

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE GRADUAÇÃO DE BIOMEDICINA**

**NÍVEIS SÉRICOS DE PRÓ-HEPCIDINA E FERRITINA EM INDIVÍDUOS
COM APNÉIA DO SONO E DOENÇA ATEROSCLERÓTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso em Biomedicina

TÁSSIA MACHADO MEDEIROS

Orientadora: Dra. Mara da Silveira Benfato

Porto Alegre, julho de 2010.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE GRADUAÇÃO DE BIOMEDICINA**

**NÍVEIS SÉRICOS DE PRÓ-HEPCIDINA E FERRITINA EM INDIVÍDUOS
COM APNÉIA DO SONO E DOENÇA ATEROSCLERÓTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso em
Biomedicina submetido à Comissão de
Graduação de Biomedicina como um dos
requisitos para a obtenção do Grau de
Biomédico.

Aluna: Tássia Machado Medeiros
Orientadora: Dra. Mara Silveira Benfato

Porto Alegre, julho de 2010.

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

*Dedico este trabalho àqueles que acreditaram e continuarão acreditando em mim,
àqueles que me apoiaram e continuarão me apoiando:*

Deus e meus Pais.

Agradeço aos meus pais, Plínio e Netinha, pelo exemplo de que com força de vontade e perseverança, sonhos podem se tornar realidade; por abdicarem de muitas vontades e sonhos para que o meu virasse realidade;

Aos meus irmãos, Joubert e Emanuel; avó, Angelina; a madrasta, Jussara; ao padrasto, Paulo Cesar por toda força, preocupação e torcida dedicadas a mim;

Ao meu namorado, Diogo, e sua família pelos sete anos de torcida e ajuda;

A minha Orientadora, Mara, pelo conhecimento que me foi passado, pela paciência e compreensão;

A Cristini, pela idéia deste projeto, atenção, apoio e amizade;

Aos meus colegas de laboratório, Fernanda, Paulo, Marcus, Ártur, Paula, Cleber, Maxwel e Tiago pelo convívio diário, risadas, paciência e assistência;

Aos Professores que tive durante a graduação, por todos os ensinamentos, tanto teóricos como de vida;

Aos meus colegas de aula e amigos pelos momentos inesquecíveis e pelo companheirismo;

Enfim, agradeço a todos aqueles que amo e que fazem de mim uma pessoa melhor, mais forte e feliz.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	7
RESUMO	9
I – INTRODUÇÃO GERAL	10
I.1 – Síndrome da Apnéia e Hipopnéia Obstrutiva do Sono	10
I.1.2 – Diagnóstico de SAOS	11
I.1.3 – Tratamento da SAOS	12
I.1.4 – SAOS e Inflamação	13
I.1.5 – SAOS e Estresse Oxidativo	14
I.2 – Doença Arterial Coronariana	16
I.3 – Homeostase do Ferro, Inflamação e Hipóxia	19
I.3.1 – Hepsidina	21
I.3.2 – Ferritina	25
II – TRABALHO EXPERIMENTAL/ARTIGO CIENTÍFICO	31
Resumo	33
Introdução	34
Materiais e Métodos	36
Resultados e Discussão	39
Lista de Tabela e Figura	45
Referências	47
Tabelas e Figuras Suplementares	49
III – CONCLUSÕES	52
IV – PERSPECTIVAS	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ADICIONAIS	55

LISTA DE ABREVIATURAS

1. SAOS – Síndrome da Apnéia Obstrutiva do Sono
2. IAH – Índice de Apnéia e Hipopnéia
3. CPAP – Pressão Positiva Contínua nas Vias Aéreas (*Continuous Positive Airway Pressure*)
4. NF- κ B – Fator Nuclear- κ B (*Nuclear Factor- κ B*)
5. TNF- α – Fator de Necrose Tumoral- α (*Tumor Necrosis Factor- α*)
6. EPO – Eritropoietina
7. VEGF - Fator de Crescimento Endotelial Vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*)
8. NO – Óxido Nítrico
9. IL-8 – Interleucina-8
10. IL-6 – Interleucina-6
11. ICAM-1 – Molécula de Adesão Intercelular-1 (*Intercellular Adhesion Molecule-1*)
12. VCAM-1 – Molécula de Adesão Vascular-1 (*Vascular Adhesion Molecule-1*)
13. CRP – Proteína-C-reativa (*C-reactive Protein*)
14. DAC – Doença Arterial Coronariana
15. ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

16. HIF – Fator Induzido por Hipóxia (*Hypoxia Inducible Factor*)
17. TBARS - Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico
18. 8-OHdG - 8-hidroxi-2'deoxiguanosina
19. LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade (*Low-Density Lipoprotein*)
20. IRE – Elemento Responsivo ao Ferro (*Iron Responsive Elements*)
21. IRP - Proteínas Reguladoras do Ferro (*Iron Regulatory Proteins*)
22. STAT-3 - *Signal Transducers and Activators of Transcription protein-3*
23. BNP - Proteínas Morfogenéticas Ósseas (*Bone Morphogenetic Proteins*)
24. C/EBP α - *CCAAT/enhancer-binding protein*
25. INF γ – Interferon γ
26. HDL – Lipoproteína de Alta Densidade (*High Density Lipoprotein*)

RESUMO

A Síndrome da Apnéia do Sono (SAOS) é caracterizada por eventos de hipóxia e reoxigenação, os quais ativam a resposta inflamatória e levam à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Estudos têm evidenciado que distúrbios respiratórios do sono, entre eles, o mais grave, a SAOS, são fatores independentes para o desenvolvimento e progressão de Doença Arterial Coronariana (DAC). O processo aterosclerótico envolvido na DAC é caracterizado por inflamação e estresse oxidativo. Ambos estão relacionados com a regulação de proteínas envolvidas com o metabolismo do ferro, dentre as quais se destacam neste trabalho a hepcidina e a ferritina. A hepcidina é um hormônio regulador do nível de ferro extracelular sintetizado pelo fígado, cuja produção é regulada por fatores como anemia, inflamação, infecções e hipóxia, possuindo como pró-hormônio a pró-hepcidina. A ferritina está envolvida no estoque de ferro e mostra ter a expressão regulada por hipóxia e inflamação. Além disso, seus níveis estão relacionados à DAC e ao infarto do miocárdio. Este trabalho teve por objetivo estudar e esclarecer a possível relação entre SAOS, DAC, pró-hepcidina e ferritina. Foi realizado um estudo transversal no qual foram incluídos 56 pacientes (519 triados), os quais haviam sido encaminhados para a realização de angiografia por suspeita de DAC. Além dos níveis de pró-hepcidina e dos níveis hematimétricos, os pacientes foram submetidos à polissonografia para a determinação do Índice de Apnéia e Hipopnéia (IAH), e como marcador inflamatório dosou-se a proteína-C-reativa ultra sensível. Em um modelo de regressão (Poisson), foi verificado que o aumento de uma unidade da IAH aumenta o risco de DAC em 29,3%. Em um modelo de regressão multivariada, controlando para idade, sexo e IMC, verificou-se que a ferritina e o IAH predizem 30,4% da variância da pró-hepcidina. Portanto, demonstrou-se que esses eventos encontram-se relacionados, e se sugere que estes fatores possuem forças diferentes na regulação da síntese da ferritina e pró-hepcidina, agindo hierarquicamente para a regulação dos níveis dessas proteínas para a manutenção da homeostase do ferro.

I – INTRODUÇÃO GERAL

I.1 – Síndrome da Apnéia e Hipopnéia Obstrutiva do Sono

A Síndrome da Apnéia Obstrutiva do Sono (SAOS) é uma doença caracterizada pela obstrução repetitiva, total ou parcial, da via aérea superior durante a inspiração, geralmente resultando na queda da saturação de oxigênio e despertares. Os seus principais sintomas são roncos, sonolência diurna excessiva e apnéias relatadas por observadores. Além disso, existem evidências de que esta síndrome está associada com um considerável número de seqüelas adversas, tanto físicas como comportamentais, como, por exemplo, a grande incidência de acidentes de trânsito com pacientes com SAOS.²³ É a mais freqüente desordem respiratória, que ocorre em todas as idades, afetando de 1 a 4% dos adultos, tendo maior prevalência em homens, idosos e obesos, estando presente em 1 a 10% da população de meia-idade.²⁴ Young e col.²⁵ indicaram que essa prevalência é de 4% em homens e 2% em mulheres de meia-idade.

De acordo com *American Academy of Sleep Medicine* (1999), a apnéia é caracterizada pela diminuição do fluxo respiratório a $\leq 10\%$ do basal, ou pela parada do fluxo aéreo por mais de 10 segundos. O diagnóstico é realizado por meio de polissonografia. A severidade da SAOS é medida pelo Índice de Apnéia e Hipopnéia (IAH), o qual é obtido pela contagem do número total de apnéias e hipopnéias durante o sono dividida pelo tempo de registro polissonográfico (tempo de sono). Um IAH menor do que 5 por hora é considerado normal, sendo um indivíduo sem distúrbio respiratório; entre 5 e 15 é diagnosticado como apnéia e hipopnéia leve; entre 15 e 30 é diagnosticado como moderado; e maior do que 30 como grave.^{26,27}

Outras manifestações clínicas das apnéias e hipopnéias repetitivas incluem hipóxia intermitente, em que indivíduos são submetidos a repetitivos episódios de dessaturação de oxigênio no sangue seguido pelo processo de reoxigenação (hipóxia-reoxigenação), hipercapnia, aumento da frequência cardíaca e arritmias; sintomas esses resultantes da ativação do sistema simpático.²⁸

I.1.2 – Diagnóstico de SAOS

O diagnóstico da síndrome é feito através de polissonografia. Existem quatro tipos de polissonografia, sendo que o padrão ouro do método é a I, realizada em laboratórios de sono, e as demais são métodos de monitorização portáteis, os quais servem para monitorar o sono do paciente em domicílio. Elas são diferenciadas pela quantidade de parâmetros medidos e avaliados. Por exemplo, a polissonografia portátil tipo III faz a monitorização do sono a partir de no mínimo quatro canais, sendo dois para o fluxo ventilatório, um para a frequência cardíaca e um para a oximetria.²⁹ A figura 1 mostra a monitorização da polissonografia do tipo III a qual foi realizada neste estudo. Foram analisados cinco canais: fluxo aéreo, roncos, pressão de oxigênio, frequência cardíaca e posição do paciente. As polissonografias portáteis realizadas a domicílio aumentam a possibilidade de um diagnóstico correto e de tratamento efetivo da SAOS.¹¹

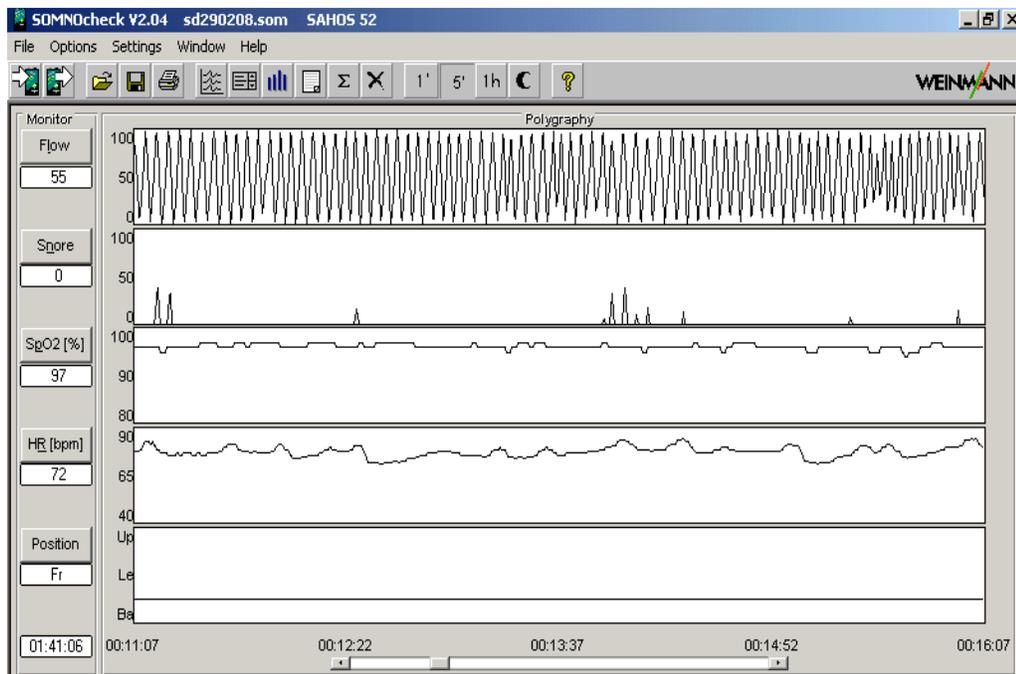


Figura 1. Apresentação gráfica da polissonografia portátil tipo III utilizada neste estudo, com a presença de cinco canais: fluxo aéreo, roncos, saturação de oxigênio, frequência cardíaca e posição do sono, de cima para baixo respectivamente.

I.1.3 – Tratamento da SAOS

O tratamento de primeira escolha para a SAOS é o uso de um aparelho que mantém a pressão positiva contínua nas vias aéreas superiores (CPAP - *Continuous Positive Airway Pressure*). O CPAP é usado durante o sono, e o paciente recebe a pressão positiva por meio de uma máscara nasal ou oronasal. A pressão positiva que será usada é a menor necessária para manter a via aérea do indivíduo aberta durante o sono, impedindo episódios de apnéia e hipopnéia. Esta pressão necessária é determinada através da realização da polissografia.³⁰

Sendo a obesidade um dos principais fatores de risco para SAOS e sendo sua prevalência maior em indivíduos obesos, a perda de peso é uma das recomendações que se faz aos pacientes.³¹ Algumas cirurgias como vulopalatofaringoplastia,

glosectomia, osteostomia mandibular sagital inferior e traqueostomia também podem beneficiar os pacientes.²⁶

I.1.4 – SAOS e Inflamação

Existem inúmeros estudos demonstrando os elevados níveis de agentes pró-inflamatórios circulantes, como citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão em pacientes com SAOS, e estes estudos são suportados pelo fato de que pacientes submetidos ao tratamento com CPAP possuem uma queda significativa dos níveis desses agentes.³² Foi sugerido que a ativação da resposta pró-inflamatória ocorre devido à ativação do Fator de Transcrição Nuclear- κ B (NF- κ B), o qual acarreta o aumento da expressão do Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), um importante agente pró-aterogênico. A hipóxia intermitente mostrou-se responsável pela ativação tanto do NF- κ B quanto do Fator Induzido por Hipóxia-1 (HIF-1 - *hypoxia inducible factor*), um fator chave na homeostase do oxigênio que estimula a expressão de inúmeros genes como Eritropoietina (EPO), Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) e a síntese de Óxido Nítrico (NO), os quais medeiam a resposta à hipóxia.⁵ Além dessas moléculas, a Interleucina-8 (IL-8), Interleucina-6 (IL-6), bem como a Molécula de Adesão Intercelular-1 (ICAM-1), Molécula de Adesão Vascular-1 (VCAM-1) e a Proteína-C-reativa (CRP) mostraram-se alteradas em indivíduos com SAOS.³³

Juntamente com a hipóxia intermitente outro fator que contribui para o aumento dos níveis dos agentes pró-inflamatórios em pacientes com SAOS é a fragmentação do sono. Sabe-se que o pouco tempo de sono e a sua privação durante

vários dias estão associados com o aumento dos níveis de marcadores inflamatórios como CRP, IL-6 e TNF- α .^{34,35}

A SAOS está associada com uma significativa mortalidade e morbidade, sendo em grande parte ocasionada pela sua associação com doenças cardiovasculares como hipertensão, doença arterial coronariana (DAC), insuficiência cardíaca e acidente vascular cerebral. Os mecanismos dessa associação ainda não são bem entendidos, mas parecem ser multifatoriais e envolvem a ativação simpática, disfunção endotelial, ativação de rotas inflamatórias e desordens metabólicas como hiperlipidemias.³⁶

I.1.5 – SAOS e Estresse Oxidativo

Episódios de hipóxia e reoxigenação sofridos por indivíduos com SAOS estão associados com a formação de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e com o aumento do estresse oxidativo. As ERO incluem radicais livres e peróxidos e são responsáveis por atividades vitais como produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular e sinalização intercelular.³⁷ Além disso, algumas das menos reativas dessas espécies podem ser convertidas por reações de oxido-redução com metais de transição, como por exemplo, o ferro, em mais agressivas espécies de radicais livres. Os radicais livres são altamente reativos e podem reagir com ácidos nucléicos, lipídeos e proteínas, causando prejuízo do metabolismo e lesão celular.⁴

Embora se saiba que a hipóxia acarreta a geração de ERO, a fonte precisa das ERO ainda é desconhecida. Sugere-se que esse aumento ocorra porque em baixas concentrações de oxigênio verifica-se uma formação maior de redutores na mitocôndria.⁴ A mitocôndria tem sido considerada uma provável fonte de ERO,

sendo que a cadeia transportadora de elétrons foi proposta ser um sensor de oxigênio, liberando ERO em resposta a hipóxia, as quais desempenham um papel sinalizador desencadeando diversas respostas funcionais, incluindo a ativação da expressão gênica por meio do Fator Induzido por Hipóxia (HIF). O principal local da produção de ERO na mitocôndria parece ser o complexo III. Isso pode ocorrer devido a um efeito do oxigênio dentro da membrana mitocondrial interna sobre o tempo de vida do radical semi-ubiquinona no próprio complexo III, ou à liberação de ERO no espaço matriz versus espaço intermembranas.³ Além da cadeia transportadora de elétrons, as ERO também podem derivar de isoformas da NADPH-oxidase, presente em muitas células como leucócitos e células endoteliais. Esta enzima tem como produto o ânion radical superóxido, o qual causa estímulo para a liberação de citocinas, fatores de crescimento, entre outros. O metabólito do radical superóxido, o peróxido de hidrogênio, age como segundo mensageiro para ativar múltiplas vias intracelulares.^{4,38}

Estudos utilizando marcadores de dano oxidativo demonstraram que pacientes com SAOS apresentam maior dano oxidativo. Barcelo e col.³⁹ mostraram que pacientes com SAOS apresentam maior dano lipídico, utilizando o ácido tiobarbitúrico (TBARS) como marcador; e Yamauchi e col.⁴⁰ verificaram a presença de maior dano em DNA utilizando o 8-hidroxi-2'deoxiguanosina (8-OHdG) como marcador. Esses dados são reafirmados por estudos que demonstram a diminuição de dano oxidativo em pacientes que realizaram terapia para SAOS. Esses estudos verificaram que após o tratamento com CPAP ocorreu diminuição do TBARS e peróxidos,⁴¹ e outro estudo ainda verificou diminuição da pressão diastólica e aumento da atividade antioxidante.⁴²

I.2 – Doença Arterial Coronariana

A SAOS tem sido considerada um fator de risco para doenças cardiovasculares. Drager e col.⁴³ demonstraram que distúrbios respiratórios do sono possuem importante papel no desenvolvimento e progressão da aterosclerose, independentemente de outros fatores, por isso a SAOS passou a ser um fator de risco independente. Schulz e col.⁴⁴ encontraram uma predisposição maior à formação de placa aterosclerótica em pacientes com SAOS. Concordando com este último estudo, Suzuki e col.⁴⁵ verificaram que o espaçamento da camada íntima da artéria carótida apresenta correlação com a gravidade da SAOS.

Evidências indicam que a formação excessiva de ERO está associada à fisiopatologia das doenças cardiovasculares dentre elas vale destacar a aterosclerose.⁴⁶ Os mecanismos desta relação ainda não são totalmente conhecidos, mas acredita-se que a hipóxia intermitente induzida por apnéia, devido aos períodos de hipóxia-reoxigenação, seja a principal causa da associação entre SAOS e doenças cardiovasculares.²⁷ Outros fatores envolvidos nessa fisiopatologia incluem disfunção endotelial, inflamação sistêmica, distúrbios metabólicos e coagulopatias.¹

O dano endotelial é o fator desencadeador do processo aterosclerótico, e pode ser causado pela hipóxia tanto através da diminuição da oferta de oxigênio quanto pela geração de ERO. Essa lesão endotelial ativa a expressão pelas células endoteliais de moléculas de adesão, provoca o recrutamento de células mediadoras da inflamação, como monócitos e linfócitos T e leva ao aumento da permeabilidade do vaso a lipoproteínas propiciando o processo de oxidação de biomoléculas. O transporte de Lipoproteínas de Baixa Densidade Oxidadas (LDL-ox) do endotélio para a parede do vaso é outro fator importante para a formação da placa

aterosclerótica. A presença de LDL-ox na parede na camada íntima do vaso e de linfócitos T, estimula os monócitos a se tornarem macrófagos, e esses fagocitam o LDL-ox, causam sua hiper-oxidação e dão origem as células espumosas, as quais se combinam com leucócitos e formam as estrias de gordura.¹⁹ Os níveis elevados de LDL-ox possuem relação positiva com a severidade da DAC.⁴⁷ As estrias de gordura secretam fatores de crescimento e induzem a migração de células da musculatura lisa para a camada íntima do vaso. Este processo ocorre continuamente, aumentando cada vez mais a lesão, acarretando processo fibrótico e calcificação da placa de ateroma. Quando essa placa se desestabiliza e rompe ocorrem problemas cardiovasculares agudos, como o infarto do miocárdio pela formação e liberação de trombos que podem causar a oclusão de vasos (figura 2).¹⁹

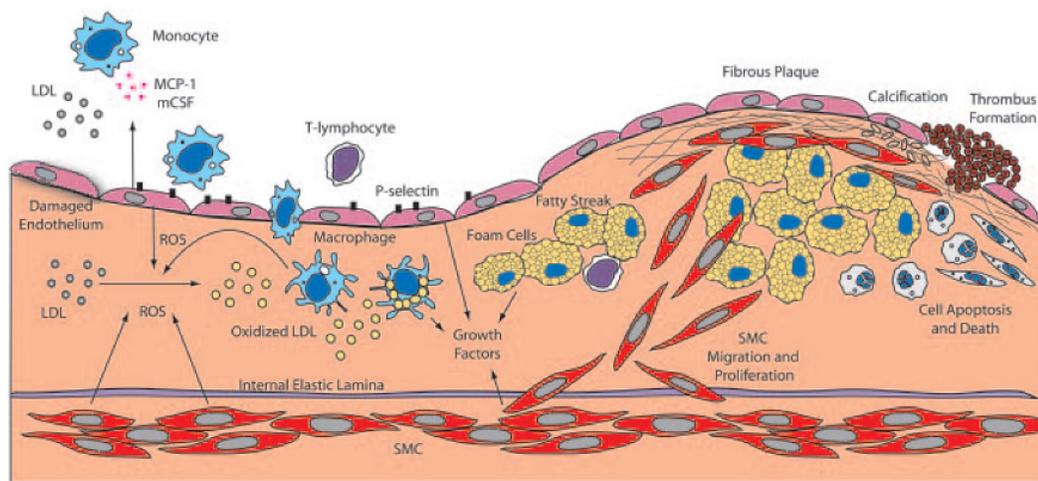


Figura 2. Desenvolvimento da aterosclerose. Produção de ERO pelas células endoteliais, células da musculatura lisa e macrófagos; oxidam o LDL no espaço subendotelial, nos locais de lesão endotelial, iniciando eventos que culminam na formação da placa fibrótica. A ruptura da placa fibrótica leva a formação do trombo e oclusão do vaso. Retirado de “*Oxidative Stress and Vascular Disease*”.¹⁹

Torna-se relevante salientar, após a breve descrição desse processo, que as ERO estão envolvidas em várias vias desse processo, direta ou indiretamente, como

ativação de fatores de transcrição (HIF, NF- κ B), aumento dos níveis de mediadores da inflamação (citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, fatores de crescimento) e conseqüente ativação do processo inflamatório, oxidação de moléculas como o LDL, recrutamento de células inflamatórias e plaquetas, além da produção de mais espécies reativas e do dano causado diretamente em biomoléculas que afetam o metabolismo e viabilidade celular.

I.3 – Homeostase do Ferro, Inflamação e Hipóxia

O ferro é essencial para a manutenção da vida. Está envolvido em processos como respiração e proliferação celular, síntese de DNA, entre outros, e participa de várias reações redox. É um átomo fundamental para o funcionamento de muitas proteínas e enzimas, entre elas a hemoglobina, mioglobina, ciclo-hoxigenases, citocromos e aconitase. Um exemplo da importância do ferro para o funcionamento adequado do corpo é que sua deficiência gera cansaço, diminuição da tolerância a exercício, inanição, suscetibilidade a episódios traumáticos, e outros. Tanto a deficiência de ferro quanto a sua sobrecarga estão envolvidas em várias patologias, e ambas as situações podem gerar estresse oxidativo.^{6,48}

A toxicidade do ferro está relacionada com a sua capacidade de participar no dano oxidativo. Através da reação de Fenton ($\text{Fe}^{++} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{+++} + \text{OH}^\bullet + \text{OH}^-$), o ferro é capaz de catalisar a produção de ERO e dentre elas o radical mais nocivo é o radical hidroxila. O dano oxidativo está relacionado com a fisiopatologia de vários processos, como a inflamação e a hipóxia,⁶ eventos mencionados anteriormente.

O controle da homeostase do ferro é realizado tanto a nível celular quanto sistêmico. O metabolismo do ferro celular é mantido pela sua captação, estoque, reciclagem, exportação e distribuição intracelular. A homeostase sistêmica é mantida pela entrada de ferro no organismo e pela mobilização dos seus estoques. Este controle envolve a regulação tanto de hormônios (hepcidina) quanto proteínas (ferritina, transferrina, ferroportina), além de todo o sistema antioxidante (enzimas e moléculas com capacidade antioxidantes).⁴⁹

Muitos estudos têm sugerido uma ligação entre estoques anormais de ferro e a progressão da DAC, e esta ligação é conhecida como “hipótese do ferro”.⁵⁰ Esta

hipótese é sustentada pelo fato de o ferro catalisar a formação de ERO, portanto, o ferro em excesso em um tecido contribuiria para a geração de formas reativas, acarretando dano tecidual, sinalização para rotas inflamatórias e oxidação do LDL, mecanismos que, como recentemente descritos neste trabalho, contribuem para a DAC. Esta hipótese tem sido utilizada como exemplo para explicar a diferença da incidência de DAC entre homens e mulheres e o aumento dessa incidência em mulheres após a menopausa. Isso porque homens e mulheres pós-menopausa apresentam níveis superiores de ferro em relação a mulheres pré-menopausa.⁵¹ Além disso, outros estudos suportam esta hipótese, pois demonstram que existe queda na quantidade de ferro depositado na lesão aterosclerótica e redução do tamanho dessa lesão em situações de flebotomia, dieta pobre em ferro e tratamento sistêmico com quelante de ferro.^{52,53} O ferro também é encontrado em placas ateroscleróticas em concentrações significativamente superiores às concentrações vistas em tecido arterial de indivíduos saudáveis. O ferro não é um componente inerte dentro da placa, alguma quantidade dele possui atividade redox, e o ferro ligado a ferritina e hemossiderina é um reservatório em potencial de ferro reativo dentro da lesão.⁵⁴ Stadler e col.⁵⁵ quantificaram ferro *ex vivo* em lesões carotídeas de artérias de humanos saudáveis e encontraram correlação positiva entre os níveis de colesterol nessas lesões com a concentração de ferro acumulada.

O ferro pode ser desvinculado de proteínas que tem a função de armazená-lo em condições de hipóxia. Por exemplo, o ferro vinculado à ferritina é liberado após ser reduzido a íon ferroso, processo que é facilitado pelo ânion radical superóxido, meio ácido, cetocolaminas ou NO, moléculas que se encontram em abundância sob condições de hipóxia,⁵⁶ e, ainda, este ferro livre pode contribuir para o dano tecidual. Também foi visto que o ferro atua na regulação dos HIF, sendo que condições de

deficiência de ferro simulam condições de hipóxia.⁵⁷ Como descrito anteriormente, estes fatores possuem um papel central na adaptação celular em baixos níveis de oxigênio e ferro. O mRNA dos HIF possui Elementos Responsivos ao Ferro (IRE – *iron responsive elements*), os quais são grampos de nucleotídeos no mRNA de certas proteínas do metabolismo do ferro e servem para o controle pós-transcricional feito pelas Proteínas Reguladoras do Ferro (IRP - *iron regulatory proteins*), que se ligam aos IRE na presença de baixas concentrações de ferro.⁵⁸ Este mecanismo de regulação do metabolismo do ferro envolve tanto a hipóxia quanto os níveis do mesmo.

I.3.1 – Hecpidina

Há poucos anos, Park e col.⁵⁹ descobriram um novo peptídeo presente na urina humana e o denominaram “hepcidina”, o qual é sintetizado pelo fígado, e possui atividade antimicrobiana. Este peptídeo é encontrado em três formas, com 25, 22 e 20 aminoácidos. Contém oito resíduos de cisteína ligados por quatro pontes dissulfeto, resultando em uma molécula com a estrutura de um simples grampo, tendo uma configuração semelhante a outros peptídeos com atividade antimicrobiana.⁸ Além disso, possui um papel chave na manutenção da homeostase do ferro.

A hepcidina é um hormônio sintetizado pelos hepatócitos, codificado como um pré-pró-peptídeo de 84 aminoácidos, possuindo em sua região N-terminal uma seqüência com 24 aminoácidos que serve como peptídeo sinal alvo para a localização no retículo endoplasmático (pré-região). Logo após, existe uma seqüência com 35 aminoácidos (pró-região) contendo uma região para o reconhecimento e clivagem

realizados pela furina (uma serino peptidase). Por fim, resta uma seqüência de 25 aminoácidos, na região C-terminal do pré-pró-peptídeo, a qual é a forma ativa do hormônio (figura 3). Após o processamento do pré-pró-hormônio pelo retículo endoplasmático, o pró-hormônio restante (pró-hepcidina) é liberado na circulação. A furina é uma convertase que ativa hormônios pela clivagem da proteína precursora, no caso a pró-hepcidina. Na circulação, a furina cliva a pró-hepcidina, formando o hormônio ativo, hepcidina. No entanto, nenhum estudo demonstrou como esse processamento é regulado.⁶⁰

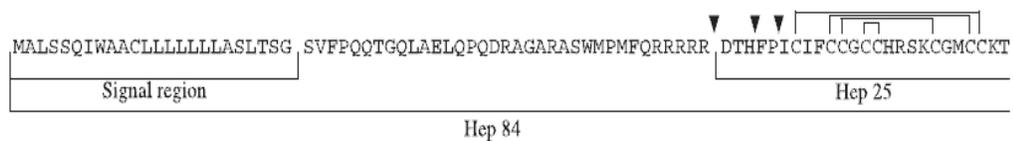


Figura 3. Estrutura e maturação da hepcidina. A primeira região com 24 aminoácidos serve para direcionamento ao retículo endoplasmático. Para gerar o peptídeo maduro com 25 aminoácidos, existe um sítio de clivagem para a furina na região C-terminal da pró-hepcidina. Retirado de “*a-1 Antitrypsin binds preprohepcidin intracellularly and prohepcidin in the serum*”.⁶¹

Quando ativa na circulação, a hepcidina se liga a ferroportina causando a sua internalização e degradação lisossomal (figura 4).⁶² A ferroportina é uma proteína presente na superfície celular de enterócitos, macrófagos, células placentárias e hepatócitos, e é responsável pelo transporte do ferro do meio intracelular para o plasma, funcionando tanto como um canal do efluxo de ferro regulado pela hepcidina quanto como um receptor da hepcidina⁶³. O efeito desta ação é a redução dos níveis plasmáticos de ferro através da diminuição da sua absorção intestinal e liberação pelos macrófagos e pelos estoques hepáticos.

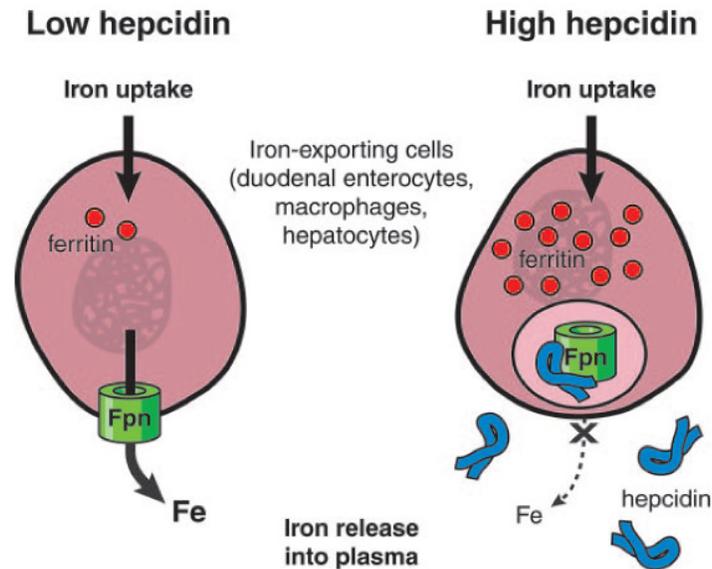


Figura 4. Hepcidina regula a exportação do ferro intracelular para o plasma. Quando a hepcidina se encontra em baixas concentrações, as moléculas de ferroportina se localizam na interface membrana celular e plasma, exportando o ferro. Com o aumento da concentração de hepcidina, esta se liga a ferroportina e induz sua internalização e degradação, e a liberação do ferro para o plasma decresce progressivamente. Retirado de “*Molecular Control of Iron Transport*”.⁶³

A relação entre hepcidina e ferro foi vista durante um estudo sobre a resposta hepática à sobrecarga de ferro.⁶⁴ Neste estudo, os autores verificaram que o mRNA da hepcidina era estimulado durante sobrecarga de ferro e também por injeção de lipopolissacarídeos em ratos, indicando que ela também é influenciada pela resposta imune, estando envolvida no processo inflamatório. A hepcidina também é estimulada em resposta a infecções, causando a anemia de inflamação, no intuito de diminuir a disponibilidade de ferro para os agentes patogênicos.⁶⁵ A síntese da hepcidina é induzida por citocinas inflamatórias, principalmente por IL-6, indicando que o estímulo que a hepcidina sofre durante a inflamação é um efeito indireto, e que a hepcidina é uma proteína de fase aguda tipo II.⁶⁶ A IL-6 regula diretamente a expressão da hepcidina através da indução de sua ligação no promotor do “*Signal*

Transducers and Activators of Transcription protein-3” (STAT-3).¹⁷ Outras citocinas inflamatórias também estimulam a hepcidina como IL-1 α e IL-1 β , proteínas morfogenéticas ósseas (BNP – *bone morphogenetic proteins*). Bem como a hepcidina, a pró-hepcidina também parece se correlacionar com citocinas inflamatórias como IL-6, IL-1 α e TNF- α , além de CRP.⁶⁷

Durante a anemia, a expressão da hepcidina é suprimida, com o objetivo de aumentar a oferta de ferro necessária para a atividade eritropoiética. A hipóxia também mostrou o mesmo efeito da anemia. No entanto, a anemia, por si só, parece não afetar os níveis séricos de hepcidina como na anemia induzida por flebotomia, mas quando ocorre hipóxia tecidual por consequência da anemia hipóxica, a expressão da hepcidina é reprimida.⁶⁸ Com o objetivo de testar a possibilidade de HIF-1 e ERO estarem envolvidos na regulação da hepcidina, um estudo verificou que o mRNA, o pré-mRNA e os níveis da proteína estavam reduzidos em uma linhagem celular de hepatócitos humanos após a incubação em condições de hipóxia. Somando-se a isso, os níveis de ERO estavam significativamente aumentados nos hepatócitos, e a adição de antioxidantes reprimiu o efeito da hipóxia sobre a hepcidina, também a adição de peróxido de hidrogênio suprimiu a expressão da hepcidina. Esse estudo também examinou a ligação dos fatores de transcrição presentes no promotor da hepcidina, e constatou que “*CCAAT/enhancer-binding protein*” (C/EBP α) e STAT-3 encontravam-se dissociados durante a hipóxia, mas que na adição de antioxidantes eles voltavam a se ligar, sugerindo que as ERO estão envolvidas na repressão da expressão da hepcidina.¹²

Os mecanismos que estimulam a conversão de pró-hepcidina a hepcidina permanecem desconhecidos, e ainda se discute se a pró-hepcidina é uma medida da hepcidina ativa ou simplesmente um precursor não funcional.⁶⁹ No entanto, os níveis

séricos de pró-hepcidina são amplamente utilizados para diagnosticar a sobrecarga de ferro.⁷⁰ Como marcador inflamatório em pacientes com artrite reumatóide, a pró-hepcidina parece ser efetiva, independente do estado de anemia.⁷¹ Atualmente, a mensuração desse pró-hormônio pode ser facilmente realizada no soro e urina utilizando-se um ensaio imunoenzimático por ELISA.

De acordo com essa relação entre hepcidina, inflamação e hipóxia, Kanbay e Hasanoglu² formularam a hipótese de haver uma possível associação entre hepcidina e SAOS, sugerindo a hepcidina como um marcador prognóstico de doenças inflamatórias em indivíduos com SAOS, incluindo nessas doenças a DAC.

I.3.2 – Ferritina

A ferritina possui um importante papel na homeostase do ferro. É capaz de seqüestrar grandes quantidades de ferro, atuando no seu armazenamento e detoxificação, devido à ação tóxica que o ferro exerce. É composta de 24 subunidades, alternando entre ferritina H e L, cujas concentrações variam de acordo com o tecido em que são expressas, tendo maior quantidade de L em tecidos como fígado e baço, e de H no coração e rins. Estas subunidades se arranjam formando uma cavidade oca com a capacidade de armazenar até 4.500 átomos de ferro III (figura 5).⁷² Ferritina H e L são produtos de diferentes genes e também possuem funções diferentes: a ferritina H possui atividade de ferro oxidase, convertendo ferro II a ferro III, forma em que o ferro é internalizado e seqüestrado; a ferritina L faz a nucleação e a mineralização do ferro III, precisando, portanto, da ação da ferritina H para agir.⁷³ Devido a essas características, a ferritina H pode se ligar e liberar o ferro mais facilmente do que a ferritina L. Acredita-se que a H exerça a função de

detoxificação rápida do ferro e transporte intracelular e a ferritina L está envolvida mais com o armazenamento de ferro a longo prazo.⁷²

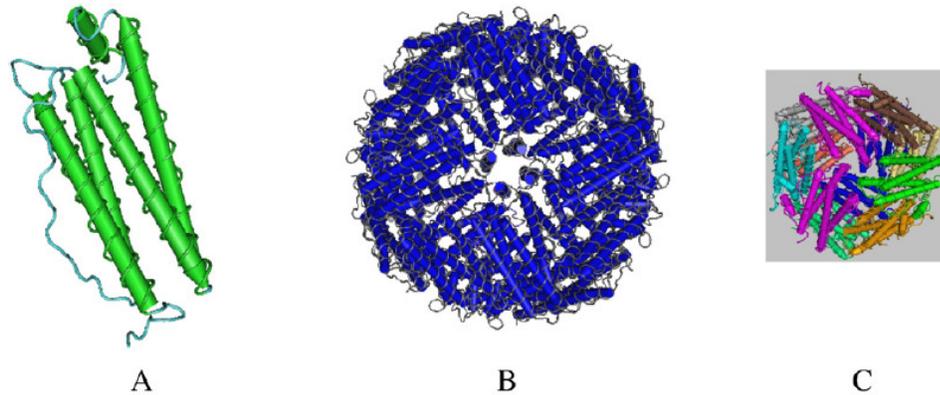


Figura 5. Aspectos estruturais das ferritinas. As subunidades tipicamente se arranjam em feixe de 4 hélices (A), as quais podem se agrupar em 24 subunidades, como no caso da ferritina humana, formando uma cavidade reservatória (B), ou ainda com 12 subunidades na Dps bacteriana (C), possuindo diferença de tamanho e simetria. Retirada de “*Ferritins: A family of molecules for iron storage, antioxidation and more*”.⁷⁴

A ferritina é uma proteína intracelular localizada principalmente no citoplasma, embora traços também sejam encontrados no soro e outros fluidos biológicos.⁷³ As concentrações de ferritina no soro encontram-se elevadas em condições como inflamações e super dosagem de ferro. No soro ela é pobre em ferro, e consiste de ferritina L, um traço de ferritina H e uma nova forma denominada ferritina “G” (glicosilada). A ferritina sérica é utilizada como um marcador clínico de estoque de ferro, contudo, sua origem é desconhecida, mas acredita-se que tenha origem hepática.⁷⁵ Esta ferritina sérica parece desempenhar um papel na modulação do peptídeo vasoativo bradicinina. Além disso, os níveis de ferritina sérica e intracelular parecem ser diretamente proporcionais.⁷⁶ Recentemente foi descoberta uma ferritina mitocondrial, que também é importante não somente porque a

mitocôndria desempenha um papel no tráfego do ferro, mas também pela sua função na respiração celular, apoptose e biossíntese de núcleos-ferro enxofre. Sugere-se que este seja um dos meios utilizados pela mitocôndria para proteger-se de si mesma devido ao excesso de ferro e dano oxidativo, bem como a regulação do tráfego de ferro entre o citosol e a mitocôndria.⁷³

A ferritina é uma das proteínas que possui regulação principalmente pós-transcricional através dos IRE e das IRPs. A atividade ligante das IRPs aos IRE, além de ser controlada pelos níveis de ferro, é regulada também por outros estímulos, como, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e hipóxia, alterando assim a tradução da ferritina.⁷⁷

Inflamação, infecção e estresse oxidativo possuem grande influência na regulação da expressão da ferritina em vários níveis: transcricional, pós-transcricional e traducional. Citocinas inflamatórias, particularmente TNF- α e IL-2, aumentam a síntese de ferritina em várias células, incluindo hepatócitos e macrófagos. TNF- α , interferon γ (INF γ) e IL-1 α induzem à transcrição de ferritina H, juntamente com a secreção da ferritina. A indução da transcrição da ferritina em macrófagos pode ser particularmente importante devido ao seu papel como seqüestrador de eritrócitos velhos e danificados, contribuindo para a reciclagem de ferro no corpo. A IL-6 também se mostrou capaz de induzir à síntese de ferritina, bem como sua secreção, lembrando que essa citocina possui um papel fundamental na resposta da hepcidina à inflamação, e, assim como a hepcidina, a ferritina também é considerada uma proteína de fase aguda.⁷ O estresse oxidativo regula a expressão da ferritina ou diretamente na expressão do gene, ou indiretamente via modificações da atividade das IRPs. Os oxidantes também podem alterar os níveis de ferritina

através da liberação de ferro de proteínas; entre esses oxidantes encontram-se ERO e NO.⁷

Muitos estudos têm ligado estoques anormais de ferro com DAC, e esta ligação é baseada na “hipótese do ferro”, na qual os radicais livres podem causar a oxidação do LDL. No entanto, muito se discute pelo fato de a ferritina ser considerada como um antioxidante por seqüestrar o ferro livre, mas por outro lado, ela pode funcionar como um pró-oxidante pela liberação do ferro estocado. O efeito antioxidante da ferritina foi mostrado, por exemplo, em um estudo que realizou o tratamento de células endoteliais com apoferritina (ferritina não combinada com o íon ferro), demonstrando um efeito protetor nas células contra oxidantes citosólicos, sugerindo que a ferritina possui efeito citoprotetor.⁷⁸ O efeito pró-oxidante da ferritina foi visto quando ânion radical superóxido, formado ou enzimaticamente, ou por efeito de radiação ou por xenobióticos, causou a liberação do ferro da ferritina ($O_2^{\bullet-} + Fe^{3+}\text{-ferritina} \rightarrow O_2 + Fe^{2+}\text{-apoferritina}$).⁷⁹ Isto é consistente com a observação de que a degradação autofágica da ferritina é uma fonte de liberação de ferro em cultura de hepatócitos.⁸⁰

Além da “hipótese do ferro”, existe uma segunda linha de evidências para a relação entre ferritina e DAC, a epidemiológica, em que o risco para DAC se correlaciona com níveis de ferritina sérica e ocasionalmente com outras medidas de estoque de ferro, como a saturação de transferrina.⁴⁸ Salonen e col.⁸¹ fizeram o primeiro relato da associação significativa entre os níveis séricos de ferritina e o risco de infarto do miocárdio em homens de meia idade que foram acompanhados durante três anos. Homens com níveis de ferritina $\geq 200 \mu\text{g/L}$ tinham 2,2 vezes mais risco de ter um infarto do miocárdio do que homens com níveis de ferritina baixos, sendo que esta associação foi maior quando os níveis de LDL eram maiores ($\geq 5,0 \text{ mmol/L}$).

Posteriormente, outros estudos também confirmaram essa relação, como o de Kiechl e col.⁸² que analisaram 847 indivíduos com idade entre 40 e 79 anos em um estudo transversal, relacionando análises de aterosclerose nas carótidas por acesso sonográfico e os estoques de ferro. Este grupo de pesquisadores continuou acompanhando a progressão da aterosclerose nos pacientes, e, após cinco anos, ajustando para fatores de confusão e para o status vascular basal, também constatou significativa relação entre a progressão da doença e os níveis séricos de ferritina.⁸³ Interessantemente, a diminuição dos estoques de ferro mostrou reduzir o risco de infarto do miocárdio, concordando com os resultados citados anteriormente. Facchini e Saylor⁸⁴ analisaram o efeito da depleção de ferro nos fatores de risco para doenças cardiovasculares em 31 pacientes que foram submetidos à flebotomia mensal ou bimestralmente. Observaram que houve um significativo aumento na lipoproteína de alta densidade (HDL – *high density lipoprotein*) e redução do LDL. Outro estudo prospectivo conduzido por 5,5 anos, envolvendo 2.682 homens, encontrou que o risco de infarto do miocárdio obteve um decréscimo de 86% em doadores de sangue, comparando-os com não-doadores.⁸⁵ Somando-se a estas evidências, e sabendo que há maior deposição de ferro na forma de ferritina e hemoglobina na lesão aterosclerótica, outro estudo mostrou que a exposição dos macrófagos ao LDL-ox leva a um aumento da secreção de ferritina por estas células, e a exposição ao HDL leva a uma diminuição dessa secreção,⁸⁶ evidenciando a íntima relação entre ferritina e fatores de risco para DAC.

A isquemia em tecidos e a hipóxia se incluem na lista de fatores que afetam os níveis de ferritina. Em modelo animal de hipóxia-isquemia em cérebro de ratos, houve acúmulo de ferritina em células da microglia e na massa branca subcortical, bem como em hemisférios cerebrais nos quais se induziu a hipóxia.⁸⁷ As mudanças

causadas nos níveis de ferritina durante a hipóxia são mediadas em parte pelas IRPs.⁷ O período de reperfusão após a isquemia é crítico para o dano oxidativo, pois esse dano é máximo em muitos tecidos como cérebro, coração e outros órgãos. A ferritina parece ser regulada tanto transcricionalmente quanto pós-transcricionalmente pelos eventos de isquemia e reperfusão.⁸⁸ Durante o período de reoxigenação pós-isquêmico, a degradação da ferritina e a sua transcrição são ajustadas, e ocorre a concomitante regulação negativa das IRPs, este efeito foi sugerido como resposta do órgão para diminuir o dano oxidativo.⁸⁹ Essa ligação entre ferritina e eventos de hipóxia e reoxigenação levam a crer que a ferritina também possa estar alterada em indivíduos com SAOS, pois esses eventos são característicos dessa síndrome.

II – TRABALHO EXPERIMENTAL/ARTIGO CIENTÍFICO

- Intenção de submissão ao periódico:

“*Blood*” (<http://bloodjournal.hematologylibrary.org>)

Níveis de Pró-hepcidina e Ferritina em Indivíduos com Apnéia do Sono e Doença Arterial Coronariana

Tássia Machado Medeiros, Cristini Klein, Fernanda Schäfer Hackenhaar, Paulo Vinicius Gil Alabarse, Fabíola Suris Silveira, Denis Martinez, Marco Vugman Wainstein, Sandro Cadaval Gonçalves, Mara Silveira Benfato.

- Não há nenhum conflito de interesse sobre o trabalho;
- O presente trabalho será submetido exclusivamente para este periódico, e os resultados contidos no manuscrito são todos originais;
- Tipo de documento: *Brief report* (experimento original);
- Categoria do Trabalho: Cardiorespiratório.

Níveis de Pró-hepcidina e Ferritina em Indivíduos com Apnéia do Sono e Doença Arterial Coronariana

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

¹ Departamento de Biofísica;

² Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular;

³ Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil;

⁴ Unidade de Cardiologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Resumo

A Síndrome da Apnéia Obstrutiva do Sono (SAOS) tem sido associada ao desenvolvimento de desordens relacionadas com inflamação e estresse oxidativo, como por exemplo, a Doença Arterial Coronariana (DAC). O aumento de citocinas inflamatórias e a formação de espécies reativas durante eventos de hipóxia e reoxigenação em pacientes com SAOS podem afetar diversos fatores envolvidos na homeostase do ferro, como a ferritina e pró-hepcidina. O objetivo do presente estudo foi contribuir para o esclarecimento dos mecanismos envolvidos nessa associação, verificando a possível relação entre pró-hepcidina e ferritina com SAOS e DAC. Participaram do estudo 56 pacientes encaminhados para a realização de angiografia por suspeita de DAC. Além dos níveis hematimétricos e de pró-hepcidina, os pacientes foram submetidos à polissonografia para a determinação do Índice de Apnéia e Hipopnéia (IAH), bem como à dosagem de proteína-C-reativa ultra sensível (marcador inflamatório). Em um modelo de regressão (Poisson), foi encontrado que o aumento de uma unidade da IAH, aumenta o risco de DAC em 29.3%. Em um modelo de regressão multivariada, controlando para idade, sexo e IMC, verificou-se que a ferritina e o IAH predizem 30,4% da variância da pró-hepcidina. Portanto, demonstrou-se que esses eventos encontram-se relacionados, e se sugere que estes fatores podem estar agindo hierarquicamente para a regulação dessas proteínas envolvidas na homeostase do ferro.

Palavras-chave: Apnéia do sono, aterosclerose, ferritina e pró-hepcidina.

Introdução

A Síndrome da Apnéia Obstrutiva do Sono (SAOS) é caracterizada por períodos de hipóxia e reoxigenação. Ambos os eventos estão associados com a formação de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO).¹⁻³ A SAOS é fortemente relacionada com o aumento da morbidade e mortalidade cardiovascular, incluindo maior risco de disfunção endotelial e aterosclerose,^{1,4} bem como o aumento dos níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias.⁵ O ferro é importante para a manutenção das funções celulares em todos os organismos vivos, mas pode ser considerado tóxico em sistemas celulares devido a sua capacidade em participar da geração de espécies reativas.⁶ Vários elementos envolvidos na homeostase do ferro já foram descritos como tendo um importante papel na patogênese de doenças caracterizadas por inflamação, infecção, injúria e reparo, por exemplo, doenças vasculares causadas por isquemia-reoxigenação e aterosclerose.⁷ Entre esses elementos encontra-se a hepcidina, um hormônio peptídico com a função central de regular a homeostase do ferro, sendo um regulador de sua absorção, reciclagem e mobilização.⁸ Este hormônio é produzido nos hepatócitos na forma de um pré-pró-hormônio, sendo liberado na circulação na forma de pró-hepcidina e ativado pela ação de uma serino peptidase (furina), que cliva o peptídeo gerando a hepcidina, acarretando um decréscimo dos níveis de ferro circulantes.⁹ A produção da hepcidina apresenta-se aumentada durante inflamação, infecção e hiperferremia e inibida em anemia e hipóxia.⁸ Kanbay e Hasanoglu (2007)² hipotetizaram uma possível relação entre hepcidina e SAOS, sugerindo que a hepcidina poderia ser um marcador prognóstico de doenças inflamatórias em indivíduos com SAOS, já que apnéia do sono vem sendo descrita como possível fator de risco para doenças inflamatórias, como as doenças cardiovasculares, dentre elas mais notavelmente, a hipertensão.⁴

Além da hepcidina, a ferritina também possui seu papel na homeostase do ferro, seqüestrando o excesso de ferro livre para uma forma atóxica. Elevados níveis de ferritina são associados com aumentado risco de Doença Arterial Coronariana (DAC) e Infarto do Miocárdio.¹⁰ Tendo em vista que até o presente não existem estudos relacionando SAOS e DAC com níveis de pró-hepcidina e ferritina, o objetivo deste estudo foi esclarecer aspectos desta associação, controlando para possíveis fatores de confusão.

Materiais e Métodos

Amostragem

Um estudo transversal foi desenhado incluindo pacientes com idade entre 35 e 65 anos (n=56), os quais haviam sido encaminhados por prescrição médica para a realização de angiografia coronária de diagnóstico ou de terapia devido a suspeita de DAC, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Os critérios de exclusão foram: tabagismo nos últimos seis meses; diagnóstico clínico, dieta ou tratamento farmacológico para diabetes mellitus; angina durante a semana anterior à triagem; uso de medicamentos ansiolíticos; tratamento para doença pulmonar crônica; uso de suplementação vitamínica; Índice de Massa Corporal (IMC) > 40 Kg/m²; possuir qualquer dificuldade física, psicológica ou social, as quais pudessem impedir a realização da polissonografia e prévia intervenção (revascularização miocárdica ou angioplástica). O projeto foi aprovado pelo comitê de ética institucional (HCPA) e todos os participantes assinaram o termo de consentimento informado e esclarecido.

Aproximadamente 20 mL de sangue arterial de cada paciente foram coletados através da punção da artéria femural para a realização de cateterismo, sendo coletados em três frascos: ativador de coagulação, EDTA e citrato. As amostras foram refrigeradas a 0°C, centrifugadas por 10 minutos a 1.500 g, aliquotadas em microtubos e estocadas a -80°C.

Análise da Angiografia

Os pacientes realizaram angiografia quantitativa, todos com o mesmo equipamento de projeção, e a análise dos resultados foi feita por um médico, cego

para os demais fatores analisados neste estudo. Foi definida como DAC significativa a obstrução de mais de 30% de uma ou mais coronárias, e os controles foram pacientes sem lesão ou com menos de 30% do estreitamento luminal

Estudo do Sono

O Estudo do sono foi realizado com um aparelho de polissonografia portátil na residência do paciente, utilizando um monitor nível III (*SomnoCheck, Weinmann, Germany*), onde foram monitorados fluxo aéreo e roncos, além de esforço inspiratório, oximetria de pulso, frequência cardíaca e posição do sono.¹¹ O IAH foi calculado dividindo-se o número total de apnéias e hipopnéias pelo total de horas de sono (período gravado), e expresso como episódios de apnéia/hipopnéia por hora, sendo que apnéias foram definidas como a redução do fluxo aéreo a 10% ou menos do valor inicial num período de 10 segundos ou mais; hipopnéias como a redução do fluxo aéreo a 50% ou mais, associada à diminuição da saturação de oxigênio de 3% ou mais.

Ensaio

A concentração de pró-hepcidina foi mensurada no soro por um ensaio imunoenzimático (*Hepcidin Prohormone – ELISA, DRG® Instruments, Marburg, Germany*). Glicose, proteína-C-reativa ultra-sensível (CRP-us), hematócrito, hemoglobina, transferrina, ferro e ferritina foram medidos por técnicas de análises clínicas convencionais.

Análise Estatística

Os pacientes foram divididos em quatro grupos: controle, apnéia/hipopnéia leve, moderada e grave. As variáveis estão apresentadas como média \pm desvio

padrão, e as médias foram comparadas por ANOVA. Variáveis que apresentaram distribuição assimétrica foram normalizadas utilizando \ln , raiz quadrada e $1/x^2$. Indivíduos com DAC foram comparados pelo teste Mann Whitney, comparando os grupos dois a dois. Para verificar associação entre as variáveis analisadas, utilizou-se a correlação de Pearson. Regressão linear multivariada utilizou-se para prever as variáveis que estão envolvidas com a pró-hepcidina, controlando para fatores de confusão (idade, sexo e IMC). Para prever DAC, foi utilizado um modelo de regressão, modo Poisson.

Resultados e Discussão

Dos 56 pacientes incluídos no estudo, 9 apresentavam apnéia/hipopnéia grave (IAH>30), 18 apnéia/hipopnéia moderada (IAH \geq 15-30), 17 apnéia/hipopnéia leve (IAH \geq 5-14) e 12 foram considerados controles (IAH<5). A tabela 1 mostra os dados clínicos, bioquímicos e antropométricos dos pacientes nos diferentes grupos.

Analisando as médias apresentadas na tabela supramencionada, encontrou-se diferença significativa entre os níveis de ferritina do grupo controle em comparação com o grupo com apnéia/hipopnéia grave, bem como entre o grupo com apnéia/hipopnéia leve comparando com o de apnéia/hipopnéia grave. Também foi observada maior percentagem de indivíduos com DAC nos grupos com apnéia/hipopnéia moderada e grave, sendo significativamente maior quando comparados com o grupo controle.

Verificou-se correlação significativamente positiva entre ferritina e IAH ($r = 0,398$; $P = 0,002$), ferritina e pró-hepcidina ($r = 0,432$; $P = 0,001$); e ferritina e ferro ($r = 0,346$; $P = 0,009$). Correlação significativamente negativa foi encontrada entre ferritina e transferrina ($r = -0,281$; $P = 0,036$). Houve uma tendência de correlação negativa entre IAH e transferrina ($r = -0,261$; $P = 0,052$). Incluindo como regressores IAH e ferritina no modelo de regressão de Poisson, verificou-se que o aumento de uma unidade da raiz quadrada de IAH aumenta o risco de desenvolver DAC em 29,3%. Para avaliar as possíveis variáveis que poderiam estar influenciando os níveis séricos de pró-hepcidina, foi desenhado um modelo de regressão linear multivariada, sendo este o primeiro trabalho a realizar esta análise para esses fatores. Utilizando a pró-hepcidina como variável dependente em um modelo de regressão linear multivariada, constatou-se uma relação positiva com a raiz quadrada da ferritina e

uma relação negativa com a raiz quadrada do IAH, ajustando para idade, sexo e IMC, sendo que ferritina e IAH predizem 30,4% da variância da pró-hepcidina.

Os eventos de hipóxia e reoxigenação têm por consequência a formação de ERO.^{3,4} É sabido que a hipóxia afeta o metabolismo do ferro, mas pouco ainda se sabe sobre os mecanismos que regulam a expressão de hepcidina pelas ERO. Choi e col¹² sugeriram que as ERO produzidas durante a hipóxia, em células hepáticas humanas, causariam a inibição da ligação de ativadores da transcrição da hepcidina, tal como “*Signal Transducers and Activators of Transcription protein-3*” (STAT-3) e “*CCAAT/enhancer-binding protein*” (C/EBP), na região promotora do gene da hepcidina, levando a redução de sua transcrição, bem como o decréscimo nos níveis de pró-hepcidina. Este resultado corrobora com a correlação negativa encontrada entre pró-hepcidina e IAH, indicando que a hipóxia pode estar interferindo nos níveis de pró-hepcidina. Além disso, a hipóxia possui um importante papel na eritropoiese, regulando a liberação renal de eritropoietina.¹³ Um outro estudo evidenciou a relação entre eritropoietina e hepcidina em humanos, onde a administração de eritropoietina causou a redução dos níveis de hepcidina.¹⁴ A hipóxia também possui efeitos sobre os níveis de ferritina, os quais podem ser causados também pela geração de ERO. A resposta da ferritina à isquemia e reoxigenação parece ser regulada tanto em nível transcricional quanto pós-transcricional. Estudos ainda se mostram controversos quanto a esse assunto,⁷ e a validade dos marcadores de estoque de ferro na avaliação da atividade eritropoiética vem sendo discutida.¹⁵

A SAOS está fortemente associada com processos inflamatórios, e, portanto com o aumento de marcadores inflamatórios como a IL-6, PCR,¹⁶ TNF- α .⁵ Isto é evidenciado pelo fato de que o tratamento de pessoas com SAOS pelo uso de um aparelho que mantém a pressão positiva contínua nas vias aéreas superiores (CPAP -

“*Nasal Continuous Positive Airway Pressure*”) causa o decréscimo dos níveis de algumas destas citocinas.¹⁶ A hepcidina é regulada positivamente pela inflamação, e sofre influência de citocinas inflamatórias como IL-6, IL-1 α , IL-8 e TNF- α .⁸ A IL-6 é o maior regulador da resposta de fase aguda nos hepatócitos e induz a expressão do mRNA da hepcidina através da indução de STAT-3, e por esse motivo a hepcidina é classificada como uma proteína inflamatória de fase II.¹⁷ A CRP-us é um importante marcador inflamatório, sugerido como preditor de risco para aterosclerose e DAC.¹⁶ De acordo com “*Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association*”,¹⁸ os valores de referência para o uso CRP-us como marcador inflamatório em doenças cardiovasculares são: <1,0 mg/L de baixo risco, de 1,0 a 3,0 mg/L de médio risco e >3,0 mg/L de alto risco. No presente estudo, valores referentes à presença de alto risco para doenças cardiovasculares foram encontrados nos quatro grupos, indicando que os indivíduos incluídos no estudo se encontram em processo inflamatório, sendo que o nível de CRP-us é maior nos indivíduos com apnéia/hipopnéia grave, onde a percentagem de indivíduos com DAC também é maior. Os valores encontrados para pró-hepcidina também foram considerados altos (valores para indivíduos saudáveis indicados pelo kit – de 58,9 a 158,1 ng/mL), sugerindo influência da inflamação sobre os níveis de pró-hepcidina.

A ferritina é outro fator importante para a aterosclerose, pois é considerada um antioxidante, imobilizando o ferro livre que poderia participar da geração de ERO através da reação de Fenton, sendo que essas ERO, tais como o radical hidroxila, oxigênio singlet ou peróxido de hidrogênio podem causar a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL-colesterol, “*low-density lipoprotein*”), o qual possui papel chave no desenvolvimento de DAC,¹⁰ pois pode iniciar o processo aterosclerótico devido ao seu transporte através de endotélio e deposição na parede

arterial.¹⁹ Por outro lado, a ferritina pode ser vista como um pró-oxidante pela liberação do ferro que ela estoca, sendo que o ânion superóxido pode ser o responsável. Por este motivo, a ferritina também pode ser vista como um fator de risco para DAC devido a essa característica pró-oxidante. A ferritina também possui sua síntese induzida por citocinas inflamatórias como o TNF α , IL-1 α e IL-6, e altos níveis de ferritina estão ligada a processos inflamatórios e aterosclerose.^{8,10} Além da inflamação, o estresse oxidativo é capaz de ativar múltiplas vias da regulação da ferritina. Os oxidantes podem induzir a síntese de ferritina por ação direta nas regiões conservadas do gene da ferritina, ou inativando proteínas reguladoras do ferro (IRP – “*iron responsive protein*”), ou ainda pela liberação do ferro de proteínas celulares. Importante citar aqui que o LDL-colesterol oxidado é um dos oxidantes que se mostrou capaz de estimular a síntese da ferritina,^{7,10} A hipóxia regula a síntese da ferritina, pelo menos em parte, por influência nas IRPs (1 e 2), em duas fases distintas: uma inicial onde IRP1 aumenta a síntese de ferritina, e uma tardia onde a IRP2 diminui a síntese.²⁰ Os resultados apresentados neste estudo mostram que a ferritina encontra-se significativamente aumentada nos pacientes com apnéia/hipopnéia grave, justamente o grupo onde a presença de DAC é maior, corroborando com dados da literatura. Também se observou que nos indivíduos incluídos no estudo, assim como os valores de CRP-us e pró-hepcidina, os valores de ferritina também se encontram mais altos do que os valores de referência (20 a 250 $\mu\text{g/L}$).²¹

Para tentar elucidar a regulação da hepcidina em patologias que estão relacionadas tanto ao aumento da resposta inflamatória quanto a hipóxia, como é o caso da SAOS, Huang e col.²² realizaram uma série de experimentos, mostrando que

a hipóxia, analisada isoladamente, levou a supressão do mRNA da hepcidina, mas não conseguiu bloquear a indução de sua expressão pela inflamação. Nestes experimentos, os efeitos da eritropoetina se sobrepuseram aos efeitos da hipóxia e inflamação. Esses dados sugerem que os níveis de hepcidina são determinados pela força individual de cada fator regulador, porém os autores enfatizam que estes resultados são limitados às doses de eritropoetina, hipóxia ou lipopolissacarídeos utilizadas nos experimentos. De acordo com este trabalho, dados da literatura e os resultados apresentados no presente estudo, a síntese da hepcidina é regulada por diversos fatores, parecendo existir certa hierarquia entre eles devido a suas forças reguladoras. Esta hierarquia também pode ser observada para a regulação da ferritina, assim como ocorre em diversas rotas da regulação da síntese e supressão de diversas proteínas. Além disso, os fatores analisados estariam influenciando diferentemente nos níveis dos intermediários da rota da hepcidina, desde o seu mRNA, passando pela pró-hepcidina, até chegar a hepcidina ativada.

Em resumo, os resultados deste trabalho mostraram que DAC obteve relação positiva com IAH (regressão - Poisson), como o esperado. IAH obteve relação negativa com pró-hepcidina (regressão multivariada), e correlação positiva com ferritina, mostrando que a hipóxia pode estar causando a diminuição da proteína que inibe a absorção do ferro (hepcidina) e aumentando o estoque de ferro (ferritina). A pró-hepcidina relacionou-se positivamente com a ferritina (regressão multivariada). Na figura 1 foram desenhados esquematicamente esses achados para a melhor compreensão. É possível observar que a ferritina possui relação direta tanto com a pró-hepcidina quanto com IAH, sendo que ambos influenciam em seus níveis, um causando sua diminuição e o outro o seu aumento. O resultado final dessa relação

dependerá da força individual de cada um, respeitando certa hierarquia. Esta hierarquia também pode ser observada para a regulação da pró-hepcidina, assim como ocorre em diversas rotas da regulação da síntese e supressão de diversas proteínas. Além disso, os fatores analisados podem estar influenciando nos níveis dos intermediários da rota da hepcidina, participando na regulação de mecanismos pré e pós-transcricionais.

Agradecimentos

Este trabalho recebeu subsídio do Governo Brasileiro, através do Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE – HCPA), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (Fapergs).

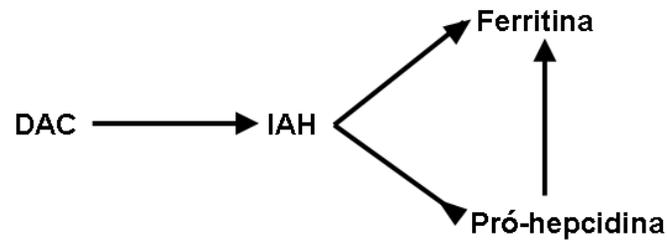
Lista de Tabela e Figura

Tabela 1. Características clínicas e bioquímicas dos pacientes incluídos no estudo

Variáveis	Controle (IAH<5)	Leve (IAH≥ 5-14)	Moderada (IAH≥ 15-30)	Grave (IAH> 30)
Sexo masculino (n)	3 (12)	9 (17)	10 (18)	8 (9)
Idade (anos)	50,92±7,5	51,55±6,8	56,39±6,2	58,22±4,4
IMC (Kg/m ²)	27,09±4,3	28,07±4,2	27,70±3,3	26,73±3,7
% Indivíduos com DAC por grupo	8,3 ^{ab}	58,8	66,7 ^a	77,8 ^b
Glicose (mg/dL)	102,25±15,3	105,67±9,3	110,89±9,8	102,33±10,9
CRP-us (mg/L)	4,38±5,8	4,17±4,9	4,64±6,0	5,04±5,6
Hematócrito (%)	38,16±3,0	40,09±3,7	40,34±3,2	41,0±2,5
Hemoglobina (g/dL)	12,84±1,5	13,39±1,4	13,51±1,3	13,81±1,1
Transferrina (mg/dL)	275,50±60,6	242,06±29,4	238,22±38,0	231,89±32,8
Ferro (µg/mL)	79,58±23,3	84,65±26,2	83,05±29,8	84,11±23,3
Ferritina (µg/L)	146,11 ^b ±135,4	178,09 ^c ±140,6	267,79±167,2	364,29 ^{b c} ±235,0
Pró-hepcidina (ng/mL)	312,29±39,2	314,39±39,0	313,87±25,8	294,11±34,3

Variáveis são apresentadas como média±DP. As variáveis com distribuição assimétrica foram transformadas para ln, raiz quadrada e 1/x² (transferrina, ferro, CRP-us e hemoglobina; ferritina; e glicose respectivamente). As médias foram comparadas por ANOVA. DAC foi comparada pelos seus mínimos e máximos (com DAC, <30% de estenose; sem DAC >30%), sendo a média do número de indivíduos comparada por teste Mann Whitney, combinando os grupos dois a dois. IC.: P<0,05. (^a) indica diferença entre controle e moderada; (^b) indica diferença controle e grave; (^c) indica diferença entre leve e grave.

a)



b) $(IAH)^x \propto \frac{(Ferritina)^y}{(Pró-hepcidina)^z} \longrightarrow (Ferritina)^y \propto (IAH)^x \cdot (Pró-hepcidina)^z$

Figura 1. Representação esquemática dos resultados encontrados através das regressões e correlações. **a)** DAC → IAH – relação positiva encontrada na regressão de Poisson (B = 0,257; P = 0,001; risco relativo = 1,293). IAH → Ferritina – relação positiva encontrada na correlação de Pearson (r = 0,398; P = 0,002). IAH ← Pró-hepcidina – relação negativa encontrada na regressão linear multivariada (B = -0,366; P = 0,012). Pró-hepcidina → Ferritina – relação positiva encontrada na correlação de Pearson (r = 0,432; P = 0,001) e regressão linear multivariada (B = 0,574; P = 0,001). O R² da regressão linear multivariada é 0,304. **b)** Equação representativa para ilustrar relação de proporcionalidade direta e indireta das variáveis analisadas. “x”, “y” e “z” indicam força regulatória (sendo x > z).

Referências

1. Butt M, Dwivedi G, Khair O, Lip GYH. Obstructive sleep apnea and cardiovascular disease. *International Journal of Cardiology*. 2010;139:7-16.
2. Kanbay A, Hasanoglu HC. A new prognostic marker for obstructive sleep apnea: Hepcidin. *Medical Hypotheses*. 2007;69:1381-1382.
3. Guzy RD, Schumacker PT. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Experimental Physiology*. 2006;91:807-819.
4. Lavie L. Obstructive sleep apnoea syndrome - an oxidative stress disorder. *Sleep Medicine Reviews*. 2003;7:35-51.
5. Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation*. 2005;112:2660-2667.
6. Halliwell B GJ. *Free Radicals in Biology and Medicine* (ed 3rd). New York: Oxford University Press; 2007.
7. Torti FM, Torti SV. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood*. 2002;99:3505-3516.
8. Ganz T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood*. 2003;102:783-788.
9. Schranz M, Bakry R, Creus M, Bonn G, Vogel W, Zoller H. Activation and inactivation of the iron hormone hepcidin: Biochemical characterization of prohepcidin cleavage and sequential degradation to N-terminally truncated hepcidin isoforms. *Blood Cells Molecules and Diseases*. 2009;43:169-179.
10. You SA, Wang Q. Ferritin in atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta*. 2005;357:1-16.
11. de Oliveira ACT, Martinez D, Vasconcelos LFT, et al. Diagnosis of Obstructive Sleep Apnea Syndrome and Its Outcomes With Home Portable Monitoring. *Chest*. 2009;135:330-336.
12. Choi SO, Cho YS, Kim HL, Park JW. ROS mediate the hypoxic repression of the hepcidin gene by inhibiting C/EBP alpha and STAT-3. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007;356:312-317.
13. Knaupp W, Khilnani S, Sherwood J, Scharf S, Steinberg H. Erythropoietin Response to Acute Normobaric Hypoxia in Humans. *Journal of Applied Physiology*. 1992;73:837-840.

14. Ashby DR, Gale DP, Busbridge M, et al. Erythropoietin administration in humans causes a marked and prolonged reduction in circulating hepcidin. *Haematologica-the Hematology Journal*. 2010;95:505-508.
15. Goodnough LT, Skikne B, Brugnara C. Erythropoietin, iron, and erythropoiesis. *Blood*. 2000;96:823-833.
16. Yokoe T, Minoguchi K, Matsuo H, et al. Elevated levels of C-reactive protein and interleukin-6 in patients with obstructive sleep apnea syndrome are decreased by nasal continuous positive airway pressure. *Circulation*. 2003;107:1129-1134.
17. Wrighting DM, Andrews NC. Interleukin induces hepcidin expression through STAT3. *Blood*. 2006;108:3204-3209.
18. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease application to clinical and public health practice - A statement for healthcare professionals from the centers for disease control and prevention and the American Heart Association. *Circulation*. 2003;107:499-511.
19. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 2005;25:29-38.
20. Schneider BD, Leibold EA. Effects of iron regulatory protein regulation on iron homeostasis during hypoxia. *Blood*. 2003;102:3404-3411.
21. Burtis CA AE, Bruns DE. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnosis* (ed 4th). St. Louis: Elsevier Saunders; 2006.
22. Huang H, Constante M, Layoun A, Santos MM. Contribution of STAT3 and SMAD4 pathways to the regulation of hepcidin by opposing stimuli. *Blood*. 2009;113:3593-3599.

Tabelas e Figuras Suplementares

Tabela Suplementar 1. Resultados do modelo de Regressão de Poisson para prever DAC

Variáveis Independentes	B	P	RR (IC)
rq Ferritina	0,016	0,536	1,016 (0,966 - 1,069)
rq IAH	0,257	0,001	1,293 (1,108 - 1,510)

DAC foi utilizada como variável dependente. rq (raiz quadrada). IC.: $P < 0,05$.

Tabela Suplementar 2. Modelo de regressão linear multivariada utilizando a Pró-hepcidina como variável dependente

Variável Independente	B	P
Idade	-0,072	0,614
Sexo	0,037	0,823
IMC	0,125	0,325
rq IAH	-0,366	0,012
rq Ferritina	0,574	0,001
R^2	0,304	

B indica coeficiente de regressão padronizado e R^2 o coeficiente de. IC.: $P < 0,05$.

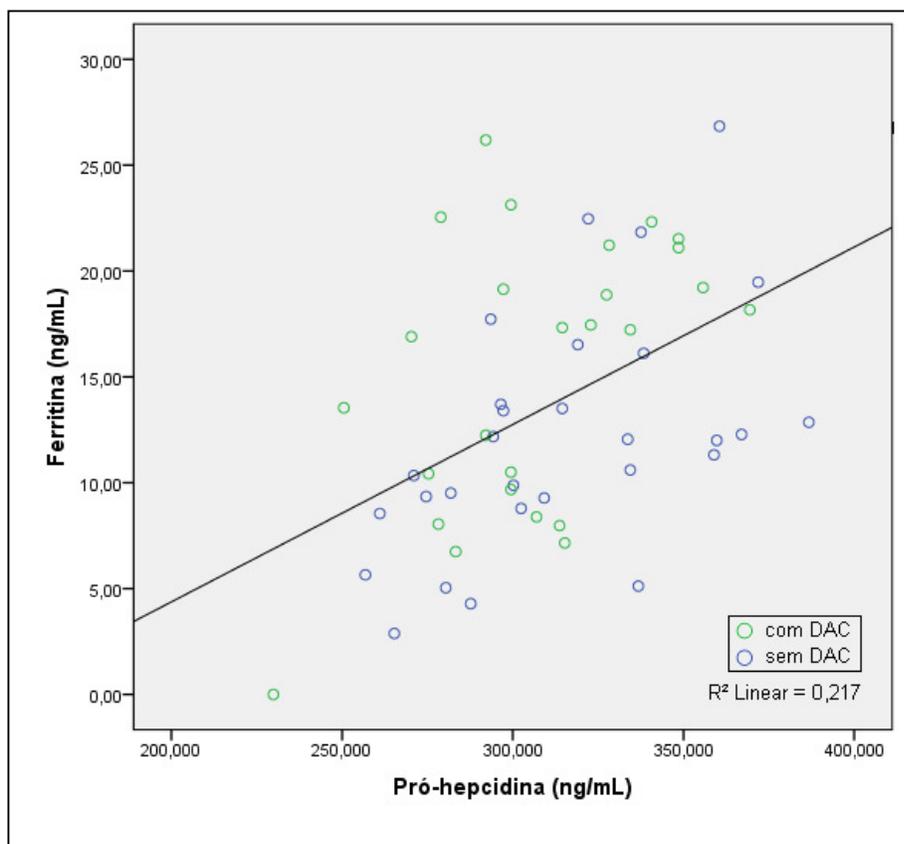


Figura Suplementar 1. Correlação de Pearson da concentração sérica de Ferritina x concentração sérica de Pró-hepcidina. Círculos verdes indicam pacientes com DAC ($\geq 30\%$ de estenose) e círculos azuis indicam pacientes sem DAC ($< 30\%$ de estenose).

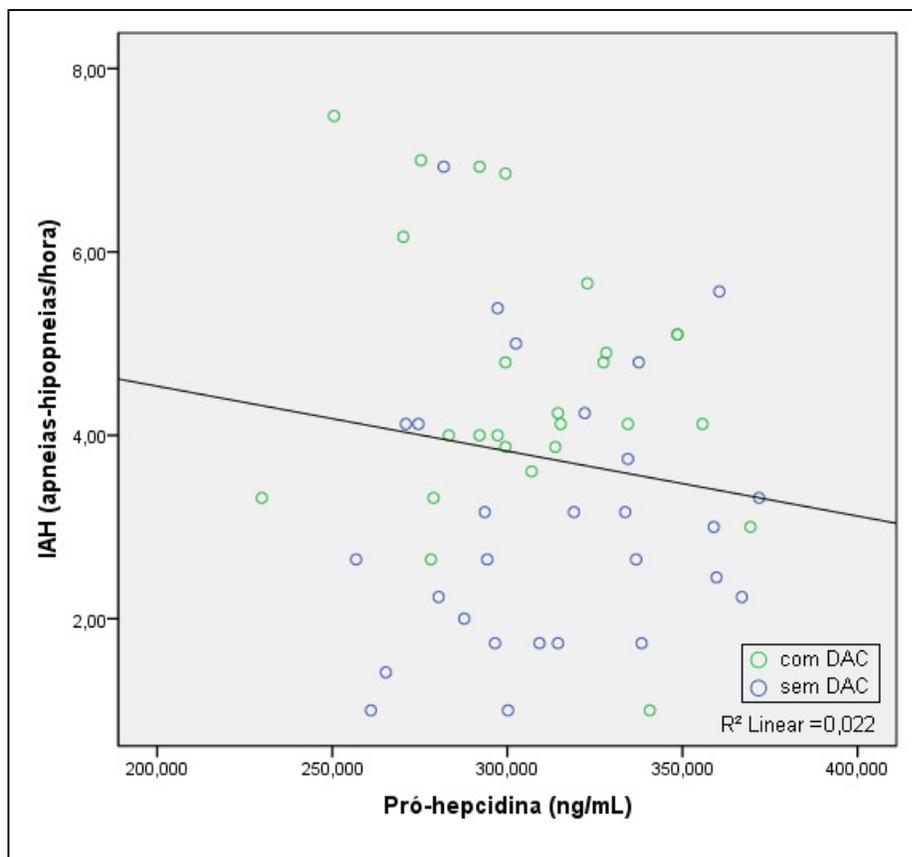


Figura Suplementar 2. Correlação de Pearson da IAH x concentração sérica de Pró-hepcidina. Círculos verdes indicam pacientes com DAC ($\geq 30\%$ de estenose) e círculos azuis indicam pacientes sem DAC ($< 30\%$ de estenose).

III – CONCLUSÕES

Através da realização desta pesquisa foi possível mostrar a relação entre os distúrbios discutidos ao longo trabalho, SAOS e DAC, e a relação destes com o metabolismo e manutenção da homeostase do ferro.

Nos indivíduos estudados, a associação entre SAOS e DAC se mostrou evidente pela percentagem de indivíduos com DAC aumentar de acordo com a gravidade do distúrbio do sono. Este resultado corrobora com os descritos na literatura e se torna mais uma afirmação da ligação entre essas doenças.

Os estoques de ferro também se mostraram importantes na fisiopatologia desses distúrbios, pois correlacionaram-se com a SAOS, através do IAH, tanto as medidas de pró-hepcidina e ferritina. Foi observado que os níveis de ferritina e a percentagem de indivíduos com DAC aumentam conforme a gravidade do IAH aumenta, já o contrário foi visto para a pró-hepcidina.

As análises de regressão nos permitiram analisar como as correlações estavam se inter-relacionando, evidenciando a associação DAC e IAH, e a relação IAH, ferritina e pró-hepcidina. Através dessa análise verificou-se forte relação da DAC com IAH, onde o aumento de IAH causa o aumento das chances de desenvolver DAC (29,3%). Além disso, também se constatou que IAH e ferritina causam influência sobre os níveis de pró-hepcidina, predizendo 30,4% de sua variância.

Por meio deste trabalho, pode-se sugerir que as mudanças ocasionadas por eventos relacionados a esses distúrbios, tanto inflamação quanto hipóxia, causam alterações individuais no organismo, e que o resultado da soma dessas alterações individuais será o resultado final verificado no organismo. Mediante este raciocínio e

dos resultados obtidos, é possível se pensar que tais fatores agem hierarquicamente, e que o resultado da soma dependerá da força individual que cada fator exercer. Desta forma, acredita-se que a hipóxia esteja exercendo uma força maior para a regulação do estoque de ferro por meio da ferritina, no caso deste estudo.

IV – PERSPECTIVAS

Os resultados adquiridos com a realização deste trabalho causaram o levantamento de questões a serem respondidas. Para tais respostas, mais fatores precisam ser medidos e avaliados para um maior entendimento dos mecanismos envolvidos na associação entre DAC, SAOS e homeostase do ferro.

Portanto, como perspectivas iniciais da continuação deste trabalho destacam-se:

- Medida de mais marcadores inflamatórios, como IL-6;
- Além da mensuração de pró-hepcidina, mensurar também o peptídeo ativo, hepcidina;
- Medir mais indicadores de estoque de ferro, como saturação da transferrina e apoferritina.
- Medida de biomarcadores de DAC como LDL-ox e paraoxonase (enzima redutora do LDL-ox, presente no HDL).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ADICIONAIS

23. McNicholas WT, Krieger J, Task Force M. Public health and medicolegal implications of sleep apnoea (vol 20, pg 1594, 2002). *European Respiratory Journal*. 2003;21:561-561.
24. Arens R, Marcus CL. Pathophysiology of upper airway obstruction: a developmental perspective. *Sleep*. 2004;27:997-1019.
25. Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Weber S, Badr S. The Occurrence of Sleep-Disordered Breathing among Middle-Aged Adults. *New England Journal of Medicine*. 1993;328:1230-1235.
26. Flemons WW, Buysse D, Redline S, et al. Sleep-related breathing disorders in adults: Recommendations for syndrome definition and measurement techniques in clinical research. *Sleep*. 1999;22:667-689.
27. Suzuki YJ, Jain V, Park AM, Day RM. Oxidative stress and oxidant signaling in obstructive sleep apnea and associated cardiovascular diseases. *Free Radical Biology and Medicine*. 2006;40:1683-1692.
28. Mehra R, Benjamin EJ, Shahar E, et al. Association of nocturnal arrhythmias with sleep-disordered breathing - The Sleep Heart Health Study. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2006;173:910-916.
29. Chesson AL, Berry RB, Pack A. Practice parameters for the use of portable monitoring devices in the investigation of suspected obstructive sleep apnea in adults. *Sleep*. 2003;26:907-913.
30. Kushida CA, Littner MR, Hirshkowitz M, et al. Practice parameters for the use of continuous and bilevel positive airway pressure devices to treat adult patients with sleep-related breathing disorders. *Sleep*. 2006;29:375-380.
31. Young T, Peppard PE, Gottlieb DJ. Epidemiology of obstructive sleep apnea - A population health perspective. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2002;165:1217-1239.
32. Arnardottir ES, Mackiewicz M, Gislason T, Teff KL, Pack AI. Molecular Signatures of Obstructive Sleep Apnea in Adults: A Review and Perspective. *Sleep*. 2009;32:447-470.
33. Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Systemic inflammation: a key factor in the pathogenesis of cardiovascular complications in obstructive sleep apnoea syndrome? *Thorax*. 2009;64:631-636.
34. Meier-Ewert HK, Ridker PM, Rifai N, et al. Effect of sleep loss on C-reactive protein, an inflammatory marker of cardiovascular risk. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;43:678-683.

35. Vgontzas AN, Zoumakis E, Bixler EO, et al. Adverse effects of modest sleep restriction on sleepiness, performance, and inflammatory cytokines. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004;89:2119-2126.
36. McNicholas WT, Bonsignore MR, Management Comm ECAB. Sleep apnoea as an independent risk factor for cardiovascular disease: current evidence, basic mechanisms and research priorities. *European Respiratory Journal*. 2007;29:156-178.
37. Genestra M. Oxy radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular Signalling*. 2007;19:1807-1819.
38. Li CY, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2002;282:C227-C241.
39. Barcelo A, Miralles C, Barbe F, Vila M, Pons S, Augusti AGN. Abnormal lipid peroxidation in patients with sleep apnoea. *European Respiratory Journal*. 2000;16:644-647.
40. Yamauchi M, Nakano H, Maekawa J, et al. Oxidative stress in obstructive sleep apnea. *Chest*. 2005;127:1674-1679.
41. Lavie L, Vishnevsky A, Lavie P. Evidence for lipid peroxidation in obstructive sleep apnea. *Sleep*. 2004;27:123-128.
42. Murri M, Alcazar-Ramirez J, Garrido-Sanchez L, et al. Oxidative stress and metabolic changes after continuous positive airway pressure treatment according to previous metabolic disorders in sleep apnea-hypopnea syndrome patients. *Translational Research*. 2009;154:111-121.
43. Drager LF, Bortolotto LA, Lorenzi MC, Figueiredo AC, Krieger EM, Lorenzi G. Early signs of atherosclerosis in obstructive sleep apnea. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2005;172:613-618.
44. Schulz R, Seeger W, Fegbeutel C, et al. Changes in extracranial arteries in obstructive sleep apnoea. *European Respiratory Journal*. 2005;25:69-74.
45. Suzuki T, Nakano H, Maekawa J, et al. Obstructive sleep apnea and carotid-artery intima-media thickness. *Sleep*. 2004;27:129-133.
46. Mutlu-Turkoglu U, Akalin Z, Ilhan E, et al. Increased plasma malondialdehyde and protein carbonyl levels and lymphocyte DNA damage in patients with angiographically defined coronary artery disease. *Clinical Biochemistry*. 2005;38:1059-1065.
47. Liu ML, Ylitalo K, Salonen R, Salonen JT, Taskinen MR. Circulating oxidized low-density lipoprotein and its association with carotid intima-media thickness in asymptomatic members of familial combined hyperlipidemia families. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 2004;24:1492-1497.

48. Brewer GJ. Iron and copper toxicity in diseases of aging, particularly atherosclerosis and Alzheimer's disease. *Experimental Biology and Medicine*. 2007;232:323-335.
49. Eaton JW, Qian MW. Molecular bases of cellular iron toxicity. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002;32:833-840.
50. Sullivan JL. Iron and The Sex Difference in Heart-Disease Risk. *Lancet*. 1981;1:1293-1294.
51. Hu FB. The iron-heart hypothesis - Search for the ironclad evidence. *Jama-Journal of the American Medical Association*. 2007;297:639-641.
52. Lee TS, Shiao MS, Pan CC, Chau LY. Iron-deficient diet reduces atherosclerotic lesions in ApoE-deficient mice. *Circulation*. 1999;99:1222-1229.
53. Ren MQ, Rajendran R, Pan N, et al. The iron chelator desferrioxamine inhibits atherosclerotic lesion development and decreases lesion iron concentrations in the cholesterol-fed rabbit. *Free Radical Biology and Medicine*. 2005;38:1206-1211.
54. Sullivan JL. Iron in arterial plaque: A modifiable risk factor for atherosclerosis. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*. 2009;1790:718-723.
55. Stadler N, Lindner RA, Davies MJ. Direct detection and quantification of transition metal ions in human atherosclerotic plaques: Evidence for the presence of elevated levels of iron and copper. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 2004;24:949-954.
56. Palmer C, Menzies SL, Roberts RL, Pavlick G, Connor JR. Changes in iron histochemistry after hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal rat (vol 56, pg 60, 1999). *Journal of Neuroscience Research*. 1999;58:349-355.
57. Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Signalling hypoxia by HIF hydroxylases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005;338:617-626.
58. Hower V, Mendes P, Torti FM, et al. A general map of iron metabolism and tissue-specific subnetworks. *Molecular Biosystems*. 2009;5:422-443.
59. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276:7806-7810.
60. Valore EV, Ganz T. Posttranslational processing of hepcidin in human hepatocytes is mediated by the prohormone convertase furin. *Blood Cells Molecules and Diseases*. 2008;40:132-138.
61. Pandur E, Nagy J, Poor VS, et al. alpha-1 Antitrypsin binds preprohepcidin intracellularly and prohepcidin in the serum. *Febs Journal*. 2009;276:2012-2021.

62. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, et al. Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004;306:2090-2093.
63. Ganz T. Molecular control of iron transport. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2007;18:394-400.
64. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276:7811-7819.
65. Falzacappa MV, Muckenthaler MU. Heparin: Iron-hormone and antimicrobial peptide. *Gene*. 2005;364:37-44.
66. Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T. Heparin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood*. 2003;101:2461-2463.
67. Truksa J, Peng HF, Lee P, Beutler E. Different regulatory elements are required for response of hepcidin to interleukin-6 and bone morphogenetic proteins 4 and 9. *British Journal of Haematology*. 2007;139:138-147.
68. Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *Journal of Clinical Investigation*. 2002;110:1037-1044.
69. Brookes MJ, Sharma NK, Tselepis C, Iqbal TH. Serum pro-hepcidin: measuring active hepcidin or a non-functional precursor? *Gut*. 2005;54:169-170.
70. Maruna P, Lindner J, Kunstyr J, Plocova K, Hubacek J. Plasma Prohepcidin as a Negative Acute Phase Reactant after Large Cardiac Surgery with a Deep Hypothermic Circulatory Arrest. *Physiological Research*. 2009;58:827-833.
71. Kim HR, Kim KW, Yoon SY, Kim SH, Lee SH. Serum Pro-hepcidin Could Reflect Disease Activity in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Journal of Korean Medical Science*. 2010;25:348-352.
72. Harrison PM, Arosio P. Ferritins: Molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*. 1996;1275:161-203.
73. Recalcati S, Invernizzi P, Arosio P, Cairo G. New functions for an iron storage protein: The role of ferritin in immunity and autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*. 2008;30:84-89.
74. Arosio P, Ingrassia R, Cavadini P. Ferritins: A family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*. 2009;1790:589-599.

75. Ghosh S, Hevi S, Chuck SL. Regulated secretion of glycosylated human ferritin from hepatocytes. *Blood*. 2004;103:2369-2376.
76. Cook JD, Lipschit.Da, Miles LEM, Finch CA. Serum Ferritin as A Measure Of Iron Stores in Normal Subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1974;27:681-687.
77. Cairo G, Pietrangelo A. Iron regulatory proteins in pathobiology. *Biochemical Journal*. 2000;352:241-250.
78. Balla G, Jacob HS, Balla J, et al. Ferritin - A Cytoprotective Antioxidant Strategem of Endothelium. *Journal of Biological Chemistry*. 1992;267:18148-18153.
79. Reif DW. Ferritin as A Source of Iron for Oxidative Damage. *Free Radical Biology and Medicine*. 1992;12:417-427.
80. Sakaida I, Kyle ME, Farber JL. Autophagic Degradation of Protein Generates A Pool of Ferric Iron Required for The Killing of Cultured-Hepatocytes by an Oxidative Stress. *Molecular Pharmacology*. 1990;37:435-442.
81. Salonen JT, Nyyssonen K, Korpela H, Tuomilehto J, Seppanen R, Salonen R. High Stored Iron Levels are Associated with Excess Risk of Myocardial-Infarction in Eastern Finnish Men. *Circulation*. 1992;86:803-811.
82. Kiechl S, Aichner F, Gerstenbrand F, et al. Body Iron Stores and Presence of Carotid Atherosclerosis - Results From The Bruneck Study. *Arteriosclerosis and Thrombosis*. 1994;14:1625-1630.
83. Kiechl S, Willeit J, Egger G, Poewe W, Oberhollenzer F. Body iron stores and the risk of carotid atherosclerosis - Prospective results from the Bruneck study. *Circulation*. 1997;96:3300-3307.
84. Facchini FS, Saylor KL. Effect of iron depletion on cardiovascular risk factors - Studies in carbohydrate-intolerant patients. *Lipids and Insulin Resistance: the Role of Fatty Acid Metabolism and Fuel Partitioning*. 2002;967:342-351.
85. Tuomainen TP, Salonen R, Nyyssonen K, Salonen JT. Cohort study of relation between donating blood and risk of myocardial infarction in 2682 men in eastern Finland. *British Medical Journal*. 1997;314:793-794.
86. Yuan XM, Li W, Baird SK, Carlsson M, Melefors O. Secretion of ferritin by iron-laden macrophages and influence of lipoproteins. *Free Radical Research*. 2004;38:1133-1142.
87. Cheepsunthorn P, Palmer C, Menzies S, Roberts RL, Connor JR. Hypoxic/Ischemic insult alters ferritin expression and myelination in neonatal rat brains. *Journal of Comparative Neurology*. 2001;431:382-396.
88. Yeh KY, Yeh M, Glass J. Expression of intestinal brush-border membrane hydrolases and ferritin after segmental ischemia-reperfusion in rats. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1998;275:G572-G583.

89. Tacchini L, Recalcati S, BernelliZazzera A, Cairo G. Induction of ferritin synthesis in ischemic-reperfused rat liver: Analysis of the molecular mechanisms. *Gastroenterology*. 1997;113:946-953.