamente – 170 graus Celsius), sendo armazenados em frascos plásticos devidamente identificados. Foram realizados cortes para análise histológica no estudo prévio. O restante do material permaneceu armazenado em freezer com temperatura de -80 graus Celsius até o início do presente estudo <sup>(89)</sup>.

### 4.3.4 Extração do RNA, Avaliação da Qualidade, Preparo das Bibliotecas e Sequenciamento

As células foram lisadas em tampão RLT Plus do kit *AllPrep* DNA/RNA Mini Kit, e a extração de RNA seguiu de acordo com as recomendações do fabricante (Qiagen). O RNA foi tratado com enzima DNase a fim de eliminar

qualquer contaminação com DNA genômico. A análise de concentração e pureza foi realizada por leitura de absorbância a 260 e 280 nm. Razões 260/280 entre 1,8 e 2,2 foram consideradas satisfatórias quanto ao grau de pureza. As amostras de RNA foram armazenadas a -80°C até sua utilização para a síntese de DNA complementar (cDNA).

O procedimento de síntese de cDNA foi realizado utilizando o kit *GoScript™* (*Promega Corporation*), onde as amostras foram adicionadas ao mix de transcrição reversa contendo água *nuclease-free*, *GoScript™ reaction buffer* com oligonucleotídeos randômicos, e *GoScript™ enzyme mix*. A síntese de cDNA foi realizada utilizando as temperaturas/tempos indicados pelo fabricante. Em seguida o cDNA foi diluído em TE (Tris/EDTA) e armazenado a -20°C, para subsequente análise da expressão gênica.

Para analisar o perfil de expressão gênica diferencial entre os grupos, foi realizado o sequenciamento em larga escala de RNA (RNASeq). As bibliotecas das amostras foram preparadas a partir de 1 µg de RNA total usando o *QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit-FWD* (Lexogen, Vienna, Austria). A concentração das bibliotecas foi medida pelo *Qubit Fluorometer and Qubit dsDNA HS Assay Kit* (*Applied Biosystems*) e a distribuição do tamanho dos fragmentos foi determinada usando *Agilent D1000 ScreenTape System* (*Agilent Technologies*). O sequenciamento foi realizado em sequenciador *NextSeq 500* na plataforma *Illumina* no centro multiusuário SELA da rede Premium da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (<https://www.premium.fm.usp.br/index.php?mpg=11.42.00&lab=SELA&equipo=34>).

#### 4.3.5 Análise de Dados e Bioinformática

O objetivo principal desta análise foi determinar o impacto da doença no transcriptoma da musculatura da PLF. Os dados brutos de RNASeq, foram alinhados no hg38 humano pelo STAR<sup>(90)</sup> e o processamento dos arquivos BAM, incluindo fusão, ordenação e determinação de duplicatas, foi realizado utilizando-se a ferramenta *bamsort* do *biobambam2*. O *featureCounts*<sup>(91)</sup> foi usado para contagem do número de leituras que se sobrepuseram a cada gene.



O arquivo GFF contendo os modelos dos genes foi obtido do <ftp.ensembl.org>. Os programas fastQC e RNASEQC foram utilizados para acessar as qualidades do sequenciamento e do alinhamento, respectivamente. A normalização dos dados foi feita com edgeR <sup>(92)</sup> utilizando o método *trimmed-mean* (TMM). O pacote do R-bioconductor limmavoom <sup>(93)</sup> foi utilizado para a análise de expressão diferencial. As análises de vias e o enriquecimento do grupo de genes foram feitas utilizando-se as ferramentas online de GSEA (<http://software.broadinstitute.org/gsea>) e *WebGestalt* (<http://www.webgestalt.org/>).

A análise da distribuição dos dados foi feita pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. A expressão gênica diferencial entre os grupos foi analisada pelo teste não paramétrico de Kurskal-Wallis e pelo teste post-hoc de Dunn. Foram considerados resultados significativos quando  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

---

---

## 5 RESULTADOS

A tabela 2 apresenta as características dos indivíduos dos quais foram coletadas amostras de tecido para análise de RNA. Estas informações incluem dados demográficos (idade e gênero), bem como os parâmetros clínicos relevantes, como o IMC, IAH, nadir de oxigênio e saturação média de oxigênio. A análise a partir dessas características foi fundamental para contextualizar a análise genômica, garantir a representatividade da amostra estudada e inferir correlações entre os perfis genéticos e as características clínicas dos participantes.

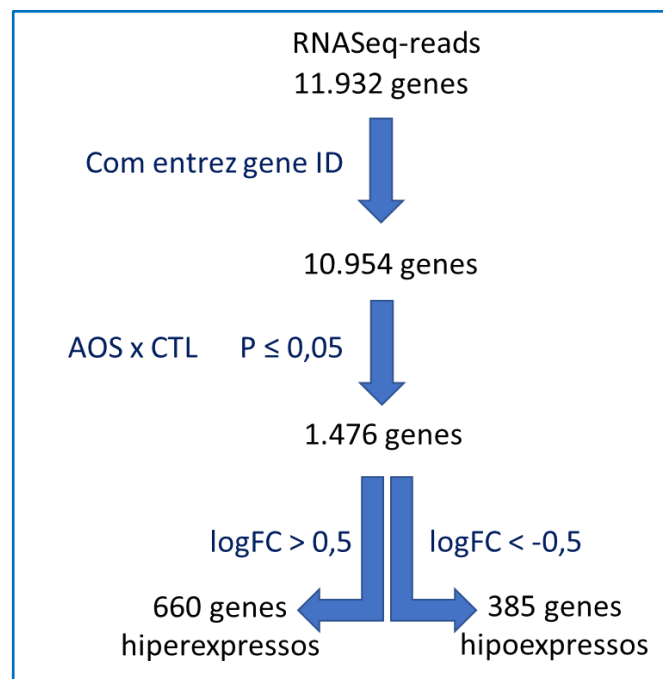
**Tabela 2** - Dados da casuística

Amostra	Grupo	Idade	Gênero	IMC	IAH	Sat O <sub>2</sub> mín	SatO <sub>2</sub> méd
5, 6	AOS	55	M	27,6	50,07	76	92
21, 22	AOS	26	M	29,8	75,5	54	89
31, 32	AOS	32	M	23,2	32,9	81	88
37, 38	AOS	30	M	28,4	60,2	67	86,8
27, 28	RONC	20	M	23,9	4,8	91	96
35	RONC	28	M	20,1	5,8	88	96
43, 44	RONC	46	M	23,5	7,4	86	94
45	RONC	21	M	24,2	9	93	98
47, 48	RONC	43	M	27,7	3,9	89	93
49, 50	CTRL	22	M	25,1	1,7	92	95
53, 54	CTRL	21	M	21,7	2,1	91	95

AOS: grupo de apneicos graves; RONC: grupo de ronco primário ou AOS leve; CTRL: grupo sem história de ronco ou AOS; IMC: índice de massa corpórea; IAH: índice de apneia e hipopneia; Sat: saturação; O<sub>2</sub>: oxigênio; mín: mínima; méd: média.

O sequenciamento em larga escala RNASeq identificou um total de 11.932 genes, dos quais 10.954 apresentavam identificador do gene na base de dados *ensembl*. Foram analisados os 1.476 genes diferencialmente expressos (GDE) que apresentaram valor de  $p \leq 0,05$  na comparação entre os grupos AOS e controles (CTRL) obtido na análise gerada com o pacote Limma (O pacote Limma gerou como resultado a relação dos genes com seus respectivos valores estatísticos: *Fold-change*, média de expressão, valor de T, valor de P e Valor de B). Dentre os 1.476 GDE, 660 genes apresentavam-se hiperexpressos considerando valor de  $\log \text{Fold-change (FC)} > 0,5$  e 385 genes apresentavam-se hipoexpressos considerando valor de  $\log \text{FC} < -0,5$ . Vide fluxograma na figura 1.

**Figura 1** - Fluxograma de seleção de genes hiper e hipoexpressos

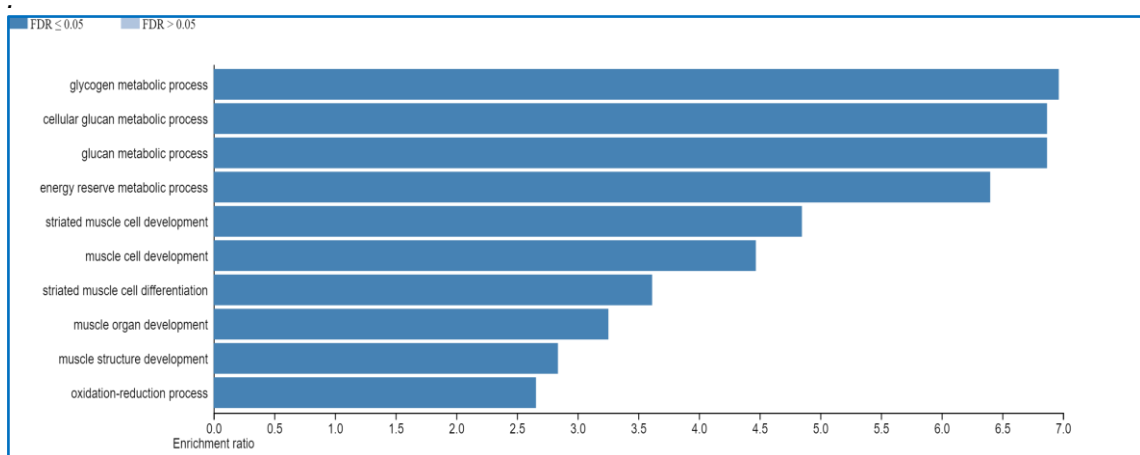


*RNA-Seq reads*: total de genes da leitura do sequenciamento do RNA; *entrez gene ID*: genes previamente identificados; *AOS*: grupo de apneia obstrutiva do sono grave; *CTL*: grupo de pacientes saudáveis, sem história de ronco ou apneia do sono; *logFC*: logaritmo de fold change, representando quantitativamente a expressão de cada gene.

## 5.1 GENES HIPOEXPRESSOS EM APNEICOS

Os 385 genes hipoexpressos no grupo de apneicos em comparação com o grupo controle foi analisado com o auxílio da plataforma *WebGestalt* ([webgestalt.org](http://webgestalt.org)), onde foi observado que o grupo de genes envolvidos nos principais processos biológicos e que compreendem o maior número de genes são: processo de oxidação-redução e desenvolvimento de estrutura muscular, que totalizaram 82 genes. Vide gráfico de barras na figura 2.

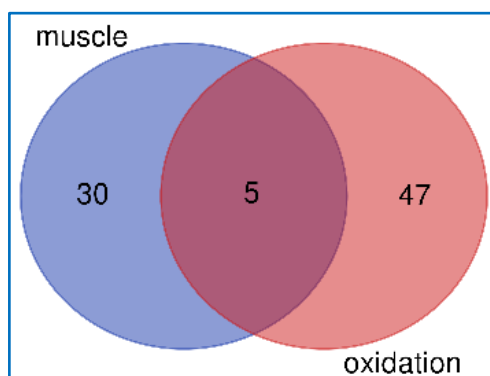
**Figura 2 -** Gráfico de barras da plataforma de bioinformática *Webgestalt* com os processos biológicos dos genes hipoexpressos em apneicos quando comparados aos controles



*FDR: false discovery rate; Enrichment ratio: taxa de enriquecimento; glycogen metabolic process: processo metabólico do glicogênio; cellular glucan metabolic process: processo metabólico de glucano celular; processo metabólico de reserva de energia; striated muscle cell development: desenvolvimento de células musculares esqueléticas; muscle cell development: desenvolvimento de células musculares; striated muscle cell differentiation: diferenciação de células musculares; muscle organ development: desenvolvimento de órgãos musculares; muscle structure development: desenvolvimento de estruturas musculares; oxidation-reduction process: processo de oxidação-redução.*

Esses 82 GDE foram posteriormente plotados em um diagrama de Venn e pudemos observar que cinco genes estão envolvidos em ambos os processos biológicos. Vide gráfico de Venn na figura 3 e a tabela de genes distribuídos de acordo com o processo biológico na tabela 3.

**Figura 3** - Diagrama de venn dos genes hipoeexpressos distribuídos de acordo com o processo biológico



Processo de oxidação-redução (oxidation) em vermelho e desenvolvimento de estrutura muscular (muscle) em azul

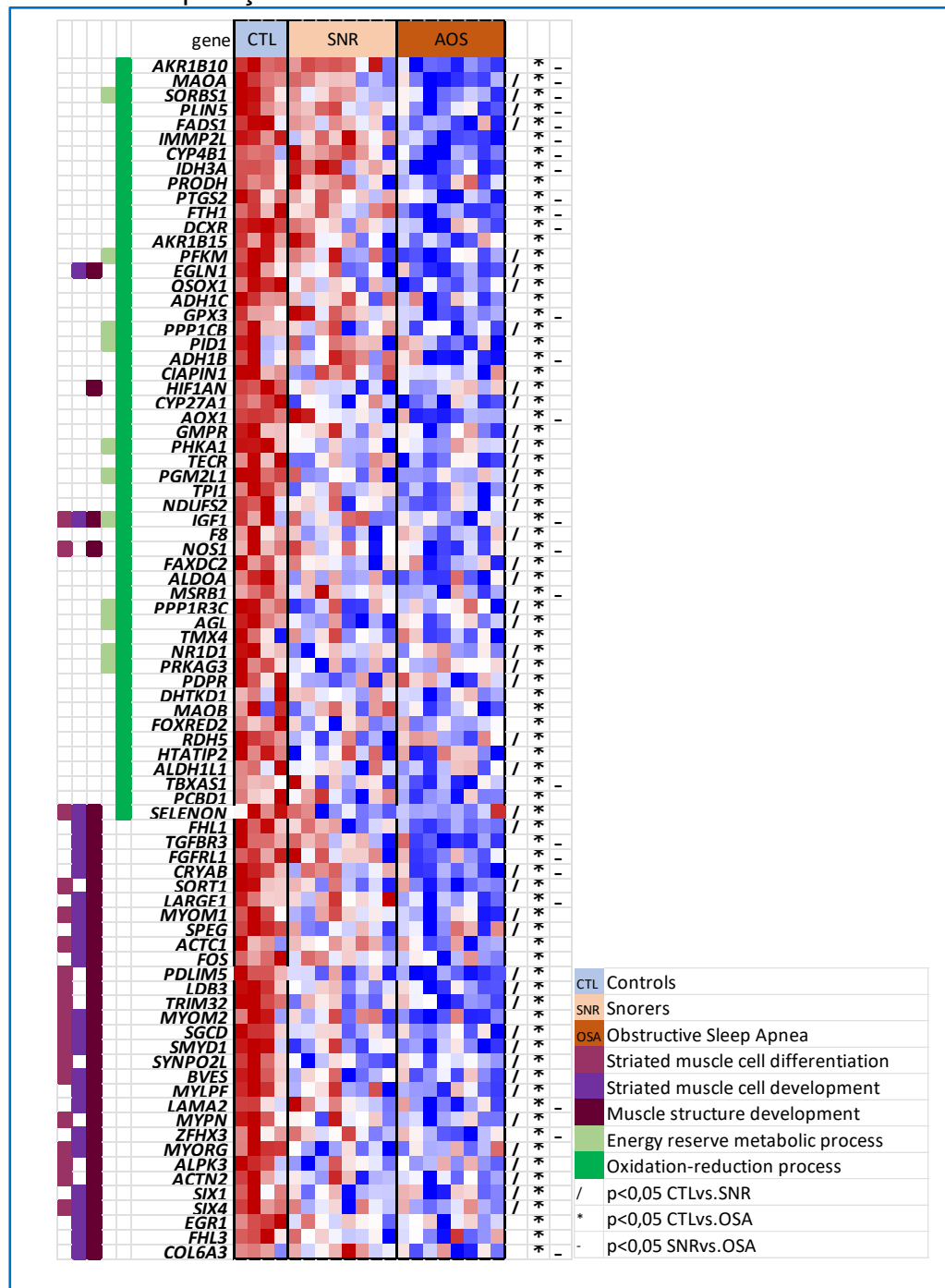
**Tabela 3** - Tabela de distribuição dos GDE hipoeexpressos de acordo com processo biológico após análise em diagrama de venn

Processo Biológico	Nº genes	Genes
Muscle and Oxidation	5	EGLN1 NOS1 IGF1 SELENON HIF1AN
Desenvolvimento de estrutura muscular	30	MYOM1 MYLPF SPEG FOS SYNPO2L SORT1 CRYAB COL6A3 ACTN2 LDB3 MYPN LAMA2 TRIM32 ZFH3 MYORG SMYD1 EGR1 PDLIM5 TGFBR3 FHL3 SIX1 FHL1 SIX4 BVES ALPK3 LARGE1 ACTC1 FGRL1 SGCD MYOM2
Processo de oxido-redução	47	PPP1CB MSRB1 PDPR PHKA1 AKR1B10 ALDOA PCBD1 FAXDC2 QSOX1 F8 AOX1 CIAPIN1 NDUFS2 CYP27A1 TECR AGL PRKAG3 HTATIP2 ALDH1L1 FTH1 TBXAS1 PRODH NR1D1 PTGS2 FOXRED2 GPX3 PFKM PPP1R3C SORBS1 CYP4B1 TMX4 RDH5 ADH1C DCXR ADH1B IMMP2L PID1 PLIN5 DHTKD1 IDH3A AKR1B15 TPI1 MAOA FADS1 PGM2L1 MAOB GMPR

GDE: genes diferencialmente expressos; muscle: desenvolvimento de estrutura muscular; oxidation: processo de oxidação-redução;

Também foi confeccionado um *heatmap* (mapa de calor) com os 82 GDE hipoexpressos nos apneicos quando comparados com os controles. O *heatmap* permite a representação da intensidade da expressão de cada gene por cores: genes menos expressos no grupo de apneicos (em cor azul), genes mais expressos no grupo de controles (em cor vermelha) e, quando expressos de forma intermediária, em variações mais claras de cada cor, predominando no grupo de roncadores. Vide *heatmap* na figura 4.

**Figura 4 - Heatmap com genes hiporexpressos no grupo de apneicos em comparação com os controles**



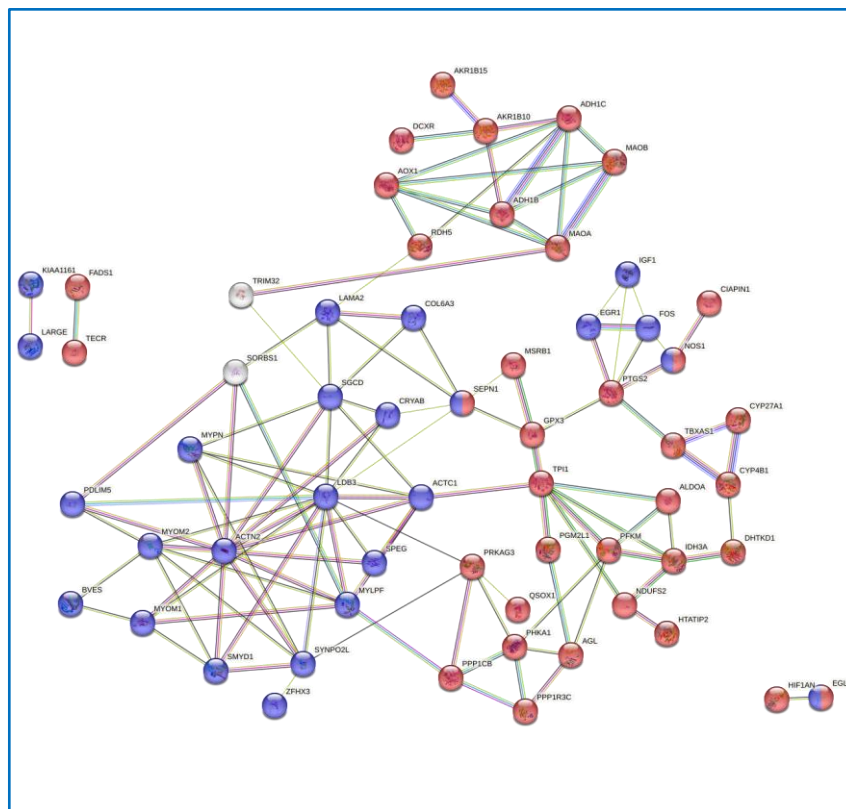
CTL: grupo de controles; SNR: grupo de roncoadores e apneicos leves; OSA: grupo de apneia obstrutiva do sono grave; Striated muscle cell differentiation: diferenciação de células musculares esqueléticas; striated muscle cell development: desenvolvimento de células musculares; muscle structure development: desenvolvimento de estruturas musculares; energy reserve metabolic process: processo metabólico de reserva de energia; oxidation-reduction process: processo de oxidação-redução; /: valor de p significativo para a comparação entre controles e roncoadores/apneicos leves; \*: valor de p significativo para a comparação entre controles e apneicos graves; -: valor de p significativo para a comparação entre roncoadores e apneicos graves.



Os 82 genes também foram avaliados pelo banco de dados *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes (STRING)*, que organiza e disponibiliza dados de interação e associações diretas (físicas) e indiretas (funcionais) entre os genes (SZKLARCZYK *et al.*, 2015) e nos permite observar a forma como os genes se conectam e identificar as ligações existentes. Vide figura 5.

**Figura 5 -** STRING dos genes hipoexpressos em apneicos em relação aos controles

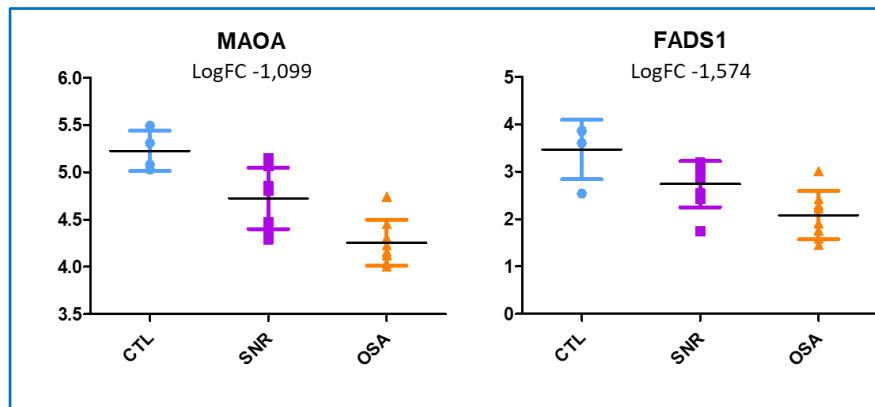
Biological Process (Gene Ontology)				
GO-term	description	count in network	strength	false discovery rate
GO:0055114	Oxidation-reduction process	49 of 939	1.1	1.76e-38
GO:0061061	Muscle structure development	33 of 479	1.22	3.40e-27
GO:0007517	Muscle organ development	25 of 291	1.31	7.89e-22
GO:0055002	Striated muscle cell development	16 of 132	1.46	3.21e-15
GO:0051146	Striated muscle cell differentiation	18 of 200	1.33	3.21e-15



*Biological process: processo biológico; GO-term: termo de geneontologia; description: descrição; count in network: quantidade na rede; strength: força; false discovery rate: taxa de descoberta falsa. Em vermelho: processo de oxidação-redução; em azul: desenvolvimento de estrutura muscular.*

Dos 82 GDE hipoexpressos na comparação entre CTRL e AOS, 25 também apresentaram valor de p significativo na comparação entre RONC e AOS. Enquanto 5 genes dentre os 82 apresentaram valor de p significativo em todas as comparações (CTRLxAOS, CTRLxRONC e RONCxAOS). Os GDE hipoexpressos e com valor de p significativo em todas as comparações também foram plotados em gráficos tipo *boxplot* incluindo o grupo de RONC a fim de facilitar a visualização de uma possível progressão da doença também se manifestando na expressão gênica entre esses grupos. Alguns exemplos estão demonstrados na figura 6.

**Figura 6** - Gráficos tipo boxplot de genes hipoexpressos cujo valor de p é significativo para a comparação entre todos os grupos: controles, roncoadores e apneicos



CTL: grupo de controles; SNR: grupo de roncoadores e apneicos leves; OSA: grupo de apneicos graves.

### 5.1.1 A atuação dos GDE hipoexpressos na AOS:

#### *Metabolismo Energético e Resposta ao Estresse Oxidativo*

Genes como *AKR1B10* (aldo-ceto redutase família 1 membro B10)<sup>(94)</sup>, *CYP4B1* (citocromo P450 família 4 subfamília B membro 1)<sup>(95)</sup>, *AOX1* (aldeído oxidase 1)<sup>(96,97)</sup>, *FADS1* (desaturase de ácidos graxos 1)<sup>(98)</sup> e *IDH3A* (isocitrato desidrogenase (NAD(+)) 3 subunidade catalítica alfa)<sup>(99)</sup> estão envolvidos no metabolismo energético e na produção de ATP. A regulação negativa desses genes pode levar a uma diminuição na produção de energia nas células musculares, o que pode dificultar que os músculos faríngeos lidem com o estresse e se recuperarem adequadamente.

O gene *GPX3* (glutathiona peroxidase 3)<sup>(100,101)</sup> codifica a enzima glutathiona peroxidase 3, que tem papel na defesa antioxidante celular contra o estresse oxidativo. A regulação negativa desse gene aumenta a vulnerabilidade do tecido muscular aos efeitos do estresse oxidativo resultando em inflamação crônica e lesão tecidual, o que compromete a integridade e a função da musculatura.

Já o gene *IGF1* (fator de crescimento semelhante à insulina 1)<sup>(102)</sup> tem um papel significativo na regulação do metabolismo energético e na regeneração celular pois atua na capacidade da musculatura em utilizar a glicose de forma eficaz. Sua hipoexpressão compromete a eficiência metabólica e o reparo celular após injúria por estresse oxidativo.

Em suma, a baixa expressão desse grupo de genes compromete o metabolismo energético, aumenta o estresse oxidativo e prejudica a função muscular, contribuindo para a progressão da AOS.

#### *Controle da Inflamação e Resposta Imune*

O gene *EGLN1* (fator de indução de hipóxia da família EGL-9 1)<sup>(103)</sup>, também conhecido como PHD2, codifica a enzima hidroxilase de prolil-4 (PHD2), que atua na regulação do fator induzível por hipóxia (HIF-1 $\alpha$ ). Em condições de

hipóxia intermitente, como na AOS, a redução da expressão de *EGLN1* pode levar à ativação prolongada de genes alvo de HIF-1 $\alpha$  envolvidos na adaptação à hipóxia e contribui para a resposta inflamatória, angiogênese, remodelamento tecidual e fibrose, observados na AOS.

Genes como *PTGS2* (prostaglandina-endoperóxido sintase 2, ou COX-2) estão relacionados com a resposta inflamatória, codificando uma enzima envolvida na produção de prostaglandinas. As respostas inflamatórias impulsionadas por *PTGS2* podem influenciar a capacidade do tecido em controlar a inflamação, afetando a miogênese, a estabilidade das miofibrilas, a integridade da matriz extracelular e o processo geral de reparo e remodelagem do tecido. Sem a regulação adequada através de COX-2 e prostaglandinas, a resposta inflamatória pode se tornar desregulada, levando a um estado de inflamação crônica ou não resolvida. Essa inflamação prolongada poderia contribuir para a progressão do dano tecidual na AOS <sup>(104)</sup>. A supressão da expressão do gene COX-2 também pode significar uma tentativa de reduzir a fibrose muscular em um contexto de lesão <sup>(105)</sup>.

*NOS1* (óxido nítrico sintase 1) codifica a óxido nítrico sintase neuronal, uma enzima envolvida na produção de óxido nítrico (NO) nas células musculares. O NO sintetizado por *NOS1* afeta diversas funções metabólicas musculares, como a captação de glicose, o consumo de oxigênio e a homeostase de cálcio, e as adaptações do tônus vascular às necessidades metabólicas musculares. No contexto da AOS, a inflamação sistêmica é provavelmente o principal determinante das modificações expressionais de *NOS1* (hipoexpresso) e *NOS3* (hiperexpresso), conforme visto no contexto de sepse, e resulta em comprometimentos da função muscular <sup>(106)</sup>.

Genes como *FOS* (proto-oncogene Fos, subunidade do fator de transcrição AP-1) <sup>(107–109)</sup> e *MAOA* (monoamina oxidase A) <sup>(110–112)</sup> podem influenciar a resposta inflamatória. A regulação negativa desses genes pode contribuir para a persistência da inflamação crônica nos músculos faríngeos, interferindo na capacidade de recuperação.

*PLIN5* (perilipina 5) é uma proteína associada aos lipídios que desempenha um papel na regulação do metabolismo lipídico e armazenamento de lipídios nas células musculares. Na AOS, *PLIN5* pode estar envolvido na regulação do metabolismo lipídico no músculo faríngeo, afetando a disponibilidade de substratos energéticos durante os episódios de hipóxia e estresse metabólico associados à doença. A redução da expressão de *PLIN5* pode levar a disfunções no metabolismo lipídico, comprometendo a capacidade do músculo de obter energia de forma eficiente durante o sono, o que pode contribuir para a fadiga muscular e a progressão da doença <sup>(113)</sup>.

Em resumo, a regulação negativa desses genes pode desencadear uma cascata de eventos que comprometem o metabolismo, a integridade estrutural, a resposta inflamatória e a capacidade de recuperação dos músculos faríngeos. Isso pode levar a uma recuperação mais lenta, aumento da susceptibilidade a lesões e redução da capacidade de lidar com o estresse adicional induzido pela apneia do sono e outros fatores.

#### *Matriz Extracelular, Estrutura e Integridade Muscular*

*PDLIM5* (Domínio PDZ e LIM 5) codifica uma proteína que contém domínios PDZ e LIM, sugerindo envolvimento em interações proteína-proteína e sinalização celular. Ancora e regula a atividade da proteína quinase C (PKC) de maneira específica à isoforma por meio de seus domínios LIM <sup>(114,115)</sup>. No contexto dos músculos faríngeos em pacientes com AOS, *PDLIM5* pode desempenhar um papel na modulação de vias de sinalização relacionadas à função muscular e adaptação. Quando hipoexpresso, pode contribuir para interrupções nas cascatas de sinalização que são cruciais para a adaptação muscular.

*CRYAB* (alfa-b cristalina) é uma proteína chaperona do tipo sHSP (small heat shock protein) conhecida por sua função na homeostase muscular e na proteção contra o estresse celular, incluindo o estresse oxidativo e inflamação e sua deficiência está relacionada a miopatia miofibrilar <sup>(116–119)</sup>. No músculo da faringe, *CRYAB* pode estar envolvido na proteção contra danos induzidos pelo

estresse mecânico associado à obstrução das vias aéreas durante os episódios de apneia. A redução da expressão de CRYAB pode comprometer a capacidade do músculo faríngeo de lidar com o estresse oxidativo e inflamatório crônico associado à AOS, contribuindo para o dano e a disfunção muscular.

Genes como *LAMA2* (subunidade alfa 2 da laminina) desempenham papéis na matriz extracelular, estrutura e integridade muscular. A expressão prejudicada de laminina poderia contribuir para a estrutura muscular enfraquecida e os processos de reparo, tornando-a mais suscetível a lesões e retardando o processo de recuperação <sup>(120)</sup>.

### *Contração e Regulação do Tônus*

*ACTC1* (actina, alfa, músculo cardíaco 1) <sup>(121,122)</sup>, *MYLPP* (cadeia leve de miosina, fosforilável, músculo esquelético rápido) <sup>(123)</sup> e *ACTN2* (actinina alfa 2) <sup>(124)</sup>, estão envolvidos no aparato contrátil e na organização estrutural das fibras musculares. Quando hipoexpressos, eles podem comprometer coletivamente a contração muscular, a resposta à demanda aumentada e a integridade citoesquelética nos músculos faríngeos de pacientes com OSA.

*LDB3* (domínio de ligação LIM 3) codifica uma proteína envolvida na organização de complexos proteicos e na manutenção da integridade estrutural nas células musculares. Colocaliza-se com a-actinina na banda Z muscular e funciona como uma proteína estabilizadora da banda Z. Quando hipoexpresso, *LDB3* pode contribuir para bandas Z interrompidas sem sinais de necrose muscular e comprometer a estabilidade de sarcômeros e miofibrilas nos músculos faríngeos, afetando potencialmente a contração muscular e os processos de reparo em resposta à demanda aumentada <sup>(125)</sup>.

*MYOM1* (miomesina 1) e *MYOM2* (miomesina 2), quando hipoexpressos, podem afetar a estrutura e estabilidade da miofibrila. Acredita-se que os membros da família de genes de miomesina atuam como conectores estruturais entre miosina e titina <sup>(126)</sup>. A expressão reduzida de miomesina também pode influenciar a elasticidade muscular e pode afetar a transmissão adequada da força gerada pela contração <sup>(127)</sup>.

*SORBS1* (domínio sorbina e SH3 contendo 1) é uma proteína que desempenha um papel na organização do citoesqueleto e na regulação da sinalização celular <sup>(128)</sup>. No contexto da AOS, pode estar envolvido na manutenção da integridade estrutural e da função contrátil do músculo faríngeo. A redução da expressão de *SORBS1* pode levar a alterações na estrutura do citoesqueleto e na regulação da sinalização celular, predispondo o músculo à disfunção contrátil e ao comprometimento da sua capacidade de resposta adaptativa.

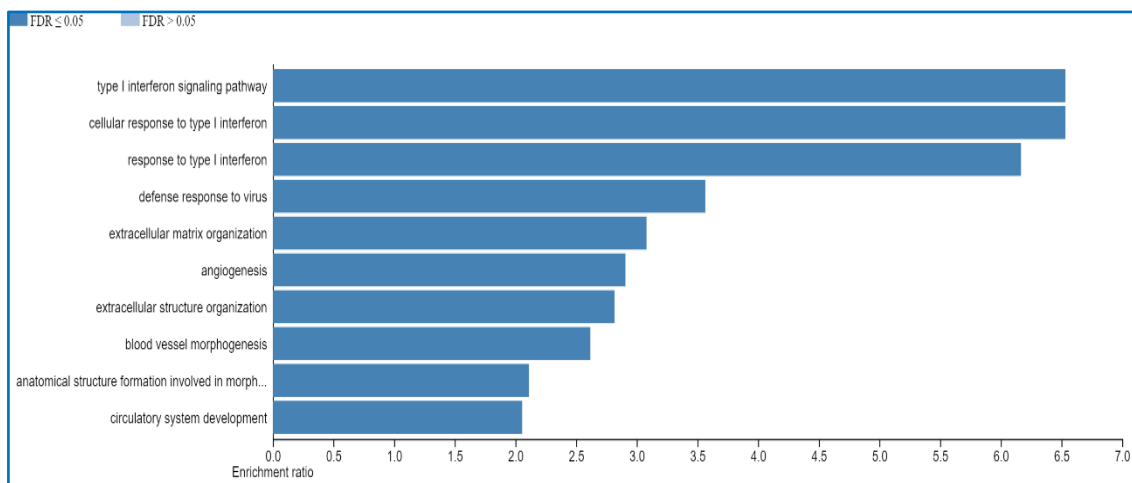
*SPEG* (proteína quinase expressa preferencialmente em músculo estriado) é uma proteína quinase que desempenha um papel significativo no desenvolvimento e na regeneração muscular e está envolvida em vias de sinalização relacionadas à função muscular. A deficiência de *SPEG* tem sido associada ao tamanho anormal, desorganização e degeneração das miofibrilas, nucleação central, fragmentação sarcomérica e aparência irregular ou não estriada do tecido muscular. Quando hipoexpresso, pode afetar a atividade da proteína quinase nas células musculares, potencialmente interrompendo as cascatas de sinalização crucial para a adaptação e reparo muscular em resposta à demanda aumentada <sup>(129)</sup>.

## 5.2 GENES HIPEREXPRESSOS EM APNEICOS

Todas as análises realizadas para os genes hipoexpressos também foram realizadas para os GDE hiperexpressos nos apneicos em relação aos controles conforme detalhamento a seguir.

Os 660 genes hiperexpressos foram analisados com auxílio da plataforma *WebGestalt* ([webgestalt.org](http://webgestalt.org)). Do total, 577 tem categorias funcionais descritas nas listas de referência de todos os genes mapeados do genoma e foram utilizados para a análise de enriquecimento. O grupo de GDE envolvidos nos principais processos biológicos (via de sinalização interferon tipo I, organização da matriz extracelular e angiogênese – conforme observado no gráfico de barras da figura 7) totalizou 95 genes, que foram então analisados em um diagrama de venn (figura 8 e tabela 4) e em um *heatmap*. (figura 9)

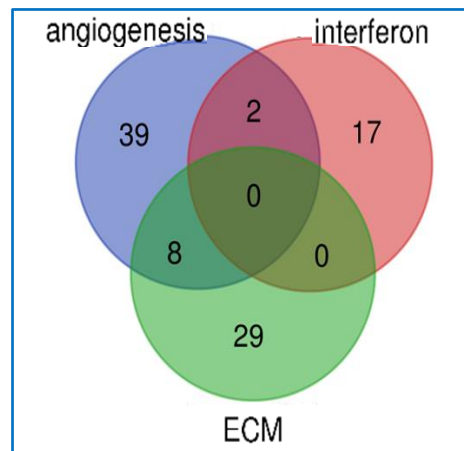
**Figura 7 -** Gráfico de barras da plataforma de bioinformática *Webgestalt* com os processos biológicos dos genes hiperexpressos em apneicos quando comparados aos controles



*FDR: false discovery rate; Enrichment ratio: taxa de enriquecimento; type I interferon signaling pathway: via de sinalização interferon tipo I; cellular response to type I interferon: resposta celular ao interferon tipo I; response to type I interferon: resposta ao interferon tipo I; defense response to virus: resposta de defesa aos vírus; extracellular matrix organization: organização da matriz extracelular; angiogenesis: angiogênese; extracellular structure organization; blood vessel morphogenesis: morfogênese dos vasos sanguíneos; anatomical structure formation involved in morph...: estrutura anatômica envolvida em morfogênese; circulatory system development: desenvolvimento do sistema circulatório.*



**Figura 8** - Diagrama de venn dos genes hiperexpressos distribuídos de acordo com o processo biológico



Angiogenese (angiogenesis) em azul, via de sinalização interferon tipo I (interferon) em vermelho e organização da matriz extracelular (ECM) em verde.

**Tabela 4** - Tabela de distribuição dos GDE hiperexpressos de acordo com processo biológico após análise em diagrama de venn

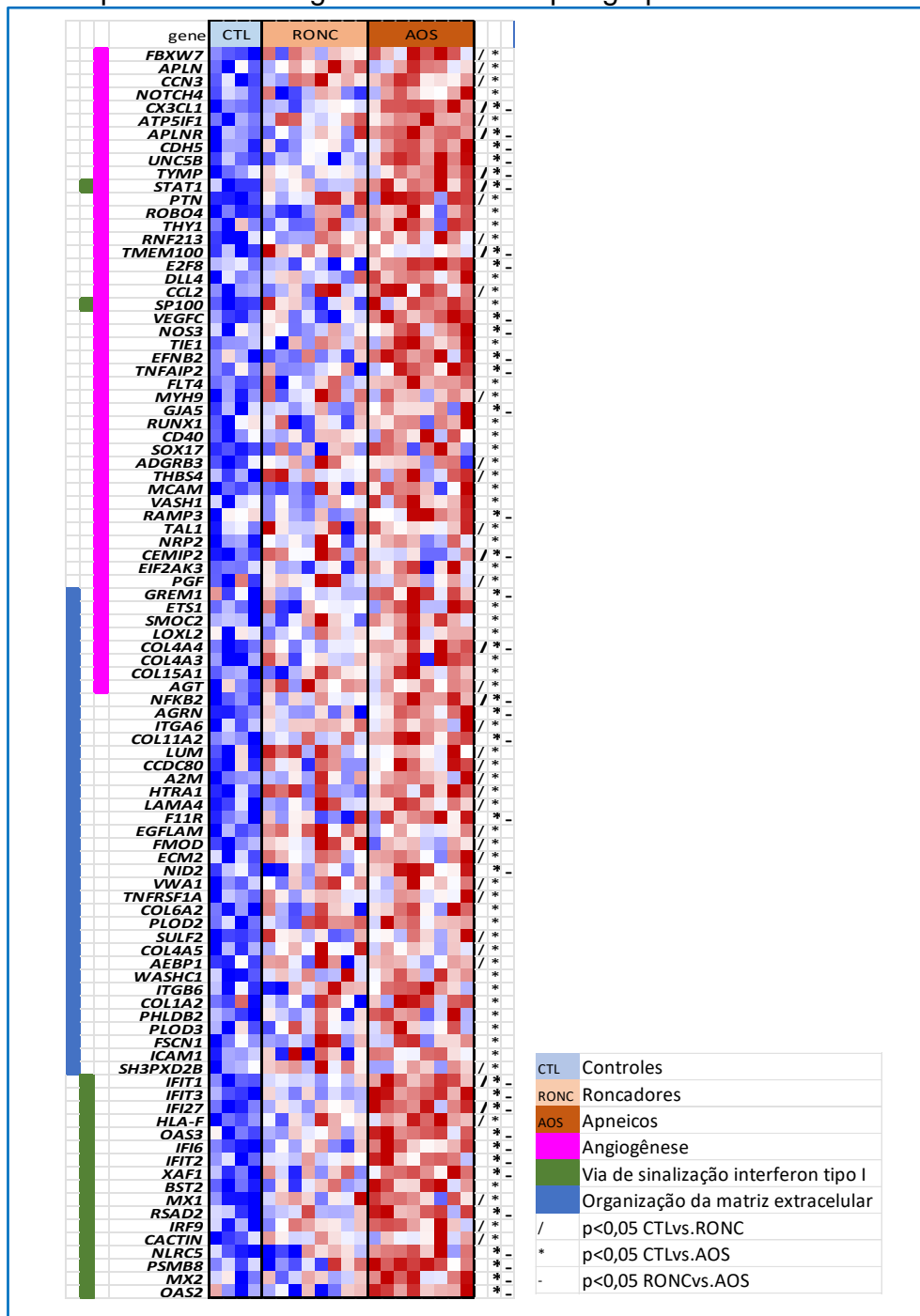
Processo Biológico	Nº genes	Genes
angiogenesis and interferon	2	SP100 STAT1
ECM and angiogenesis	8	AGT ETS1 LOXL2 COL4A3 COL4A4 GREM1 COL15A1 SMOC2
angiogenesis	39	FLT4 THY1 CEMIP2 ADGRB3 MCAM E2F8 PTN APLN APLNR VASH1 CDH5 ATP5IF1 PGF CCL2 RAMP3 GJA5 TYMP EIF2AK3 MYH9 NOS3 RUNX1 DLL4 CX3CL1 SOX17 ROBO4 CCN3 FBXW7 THBS4 TNFAIP2 EFNB2 TMEM100 UNC5B TAL1 CD40 VEGFC NOTCH4 RNF213 NRP2 TIE1
interferon	17	CACTIN IFIT1 IFI6 HLA-F XAF1 OAS3 OAS2 NLRC5 RSAD2 MX1 PSMB8 MX2 IRF9 IFIT3 IFIT2 IFI27 BST2
ECM	29	FMOD LAMA4 COL1A2 AGRN A2M TNFRSF1A NID2 CCDC80 NFKB2 LUM HTRA1 SH3PXD2B COL6A2 EGFLAM COL4A5 ECM2 VWA1 WASHC1 ICAM1 ITGA6 COL11A2 FSCN1 ITGB6 AEBP1 SULF2 PLOD3 PLOD2 F11R PHLDB2

GDE: genes diferencialmente expressos; angiogenesis: angiogênese, interferon: via de sinalização interferon tipo I; ECM: organização da matriz extracelular.

Dois GDE estão envolvidos tanto em angiogênese quanto na via de sinalização interferon tipo I e oito genes estão envolvidos tanto em angiogênese quanto na organização de matriz extracelular. Não foram encontrados genes que participem ao mesmo tempo da via de sinalização interferon tipo I e organização de matriz extracelular. Da mesma forma, não há genes no grupo que estejam envolvidos simultaneamente nos três principais processos biológicos ao mesmo tempo.

Após a análise de ontologia genética, foi confeccionado um *heatmap* dos 95 genes hiperexpressos envolvidos nos principais processos biológicos selecionados, onde é possível observar em representação por cor: genes pouco expressos no grupo controle (em cor azul), genes muito expressos no grupo de AOS (em cor vermelha) e, quando expressos de forma intermediária, em variações mais claras de cada cor, predominando no grupo de roncoadores. Vide *heatmap* na figura 9.

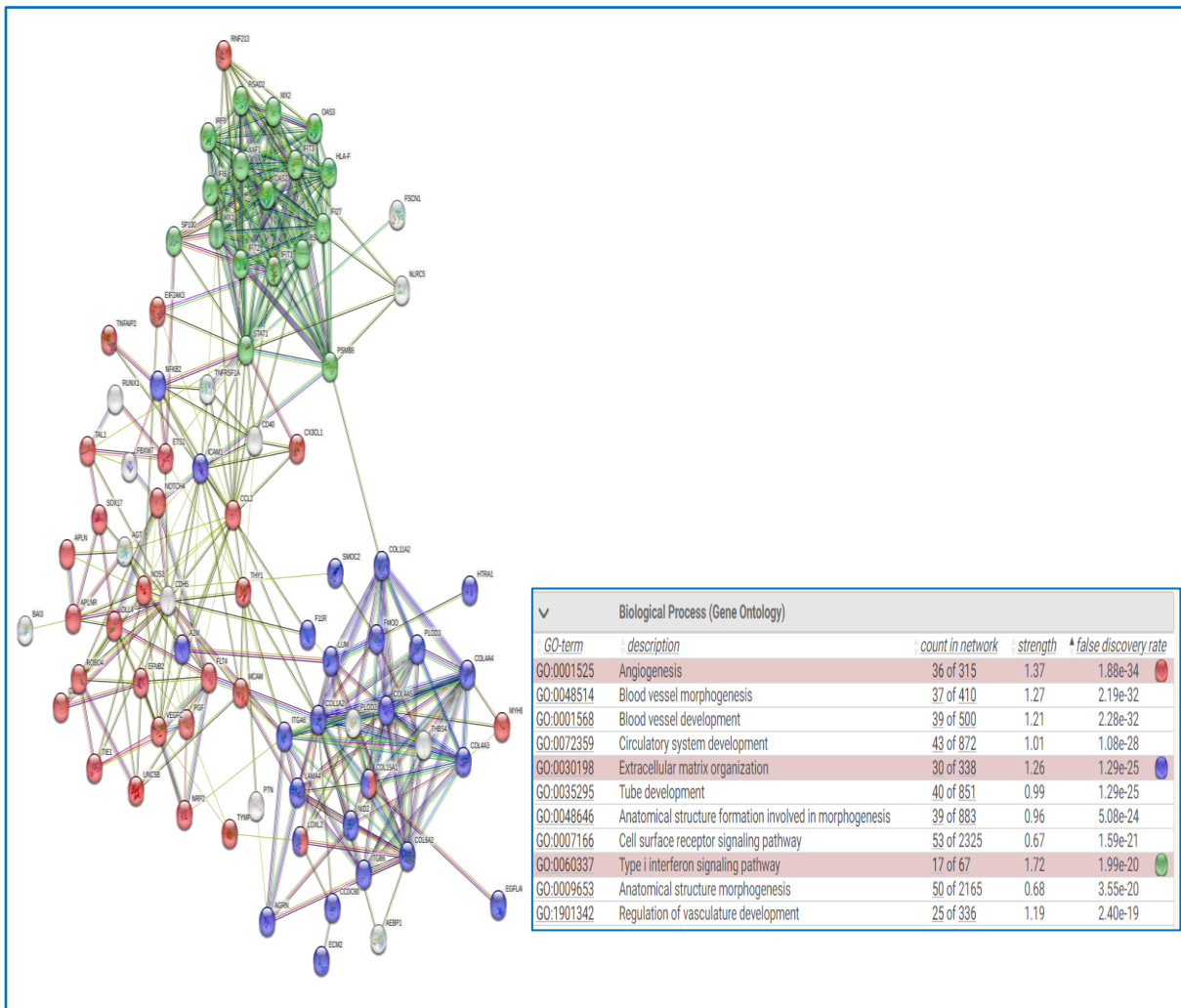
**Figura 9 -** Heatmap com os genes hiperexpressos envolvidos nos principais processos biológicos distribuídos por grupos



*/*: valor de p significativo para a comparação entre controles e roncadores/apneicos leves; *\**: valor de p significativo para a comparação entre controles e apneicos graves; *-*: valor de p significativo para a comparação entre roncadores e apneicos graves.

Os 95 genes também foram avaliados pelo banco de dados *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes (STRING)*, que organiza e disponibiliza dados de interação e associações diretas (físicas) e indiretas (funcionais) entre os genes (SZKLARCZYK *et al.*, 2015). Vide figura 10.

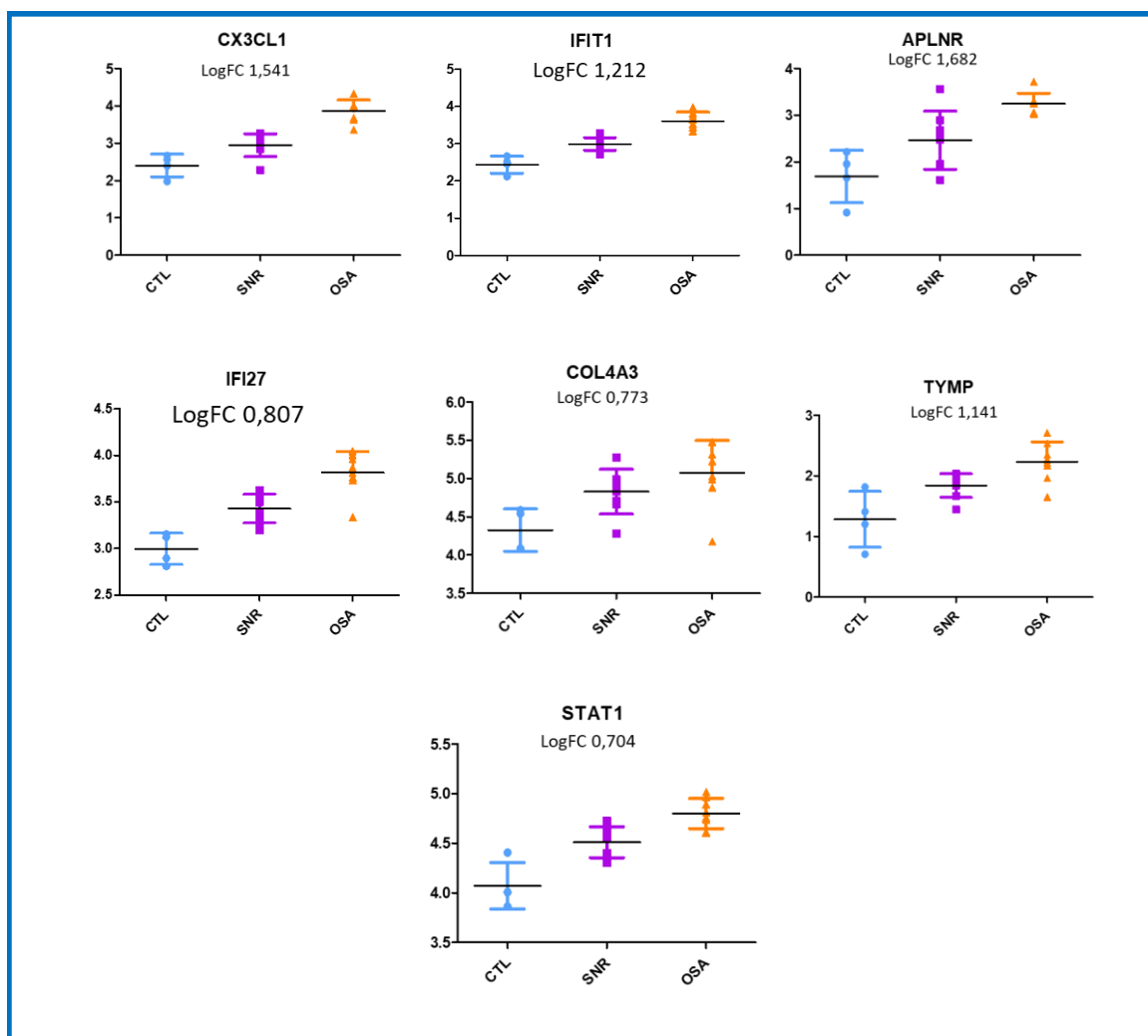
**Figura 10** - STRING dos genes hiperexpressos em apneicos em relação aos controles



*Biological process: processo biológico; GO-term: termo de geneontologia; description: descrição; count in network: quantidade na rede; strength: força; false discovery rate: taxa de descoberta falsa. Em vermelho: angiogênese; em azul: organização da matriz extracelular; em verde: via de sinalização interferon tipo I.*

34 dos 95 GDE evidenciaram um valor de  $p$  significativo na comparação de CTRL com AOS e também ao compararmos RONC com AOS. Desses, 10 genes também apresentam  $p$  valor significativo na comparação de CTRL com RONC. Os GDE hiperexpressos e com valor de  $p$  significativo em todas as comparações também foram plotados em gráficos tipo *boxplot* incluindo o grupo de RONC a fim de facilitar a visualização de uma possível progressão da doença também se manifestando na expressão gênica entre esses grupos. Alguns dos genes plotados em *boxplot* estão demonstrados na figura 11.

**Figura 11** - Gráficos tipo *boxplot* de genes hiperexpressos cujo valor de  $p$  é significativo para a comparação entre todos os grupos: controles, roncoadores e apneicos



CTL: grupo de controles; SNR: grupo de roncoadores e apneicos leves; OSA: grupo de apneicos graves.

### 5.2.1 A atuação dos GDE hiperexpressos na AOS:

#### *Respostas Inflamatórias e Imunológicas*

*CX3CL1* (ligante 1 de quimiocina) ou também conhecida como fractalquina <sup>(130,131)</sup>, e *CCL2* (quimiocina da família CC ligante 2) <sup>(131,132)</sup> estão envolvidos na atração de células imunes e na resposta ao estresse. A hiperexpressão desses genes pode afetar a resposta inflamatória e a vascularização nos músculos faríngeos. *STAT1*(transdutor de sinal e ativador da transcrição 1) <sup>(133)</sup>, *IFIT3* (proteína induzida por interferon com repetições tetratricopeptídeo 3) <sup>(134)</sup>, *IFIT2* proteína induzida por interferon com repetições tetratricopeptídeo 2) <sup>(134)</sup>, *IFIT1* proteína induzida por interferon com repetições tetratricopeptídeo 1) <sup>(134)</sup>, *OAS3* (2'-5'-oligoadenilato sintetase 3) <sup>(135)</sup>, *IFI6* (proteína induzível por interferon alfa 6) <sup>(136)</sup>, *IFI27* (proteína induzível por interferon alfa 27) <sup>(136)</sup>, *RSAD2* (domínio radical S-adenosil metionina contendo 2) <sup>(137)</sup>, *HLA-F* (complexo principal de histocompatibilidade, classe I, F) <sup>(138)</sup>, *MX1* (dinamina MX como GTPase 1) <sup>(135)</sup>, *MX2* (dinamina MX como GTPase 2) <sup>(135)</sup>: Estes genes desempenham papéis na resposta imune e na defesa antiviral. A regulação positiva pode significar uma reação imune aumentada, possivelmente desencadeada por inflamação e/ou hipóxia. Embora benéfica no combate a patógenos, a ativação imune sustentada pode contribuir para danos nos tecidos e dificultar a reparação.

*NFKB2* (fator nuclear kappa subunidade B 2): O gene *NFKB2* codifica uma subunidade do fator de transcrição NF-κB, que desempenha um papel central na regulação da resposta inflamatória <sup>(139,140)</sup>. No contexto da AOS, a ativação do NF-κB pode ocorrer devido ao estresse oxidativo, inflamação crônica e hipóxia intermitente associada à doença. A ativação do NF-κB pode levar à transcrição de genes pró-inflamatórios e pró-fibróticos, contribuindo para a progressão da inflamação crônica e fibrose no músculo faríngeo.

### *Angiogênese e Regulação do Fluxo Sanguíneo*

*VEGFC* (fator de crescimento endotelial vascular C) <sup>(141,142)</sup>, *NOS3* (óxido nítrico sintase 3 <sup>(143,144)</sup>, *AGT* (angiotensinogênio) <sup>(145)</sup>: Esses genes promovem a angiogênese e influenciam a regulação do fluxo sanguíneo. Na presença de inflamação e hipóxia intermitente, a angiogênese anormal pode ocorrer, afetando o suprimento de oxigênio aos músculos e dificultando os processos de reparação.

*CDH5* (caderina) codifica uma proteína crucial para a adesão celular e a integridade tecidual. Sua regulação positiva pode ser uma resposta adaptativa para contrariar a lesão muscular e apoiar a coesão tecidual durante o aumento da demanda muscular no contexto de hipóxia intermitente, injúria e reparo tecidual <sup>(146)</sup>.

### *Regulação do Tônus Muscular*

*APLN* (apelina) e *APLNR* (receptor da apelina) podem influenciar o tônus muscular e a contração <sup>(147–150)</sup>. A expressão de apelina tem sido demonstrada na indução de angiogênese nos músculos esqueléticos, especialmente em contextos de hipóxia. Sua atividade vasodilatadora é dependente do óxido nítrico. Além disso, tem um papel potencial no metabolismo energético relacionado à hipóxia intermitente, levando a uma tolerância à glicose aprimorada e melhor desempenho no exercício. Quando regulados positivamente, esses genes podem indicar uma resposta adaptativa, possivelmente tentando manter o tônus muscular diante de lesões e inflamação.

### *Remodelamento da Matriz Extracelular e Reparo Tecidual*

*LOXL2* (lisil oxidase tipo 2) <sup>(151,152)</sup>, *COL4A3* (cadeia alfa 3 de colágeno tipo IV), *COL4A4* (cadeia alfa 4 de colágeno tipo IV) e *COL15A1* (cadeia alfa 1 de colágeno tipo XV) <sup>(153–155)</sup> *COL11A2* (cadeia alfa 2 de colágeno tipo XI) <sup>(156)</sup> modulam a matriz extracelular. Juntamente com a inflamação mediada por outros genes, essa regulação positiva pode levar a uma remodelagem anormal

da MEC dos músculos faríngeos, aumentando a deposição de colágeno entre as fibras musculares e resultando em fibrose que contribui para a rigidez tecidual e flexibilidade muscular prejudicada.

#### *Dinâmica do Citoesqueleto e Função Muscular*

*TYMP* (timidina fosforilase) codifica uma enzima envolvida no metabolismo das pirimidinas e na angiogênese <sup>(157,158)</sup>. No contexto da AOS, a expressão aumentada de *TYMP* pode estar relacionada à tentativa do organismo de compensar a hipóxia intermitente induzida pela apneia, promovendo a angiogênese como parte da resposta adaptativa dos tecidos à redução intermitente do suprimento de oxigênio.

*TMEM100* (proteína transmembrana 100) é um gene que codifica uma proteína de membrana pouco conhecida <sup>(159,160)</sup>. Sua função específica ainda não foi totalmente elucidada, porém, em um contexto de inflamação crônica e adaptação tecidual na AOS, pode estar envolvido na modulação de vias de sinalização celular relacionadas à resposta inflamatória e à remodelação tecidual.

*CEMIP2* (migração celular induzindo hialuronidase 2), também conhecido como *TMEM2*, é um gene que codifica uma enzima que pode estar envolvida na degradação do ácido hialurônico e na regulação da migração celular <sup>(161,162)</sup>. No contexto da AOS, a expressão aumentada de *CEMIP2* pode estar relacionada à remodelação tecidual, incluindo fibrose e alterações na composição da matriz extracelular, como parte da resposta adaptativa do músculo faríngeo à inflamação crônica e ao estresse mecânico associado à obstrução intermitente das vias aéreas durante o sono.

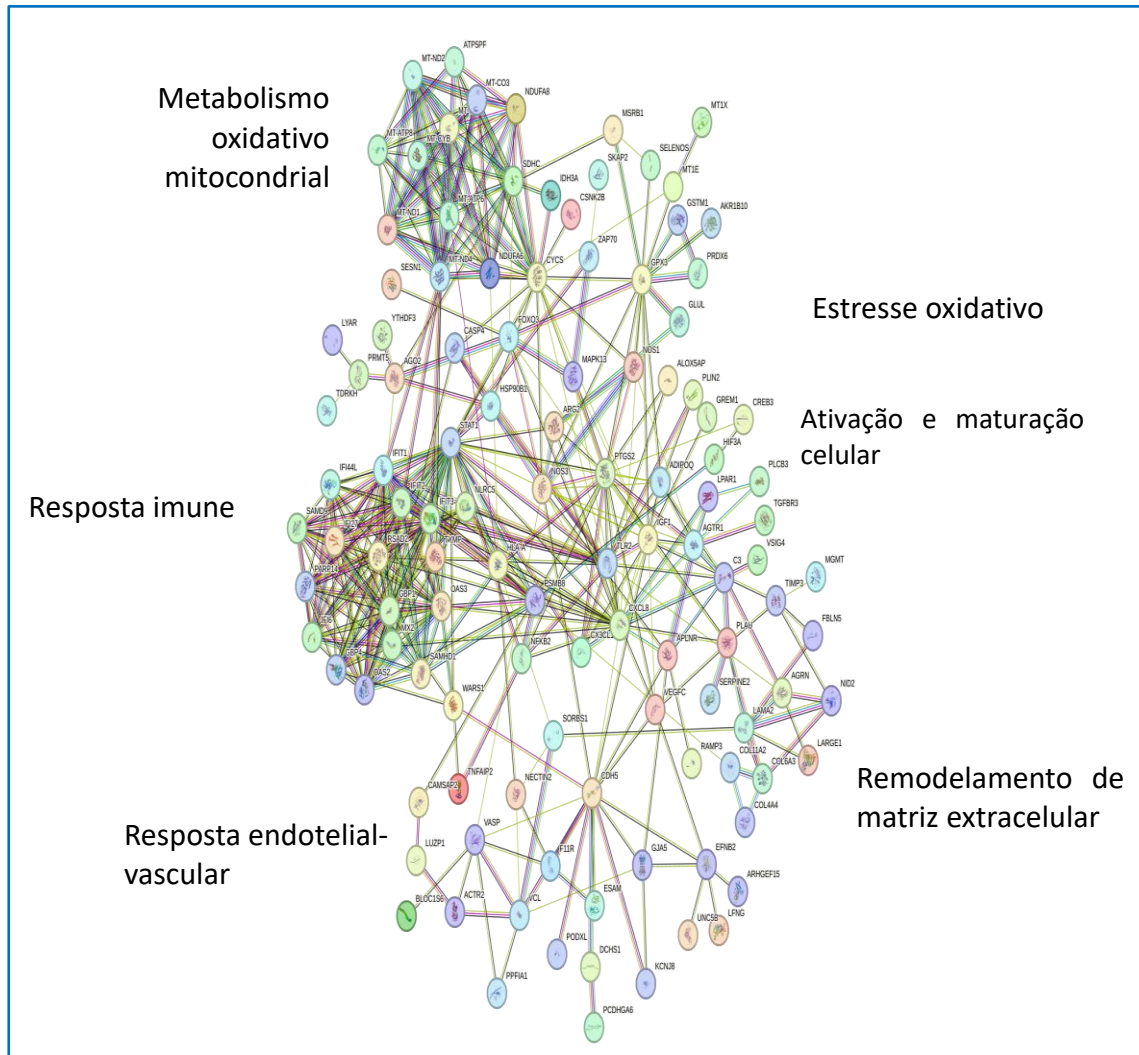


**Tabela 5** – Resumo dos principais GDE na comparação entre AOS e CTRL e seus processos biológicos relacionados

<b>Genes diferencialmente expressos na comparação entre apneicos e controles e suas funções relacionadas</b>			
<b>Gene ID</b>	<b>Gene Nome</b>	<b>logFC</b>	<b>Função relacionada</b>
<b>Hipoexpressos</b>			
<i>AKR1B10</i>	aldo-ceto redutase família 1 membro B10	-2,05488	
<i>CYP4B1</i>	citocromo P450 família 4 subfamília B membro 1	-1,776542	
<i>AOX1</i>	aldeído oxidase 1	-1,362068	Metabolismo e
<i>FADS1</i>	desaturase de ácidos graxos 1	-1,574431	Resposta ao Estresse
<i>IDH3A</i>	isocitrato desidrogenase (NAD(+)) 3 subunidade catalítica alfa	-0,86878	Oxidativo
<i>GPX3</i>	glutaciona peroxidase 3	-0,867166	
<i>IGF1</i>	fator de crescimento semelhante à insulina 1	-1,118728	
<i>EGLN1</i>	fator de indução de hipóxia da família EGL-9 1	-0,990493	
<i>PTGS2</i>	prostaglandina-endoperóxido sintase 2, ou COX-2	-1,388345	Controle da
<i>NOS1</i>	óxido nítrico sintase 1	-0,737855	Inflamação e
<i>FOS</i>	proto-oncogene Fos, subunidade do fator de transcrição AP-1	-1,101676	Resposta Imune
<i>MAOA</i>	monoamina oxidase A	-1,099283	
<i>PLIN5</i>	perilipina 5	-1,345029	
<i>PDLIM5</i>	domínio PDZ e LIM 5	-0,940059	
<i>CRYAB</i>	alfa-b cristalina	-1,000858	
<i>LAMA2</i>	subunidade alfa 2 da laminina	-0,969385	
<i>ACTC1</i>	actina, alfa, músculo cardíaco 1	-1,296959	
<i>MYLPF</i>	cadeia leve de miosina, fosforilável, músculo esquelético rápido	-0,751182	Integridade Muscular,
<i>ACTN2</i>	actinina alfa 2	-0,564271	Contratilidade e
<i>LDB3</i>	domínio de ligação LIM 3	-0,933938	Regulação do Tônus
<i>MYOM1</i>	miomesina 1	-0,58984	
<i>MYOM2</i>	miomesina 2	-0,628622	
<i>SORBS1</i>	domínio sorbina e SH3 contendo 1	-0,807621	
<i>SPEG</i>	proteína quinase expressa preferencialmente em músculo estriado	-0,514485	
<b>Hiperexpressos</b>			
<i>CX3CL1</i>	ligante 1 de quimiocina ou fractalquina	1,541361	
<i>CCL2</i>	quimiocina da família CC ligante 2	1,459797	
<i>STAT1</i>	transdutor de sinal e ativador da transcrição 1	0,704803	
<i>IFIT3</i>	proteína induzida por interferon com repetições tetratricopeptídeo 3	1,34583	
<i>IFIT2</i>	proteína induzida por interferon com repetições tetratricopeptídeo 2	1,310318	
<i>IFIT1</i>	proteína induzida por interferon com repetições tetratricopeptídeo 1	1,21181	
<i>OAS3</i>	2'-5'-oligoadenilato sintetase 3	1,098874	Resposta Imune e
<i>IFI6</i>	proteína induzível por interferon alfa 6	1,06454	Inflamatória
<i>IFI27</i>	proteína induzível por interferon alfa 27	0,807393	
<i>RSAD2</i>	domínio radical S-adenosil metionina contendo 2	1,057357	
<i>HLA-F</i>	complexo principal de histocompatibilidade, classe I, F	0,977402	
<i>NFKB2</i>	fator nuclear kappa subunidade B 2	1,364451	
<i>MX1</i>	Dinamina MX como GTPase 1	0,797584	
<i>MX2</i>	Dinamina MX como GTPase 2	0,712393	
<i>VEGFC</i>	fator de crescimento endotelial vascular C	1,155176	
<i>NOS3</i>	óxido nítrico sintase 3	1,014923	Angiogênese e
<i>AGT</i>	angiotensinogênio	1,007036	Regulação do Fluxo
<i>CDH5</i>	caderina 5	0,895039	Sanguíneo
<i>APLN</i>	apelina	2,752288	
<i>APLNR</i>	receptor da apelina	1,68178	
<i>LOXL2</i>	lisil oxidase tipo 2	1,299819	
<i>COL4A3</i>	cadeia alfa 3 de colágeno tipo IV	0,773088	
<i>COL4A4</i>	cadeia alfa 4 de colágeno tipo IV	0,772979	
<i>COL15A1</i>	cadeia alfa 1 de colágeno tipo XV	0,770669	Remodelamento da
<i>COL11A2</i>	cadeia alfa 2 de colágeno tipo XI	1,227306	Matriz Extracelular e
<i>TYMP</i>	timidina fosforilase	1,130873	Fibrose
<i>TMEM100</i>	proteína transmembrana 100	0,774314	
<i>CEMIP2</i>	migração celular induzindo hialuronidase 2	0,566551	

*GDE: genes diferencialmente expressos; AOS: grupo de apneicos graves; CTRL: grupo de controles.*

**Figura 12** – STRING de todos os principais GDE na comparação entre AOS e CTRL e os respectivos processos biológicos relacionados



*GDE: genes diferencialmente expressos; AOS: grupo de apneicos graves; CTRL: grupo de controles.*

A tabela 5 apresenta os principais genes hiper e hipoexpressos que foram mencionados e seus processos biológicos relacionados de forma resumida, enquanto a figura 12 reúne esses genes em uma rede que ilustra a forma como se interconectam de acordo com suas funções relacionadas.

## **DISCUSSÃO**

---

---

## 6 DISCUSSÃO

No presente estudo, analisamos o perfil de expressão gênica dos músculos da parede lateral da faringe de pacientes com AOS e o comparamos com o de pacientes sem histórico de ronco e com IAH<5/h para a análise dos GDE, com o auxílio de ferramentas de bioinformática.

Após compararmos a expressão gênica nos músculos da parede lateral da orofaringe em indivíduos com AOS grave em relação aos controles, identificamos 660 genes que estavam claramente hiperexpressos e 385 que estavam hipoexpressos. As análises de bioinformática mostraram que os GDE estão relacionados a diversos processos biológicos, dentre eles destacam-se: angiogênese, organização da matriz extracelular e via de sinalização interferon tipo I, no caso dos hiperexpressos; e: processo de oxido-redução e desenvolvimento de estrutura muscular, no caso dos hipoexpressos. Correlacionamos esses processos com os mecanismos envolvidos na fisiopatologia e com as repercussões teciduais e sistêmicas da AOS.

Nossa análise considera a demanda aumentada e a injúria muscular decorrente do estresse mecânico causado tanto pelo “*overtraining*” como pelos colapsos recorrentes e sugere que os indivíduos apneicos apresentam expressão aumentada de genes envolvidos na resposta inflamatórias e imune, angiogênese, remodelação e reparo tecidual e regulação do tônus muscular, ao mesmo tempo que apresentam expressão suprimida de genes envolvidos com a estrutura, integridade e estabilidade das fibras musculares e a contração muscular, e com o metabolismo energético e o controle da inflamação crônica.

A fisiopatologia da AOS ainda não é totalmente bem compreendida. É uma condição humana única caracterizada por uma faringe alongada, com menos tecidos rígidos de sustentação em comparação com outras espécies, resultando em susceptibilidade a colapsos com pressão intrafaríngea negativa durante a inspiração. A AOS é multifatorial e tem a idade e obesidade como

grandes fatores de risco e preditores, características comuns em humanos que experimentam um aumento progressivo na longevidade, sugerindo um processo degenerativo das vias aéreas <sup>(163,164)</sup>.

No entanto, idade e obesidade sozinhas não explicam todos os casos, pois há jovens sem obesidade que apresentam maior predisposição para desenvolver a doença. Neste estudo, excluímos indivíduos idosos e classificados como obesos para investigar alterações genéticas que possam predispor os indivíduos à AOS sem a interferência desses fatores. Além disso, exploramos a expressão gênica nos músculos faríngeos, tecido diretamente envolvido na gênese da AOS <sup>(35)</sup>, com o objetivo de identificar alterações que possam justificar a falha de sua atividade contrátil e suporte faríngeo.

Na AOS, há vibração e colapso da parede lateral da faringe apesar da hiperatividade muscular tentando garantir a permeabilidade das vias aéreas <sup>(46)</sup>. No entanto, assim como todos os tecidos do corpo, os músculos faríngeos também sofrem consequências sistêmicas da AOS, estando expostos a condições como hipóxia intermitente <sup>(165)</sup>, que pode alterar sua estrutura e capacidade contrátil.

No contexto da AOS, onde os músculos faríngeos experimentam aumento da demanda <sup>(46)</sup> e potenciais consequências do trauma repetido em decorrência do ronco e dos colapsos <sup>(61)</sup>, inflamação <sup>(58,61)</sup> e reparo tecidual <sup>(60,62,63)</sup>. Enquanto algumas respostas podem ser adaptativas e podem representar um esforço para manter a contratilidade e função muscular, a ativação sustentada ou excessiva dessas vias pode contribuir para a patologia da AOS, potencialmente levando a mais injúria do tecido, inflamação crônica, reparo tecidual prejudicado e comprometimento da função e integridade muscular. Compreender essas interações é crucial para desenvolver abordagens terapêuticas direcionadas para mitigar os efeitos adversos da AOS nos músculos faríngeos.

As respostas adaptativas da musculatura frente aos colapsos e a demanda aumentada podem incluir alterações do tipo de fibras e alteração da massa muscular na tentativa de equilibrar a sua eficiência (atividade muscular/consumo energético). Porém, essa musculatura apresenta aumento de

sua atividade na ausência de período de descanso para permitir um processo restaurativo normal, visto que sua necessidade de se manter ativa é constante para a manutenção da respiração tanto durante o dia quanto durante a noite. Dessa forma, é possível propor um modelo que explica o ciclo da AOS baseado na miopatia dessa região, onde há uma faringe previamente alterada anatomicamente com maior estreitamento e colapsabilidade, levando a uma necessidade aumentada da atividade da musculatura no local, com ativação de respostas adaptativas que, quando ativadas de forma crônica, resultam em injúria muscular com miofibrilas disfuncionais, edema, fibrose e aumento do diâmetro da musculatura reduzindo ainda mais a patência da via aérea e contribuindo para o caráter progressivo da doença <sup>(52)</sup>.

**Figura 13** - Modelo proposto do ciclo da fisiopatologia da AOS baseado na miopatia da musculatura da faringe de acordo com os achados genômicos e histopatológicos



AOS: apneia obstrutiva do sono; VAS: via aérea superior.

Nossos achados indicam que a miopatia é um mecanismo subjacente importante na fisiopatologia da AOS, apesar da controvérsia em torno desse tópico na literatura <sup>(166,167)</sup>. Os achados histológicos já descritos que demonstram a presença de atrofia <sup>(54,55,168)</sup>, apoptose <sup>(48)</sup>, desarranjo de fibras <sup>(48,55,168)</sup>, redução da proporção de fibras lentas (mais resistentes à fadiga) <sup>(48,49)</sup>, menor área e diâmetro de fibras com aumento do tecido conjuntivo <sup>(48,168)</sup> e hiperplasia de colágeno nessa musculatura <sup>(48,62,63)</sup> associados aos achados de genes relacionados à contração muscular e à manutenção da estabilidade e integridade das miofibrilas bem como às alterações relacionadas ao estresse oxidativo e ao metabolismo energético sustentam a ideia de um prejuízo da performance dessa musculatura decorrente de miopatia, com possível causa genética.

Dessa forma, torna-se interessante aventar a possibilidade de desenvolvimento de novos alvos terapêuticos para interromper o ciclo a fim de evitar o agravamento da doença antes da deterioração da musculatura de modo a interromper o processo de inflamação, fibrose e deterioração da função muscular.

A elevada suscetibilidade ao dano tecidual e à injúria muscular, evidenciada pelo perfil de expressão gênica, pode ser considerada um fator crucial para o desenvolvimento da doença, porém principalmente para sua progressão, possivelmente contribuindo para a evolução para formas mais graves da condição ao longo do tempo. Ao incluirmos o grupo de roncoadores, foi possível perceber visualmente, com auxílio de *heatmaps*, e gráficos tipo *boxplot* que a análise de expressão gênica também corrobora para a hipótese de evolução gradual da doença <sup>(56)</sup> com GDE se comportando de forma distinta e gradual entre os grupos desde os controles passando por roncoadores e apneicos leves aos apneicos severos.

O tamanho da amostra é um fator limitante de nosso estudo, todavia, estudos que envolvem sequenciamento de RNA em larga escala são complexos e têm custo elevado, inviabilizando muitas vezes uma amostra mais significativa. Apesar disso, nosso estudo é pioneiro no sequenciamento do tecido escolhido e foi possível validar nossos achados e sua plausibilidade biológica ao

correlacionarmos com as alterações histológicas já bem descritas na literatura. Além disso, as análises de enriquecimento foram realizadas em bases de dados e plataformas de bioinformática distintas, encontrando resultados compatíveis em ambas.

Um ponto importante a ser mencionado é o fato de termos utilizado dois músculos distintos nas amostras. Observamos que não havia diferença estatística ao compararmos os dois músculos dentro do mesmo grupo e as diferenças estatísticas na comparação entre AOS e CTRL se mantinham para os dois músculos. Dessa forma, pudemos concluir que as diferenças de expressão nos genes considerados não são estatisticamente significativas entre os músculos palatofaríngeo e constritor superior da faringe, principalmente na análise entre AOS e CTRL, o que nos permitiu fazer a análise juntando as amostras dos tipos musculares e aumentando, portanto, o poder estatístico das análises.

Outra questão a ser considerada é a dificuldade de dividir os pacientes apneicos em fenótipos ou endótipos mais homogêneos além do IAH e de informações demográficas e polissonográficas. Ao evoluirmos em meios diagnósticos, será possível melhor caracterizar cada grupo distinto de pacientes que manifestam a doença e otimizar os achados de estudos genômicos com estudos mais robustos.

Um ponto relevante de nosso estudo foi a realização das análises de expressão gênica utilizando um tecido pouco explorado, por seu acesso dificultado pela necessidade de procedimentos invasivos, porém diretamente relacionado à ocorrência dos colapsos e, portanto, da fisiopatologia da AOS e se destacando de estudos prévios que avaliaram genes candidatos em tecidos mais periféricos em busca de possíveis biomarcadores.

É importante notar que essa explicação é baseada nas funções biológicas já conhecidas dos genes citados. No entanto, a AOS é uma condição complexa multifatorial e mais pesquisas são necessárias para delinear precisamente os mecanismos intrincados subjacentes a esses processos e seu impacto na disfunção muscular faríngea relacionada à AOS no contexto de suas bases



fisiopatológicas. Mais pesquisas são necessárias para elucidar os mecanismos e vias específicos através dos quais esses genes interagem e influenciam a resposta muscular em pacientes com AOS.

## **CONCLUSÕES**

---

---

## 7 CONCLUSÕES

A musculatura da parede lateral da faringe apresenta diversos genes sendo diferencialmente expressos ao compararmos apneicos com controles, com plausibilidade biológica que justifique seu envolvimento na fisiopatologia da doença.

Genes relacionados a contratilidade muscular estão alterados em apneicos, com genes hiperexpressos relacionados a respostas adaptativas e compensatórias e genes hipoexpressos relacionados às vias de contração muscular.

Genes relacionados a inflamação estão hiperexpressos nos apneicos.

Genes relacionados à resposta ao dano e reparo tecidual encontram-se hipoexpressos nos apneicos, envolvendo funções de proteção contra estresse oxidativo e vias de reparo e manutenção da integridade dessa musculatura.

## **REFERÊNCIAS**

---

---

## REFERÊNCIAS

1. Guilleminault C. Obstructive sleep apnea. The clinical syndrome and historical perspective. *Med Clin North Am.* 1985;69(6):1187-203.
2. 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.
3. Benjafield AV, Ayas NT, Eastwood PR, Heinzer R, Ip MSM, Morrell MJ, Nunez CM, Patel SR, Penzel T, Pépin JL, Peppard PE, Sinha S, Tufik S, Valentine K, Malhotra A. Estimation of the global prevalence and burden of obstructive sleep apnoea: a literature-based analysis. *Lancet Respir Med.* 2019;7(8):687-98.
4. Jordan AS, McEvoy RD. Gender differences in sleep apnea: Epidemiology, clinical presentation and pathogenic mechanisms. *Sleep Med Rev.* 2003;7(5):377-89.
5. Malhotra A, Huang Y, Fogel RB, Pillar G, Edwards JK, Kikinis R, Loring SH, White DP. The male predisposition to pharyngeal collapse: Importance of airway length. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166(10):1388-95.
6. American Academy of Sleep Medicine. International Classification of Sleep Disorders (ICSD-3). Third Ed. Darien - IL, USA, AASM; 2014.
7. American Academy of Sleep Medicine. International Classification of Sleep Disorders. - Third Edition, Text Revision (ICSD-3-TR). Darien - IL, USA, AASM; 2023.

8. Svanborg E, Larsson H. Natural evolution of obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep*. 1993;16(suppl\_8):S124-5.
9. Sforza E, Addati G, Cirignotta F, Lugaresi E. Natural evolution of sleep apnoea syndrome: A five year longitudinal study. *Eur Respir J*. 1994;7(10):1765-70.
10. Jennum P, Kjellberg J. Health, social and economical consequences of sleep-disordered breathing: A controlled national study. *Thorax*. 2011;66(7):560-6.
11. Walia HK. Beyond heart health: Consequences of obstructive sleep apnea. *Cleve Clin J Med*. 2019;86(9 Suppl 1):19-25.
12. Phillipson EA. Sleep apnea -- a major public health problem. *N Engl J Med*. 1993;328(17):1271-3.
13. Bradley TD, Floras JS. Obstructive sleep apnoea and its cardiovascular consequences. *Lancet*. 2009;373(9657):82-93.
14. Guilleminault C, Tilkian A, Dement WC. The sleep apnea syndromes. *Annu Rev Med*. 1976;27:465-84.
15. Strohl KP, Butler JP, Malhotra A. Mechanical properties of the upper airway. *Compr Physiol*. 2012;2(3):1853-72.
16. Eckert DJ, White DP, Jordan AS, Malhotra A, Wellman A. Defining phenotypic causes of obstructive sleep apnea: Identification of novel therapeutic targets. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188(8):996-1004.
17. Redline S, Tosteson T, Tishler PV, Carskadon MA, Milliman RP. Studies in the genetics of obstructive sleep apnea: Familial aggregation of symptoms

associated with sleep-related breathing disturbances. *Am Rev Respir Dis.* 1992;145(2 pt 1):440-4.

18. Strohl KP, Saunders NA, Feldman NT, Hallett M. Obstructive Sleep Apnea in Family Members. *N Engl J Med.* 1978;299(18):969-73.

19. Palmer LJ, Redline S. Genomic approaches to understanding obstructive sleep apnea. *Respir Physiol Neurobiol.* 2003;135(2–3):187–205.

20. Tanizawa K, Chin K. Genetic factors in sleep-disordered breathing. *Respir Investig.* 2018;56(2):111-9.

21. Arnardottir ES, Mackiewicz M, Gislason T, Teff KL, Pack AI. Molecular signatures of obstructive sleep apnea in adults: A review and perspective. *Sleep.* 2009;32(4):447–70.

22. Liu PY, O’Byrne NA. Adipose tissue transcriptomes in obstructive sleep apnea: Location matters. *Sleep.* 2020;43(6):zsaa059.

23. Christensson E, Mkrtchian S, Ebberyd A, Österlund Modalen Å, Franklin KA, Eriksson LI, Jonsson Fagerlund M. Whole blood gene expression signature in patients with obstructive sleep apnea and effect of continuous positive airway pressure treatment. *Respir Physiol Neurobiol.* 2021;294:103746.

24. Conte L, Greco M, Toraldo DM, Arigliani M, Maffia M, De Benedetto M. A review of the “OMICS” for management of patients with obstructive sleep apnoea. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2020;40(3):164-72.

25. Bencharit S, Redenz RG, Brody ER, Chiang H. Salivary biomarkers associated with obstructive sleep apnea: a systematic review. *Expert Rev Mol Diagn.* 2021;21(2):223-33.

26. Song CM, Lee CH, Rhee CS, Min YG, Kim JW. Analysis of genetic expression in the soft palate of patients with obstructive sleep apnea. *Acta Otolaryngol.* 2012;132(Suppl. 1):S63-8.
27. Hou J, Zhao L, Yan J, Ren X, Zhu K, Gao T, Du X, Luo H, Li Z, Xu M. MicroRNA expression profile is altered in the upper airway skeletal muscle tissue of patients with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *J Int Med Res.* 2019;47(9)4163-82.
28. Chen HH, Lu J, Guan YF, Li SJ, Hu TT, Xie ZS, Wang F, Peng XH, Liu X, Xu X, Zhao FP, Yu BL, Li XP. Estrogen/ERR- $\alpha$  signaling axis is associated with fiber-type conversion of upper airway muscles in patients with obstructive sleep apnea hypopnea syndrome. *Sci Rep.* 2016;6(Jun):27088.
29. Isono S, Remmers JE, Tanaka A, Sho Y, Sato J, Nishino T. Anatomy of pharynx in patients with obstructive sleep apnea and in normal subjects. *J Appl Physiol.* 1997;82(4):1319-26.
30. Stauffer JL, Zwillich CW, Cadieux RJ, Bixler EO, Kales A, Varano LA, White DP. Pharyngeal size and resistance in obstructive sleep apnea. *Am Rev Respir Dis.* 1987;136(3):623-7.
31. Cahali MB. Lateral pharyngoplasty: a new treatment for obstructive sleep apnea hypopnea syndrome. *Laryngoscope.* 2003;113(11):1961-8.
32. Schwab RJ, Geftter WB, Pack AI, Hoffman EA. Dynamic imaging of the upper airway during respiration in normal subjects. *J Appl Physiol.* 1993;74(4):1504-14.
33. Schwab RJ, Gupta KB, Geftter WB, Metzger LJ, Hoffman EA, Pack AI. Upper airway and soft tissue anatomy in normal subjects and patients with sleep-disordered breathing. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;152(25):1673-89.



34. Remmers JE, deGroot WJ, Sauerland EK, Anch AM. Pathogenesis of upper airway occlusion during sleep. *J Appl Physiol.* 2017;44(6):931-8.
35. Schellenberg JB, Maislin G, Schwab RJ. Physical findings and the risk for obstructive sleep apnea: The importance of oropharyngeal structures. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(2 Pt 1):740-8.
36. Veasey SC. Molecular and physiologic basis of obstructive sleep apnea. *Clin Chest Med.* 2003;24(2):179-93.
37. Davidson TM. The great leap forward: The anatomic basis for the acquisition of speech and obstructive sleep apnea. *Sleep Med.* 2003;4(3):185-94.
38. Schwab RJ, Geffter WB, Hoffman EA, Gupta KB, Pack AI. Dynamic upper airway imaging during awake respiration in normal subjects and patients with sleep disordered breathing. *Am Rev Respir Dis.* 1993;148(5):1385-400.
39. Rodenstein DO, Doms G, Thomas Y, Liistro G, Stanescu DC, Culee C, Aubert-Tulkens G. Pharyngeal shape and dimensions in healthy subjects, snorers, and patients with obstructive sleep apnoea. *Thorax.* 1990;45(10):722-7.
40. Eckert DJ. Phenotypic approaches to obstructive sleep apnoea – New pathways for targeted therapy. *Sleep Med Rev.* 2018;37:45-59.
41. Ryan CM, Bradley TD. Pathogenesis of obstructive sleep apnea. *J Appl Physiol.* 2005;99(6):2440-50.
42. Edwards BA, White DP. Control of the pharyngeal musculature during wakefulness and sleep: Implications in normal controls and sleep apnea. *Head Neck.* 2011;33(Suppl. 1):1-17.

43. Svanborg E. Impact of obstructive apnea syndrome on upper airway respiratory muscles. *Respir Physiol Neurobiol.* 2005;147(2-3 Spec. ISS.):263-72.
44. Pilarski JQ, Leiter JC, Fregosi RF. Muscles of breathing: Development, function, and patterns of activation. *Compr Physiol.* 2019;9(3):1025-80.
45. Kairaitis K. Is the pharynx a muscular hydrostat? *Med Hypotheses.* 2010;74(3):590-5.
46. Mezzanotte WS, Tangel DJ, White DP. Influence of sleep onset on upper-airway muscle activity in apnea patients versus normal controls. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;153(6 Pt 1):1880-7.
47. Cahali MB, Formigoni GGS, Gebrim EMMS, Miziara ID. Lateral pharyngoplasty versus uvulopalatopharyngoplasty: A clinical, polysomnographic and computed tomography measurement comparison. *Sleep.* 2004;27(5):942-50.
48. Dong J, Niu X, Chen X. Injury and apoptosis in the palatopharyngeal muscle in patients with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *Med Sci Monit.* 2020;26:e919501.
49. Smirne S, Iannaccone S, Ferini-Strambi L, Comola M, Colombo E, Nemni R. Muscle fibre type and habitual snoring. *Lancet.* 1991;337(8741):597-9.
50. Cotter M, Phillips P. Rapid fast to slow fiber transformation in response to chronic stimulation of immobilized muscles of the rabbit. *Exp Neurol.* 1986;93(3):531-45.
51. Shi S, Xia Y, Chen S, Li M, Chen D, Liu F, Zheng H. The relationship between structural / MHC changes in upper airway palatopharyngeal muscle morphology and obstructive sleep apnea / hypopnea syndrome. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2014;271(1):109-16.

52. Petrof BJ, Hendricks JC, Pack AI. Does upper airway muscle injury trigger a vicious cycle in obstructive sleep apnea? A hypothesis. *Sleep*. 1996;19(6):465-71.
53. Stauffer JL, Buick MK, Bixler EO, Sharkey FE, Abt AB, Manders EK, Kales A, Cadieux RJ, Barry JD, Zwillich CW. Morphology of the uvula in obstructive sleep apnea. *Am Rev Respir Dis*. 1989;140(3 Pt 1):724-8.
54. Woodson BT, Toohill RJ, Garancis JC. Histopathologic changes in snoring and obstructive sleep apnea syndrome. *Laryngoscope*. 1991;101(12):1318-22.
55. Edstrom L, Larsson H, Larsson L. Neurogenic effects on the palatopharyngeal muscle in patients with obstructive sleep apnoea: a muscle biopsy study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1992;55(10):916-20.
56. Friberg D, Ansved T, Borg K, Carlsson-Norlander B, Larsson H, Svanborg E. Histological indications of a progressive snorers disease in an upper airway muscle. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(2):586-93.
57. Sériès F, Simoneau JA, St. Pierre S, Marc I. Characteristics of the genioglossus and musculus uvulae in sleep apnea hypopnea syndrome and in snorers. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;153(6 Pt 1):1870-4.
58. Sekosan M, Zakkar M, Wenig BL, Olopade CO, Rubinstein I. Inflammation in the uvula mucosa of patients with obstructive sleep apnea. *Laryngoscope*. 1996;106(8):1018-20.
59. Friberg D, Gazelius B, Hökfelt T, Nordlander B. Abnormal afferent nerve endings in the soft palatal mucosa of sleep apnoics and habitual snorers. *Regul Pept*. 1997;71(1):29-36.

60. Friberg D, Gazelius B, Lindblad LE, Nordlander B. Habitual snorers and sleep apnoics have abnormal vascular reactions of the soft palatal mucosa on afferent nerve stimulation. *Laryngoscope*. 1998;108(3):431-6.
61. Boyd JH, Petrof BJ, Hamid Q, Fraser R, Kimoff RJ. Upper airway muscle inflammation and denervation changes in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170(5):541-6.
62. Molina FD, Santos FCA, Falleiros LR, Goloni-Bertollo EM, Felisbino SL, Justulin LA, et al. Microscopical evaluation of extracellular matrix and its relation to the palatopharyngeal muscle in obstructive sleep apnea. *Microsc Res Tech*. 2011;74(5):430-9.
63. Dantas DADS, Mauad T, Silva LFF, Lorenzi-Filho G, Formigoni GGS, Cahali MB. The extracellular matrix of the lateral pharyngeal wall in obstructive sleep apnea. *Sleep*. 2012;35(4):483-90.
64. Kent BD, Ryan S, McNicholas WT. The genetics of obstructive sleep apnoea. *Curr Opin Pulm Med*. 2010;16(6):536-42.
65. Gehrman PR, Keenan BT, Byrne EM, Pack AI. Genetics of sleep disorders. *Psychiatr Clin North Am*. 2015;38(4):667-81.
66. Mukherjee S, Saxena R, Palmer LJ. The genetics of obstructive sleep apnoea. *Respirology*. 2018;23(1):18-27.
67. Varvarigou V, Dahabreh IJ, Malhotra A, Kales SN. A review of genetic association studies of obstructive sleep apnea: Field synopsis and meta-analysis. *Sleep*. 2011;34(11):1461–8.
68. Redline S, Tishler P V. The genetics of sleep apnea. *Sleep Med Rev*. 2000;4(6):583-602.

69. De Paula LKG, Alvim RO, Pedrosa RP, Horimoto ARVR, Krieger JE, Oliveira CM, Pereira AC, Lorenzii-Filho G. Heritability of OSA in a rural population. *Chest*. 2016;149(1):92-7.
70. Polotsky VY, O'Donnell CP. Genomics of sleep-disordered breathing. *Proc Am Thorac Soc*. 2007;4(1):121-6.
71. Redline S, Tishler P V., Tosteson TD, Williamson J, Kump K, Browner I, Ferrette V, Krejci P. The familial aggregation of obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151(3 Pt 1):682-7.
72. Palmer LJ, Buxbaum SG, Larkin E, Patel SR, Elston RC, Tishler PV, Redline S. A whole-genome scan for obstructive sleep apnea and obesity. *Am J Hum Genet*. 2003;72(2):340-50.
73. Guilleminault C, Partinen M, Hollman K, Powell N, Stoohs R. Familial aggregates in obstructive sleep apnea syndrome. *Chest*. 1995;107(6):1545-51.
74. Pillar G, Lavie P. Assessment of the role of inheritance in sleep apnea syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151(3 Pt 1):688-91.
75. Schwab RJ. Genetic determinants of upper airway structures that predispose to obstructive sleep apnea. *Respir Physiol Neurobiol*. 2005;147(2-3):289-98.
76. Schwab RJ, Pasirstein M, Kaplan L, Pierson R, Mackley A, Hachadoorian R, Arens R, Maislin G, Pack AI. Family aggregation of upper airway soft tissue structures in normal subjects and patients with sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(4):453-63.
77. Lin SW, Tsai CN, Lee YS, Chu SF, Chen NH. Gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells of asian obstructive sleep apnea patients. *Biomed J*. 2014;37(2):60-70.

78. Ugur KS, Acar M, Ozol D, Dagli E, Oznur M, Kosus A, Gunduz M. Gene expression profiles of tumor necrosis factor- $\alpha$  and endothelin-1 in obstructive sleep apnea. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2019;81(1):16-23.
79. Cao Y, Cai X, Zhu Q, Li N. Screening and identification of potential biomarkers for obstructive sleep apnea via microarray analysis. *Medicine (Baltimore).* 2021;100(4):e24435.
80. Shi Y, Jiang Z, Jiang L, Xu J. Integrative analysis of key candidate genes and signaling pathways in acute coronary syndrome related to obstructive sleep apnea by bioinformatics. *Sci Rep.* 2021;11(1):14153.
81. Santamaria-Martos F, Benítez I, Zapater A, Girón C, Pinilla L, Fernandez-Real JM, Barbé F, Ortega FJ, Sánchez-de-la-Torre M. Identification and validation of circulating miRNAs as endogenous controls in obstructive sleep apnea. *PLoS One.* 2019;14(3):e0213622.
82. Santamaria-Martos F, Benítez I, Ortega F, Zapater A, Giron C, Pinilla L, Pascual L, Cortijo A, Dalmases M, Fernandez-Real JM, Barbé F, Sánchez-de-la-Torre M. Circulating microRNA profile as a potential biomarker for obstructive sleep apnea diagnosis. *Sci Rep.* 2019;9(1):13456.
83. Chen Y, Chen T, Su M, Chen C, Chen K, Liou C, Tang P, Wang TY, Chang JC, Wang CC, Lin HC, Chin CH, Huang KT, Lin MC, Hsiao CC. Whole genome DNA methylation analysis of obstructive sleep apnea : IL1R2, NPR2, AR, SP140 methylation and clinical phenotype. *Sleep.* 2016;39(4):743-55.
84. Khurana S, Sharda S, Saha B, Kumar S, Guleria R, Bose S. Canvassing the aetiology, prognosis and molecular signatures of obstructive sleep apnoea. *Biomarkers.* 2019;24(1):1-16.

85. Chen YC, Hsu PY, Hsiao CC, Lin MC. Epigenetics: A potential mechanism involved in the pathogenesis of various adverse consequences of obstructive sleep apnea. *Int J Mol Sci.* 2019;20(12):2937.
86. Riha RL. Genetic aspects of the obstructive sleep apnoea/Hypopnoea syndrome- Is there a common link with obesity? *Respiration.* 2009;78(1):5-17.
87. Malhotra A, Mesarwi O, Pepin J-L, Owens RL. Endotypes and phenotypes in obstructive sleep apnea. *Curr Opin Pulm Med.* 2020;26(6):609-14.
88. Riha RL, Gislason T, Diefenbach K. The phenotype and genotype of adult obstructive sleep apnoea/hypopnoea syndrome. *Eur Respir J.* 2009;33(3):646-55.
89. Duarte BB. Comparação histológica entre as fibras dos músculos palatofaríngeo e constritor superior da faringe em indivíduos com e sem apneia obstrutiva do sono. Tese. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.
90. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013;29(1):15-21.
91. Liao Y, Smyth GK, Shi W. FeatureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics.* 2014;30(7):923-30.
92. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* 2009;26(1):139-40.

93. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(7):e47.
94. Nsiah-Sefaa A, Brown EL, Russell AP, Foletta VC. New gene targets of PGC-1 $\alpha$  and ERR $\alpha$  co-regulation in C2C12 myotubes. *Mol Biol Rep.* 2014;41(12):8009-17.
95. Röder A, Hüsken S, Hutter MC, Rettie AE, Hanenberg H, Wiek C, Girhard M. Spotlight on CYP4B1. *Int J Mol Sci.* 2023;24(3):2038.
96. Kamli MR, Kim J, Pokharel S, Jan AT, Lee EJ, Choi I. Expressional studies of the aldehyde oxidase (AOX1) gene during myogenic differentiation in C2C12 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;450(4):1291-6.
97. Vantaku V, Putluri V, Bader DA, Maity S, Ma J, Arnold JM, Rajapakshe K, Donepudi SR, von Rundstedt FC, Devarakonda V, Dubrulle J, Karanam B, McGuire SE, Stossi F, Jain AK, Coarfa C, Cao Q, Sikora AG, Villanueva H, Kavuri SM, Lotan Y, Sreekumar A, Putluri N. Epigenetic loss of AOX1 expression via EZH2 leads to metabolic deregulations and promotes bladder cancer progression. *Oncogene.* 2020;39(40):6265-85.
98. Ralston JC, Matravadia S, Gaudio N, Holloway GP, Mutch DM. Polyunsaturated fatty acid regulation of adipocyte FADS1 and FADS2 expression and function. *Obesity (Silver Spring).* 2015;23(4):725-8.
99. Wang X, Wei Z, Gu M, Zhu L, Hai C, Di A, Wu D, Bai C, Su G, Liu X, Yang L, Li G. Loss of myostatin alters mitochondrial oxidative phosphorylation, TCA cycle activity, and ATP production in skeletal muscle. *Int J Mol Sci.* 2022;23(24):15707.
100. El Haddad M, Jean E, Turki A, Hugon G, Vernus B, Bonnieu A, Passerieux E, Hamade A, Mercier J, Laoudj-Chenivresse D, Carnac G.



Glutathione peroxidase 3, a new retinoid target gene, is crucial for human skeletal muscle precursor cell survival. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 24):6147-56.

101. Chung SS, Kim M, Youn B-S, Lee NS, Park JW, Lee IK, Lee YS, Kim JB, Cho YM, Lee HK, Park KS. Glutathione peroxidase 3 mediates the antioxidant effect of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in human skeletal muscle cells. *Mol Cell Biol.* 2009;29(1):20-30.

102. Yoshida T, Delafontaine P. Mechanisms of IGF-1-mediated regulation of skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Cells.* 2020;9(9):1970.

103. Li X, Zhang S, Zhang Y, Liu P, Li M, Lu Y, Han J. Myoblast differentiation of C2C12 cell may related with oxidative stress. *Intractable Rare Dis Res.* 2021;10(3):173-8.

104. Simon LS. Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation. *Am J Med.* 1999;106(5 B):37S-42S.

105. Chen H, Qian Z, Zhang S, Tang J, Fang L, Jiang F, Ge D, Chang J, Cao J, Yang L, Cao X. Silencing COX-2 blocks PDK1/TRAF4-induced AKT activation to inhibit fibrogenesis during skeletal muscle atrophy. *Redox Biol.* 2021;38:101774.

106. Lanone S, Mebazaa A, Heymes C, Valleur P, Mechighel P, Payen D, Aubier M, Boczkowski J. Sepsis is associated with reciprocal expressional modifications of constitutive nitric oxide synthase (NOS) in human skeletal muscle: Down-regulation of NOS1 and up-regulation of NOS3. *Crit Care Med.* 2001;29(9):1720-5.

107. Puntchart A, Wey E, Jostarndt K, Vogt M, Wittwer M, Widmer HR, Hoppeler H, Billeter R. Expression of fos and jun genes in human skeletal muscle after exercise. *Am J Physiol.* 1998;274(1):C129-37.

108. Rundqvist HC, Montelius A, Osterlund T, Norman B, Esbjornsson M, Jansson E. Acute sprint exercise transcriptome in human skeletal muscle. *PLoS One*. 2019;14(10):e0223024.
109. Tamboli RA, Hajri T, Jiang A, Marks-Shulman PA, Williams DB, Clements RH, Melvin W, Bowen BP, Shyr Y, Abumrad NN, Flynn CR. Reduction in inflammatory gene expression in skeletal muscle from roux-en-Y gastric bypass patients randomized to omentectomy. *PLoS One*. 2011;6(12):e28577.
110. Manoli I, Le H, Alesci S, McFann KK, Su YA, Kino T, Chrousos GP, Blackman MR. Monoamine oxidase-A is a major target gene for glucocorticoids in human skeletal muscle cells. *FASEB J*. 2005;19(10):1359-61.
111. Gupta V, Khan AA, Sasi BK, Mahapatra NR. Molecular mechanism of monoamine oxidase A gene regulation under inflammation and ischemia-like conditions: Key roles of the transcription factors GATA2, Sp1 and TBP. *J Neurochem*. 2015;134(1):21-38.
112. Sturza A, Olariu S, Ionică M, Duicu OM, Văduva AO, Boia E, Muntean DM, Popoiu CM. Monoamine oxidase is a source of oxidative stress in obese patients with chronic inflammation. *Can J Physiol Pharmacol*. 2019;97(9):844-9.
113. Kimmel AR, Sztalryd C. Perilipin 5, a lipid droplet protein adapted to mitochondrial energy utilization. *Curr Opin Lipidol*. 2014;25(2):110-7.
114. Maturana AD, Nakagawa N, Yoshimoto N, Tatematsu K, Hoshijima M, Tanizawa K, Kuroda S. LIM domains regulate protein kinase C activity: A novel molecular function. *Cell Signal*. 2011;23(5):928-34.
115. Nakagawa N, Hoshijima M, Oyasu M, Saito N, Tanizawa K, Kuroda S. ENH, containing PDZ and LIM domains, heart/skeletal muscle-specific protein, associates with cytoskeletal proteins through the PDZ domain. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;272(2):505-12.

116. Neppl RL, Kataok M, Wang DZ. Crystallin- $\alpha$ B regulates skeletal muscle homeostasis via modulation of argonaute2 activity. *J Biol Chem.* 2014;289(24):17240-8.
117. Dimauro I, Caporossi D. Alpha B-crystallin in muscle disease prevention: The role of physical activity. *Molecules.* 2022;27(3):1147.
118. Vincent AE, Grady JP, Rocha MC, Alston CL, Rygiel KA, Barresi R, Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial dysfunction in myofibrillar myopathy. *Neuromuscul Disord.* 2016;26(10):691-701.
119. Ghahramani M, Shahsavani MB, Yousefi R. Increased chaperone activity of human  $\alpha$ B-crystallin with incomplete oxidation as a new defense mechanism against oxidative stress. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* 2022;1870(7):140794.
120. Yurchenco PD, McKee KK, Reinhard JR, Rüegg MA. Laminin-deficient muscular dystrophy: Molecular pathogenesis and structural repair strategies. *Matrix Biol.* 2018;71-72:174-87.
121. Boutilier JK, Taylor RL, Ram R, McNamara E, Nguyen Q, Goullée H, Chandler D, Mehta M, Balmer L, Laing NG, Morahan G, Nowak KJ. Variable cardiac  $\alpha$ -actin (Actc1) expression in early adult skeletal muscle correlates with promoter methylation. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech.* 2017;1860(10):1025-36.
122. Gunning P, Ponte P, Blau H, Kedes L. Alpha-skeletal and alpha-cardiac actin genes are coexpressed in adult human skeletal muscle and heart. *Mol Cell Biol.* 1983;3(11):1985-95.
123. Garfinkel LI, Periasamy M, Nadal-ginardt B. Cloning and characterization of cDNA sequences corresponding to myosin light chains 1, 2, and 3, troponin-

- C, troponin-T,  $\alpha$ -tropomyosin, and  $\alpha$ -actin\*. *J Biol Chem.* 1982;257(18):11078–86.
124. Tiso N, Majetti M, Stanchi F, Rampazzo A, Zimbello R, Nava A, Danielli A. Fine mapping and genomic structure of ACTN2 , the human gene coding for the sarcomeric isoform of alpha-actinin-2 , expressed in skeletal and cardiac muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;259(1):256-9.
125. Malm C, Yu JG. Exercise-induced muscle damage and inflammation: Re-evaluation by proteomics. *Histochem Cell Biol.* 2012;138(1):89-99.
126. Lange S, Pinotsis N, Agarkova I, Ehler E. The M-band: The underestimated part of the sarcomere. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2020;1867(3):118440.
127. Schoenauer R, Bertocini P, Machaidze G, Aebi U, Perriard JC, Hegner M, Agarkova I. Myomesin is a molecular spring with adaptable elasticity. *J Mol Biol.* 2005;349(2):367-79.
128. Gong S, Huo S, Luo Y, Li Y, Ma Y, Huang X, Hu M, Liu W, Zhang R, Cai X, Zhou L, Chen L, Ren Q, Zhang S, Zhu Y, Zhang X, Chen J, Wu J, Zhou X, Lin X, Han X, Ji L. A variation in SORBS1 is associated with type 2 diabetes and high-density lipoprotein cholesterol in Chinese population. *Diabetes Metab Res Rev.* 2022;38(5):e3524.
129. Luo S, Rosen SM, Li Q, Agrawal PB. Striated preferentially expressed protein kinase (SPEG) in muscle development, function, and disease. *Int J Mol Sci.* 2021;22(11):5732.
130. Li C, He J, Zhong X, Gan H, Xia Y. CX3CL1/CX3CR1 axis contributes to angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell proliferation and inflammatory cytokine production. *Inflammation.* 2018;41(3):824-34.

131. Pappritz K, Savvatis K, Koschel A, Miteva K, Tschöpe C, Van Linthout S. Cardiac (myo)fibroblasts modulate the migration of monocyte subsets. *Sci Rep.* 2018;8(1):5575.
132. Andre AB, Rees KP, O'Connor S, Severson GW, Newbern JM, Wilson-Rawls J, Plaiser CL, Rawls A. Single cell analysis reveals satellite cell heterogeneity for proinflammatory chemokine expression. *Front Cell Dev Biol.* 2023;11:1084068.
133. Chen Z, Li B, Zhan RZ, Rao L, Bursac N. Exercise mimetics and JAK inhibition attenuate IFN- $\gamma$ -induced wasting in engineered human skeletal muscle. *Sci Adv.* 2021;7(4):eabd9502
134. Franco JH, Chattopadhyay S, Pan ZK. How different pathologies are affected by IFIT expression. *Viruses.* 2023;15(2):342.
135. Sadler AJ, Williams BRG. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(7):559-68.
136. Xin XL, Zhang R, Yuan XM, Liu L. Mechanisms of IFN $\alpha$ -1a-induced apoptosis in a laryngeal cancer cell line. *Med Sci Monit.* 2019;25:7100-14.
137. Wiedemann GM, Geary CD, Lau CM, Sun JC. Cutting edge: STAT1-mediated epigenetic control of *Rsd2* promotes clonal expansion of antiviral NK cells. *J Immunol.* 2020;205(1):21-5.
138. Gobin SJP, Van Den Elsen PJ. Transcriptional regulation of the MHC class Ib genes HLA-E, HLA-F and HLA-G. *Hum Immunol.* 2000;61(11):1102-7.
139. Courtois G, Gilmore TD. Mutations in the NF- $\kappa$ B signaling pathway: Implications for human disease. *Oncogene.* 2006;25(51):6831-43.

140. Zhang Y, Hashimoto S, Fujii C, Hida S, Ito K, Matsumura T, Sakaizawa T, Morikawa M, Masuki S, Nose H, Higuchi K, Nakajima K, Taniguchi S. NFκB2 gene as a novel candidate that epigenetically responds to interval walking training. *Int J Sports Med.* 2015;36(9):769-75.
141. Zhao W, Zhao T, Chen Y, Sun Y. Angiotensin 1-7 promotes cardiac angiogenesis following infarction. *Curr Vasc Pharmacol.* 2015;13(1):37-42.
142. Chen X guang, Lv Y xia, Zhao D, Zhang L, Zheng F, Yang JY, Li XL, Wang L, Guo LY, Pan YM, Yan YW, Chen SY, Wang JN, Tang JM, Wan Y. Vascular endothelial growth factor-C protects heart from ischemia/reperfusion injury by inhibiting cardiomyocyte apoptosis. *Mol Cell Biochem.* 2016;413(1-2):9-23.
143. Filippin LI, Cuevas MJ, Lima E, Marroni NP, Gonzalez-Gallego J, Xavier RMH. Nitric oxide regulates the repair of injured skeletal muscle. *Nitric Oxide.* 2011;24(1):43-9.
144. Kobzik L, Reid MB, Bredt DS, Stamler JS. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature.* 1994;372(6506):546-8.
145. Gorman JL, Liu STK, Slopock D, Shariati K, Hasanee A, Olenich S, Olfert IM, Haas TL. Angiotensin II evokes angiogenic signals within skeletal muscle through co-ordinated effects on skeletal myocytes and endothelial cells. *PLoS One.* 2014;9(1):e85537.
146. Mao XG, Xue XY, Wang L, Zhang X, Yan M, Tu YY, Lin W, Jiang XF, Ren HG, Zhang W, Song SJ. CDH5 is specifically activated in glioblastoma stemlike cells and contributes to vasculogenic mimicry induced by hypoxia. *Neuro Oncol.* 2013;15(7):865-79.

147. Dagamajalu S, Rex DAB, Philem PD, Rainey JK, Keshava Prasad TS. A network map of apelin-mediated signaling. *J Cell Commun Signal.* 2022;16(1):137-43.
148. Ladeiras-Lopes R, Ferreira-Martins J, Leite-Moreira AF. O sistema apelinérgico: Papel na fisiologia e patologia humanas e potenciais aplicações terapêuticas. *Arq Bras Cardiol.* 2008;90(5):374-80.
149. Luo J, Liu W, Feng F, Chen L. Apelin/APJ system: A novel therapeutic target for locomotor system diseases. *Eur J Pharmacol.* 2021;906:174286.
150. Lu L, Wu D, Li L, Chen L. Apelin/APJ system: A bifunctional target for cardiac hypertrophy. *Int J Cardiol.* 2017;230:164-70.
151. Erasmus M, Samodien E, Lecour S, Cour M, Lorenzo O, Dlundla P, Pheiffer C, Johnson R. Linking LOXL2 to cardiac interstitial fibrosis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(16):5913.
152. Yang J, Savvatis K, Kang JS, Fan P, Zhong H, Schwartz K, Barry V, Mikels-Vigdal A, Karpinski S, Kornyejev D, Adamkewicz J, Feng X, Zhou Q, Shang C, Kumar P, Phan D, Kasner M, López B, Diez J, Wright KC, Kovacs RL, Chen PS, Quertermous T, Smith V, Yao L, Tschöpe C, Chang CP. Targeting LOXL2 for cardiac interstitial fibrosis and heart failure treatment. *Nat Commun.* 2016;7:13710.
153. Reich KA, Chen YW, Thompson PD, Hoffman EP, Clarkson PM. Forty-eight hours of unloading and 24 h of reloading lead to changes in global gene expression patterns related to ubiquitination and oxidative stress in humans. *J Appl Physiol.* 2010;109(5):1404-15.
154. Kaasik P, Riso EM, Seene T. Extracellular matrix and myofibrils during unloading and reloading of skeletal muscle. *Int J Sports Med.* 2011;32(4):247-53.

155. Kivirikko S, Saarela J, Myers JC, Autio-Harminen H, Pihlajaniemi T. Distribution of type XV collagen transcripts in human tissue and their production by muscle cells and fibroblasts. *Am J Pathol.* 1995;147(5):1500-9.
156. Okazaki K, Sandell LJ. Extracellular matrix gene regulation. *Clin Orthop Relat Res.* 2004;427(Suppl.):S123-8.
157. Du L, Yue H, Rorabaugh BR, Li OQY, Dehart AR, Toloza-Alvarez G, Hong L, Denvir J, Thompson E, Li W. Thymidine phosphorylase deficiency or inhibition preserves cardiac function in mice with acute myocardial infarction. *J Am Heart Assoc.* 2023;12(7):e028023.
158. Li W, Tanaka K, Morioka K, Uesaka T, Yamada N, Takamori A, Handa M, Tanabe S, Ihaya A. Thymidine phosphorylase gene transfer inhibits vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating heme oxygenase-1 and p27KIP1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(7):1370-5.
159. Kuboyama A, Sasaki T, Shimizu M, Inoue J, Sato R. The expression of transmembrane protein 100 is regulated by alterations in calcium signaling rather than endoplasmic reticulum stress. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2018;82(8):1377-83.
160. Pan LX, Li LY, Zhou H, Cheng SQ, Liu YM, Lian PP, Li L, Wang LL, Rong SJ, Shen CP, Li J, Xu T. TMEM100 mediates inflammatory cytokines secretion in hepatic stellate cells and its mechanism research. *Toxicol Lett.* 2019;317:82-91.
161. Ryckebusch L, Hernandez L, Wang C, Phan J, Yelon D. Tmem2 regulates cell-matrix interactions that are essential for muscle fiber attachment. *Development.* 2016;143(16):2965-72.
162. Totong R, Schell T, Lescroart F, Ryckebusch L, Lin YF, Zygmunt T, Herwig L, Krudewig A, Gershoony D, Belting HG, Affolter M, Torres-Vázquez J,



- Yelon D. The novel transmembrane protein tmem2 is essential for coordination of myocardial and endocardial morphogenesis. *Development*. 2011;138(19):4199-205.
163. Edwards BA, O'Driscoll DM, Ali A, Jordan AS, Trinder J, Malhotra A. Aging and sleep: physiology and pathophysiology. *Semin Respir Crit Care Med*. 2010;31(5):618-33.
164. Jordan AS, McSharry DG, Malhotra A. Adult obstructive sleep apnoea. *Lancet*. 2014;383(9918):736-47.
165. Labarca G, Gower J, Lamperti L, Dreyse J, Jorquera J. Chronic intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea: a narrative review from pathophysiological pathways to a precision clinical approach. *Sleep Breath*. 2020;24(2):751-60.
166. Kimoff RJ. Upper airway myopathy is important in the pathophysiology of obstructive sleep apnea. *J Clin Sleep Med*. 2007;3(6):567-9.
167. Eckert DJ, Saboisky JP, Jordan AS, Malhotra A. Upper airway myopathy is not important in the pathophysiology of obstructive sleep apnea. *J Clin Sleep Med*. 2007;3(6):570-3.
168. Shi S, Xia Y, Chen S, Li M, Chen D, Liu F, Zheng H. The relationship between structural/MHC changes in upper airway palatopharyngeal muscle morphology and obstructive sleep apnea/hypopnea syndrome. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2014;271(1):109-16.

**ANEXOS**

---

---

## ANEXO A – APROVAÇÃO CAPPESQ 1



Hospital das Clínicas da FMUSP  
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa  
CAPPesq

**Nº Protocolo:** 0698/11

**Título:** ANÁLISE MORFOLÓGICA E FUNCIONAL DAS FIBRAS DA MUSCULATURA DA PAREDE LATERAL DA FARINGE EM PACIENTES COM RONCO PRIMÁRIO E PORTADORES DE SÍNDROME DA APNEIA OBSTRUTIVA DO SONO GRAVE

**Pesquisador Responsável:** Dr. Michel Burihan Cahali

**Pesquisador Executante:** Bruno Bernardo Duarte

**Co-autores:** Dra. Suely Kazue Nagahashi Marie, Dr. Gilberto Guanaes Simões Formigoni

**Finalidade Acadêmica:** Doutorado

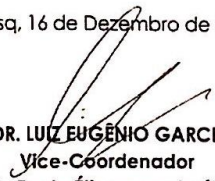
**Departamento:** OFTALMOLOGIA E OTORRINOLARINGOLOGIA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 14/12/2011, o protocolo acima.

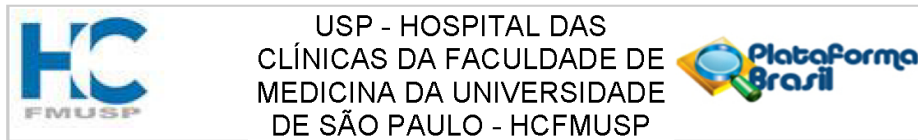
A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) s elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 16 de Dezembro de 2011

  
**PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME**  
Vice-Coordenador  
Comissão de Ética para Análise de  
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

## ANEXO B – APROVAÇÃO CAPPESQ 2



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA DA MUSCULATURA DA PAREDE LATERAL DA FARINGE DE PACIENTES APNEICOS E NÃO APNEICOS

**Pesquisador:** Michel Burihan Cahali

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

**Versão:** 2

**CAAE:** 58159222.4.0000.0068

**Instituição Proponente:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.447.891

#### Apresentação do Projeto:

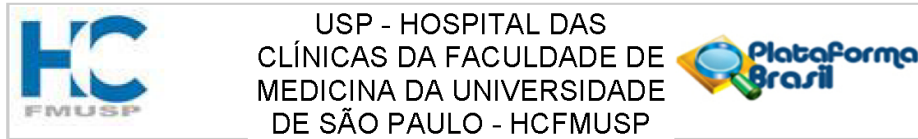
As informações apresentadas nos itens Apresentação do projeto, Objetivo da Pesquisa e Avaliação dos Riscos e Benefícios

"PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1817748.pdf" de 26/05/2022 e "Projeto\_Dou\_Camila.pdf" de 25/04/2022

Introdução:

Apneia Obstrutiva do Sono (AOS) é um distúrbio respiratório caracterizado por repetidos episódios de colapso da via aérea superior (VAS) durante o sono, cujos primeiros relatos são da década de 70.(1) É uma doença de prevalência crescente e que acomete, aproximadamente, um a cada três (32,8%) dos habitantes de São Paulo, de acordo com estudo epidemiológico realizado em 2010.(2)Em decorrência da doença, é possível observar: sonolência excessiva diurna, aumento do risco cardiovascular, risco de acidentes de trânsito e no trabalho, prejuízo cognitivo e neurológico, problemas conjugais e sociais e distúrbios de humor. Tendo em vista sua alta prevalência e todas as possíveis consequências, é inegável que a AOS acarreta grande impacto na saúde e qualidade de vida dos indivíduos acometidos o que faz, desse distúrbio, um problema de saúde pública.(3–5)Desde que foram publicados os primeiros relatos,

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 5.447.891

os esforços se voltaram para o entendimento acerca da fisiopatologia desse distúrbio respiratório do sono e muitos estudos foram realizados. Porém, até o momento presente, as causas da doença e seus mecanismos permanecem, com pontos a serem mais bem elucidados. Sabe-se que estão envolvidos na patogênese da doença: as características anatômicas da VAS, o adequado funcionamento dos dilatadores da faringe, o controle ventilatório (loop gain)(6,7) e o limiar para despertar (7). Os aspectos genéticos da AOS foram inicialmente observados a partir de relatos de gêmeos e familiares de primeiro grau há mais de 04 décadas. Porém, pouco se avançou na descoberta de genes específicos relacionados à doença. (8) O estudo das características genéticas de doenças complexas, como a AOS, vêm crescendo nos últimos anos e têm o potencial de ajudar no entendimento da patogênese da doença. (9) A expressão gênica de um tecido pode ser usada clinicamente de diversas formas, incluindo: prevenção, diagnóstico e prognóstico e tratamento. Pode indicar, por exemplo, preditores para indicar indivíduos mais propensos a evoluir com maior gravidade ou apontar os que podem responder melhor a uma determinada terapia. (10) Alguns estudos já realizados demonstram que o distúrbio do sono possui uma "assinatura molecular", ou seja: um padrão de genes ou proteínas expressos relacionados ao estado da doença. Uma questão importante ao se pensar em estudar a "assinatura molecular" de uma condição, é de quais células ou tecidos retirar as amostras para análise. Alguns estudos já foram realizados utilizando amostras de urina, saliva e sangue, que são os mais facilmente acessíveis. (10) Raros estudos foram realizados utilizando a musculatura da faringe e, entre esses, ainda mais raros são os que analisaram a musculatura da parede lateral da faringe. Este estudo tem como objetivo avaliar a expressão gênica da musculatura da parede lateral da faringe, tecido diretamente envolvido na redução da via aérea e nos eventos obstrutivos de pacientes apneicos, composta, majoritariamente, pelos músculos constritor superior da faringe e palatofaríngeo. (11)

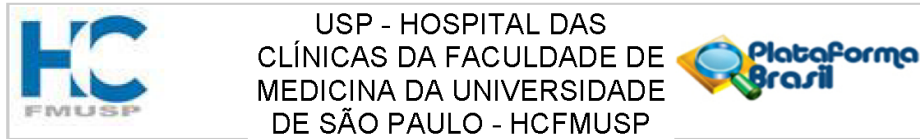
Hipótese:

Pacientes apneicos apresentam alteração na expressão gênica da musculatura faríngea que possa indicar a via envolvida na patogênese da apneia obstrutiva do sono relacionada ao fator muscular, por exemplo expressão diminuída de genes envolvidos na contratilidade muscular e aumentada de genes relacionados à inflamação.

Metodologia Proposta:

O estudo será realizado no Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo em parceria com o Laboratório de Biologia Molecular e Celular LIM 15 do Departamento de Neurologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. A coleta

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 5.447.891

do material foi realizada em pesquisa prévia aprovada pela CAPPesq sob o protocolo de nº 0698/11 em 14/12/2011 e publicada em 16/12/2011. CASUÍSTICA: O estudo foi realizado com a musculatura faríngea coletada de 17 pacientes no grupo de portadores de AOS, e 11 pacientes no grupo de não-apneicos, sendo 7 deles com ronco primário e 4 com amigdalite caseosa crônica. Todos foram atendidos e operados pelo Serviço de Otorrinolaringologia do HC-FMUSP. Para a análise da expressão gênica, serão selecionadas algumas amostras de acordo com os critérios de inclusão e exclusão mencionados no item abaixo. EXTRAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO: Será realizada a extração do material genético por Sequenciamento de Nova Geração (NGS) pela metodologia de RNA-seq. O RNA total será isolado com o RNeasy Minikit (Qiagen, Germantown, MD) seguido de transcriptase reversa para cDNA com o High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA). O RNA mensageiro terá sua qualidade e quantidade avaliadas com o uso do Agilent 2200 TapeStation (Agilent Technologies) com o uso do ensaio High Sensitivity D1000 ScreenTape. As bibliotecas de RNA-seq serão preparadas com o uso do Illumina TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit com Ribo-Zero Gold® (San Diego, CA) com 100ng de RNA total purificado de acordo com o protocolo do fabricante. As leituras brutas serão alinhadas com o STAR software. A quantificação dos dados de expressão gênica será realizada com o software Feature Counts. A normalização dos dados e a transformação em logCPM (logaritmo das contagens de transcritos por milhão) será realizada com o uso da função voom da ferramenta R/Bioconductor do limma. A análise da expressão gênica diferencial será realizada com o auxílio do limma.

As comparações entre os controles e apneicos serão realizadas e a análise de enriquecimento do conjunto de genes será realizada com o WebGestalt.

Critério de Inclusão:

a. Grupo de Apneia Obstrutiva do Sono: Ser portador de AOS grave (IAH > 30 em polissonografia tipo 1); Índice de massa corporal (IMC) < 30; Sexo masculino; Idade entre 18 e 55 anos. b. Grupo de Não-Apneicos: Polissonografia tipo 1 com IAH < 5; IMC < 30; Sexo masculino; Idade entre 18 e 55 anos.

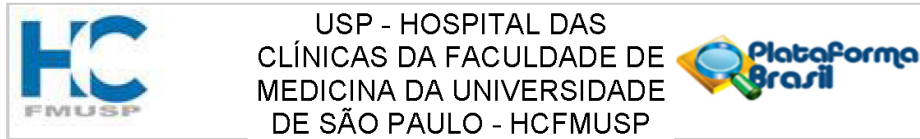
Critério de Exclusão:

Ausência de material em quantidade e qualidade satisfatória para a extração de RNaseq; Características discrepantes da média/mediana do grupo.

Metodologia de Análise de Dados:

As análises estatísticas serão realizadas com os softwares SPSS versão 15.0 (Chicago, IL) e com o software GraphPad Prism 5 (San Diego, CA, USA). O teste de Kolmogorov-Smirnov será aplicado

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 5.447.891

para checar a distribuição dos dados. O teste de Mann-Whitney U ou teste de Kruskal Wallis seguido do teste post hoc de Dunn serão aplicados quando os dados tiverem distribuição não-paramétrica e o teste t quando paramétrica. Variáveis categóricas serão avaliadas com o teste exato de Fisher. Os dados serão expressos como média e desvio padrão ou mediana, intervalos interquartil e intervalo de confiança. Valor de  $p < 0,05$  será considerado como estatisticamente significante.

**Desfecho Primário:**

Analisar se expressão de genes relacionados à contratilidade muscular está diminuída e dos genes relacionados à inflamação está aumentada nos apneicos.

**Desfecho Secundário:**

Verificar se há correlação entre a expressão genética significativamente alterada nos apneicos e a gravidade da apneia obstrutiva do sono.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

Investigar se a expressão gênica da musculatura da parede lateral da faringe apresenta alterações que possam estar envolvidas na fisiopatologia da apneia obstrutiva do sono.

**Objetivo Secundário:**

Correlacionar a expressão genética significativamente alterada nos apneicos com a gravidade da apneia obstrutiva do sono

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

Uma vez que o estudo será desenvolvido em material biológico humano coletado previamente em estudo, já aprovado pela CAPPesq, não apresentará risco aos pacientes envolvidos. As condutas e os seguimentos não sofrerão qualquer tipo de alteração ou intervenção. Os dados de identificação referentes aos pacientes não serão, em hipótese alguma, revelados.

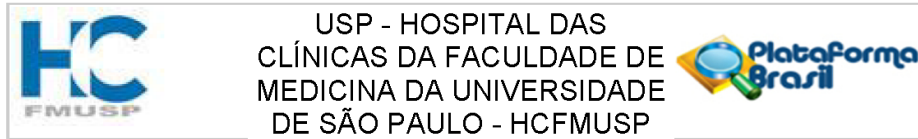
**Benefícios:**

Contribuir para o entendimento dos aspectos genéticos envolvidos na fisiopatologia da apneia obstrutiva do sono.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Desenho: Estudo descritivo e comparativo da expressão gênica (com análise de RNASeq) da musculatura da parede lateral da faringe. A obtenção das amostras ocorreu previamente por ocasião da realização de estudo aprovado pela CAPPesq sob o número de protocolo 0698/11 na

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 5.447.891

sessão datada de 14/12/2011.

Estudo unicêntrico

País de origem: Brasil

Tamanho da Amostra no Brasil: 28

Grupos em que serão divididos os participantes da pesquisa neste centro: apneicos (17 participantes - não sofrerão intervenções) e não-apneicos (11 participantes - não sofrerão intervenções)

Propõe dispensa do TCLE com a justificativa de se trata de uma pesquisa que realizará a análise de material biológico já coletado previamente após coleta de TCLE e TCC, na qual não haverá novo contato com os pacientes, qualquer intervenção ou alteração na conduta e manejo dos indivíduos envolvidos, propõe-se dispensa de novos termos de consentimento. Ressaltam ainda, que os dados demográficos e de prontuário também não serão novamente acessados. Serão consultados os dados já coletados e tabulados em estudo anterior.

Cronograma:

Elaboração textual 01/08/2023 01/12/2023

Revisão de literatura 01/01/2022 30/06/2022

Análise estatística 01/04/2023 30/06/2023

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Ver "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações"

**Recomendações:**

Ver "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações"

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Análise das respostas ao Parecer Consubstanciado n° 5.415.449 emitido em 18/05/2022:

1. Há necessidade de carta de anuência do LIM 15 do Departamento de Neurologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

RESPOSTA: Segue carta de anuência em anexo.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

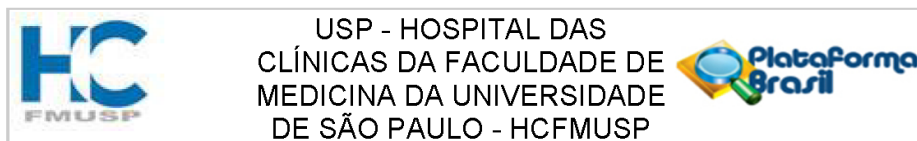
2. Há a necessidade de esclarecer qual a fonte para o orçamento de R\$11.000,00:

RESPOSTA: Todo orçamento será coberto por financiamento próprio e custeado pela aluna Camila Bae Uneda, matriculada no Programa de Doutorado do Departamento de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e pesquisadora assistente do projeto.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br





Continuação do Parecer: 5.447.891

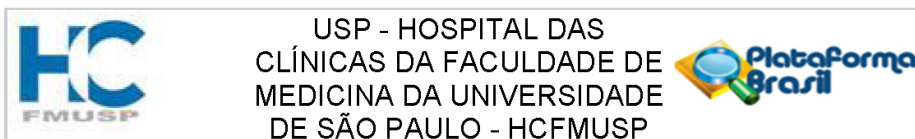
**Considerações Finais a critério do CEP:**

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1817748.pdf	26/05/2022 08:13:04		Aceito
Outros	carta_anuencia_SKNM.pdf	26/05/2022 08:11:03	Michel Burihan Cahali	Aceito
Outros	Carta_resposta_pendencias.pdf	26/05/2022 08:09:55	Michel Burihan Cahali	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Dou_Camila.pdf	25/04/2022 08:55:37	Michel Burihan Cahali	Aceito
Outros	Resposta_ao_Relator.pdf	25/04/2022 08:53:51	Michel Burihan Cahali	Aceito
Folha de Rosto	Fr_Michel.pdf	25/04/2022 08:49:51	Michel Burihan Cahali	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Isencao_TCLE0001.pdf	21/01/2022 10:34:33	Michel Burihan Cahali	Aceito
Outros	Aprovacao_Dpto0001.pdf	21/01/2022 10:32:48	Michel Burihan Cahali	Aceito
Outros	PdadosDigitais0001.pdf	21/01/2022 10:30:03	Michel Burihan Cahali	Aceito
Outros	CpatrocinioScusto0001.pdf	21/01/2022 10:29:44	Michel Burihan Cahali	Aceito
Outros	Carta_Compromisso0001.pdf	21/01/2022 10:29:09	Michel Burihan Cahali	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	21/01/2022 10:28:49	Michel Burihan Cahali	Aceito

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 5.447.891

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 03 de Junho de 2022

---

Assinado por:  
ALFREDO JOSE MANSUR  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

## ANEXO C - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE ARTIGO CIENTÍFICO

Manuscripts submitted to Sleep



### DECODING OBSTRUCTIVE SLEEP APNEA: A DEEP ANALYSIS OF THE LATERAL PHARYNGEAL MUSCLES TRANSCRIPTOME

Journal:	<i>Sleep</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Bae Uneda, Camila; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Medicina, Otolaryngology Duarte, Bruno; PUC-Campinas, Otolaryngology Lerario, Antonio; University of Michigan, Internal Medicine, Division of Metabolism, Endocrinology and Diabetes Sola, Paula; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Medicina, Neurology Campos, Eliene; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Medicina, Laboratory of Neuromuscular Diseases - Neurology Shinjo, Sueli; Universidade de Sao Paulo, Neurology Sennes, Luiz; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Medicina, Otorrinolaringologia Marie, Suely; Universidade de Sao Paulo, Neurology Cahali, Michel; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Medicina, Otolaryngology
Keywords:	mRNA and Protein Expression, OSA - Genetics, OSA - Pathogenesis, OSA - Mechanisms of Injury
Section:	
Keywords Pick List:	mRNA and Protein Expression, OSA - Genetics, OSA - Mechanisms of Injury, OSA - Pathogenesis
Other Keywords:	Transcriptome, RNA-Seq, Pharyngeal Muscles

SCHOLARONE™  
Manuscripts

<https://mc.manuscriptcentral.com/jsleep>