

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS PNEUMOLÓGICAS**

**ALTERAÇÕES HIPOCAMPAIS EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A UM
MODELO EXPERIMENTAL DE APNEIA DO SONO**

Tese de Doutorado

Dennis Baroni Cruz

Porto Alegre

2013

Dennis Baroni Cruz

**ALTERAÇÕES HIPOCAMPAIS EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A UM
MODELO EXPERIMENTAL DE APNEIA DO SONO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina, ênfase em Ciências Pneumológicas, da Universidade do Rio Grande do Sul como requisito para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Jane Maria Ulbrich

**Porto Alegre
2013**

CIP - Catalogação na Publicação

Baroni Cruz, Dennis

Alterações hipocâmpais em camundongos submetidos a um modelo experimental de apneia do sono. / Dennis Baroni Cruz. -- 2013.
137 f.

Orientador: Jane Maria Ulbrich.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Apneia obstrutiva do sono. 2. Hipocampo. 3. S100B. 4. Astrócitos. 5. Camundongos. I. Ulbrich, Jane Maria, orient. II. Título.

Dedicatória

Aos meus pais, **Amilcar** e **Elisabeth**, por servirem de farol. Devo a ambos o maior bem que uma pessoa pode adquirir ao longo de sua existência: a educação.

Aos meus avós, **Sonino** (*“in memoriam”*) e **Yeda**, pelo amor e pelo carinho incondicional. Vossos exemplos jamais serão esquecidos.

A minha esposa, **Juliana**, pelo incentivo e pela cumplicidade. Tu és a verdade que me leva a viver.

Agradecimentos

À **Prof.^a Dr.^a Jane Maria Ulbrich** pela confiança depositada e, principalmente, pela amizade. Agradeço de coração pelos conhecimentos anatomopatológicos, pela várias horas de conversa e pela cumplicidade.

Ao **Prof. Dr. Denis Martinez** pelo auxílio e disponibilização do modelo experimental de hipóxia intermitente desenvolvido pelo Laboratório Interdisciplinar de Pesquisa em Sono (LIPE - UFRGS). Sua inquietude intelectual, seu profissionalismo e seu amor à Medicina servem de espelho a todos os integrantes deste grupo de pesquisa.

Ao **Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)** pelo suporte institucional para a realização desse estudo.

Aos **alunos do curso de Medicina e de Nutrição da Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC)** por sempre terem acreditado neste professor.

Aos colegas da **Secretaria Municipal de Saúde de Venâncio Aires (RS)** por reconhecerem o poder transformador da educação e a importância da qualificação do funcionalismo público.

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação, **Marco Aurélio Silva** pela paciência e pelo incentivo.

Ao **Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do HCPA** e ao **povo brasileiro** pelo suporte financeiro ao longo desta longa jornada.

"I've always felt that one of the challenges, and in many ways one of the joys, of Diagnostic Pathology is that every month, certainly, you see something you've never seen before... Not necessarily a new disease, but different manifestations of something, or some appearance you've read about in the books but you've never actually seen. And there it is!"

James W. Ironside

Professor of Neuropathology, Edinburgh University (UK)

Resumo em língua portuguesa

Introdução: A apneia obstrutiva do sono (AOS) ocasiona a hipóxia intermitente (HI), causando doenças cardíacas, vasculares e neurológicas. O modelo de experimentação animal utiliza a HI para simular a AOS, permitindo a avaliação das alterações encefálicas, sendo o hipocampo uma área reconhecidamente influenciada pela hipóxia. A S100B é uma proteína de 21-kDa ligada ao cálcio, produzida e liberada principalmente pelos astrócitos no neurópilo do sistema nervoso central. Sua dosagem tem sido utilizada para compreender o envolvimento de distintos tipos celulares em determinadas condições patológicas. O presente estudo objetiva testar a hipótese de que a HI empregada em um modelo experimental de AOS em camundongos é capaz de alterar o número de astrócitos em diferentes subcamadas hipocampais (CA1, CA3 e DG), além de modificar qualitativamente a reatividade imuno-histoquímica destas células ao S100B.

Materiais e Métodos: Camundongos CF-1 foram expostos ou a 35 dias de HI ($n = 27$) ou a HIS ($n = 27$), alternando 30 segundos de hipóxia progressiva a um nadir de 7%, seguidos por 30 segundos de normóxia. Durante 8 horas, os animais sofreram um total de 480 ciclos de hipóxia/reoxigenação, equivalente a um índice de apneia de 60/hora. O encéfalo foi dissecado, sendo o hipocampo e suas subcamadas analisados histologicamente pela técnica de imuno-histoquímica com a utilização do anticorpo S100B. **Resultados:** Foi realizada a análise quantitativa dos astrócitos hipocampais imunorreagentes ao S100B. A média desta foi de $23,85 \pm 0,37$ astrócitos/ $0,25 \text{ mm}^2$ no grupo HI, enquanto no grupo HIS foi de $21,03 \pm 0,50$ astrócitos/ $0,25 \text{ mm}^2$ ($p < 0,001$). Esta diferença também foi observada de forma global nas subcamadas CA1 e CA3, sendo menos perceptível no DG. A imunorreatividade astrocitária foi maior (+++) no grupo HI, não atingindo tal intensidade no grupo HIS. A análise qualitativa secundária evidenciou a presença de cariorrexe, de picnose neuronal, além de corpos celulares astrocitários discretamente hipertróficos apenas nos animais do grupo HI. **Conclusão:** A HI aumentou a densidade numérica de astrócitos hipocampais, assim como a imunorreatividade destas células ao S100B, no processo chamado de astrogliose reativa. Alterações neuronais secundárias também foram observadas no grupo HI. Investigações futuras utilizando outras metodologias permitirão uma melhor avaliação dos resultados aqui descritos.

Resumo em língua inglesa

Introduction: Obstructive sleep apnea (OSA) causes intermittent hypoxia (IH), leading to cardiovascular and neurological diseases. The animal experimental studies use IH to simulate OSA, enabling the analysis of brain alterations, with the hippocampus recognized as an area influenced by hypoxia. S100B is a 21-kDa protein bonded to calcium, produced and secreted primarily by astrocytes in the neutrophil of the central nervous system. Levels of the protein have been used to understand the involvement of different cell types in certain pathological conditions. The present study aimed to test the hypothesis that IH used in an experimental design investigating OSA in mice can alter the number of astrocytes in different hippocampal sublayers (CA1, CA3 and dentate gyrus), in addition to quantitatively modifying the immunohistochemical reactivity of these cells. **Materials and Methods:** CF-1 mice were exposed to 35 days of either IH ($n = 27$) or SIH ($n = 27$), alternating 30 seconds of progressive hypoxia with a nadir of 7%, followed by 30 seconds of normoxia. Over a period of 8 hours, the animals were submitted to a total of 48 hypoxia/reoxygenation cycles, equivalent to an apnea index of 60/hour. The brain was dissected and the hippocampus and its sublayers were histologically analyzed by immunohistochemistry using S100B antibodies. **Results:** A quantitative analysis was performed of hippocampal astrocytes immunoreactive to S100B. The means recorded were 23.85 ± 0.37 astrocytes/ 0.25 mm^2 and 21.03 ± 0.50 astrocytes/ 0.25 mm^2 ($p < 0.001$) in the IH and SIH (simulated intermittent hypoxia) groups, respectively. This difference was also observed in sublayers CA1 and CA3 overall, and was less noticeable in the dentate gyrus. Astrocyte immunoreactivity was greater (+++) in the IH group and did not achieve this intensity in the SIH group. Secondary qualitative analysis revealed the presence of karyorrhexis, pyknotic neurons, and discretely hypertrophic astrocytes only in animals from the IH group. **Conclusion:** IH increased the number density of hippocampal astrocytes, as well as their immunoreactivity to S100B, in a process known as reactive astrogliosis. Secondary neuron alterations were also observed in the IH group. Future investigations using alternative methodologies would allow a better assessment of the results described here.

Lista de Ilustrações

Figuras do corpo da tese

Figura 1: Desenho de Thomas Nast representando o menino Joe do livro “*The Posthumous Papers of The Pickwick Club*”, de Charles Dickens.

Figura 2: Imagens sagitais de um indivíduo normal (A) e com AOS (B) analisadas por ressonância nuclear magnética. Observa-se que o paciente com AOS apresenta regiões das VAS mais estreitas, além de macroglossia e maior quantidade de gordura subcutânea.

Figura 3: Representação gráfica de uma polissonografia em um paciente com AOS. A doença é caracterizada pela apneia causada pela obstrução ao fluxo aéreo (1), pela persistência do esforço respiratório (2) e pela hipoxemia (3).

Figura 4: Diferenciação celular a partir das células-tronco pluripotentes.

Figura 5: Desenho mostrando um astrócitos protoplasmático originando uma densa rede de delicados processos filamentosos, alguns deles tendo contato com os vasos sanguíneos (VS).

Figura 6: Desenho demonstrando a correlação celular em uma sinapse tripartite. A numeração se refere à hipótese da influência do reveratrol sobre as células neurogliais da fonte original.

Figura 7: Hipocampo humano dissecado (à esquerda) e comparado com um espécime de cavalo-marinho (à direita).

Figura 8: Figura mostrando as principais divisões do encéfalo de um camundongo, destacando em 3D (área verde central evidenciada pela seta), o hipocampo.

Figura 9: Corte coronal do encéfalo de um camundongo ao nível do bregma, mostrando o hipocampo e suas regiões (coloração de hematoxilina-eosina, 400x). CA: corno de Amon; DG: giro denteado.

Figura 10: Configuração estrutural comum a todos os membros da família da proteína S100. Entre as hélices E e F, se encontra uma região de união, justamente onde o íon cálcio é capaz de aderir e modificar a estrutura conformacional da proteína. A mão indica um esquema da “*EF-hand*”, sendo a hélice E representada pelo dedo indicador e a hélice F representada pelo polegar. O íon cálcio ao se ligar com a região de união provoca uma ação semelhante à adução/abdução do polegar.

Figura 11: Desenho mostrando a localização das regiões “dobradiça” (“*hinge*”) da proteína S100.

Figura 12: Diagrama das câmaras de hipóxia intermitente (HI) e de normóxia (HIS). VS: válvula solenoide.

Figura 13: Visão externa da câmara de hipóxia intermitente (HI), à esquerda, e da câmara de normóxia (HIS), à direita. O sistema pode ser comparado com o diagrama mostrado na figura anterior.

Figura 14: Local onde as câmaras dos animais ficaram alocadas dentro da Unidade de Experimentação Animal do HCPA.

Figura 15: Visão macroscópica do encéfalo de um camundongo adulto “*in situ*”; (A) superfície dorsal, (B) superfície ventral. OB: bulbo olfatório; FC: córtex frontal; PC: córtex parietal; OC: córtex occipital; RC: cunículo rostral; CC: cunículo caudal; CB: cerebelo; Pit: hipófise; Tr: gânglio trigeminal; ON: nervos ópticos; OlfT: tubérculos olfatórios; OCh: quiasma óptico; PiC: córtex piriforme; P: ponte; M: medula espinhal.

Figura 16: Detalhamento da referência eletrônica utilizada, permitindo a visualização da área encefálica selecionada de forma tri ou bidimensional, sendo possível a identificação das diferentes regiões específicas.

Figura 17: Uma das opções da referência eletrônica era a comparação entre a histologia encefálica (hemisfério esquerdo) e o mapeamento das regiões correspondentes (hemisfério direito). O hipocampo (HPF) está representado em verde claro na figura, assim como suas camadas (DG, CA1, CA2 e CA3).

Figura 18: Diagrama da grade utilizada para a quantificação astrocitária. Quadrados menores: 50 µm de lado; Quadrado maior: 500 µm de lado. Os traços menores servem apenas para a calibração de câmeras de imagem acopladas ao microscópio.

Figuras do artigo em língua portuguesa

Figura 1: O histograma mostra os valores com os respectivos desvios padrões das diferenças laminares médias entre os grupos HI e HIS. $*p < 0,001$ pelo teste de Levene.

Figura 2: Escala de classificação qualitativa da imunorreatividade astrocitária hipocampal ao S100B. As fotos foram obtidas de regiões homólogas de CA1 (“*stratum oriens*”) entre animais do grupo HI. Coloração: S100B, 200x.

Figura 3: Alterações celulares (setas) representando a picnose e a cariorrexe em neurônios hipocampais do grupo HI (à direita) e a comparação com a mesma região do grupo HIS (à esquerda). Coloração: S100B, 400x.

Figura 4: Diferença astrocitária entre o grupo HIS (à esquerda) e o grupo HI (à direita). A astrogliose reativa, caracterizada pela hiperplasia e pelo aumento da densidade astrocitária, se mostra destacada no segundo grupo. As fotos foram obtidas de regiões homólogas de CA1 (“*stratum oriens*”) entre os dois grupos. Coloração: S100B, 400X.

Figuras do artigo em língua inglesa

Figure 1: Histogram showing values with the respective standard deviations of mean slide differences between the IH and SIH groups. $*p < 0.001$ in Levene’s test.

Figure 2: Qualitative grading scale for immunoreactivity of hippocampal astrocytes to S100B. The pictures were taken from homologues regions of CA1 (“*stratum oriens*”) between animals of IH group. Coloration: S100B, 200x.

Figure 3 - Neurological alterations (arrows) representing pyknosis and karryorrhesis in hippocampal neurons for the IH group (on the left) compared with the same region in the SIH group (on the right). Coloration: S100B, 400x.

Figure 4 - Astrocytic differences between the SIH group (on the left) and IH group (on the right). The reactive astrogliosis, characterized by hyperplasia and by elevation of astrocytic density, is more evident in the second group. The pictures were taken from homologues regions of CA1 (“*stratum oriens*”) between animals of IH group. Coloration: S100B, 400x.

Lista de Tabelas

Tabelas do corpo da tese

Tabela 1 - Membros da família da proteína S100 e a sua localização gênica específica.

Tabela 2 - Fatores e/ou condições regulatórias da secreção/liberação da proteína S100B.

Tabelas do artigo em língua portuguesa

Tabela 1 - Diferenças laminares hipocâmpais na densidade numérica astrocitária imunorreagentes ao S100B.

Tabela 2 - Imunopositividade astrocitária ao S100B nas diferentes subcamadas hipocâmpais.

Tabelas do artigo em língua inglesa

Table 1 - Hippocampal slide differences in number density of astrocytes immunoreactive to S100B.

Table 2 - Astrocyte immunopositivity to S100B in the different hippocampal sublayers.

Lista de Abreviaturas e Siglas

5TH_{1A} - 5-hidroxitriptamina-1A;
ANOVA - análise de variâncias;
AOS - apneia obstrutiva do sono;
CA - corno de Amon;
CA1 - área 1 do corno de Amon;
CA2 - área 2 do corno de Amon;
CA3 - área 3 do corno de Amon;
CA4 - área 4 do corno de Amon;
CO₂ - dióxido de carbono;
CPAP - pressão positiva contínua nas vias aéreas;
DAMP - dano associado ao padrão molecular;
DG - giro denteado;
EEG - eletroencefalograma;
FEEPS - Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde;
GAP-43 - neuromodulina;
GFAP - proteína ácida fibrilar glial;
HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre;
HI - hipóxia intermitente;
HIS - hipóxia intermitente simulada;
IAH - índice de apneia e hipopneia;
N₂ - gás nitrogênio;
NO - óxido nítrico;
O₂ - gás oxigênio;
RAGE - receptor para produtos finais da glicação avançada;
REM - movimentos oculares rápidos;
SA - "*stratum alveus*";
SL - "*stratum lucidum*";
SLM - "*stratum lacunosum-moleculare*";
SNC - sistema nervoso central;
SO - "*stratum oriens*";
SP - "*stratum pyramidale*";
SPSS - "*Statistical Package for Social Science*";
SR - "*stratum radiatum*";
UPPP - uvulopalatofaringeoplastia;
VAS - vias aéreas superiores.

Sumário

1	Introdução	15
2	Revisão da literatura	16
2.1	Apneia obstrutiva do sono	16
2.1.1	Histórico da doença.....	17
2.1.2	O sono.....	19
2.1.3	Patogênese	23
2.1.4	Manifestações clínicas e principais consequências	27
2.1.5	Diagnóstico	30
2.1.6	Tratamento	32
2.2	Sistema nervoso central	33
2.2.1	Desenvolvimento do sistema nervoso central	33
2.2.2	Componentes celulares do sistema nervoso central	36
2.2.3	Hipocampo	42
2.3	Proteína S100.....	46
2.3.1	Propriedades estruturais	47
2.3.2	Propriedades funcionais.....	48
2.3.3	A proteína S100B	49
2.3.4	Aplicabilidade clínica da S100B	56
3	Justificativa.....	61
4	Objetivos	62
4.1	Objetivo geral.....	62
4.2	Objetivos específicos.....	62
5	Materiais e métodos	63
5.1	Animais.....	63
5.2	Modelo de hipóxia intermitente	63
5.3	Processamento do material biológico	66
5.4	Histologia e imunohistoquímica	68
5.5	Procedimentos morfométricos	69
5.6	Análise estatística.....	71
6	Artigos	72
6.1	Artigo em língua portuguesa.....	72
6.2	Artigo em língua inglesa	92
7	Conclusões.....	111
8	Considerações finais	112
9	Referências bibliográficas da tese.....	113
	Anexos	134

1 Introdução

O sono é considerado um estado ativo e complexo, envolvido em importantes funções fisiológicas. Ele está relacionado com efeitos sobre o crescimento somático, sistema imunológico, função cardiopulmonar, produção de hormônios, consolidação da memória, entre outros (CARSKADON, 2011).

A respiração e o sono são funções indispensáveis para a preservação da vida. Alterações decorrentes do sono permitem a instalação de diferentes distúrbios, sendo estes atualmente reconhecidos como problemas de saúde pública em virtude de sua elevada prevalência (THORNTON, 2010; PARISH, 2009; FLEMONS, 2002; BIXLER, 1998; WRIGHT, 1997).

A apneia obstrutiva do sono (AOS), a forma mais comum de distúrbio ventilatório relacionado ao sono (BRADLEY, 2009), afeta a qualidade de vida dos pacientes, é causa reconhecida de doenças cardiovasculares, de acidentes vasculares encefálicos e de déficits cognitivos e neurológicos (PEKER, 2000).

Os modelos de experimentação animal utilizam a hipóxia intermitente (HI) na simulação da AOS, permitindo a avaliação de vários órgãos e sendo fundamental na detecção das possíveis alterações encefálicas.

A S100B é uma proteína de 21-kDa ligada ao cálcio, produzida e liberada principalmente pelos astrócitos no interior do sistema nervoso central (SNC). Ela exerce papel neurotrófico e gliotrófico. Em função de sua especificidade, ela é considerada um marcador de dano encefálico, sendo suas dosagens utilizadas na compreensão do envolvimento de diferentes tipos celulares em condições patológicas cerebrais, incluindo as ocasionadas pela AOS (DONATO, 2009).

Dentre as várias regiões encefálicas, o córtex hipocampal é particularmente sensível ao dano hipóxico (MORRELL, 2003), além de estar associado com o processamento da memória (MAGUIRE, 2000). A exposição crônica à HI durante o sono resulta em dano celular hipocampal (GOZAL, 2001), além de ocasionar perda de substância cinzenta desta região (MACEY, 2002).

A AOS exerce, portanto, importante impacto hipocampal. As alterações anatomopatológicas (envolvendo os astrócitos e sua quantificação) e as imunoistoquímicas (correlacionadas com reatividade à proteína S100B) necessitam ser melhor analisadas.

2 Revisão da literatura

2.1 Apneia obstrutiva do sono

A AOS é uma doença em que a perda do tônus da musculatura dilatadora faríngea no início do sono ocasiona o colapso mecânico repetitivo das vias aéreas superiores (VAS) a este nível e a consequente interrupção momentânea da respiração (RYAN, 2005a).

O seu diagnóstico requer a presença de hipopneia (redução de mais da metade do volume corrente pulmonar por um período superior a dez segundos, acompanhada por uma queda de 4% na saturação de oxigênio ou pelo despertar) ou de apneia (ausência completa deste volume pelo mesmo período de tempo) recorrentes durante o sono (BRADLEY, 2009; AMERICAN ACADEMY OF SLEEP MEDICINE TASK FORCE, 1999).

As apneias causam a HI, a retenção de dióxido de carbono e a hipercapnia, fatores que provocam o despertar do paciente, restabelecendo o tônus muscular faríngeo e o fluxo aéreo habitual. Apesar do despertar ser um mecanismo protetor, ele ocasiona alterações patológicas no ciclo do sono (DEMPSEY, 2010; CHUANG, 2009; WHITE, 2006; FLEMONS, 2002).

As apneias podem ser classificadas em obstrutivas (quando acompanhadas por esforços respiratórios contra uma oclusão das VAS), em centrais (quando associadas à perda do automatismo respiratório controlado por núcleos localizados no tronco encefálico) e em mistas (RYAN, 2005a; AMERICAN ACADEMY OF SLEEP MEDICINE TASK FORCE, 1999).

Na população geral, a AOS é a forma mais comum de apneia relacionada ao sono, enquanto as apneias centrais do sono são raramente identificadas na ausência de insuficiência cardíaca (WANG, 2007; FERRIER, 2005; BIXLER, 2001). A AOS está frequentemente associada com a história de ronco durante o sono, um sinal representante do aumento da resistência faríngea ao fluxo aéreo.

Atualmente, em virtude de seu impacto sobre a qualidade de vida dos pacientes, de sua elevada prevalência e de suas consequências multissistêmicas, a AOS é considerada um problema de saúde pública, sendo uma das doenças mais estudadas mundialmente (BRADLEY, 2009; GUILLEMINAULT, 2004; YOUNG, 1993).

2.1.1 Histórico da doença

O primeiro relato da AOS tem aproximadamente dois milênios. Textos gregos do terceiro século antes de Cristo descreveram Dionísio, tirano de Heracleia Pôntica, como um homem que apresentava uma respiração ruidosa e laboriosa durante o sono. O tratamento prescrito consistia na introdução de finas e longas agulhas no corpo do tirano, ocasionando dor e despertando-o, reestabelecendo assim sua respiração habitual (CASSOL, 2010).

No início do século XIX, relatos da literatura não médica fizeram referência à associação entre obesidade e sonolência diurna, tendo um renomado romancista inglês (DICKENS, 1837) descrito o personagem Joe (**Figura 1**): um menino preguiçoso, obeso e de face avermelhada, que passava a maior parte do tempo ou comendo ou dormindo.



Figura 1 - Desenho de Thomas Nast representando o menino Joe do livro “*The Posthumous Papers of The Pickwick Club*”, de Charles Dickens. Fonte: BURWELL, 1956.

Os relatos médicos iniciaram no final do mesmo século, mas apenas indiretamente. O conjunto das manifestações clínicas previamente descritas foi apenas superficialmente ressaltado como uma possível síndrome (OSLER, 1905;

BROADBENT, 1877). Data deste período a utilização do termo “*pickwickian*” ou “*pickwick*” (uma referência ao livro “*The Posthumous Papers of the Pickwick Club*”, de Dickens) para fazer referência aos pacientes hipersonolentos, obesos e que apresentavam alterações respiratórias durante o sono.

O estudo dos distúrbios do sono sofreu um enorme impacto na primeira metade do século XX com o advento de duas importantes descobertas. Em 1929, Hans Berger obteve os primeiros registros de potenciais elétricos do córtex encefálico humano, reunidos sob a designação de eletroencefalograma (EEG). Em 1937, Loomis e colaboradores concluíram que o sono era composto por diferentes estágios recorrentes (DEMENT, 2005).

Na última década de cinquenta, já utilizando os achados de pesquisas anteriores, a síndrome foi finalmente relatada cientificamente por um médico sob a nomenclatura de “*Pickwickian Syndrome*”. Ela englobava a obesidade predominantemente central, a hipersonolência, a cianose, a hipoventilação alveolar, a policitemia e a insuficiência cardíaca (BURWELL, 1956).

O desenvolvimento da polissonografia (teste que monitora o eletroculograma, o EEG e o eletromiograma submentoniano), considerado ainda hoje padrão-áureo para o diagnóstico dos distúrbios do sono, permitiu uma classificação mais acurada dos pacientes (IBER, 2007). Isto foi visto quando em 1966 neurologistas franceses, observaram despertares recorrentes e acompanhados por apneias em pacientes com a síndrome (GASTAUT, 1969; GASTAUT, 1966).

O esclarecimento da fisiopatogenia destas apneias começou a ocorrer após a realização de traqueostomia nos pacientes portadores das formas mais graves da síndrome. Registros polissonográficos posteriores à cirurgia confirmaram o desaparecimento dos eventos respiratórios e dos frequentes despertares (LUGARESI, 1971).

Os anos seguintes foram marcantes ao desenvolvimento de estudos relacionados com os distúrbios respiratórios do sono (LUGARESI, 1972). Esta época culmina com a designação do seu representante mais prevalente: a AOS (GUILLEMINAUL, 1976; GUILLEMINAUL, 1973).

O atual nível de conhecimento sobre a AOS foi possível apenas graças ao entendimento progressivo da fisiologia do sono. A complexidade do último ainda permite considerá-lo como um dos grandes mistérios dentro do campo da Neurociência (KRYGER, 2011).

2.1.2 O sono

Os fatores locais (principalmente a interação entre tipos celulares distintos), as redes neuronais e os diferentes níveis hormonais exercem influência sobre o controle entre os níveis de consciência (HAUW, 2011). Todos estes são regulados por centros localizados principalmente no interior do hipotálamo.

Os níveis de consciência podem ser classificados em: estado de alerta e sono, sendo o último subdividido em sono dos movimentos oculares rápidos (REM) e sono de ondas lentas (HOBSON, 2002).

O estado de alerta surge a partir da despolarização do sistema tálamo-cortical e do aumento da excitabilidade das células piramidais corticais, estas últimas sob o efeito do sistema ativador ascendente (neuronal) e do sistema hormonal orexina/hipocretina (SIEGEL, 2009).

O sistema de ativação ascendente se projeta do tronco encefálico em direção ao córtex cerebral. Ele é composto pelo sistema colinérgico e pelo sistema monoaminérgico. O sistema colinérgico surge a partir dos núcleos tegmentais, do núcleo gigantocelular e do núcleo basal magnocelular, todos ao nível do tronco encefálico, estimulando diretamente ou indiretamente o córtex (HOBSON, 2002). O sistema monoaminérgico projeta-se dos neurônios noradrenérgicos do “*locus coeruleus*”, dos neurônios histaminérgicos do núcleo tuberomamilar do hipotálamo e, mais difusamente, dos neurônios serotonérgicos do núcleo da rafe pontina (BONNET, 2010).

Os neurônios talâmicos laterais e posteriores secretam a orexina/hipocretina, um hormônio neuropeptídico altamente excitatório capaz de estimular determinados núcleos encefálicos, formando um sistema hormonal específico. Este sistema estabiliza a vigília e também exerce controle sobre a respiração e sobre o tônus muscular nos diferentes níveis de consciência (MIGNOT, 2008).

O sono consiste em um estado funcional ativo, cíclico e reversível. Ele geralmente está associado a manifestações comportamentais específicas (imobilidade relativa e menor resposta aos estímulos externos) e não necessariamente está acompanhado por postura reclinada e por fechamento ocular (KRYGER, 2011).

O sono de ondas lentas apesar de ser menos estudado do que o sono REM, apresenta importante função fisiológica. Ele inicia após o bloqueio das entradas

sensoriais ordinárias. Interações neuronais do sistema córtico-talâmico induzem a atividade rítmica e a hiperpolarização da camada V do córtex cerebral. A atividade do sistema de ativação ascendente e do sistema orexina/hipocretina conseqüentemente decai (SIEGEL, 2009).

Pequenas oscilações elétricas são registradas nesta fase do sono, geralmente envolvendo o circuito formado pelo córtex cingulado posterior, pré-cúneo, córtex pré-frontal e córtex cingulado anterior. Acredita-se que este seja uma rede encefálica independente (mas que mantém os níveis de atenção, de prospecção e de memória) operante quando a rede tarefa-positiva não está ativa. Investigações que correlacionam os achados do EEG com os da ressonância nuclear magnética funcional demonstram que a baixa oscilação característica do sono de ondas lentas não indica um estado de inatividade cerebral (CARSKADON, 2011; HOVORITZ, 2009).

Durante o sono de ondas lentas a atividade cerebral é sincronizada com o intuito de retardar oscilações nas zonas frontais e de induzir a dissociação com as áreas posteriores que acontece no sono REM. Esse processo ocorre na presença de níveis de atividade preservados dentro dos componentes do circuito, sugerindo ser a ativação sequencial de todas as partes do circuito a responsável pela consciência.

Sugere-se que as respostas encefálicas sincronizadas por baixas oscilações sejam capazes de restaurar os padrões de atividade microprovocadas que facilitam as interações neuronais, dando ao sono de ondas lentas um importante papel na sinaptogênese (MIGNOT, 2008).

O sono de ondas lentas, que é subdividido em três estágios correspondentes a níveis progressivos de profundidade, está clinicamente associado à dissipação periférica de calor (vasodilatação), ao aumento da transpiração e à redução da taxa metabólica basal. Este resfriamento tanto corporal quanto encefálico oferece múltiplas adaptações benéficas ao organismo (ROTH, 2000). Durante esta fase do sono ocorre ainda redução do tônus muscular, diminuição da atividade do sistema simpático, aumento da atividade do sistema parassimpático e a preservação dos movimentos oculares lentos (PERIN, 2011).

O início do sono REM é caracterizado fisiologicamente pela intensa atividade elétrica cortical em um padrão dessincronizado, semelhante ao que ocorre durante a vigília. Primeiramente ocorre a supressão do tônus muscular, seguida pelo início dos movimentos oculares rápidos, que acontecem sob a influência hipotalâmica e do

núcleo superior do tronco encefálico. A utilização da ressonância nuclear magnética funcional simultaneamente aos registros polissonográficos associados à estimulação acústica mostrou que durante a fase REM do sono o circuito tálamo-cortical ativo incluía o tronco encefálico basal, a área límbica e a área hipocampal (WEHRLE, 2007). Temos, portanto, um estado onde o encéfalo está ativo enquanto o corpo está paralisado (PERIN, 2011; CARSKADON, 2011).

Os neurônios responsáveis pelo acionamento do sono REM em humanos parecem estar localizados na região dorsolateral e no núcleo “*pré-coeruleos*”, enquanto os responsáveis pela sua interrupção parecem estar na substância cinzenta periaquedutal ventrolateral e látero-pontino (AUGER, 2011). Lesões ou distúrbios que afetem regiões próximas a estas áreas podem afetar a organização do sono REM.

Clinicamente o sono REM se caracteriza pelo alto grau de atividade autonômica, pelo aumento da pressão arterial e pela ocorrência dos sonhos. O fluxo sanguíneo encefálico e o consumo do gás oxigênio (O₂) por esse tecido atingem valores elevados, assim como a ventilação também pode sofrer alterações (LAVIGNE, 2011).

A caracterização do sono REM foi a responsável pelo reconhecimento do sono como um fenômeno biológico, contribuindo para a compreensão dos processos fisiológicos básicos e culminando no estabelecimento da Medicina do Sono como uma nova especialidade médica (KRYGER, 2011).

A ocorrência do sono de ondas lentas se alterna com a do sono REM. A sequência sono de ondas lentas e sono REM constitui um ciclo do sono, ocorrendo por noite um total que pode variar entre quatro a seis ciclos. O sono de ondas lentas ocupa aproximadamente 80% do tempo total de sono, restando 20% ao sono REM. Estas proporções podem ser influenciadas por múltiplos fatores como a idade, a temperatura corporal, o uso de medicamentos, entre outros (CARSKADON, 2011).

Em um indivíduo adulto jovem a evolução do sono geralmente inicia com uma vigília relaxada, passa ao sono de ondas lentas e aos seus níveis graduais de aprofundamento, atingindo finalmente o sono REM e finalizando um ciclo do sono. Após este último, tem início um novo ciclo, marcado pelo reaparecimento do estágio intermediário do sono de ondas lentas e pela subsequente recorrência dos estágios sequenciais descritos (PERIN, 2011).

A organização cíclica do sono é uma característica comum aos mamíferos e às aves. O sono das aves se distingue do sono dos mamíferos por uma menor porcentagem do sono REM e pela maior brevidade dos ciclos do sono (SIEGEL, 2011).

Para demonstrar a distribuição e a proporção dos estágios do sono, utiliza-se o hipnograma, que consiste em um gráfico desenhado com base no registro polissonográfico de uma noite de sono. A caracterização fisiológica do sono fornece uma base sólida e padronizada à compreensão das condições clínicas a ele relacionadas, pois o ciclo sono-vigília é um dos principais determinantes do ritmo circadiano e do controle homeostático (FIORI, 2011).

O ritmo circadiano pode ser definido como um marca-passo fisiológico, com duração aproximadamente vinte e quatro horas, responsável pela regulação do tempo do sono e pela consolidação do ciclo sono-vigília. Ele sofre sincronização pela claridade, pela atividade física e pelos níveis de melatonina, e influencia a temperatura corporal, a função cardiopulmonar, o desempenho cognitivo e o humor (TOBLER, 2005). A secreção hormonal também sofre interferência pelo ciclo sono-vigília: o hormônio do crescimento e a prolactina tem um acréscimo significativo durante o sono, enquanto a liberação do cortisol e da tireotrofina está inibida; o eixo gonadotrófico também é influenciado. Tais efeitos moduladores do sono não estão limitados apenas aos hormônios do eixo hipotálamo-hipofisário, sendo também observados para os hormônios que controlam o metabolismo dos carboidratos, o apetite e o balanço hidroeletrolítico. Dessa forma, podemos concluir que mesmo pequenos despertares são capazes de interromper o sono e de ocasionar alterações em diferentes funções fisiológicas (VAN CAUTER, 2005).

O sono é considerado um estado que possibilita a consolidação de novas informações adquiridas na memória, dependente das condições de aprendizagem e do tempo de sono. Este processo promove modificações tanto quantitativas quanto qualitativas da representação da memória. Através de padrões específicos de atividade neuromodulatória e de oscilações no campo de potencial elétrico, o sono de ondas lentas e o sono REM apoiam o sistema de consolidação e a sinaptogênese respectivamente. Durante o sono de ondas lentas, as baixas oscilações e a atividade colinérgica mínima coordenam a reativação e a redistribuição da memória hipocampal-dependente a regiões específicas do neocórtex. Durante o sono REM, a

alta atividade colinérgica e a atividade teta favorecem a subsequente consolidação sináptica da memória no córtex (DICKELMANN, 2010; HOBSON, 2002).

A homeostasia depende da duração da vigília prévia e da qualidade e duração dos episódios de sono anteriores. Este mecanismo controla o acúmulo de sono devido e sua recuperação, ou seja, aumenta a propensão ao sono quando ele está reduzido ou ausente e diminui a propensão em resposta ao excesso de sono (LU, 2006).

Até o presente momento, a função do sono não está completamente esclarecida. Sua importância, entretanto, já está embasada cientificamente, pois ele restaura os níveis fisiológicos de atividade, equilibra eletricamente diferentes partes do SNC, conserva o metabolismo energético, mantém a termorregulação e possibilita a maturação neuronal (VASSALLI, 2009).

2.1.3 Patogênese

Apesar do progresso na elucidação de vários aspectos na patogênese da AOS, sua etiologia ainda permanece parcialmente compreendida devido à dificuldade da realização de estudos invasivos e intervencionistas durante o sono (RYAN, 2005a).

A AOS tem caráter crônico, é multifatorial e possui causas tanto anatômicas quanto funcionais (AMERICAN THORACIC SOCIETY/AMERICAN SLEEP DISORDERS ASSOCIATION, 1998).

A traqueostomia foi crucial ao entendimento da patogênese da doença, pois após serem submetidos a este procedimento cirúrgico, os pacientes com AOS apresentavam evidente melhora clínica. Este achado tornou o colapso das VAS ao nível da faringe o principal fator causal da apneia (LEE, 2010b; TOGEIRO, 2010; FLETCHER, 2003).

A faringe consiste em um tubo de aproximadamente dez centímetros de comprimento cercado por estruturas ósseas (conchas nasais inferiores, palato duro, mandíbula, osso hioide e vértebras cervicais) e por tecidos moles (língua, palato mole, pilares das tonsilas, mucosa faríngea, músculos, epiglote e vasos sanguíneos cervicais). Seus cinco centímetros iniciais correspondem à orofaringe e à hipofaringe, porções das VAS que não apresentam sustentação óssea ou cartilaginosa, o que os torna potencialmente colapsáveis.

O colapso é ocasionado pela redução do tônus dos músculos cervicais no início do sono e pela compressão intrínseca ou extrínseca da faringe, podendo ocorrer no final da expiração ou no início da inspiração.

O sono causa o relaxamento muscular e o aumento da resistência das VAS. A luz faríngea se mantém permeável através do equilíbrio entre a força muscular abduzora e a pressão inspiratória negativa (RYAN, 2005a). Caso a última prevaleça, a redução da luz faríngea aumentará a resistência ao fluxo aéreo, causando obstruções de diversos graus de gravidade.

A compressão extrínseca faríngea está diretamente relacionada com a maior quantidade de tecidos moles cervicais - principalmente gordura subcutânea - nos pacientes com AOS (**Figura 2**).

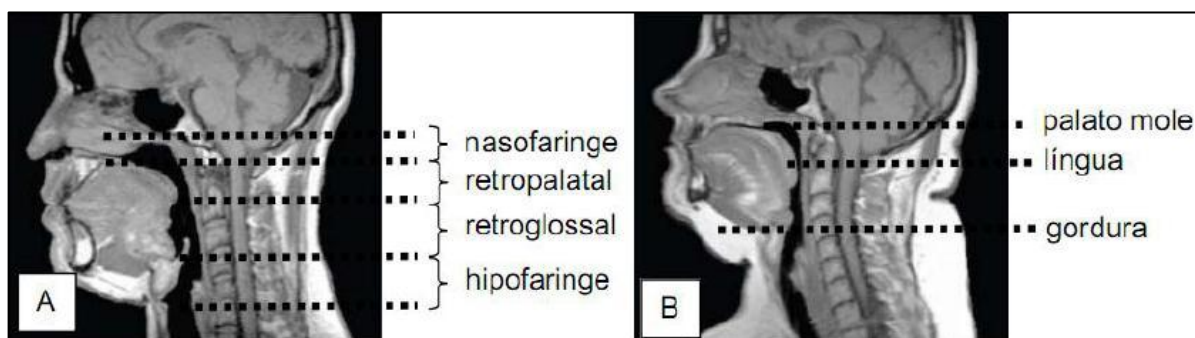


Figura 2 - Imagens sagitais de um indivíduo normal (A) e com AOS (B) analisadas por ressonância nuclear magnética. Observa-se que o paciente com AOS apresenta regiões das VAS mais estreitas, além de macroglossia e maior quantidade de gordura subcutânea. *Fonte:* FIORI, 2011.

Durante o sono, o ronco (sintoma frequentemente relatado pelos pacientes com AOS) é resultado do leve contato mecânico entre as paredes da faringe. As hipopneias surgem quando o colapso faríngeo é subtotal (sendo a ventilação mantida com um volume insuficiente), enquanto que as apneias ocorrem quando o colapso é total (ocasionando a asfixia), sendo a ventilação apenas reestabelecida com o despertar do paciente.

Estas observações sugerem que a AOS seja uma doença heterogênea. A contribuição relativa de cada um dos diferentes fatores associados ao colapso faríngeo nos indivíduos afetados pela doença ainda necessita de uma avaliação mais minuciosa, o que auxiliará no desenvolvimento de tratamentos alternativos à pressão positiva contínua nas vias aéreas (CPAP).

2.1.3 Epidemiologia

Vários fatores têm sido associados ao desenvolvimento da AOS. Entre estes os mais estudados são o sexo masculino, a obesidade central, os níveis hormonais, grupos étnicos específicos, a idade e a predisposição genética.

A AOS é duas vezes mais prevalente em homens do que em mulheres (LEE, 2010a; RAO, 2009; CHENG, 2008; YOUNG, 2005; SHAHAR, 2003; TISHLER, 2003). Apesar de estudos comparativos entre as VAS de pacientes com AOS não são frequentes na literatura, a área de secção transversal desta estrutura parece ser similar entre os sexos. Os pacientes masculinos, entretanto, apresentam as VAS mais facilmente colapsáveis durante a fase de sono de ondas lentas quando comparados com as pacientes de mesmo índice corporal. Este achado permite concluir que as mulheres apresentam uma menor colapsibilidade faríngea. Não foi encontrada diferença na resistência das VAS no início do sono entre homens e mulheres saudáveis (GENTA, 2008; VILLANEUVA, 2005).

A obesidade está presente em cerca de 60% dos pacientes acometidos pela AOS (VGONTZAS, 2005). A obesidade central (padrão onde o excesso de tecido adiposo está acumulado na região abdominal e na região cervical) está mais associada à AOS (HORA, 2007) quando comparado com a obesidade periférica (padrão onde este excesso está acumulado predominantemente no hipoderma). Os homens obesos, por apresentarem mais frequentemente o primeiro tipo, exibem chance aumentada de desenvolverem a doença, pois o depósito cervical provoca a compressão extrínseca da faringe (YOUNG, 2002). As mulheres obesas são menos suscetíveis ao desenvolvimento da AOS porque apresentam menor deposição de gordura na região cervical, especialmente na região submentoniana (SORIANO-CO, 2011; CHUANG, 2009; OLIVEN, 2008). Nas mulheres pós-menopausa, entretanto, a obesidade central é predominante, causando uma maior tendência ao desenvolvimento da doença. Em países onde o sobrepeso ainda não atingiu proporções epidemiológicas a prevalência da AOS é considerada baixa (KIM, 2004). O emagrecimento ocasiona aumento da área seccional das VAS, o que pode, em determinados casos, solucionar a obstrução durante o sono (KAWAGUCHI, 2011; SEIDELL, 2010; ONAT, 2009; MARTINHO, 2008).

Devido ao maior risco de AOS em mulheres na pós-menopausa os baixos níveis de progesterona/estrógenos e os altos níveis de testosterona foram

implicados no desenvolvimento da doença (RIHA, 2010; HACHUL, 2008; KIRKNESS, 2008; SCHARF, 2004; YOUNG, 2003; MALHOTRA, 2002b).

Os hormônios sexuais femininos são estabilizadores do sistema de controle respiratório e exercem influência protetora ao colapso faríngeo durante o sono (SIMPSON, 2010; CHANG, 2008; JORDAN, 2003; BIXLER, 2001). A testosterona, ao contrário, estimula a deposição de gordura na região cervical, contribuindo para a redução do calibre das VAS. Esta afirmação é confirmada pelo fato do aumento da prevalência da doença em mulheres com altos níveis endógenos de testosterona e pelo surgimento da doença com a administração exógena do hormônio tanto em mulheres quanto em homens com hipogonadismo (HORA, 2007; KRISHNAN, 2006; EICHLING, 2005). Os bloqueadores androgênicos, entretanto, não exerceram impacto sobre os sintomas da AOS (VGONTZAS, 2005).

A AOS pode afetar vários grupos etários, sendo sua prevalência variável de acordo com a população estudada (MALHOTRA, 2002a). Estudos epidemiológicos sugerem algumas particularidades etiológicas específicas entre os diferentes grupos étnicos. Os asiáticos apresentam o maxilar e a mandíbula mais curtos, menor dimensão facial anteroposterior e menor índice de massa corporal quando comparados aos caucasianos, o que sugere que a constituição óssea seja de grande importância neste grupo populacional. Os fatores teciduais, por outro lado, incluindo o aumento da área lingual e o aumento do comprimento do palato mole, apresentam grande influência sobre o desenvolvimento da AOS nos pacientes negros e afrodescendentes. Os dados epidemiológicos da AOS são variáveis de acordo com a população estudada. A prevalência da AOS nos adultos norte-americanos foi estimada em 24% no sexo masculino e em 9% no sexo feminino (YOUNG, 2002; YOUNG, 1993). Na população europeia, os dados espanhóis chamam a atenção pela elevada prevalência entre homens e mulheres: 26% e 24%, respectivamente (DURÁN, 2001). Já em nosso país, dados são alarmantes, pois 32,8% da população adulta da cidade de São Paulo apresenta algum grau de AOS (TUFIK, 2010).

A doença pode acometer qualquer faixa etária, sendo duas vezes mais prevalente nos indivíduos acima dos sessenta e cinco anos (TUFIK, 2010; PEPPARD, 2002), sugerindo que a AOS tenha correlação direta com o processo de envelhecimento. Este ocasiona a perda da estabilidade do controle respiratório, além de uma fraqueza muscular progressiva (MARTINEZ, 2008; ANCOLI-ISRAEL, 2008).

Vários estudos demonstraram a existência de um componente genético correlacionado com a AOS, sendo a sua recorrência familiar sugestiva de uma etiologia multifatorial: fenótipos intermediários associados à doença são causados pelo fundo oligogenético modificado por fatores ambientais (PALMER, 2003). Modelos animais têm sido desenvolvidos paralelamente aos estudos com pacientes auxiliando na identificação da suscetibilidade genética à AOS. A integração das informações obtidas tem conduzido ao mapeamento dos genes capazes de influenciar a doença.

Os dados acima mostram que a AOS é uma doença muito comum, sendo, entretanto, a maioria dos indivíduos assintomáticos. Este fato é no mínimo preocupante em virtude da correlação entre a doença com significativas complicações e com morbimortalidade elevada.

2.1.4 Manifestações clínicas e principais consequências

As queixas associadas ao sono são extremamente frequentes na prática médica, sendo as correlacionadas com a AOS classificadas em dois tipos: as que ocorrem durante o sono (ronco, apneia e despertares repetitivos) e as que ocorrem durante a vigília (sonolência diurna excessiva e as complicações consequentes da doença).

O ronco geralmente é a primeira e principal manifestação clínica. Além de ser um fator preditivo da AOS (ULUALP, 2010), ele é referido por até 96% dos indivíduos acometidos pelo distúrbio. Com o passar do tempo, ele se torna progressivamente ruidoso, indicando o crescente estreitamento das VAS ao nível da faringe, podendo causar importantes alterações ventilatórias (HU, 2000).

A hipopneia e a apneia constituem os sintomas mais temidos da AOS, pois provocam a HI. Estas alterações ventilatórias provocam a inspiração forçada contra uma VAS ocluída e são acompanhadas por pressão negativa no espaço pleural. À medida que elas se prolongam e se tornam recorrentes, a hipoxemia e a hipercapnia tornam-se cada vez mais acentuadas, provocando a queda na saturação de oxigênio e diversas consequências multissistêmicas cuja gravidade é dependente do número de repetições deste ciclo.

A apneia e a hipopneia acarretam uma manifestação clínica comum (AMERICAN ACADEMY OF SLEEP MEDICINE TASK FORCE, 1999): a

fragmentação do sono. Este processo é resultado de centenas de despertares recorrentes que provocam a redução da obstrução das VAS, revertendo assim a hipóxia. A sonolência diurna excessiva surge como consequência desta intervenção no sono (VEASEY, 2004).

A sonolência apresenta várias dimensões (MARTINEZ, 2009), sendo atualmente utilizados questionários no intuito de graduá-la. A escala de sonolência de Epworth (**Anexo 1**) é um instrumento de simples aplicação. O sua pontuação máxima é vinte e quatro pontos, sendo valores superiores a dez considerados anormais. A sonolência diurna excessiva é considerada responsável pelo risco aumentado de acidentes automobilísticos e de trabalho entre os pacientes com AOS (SWANSON, 2011; VENNELLE, 2010; RODENSTEIN, 2009; TREGGAR, 2009).

A consequência de uma única apneia é ínfima. É plausível que ao longo de anos, no entanto, os efeitos das alterações hemodinâmicas e metabólicas sejam cumulativos. Centenas de repetições desse fenômeno poderiam desempenhar papel etiológico para a gênese de distúrbios funcionais sistêmicos, sendo os mais temidos os cardiovasculares e os neurológicos (HLA, 2008).

Estudos epidemiológicos mostraram a associação entre a AOS com várias doenças cardiovasculares, destacando-se a hipertensão arterial sistêmica, a doença arterial coronariana, as arritmias, a insuficiência cardíaca e a doença cerebrovascular (BRADLEY, 2009). O estímulo sobre o sistema nervoso simpático provocar aumento significativo da pressão arterial durante o sono, mesmo em indivíduos com pressão arterial normal durante a vigília (LAVIE, 2009).

As evidências de que a AOS pode ocasionar alterações ao SNC são múltiplas. Alterações neuropatológicas, neuropsicológicas e metabólicas foram identificadas por avaliações histológicas, radiológicas, bioquímicas e comportamentais (BARTLETT, 2004; GALE, 2004; DECARY, 2000; KOTTERBA, 1998; NAEGALE, 1995).

Estudos demonstraram que a memorização e o raciocínio lógico podem estar comprometidos quando existe perturbação ao sono. As informações aprendidas são mais eficientemente memorizadas após um período adequado de sono, com algumas destas são consolidadas em longo prazo enquanto outras são memorizadas por um período mais curto (SIEGEL, 2001).

Outros exemplos de consequências neurológicas da AOS são: redução do aprendizado espacial (ROW, 2003), redução no metabolismo lipídico cerebral,

alterações funcionais da serotonina (GOLDBART, 2003a), fadiga, alterações cognitivas, deterioração intelectual, alterações de humor, depressão, ansiedade, irritabilidade, aumento da agressividade, diminuição da libido, impotência sexual (CAPLES, 2005) e a diminuição quantitativa dos neurônios hipocampais (GOLDBART, 2003b).

As modificações histológicas, entretanto, não foram identificadas universalmente, podendo permanecer subclínicas por um período indeterminado de tempo. Com o intuito de estudar estas alterações, são utilizados modelos experimentais, onde animais são expostos à HI simulando a AOS. São achados consequentes destes modelos as alterações na reatividade simpática vascular à hipóxia e à hipercapnia (GREENBERG, 1999), o aumento da regulação do fator de crescimento endotelial vascular (PATT, 1998), a elevação na pressão arterial sistêmica (KANAGY, 2001), a elevação na pressão arterial pulmonar (FAGAN, 2001), as alterações hematopoiéticas (MCGUIRE, 1999), o aumento na massa ventricular esquerda (MCGUIRE, 1999) e os distúrbios no crescimento fetal (SCHWARTZ, 1998). Muitos destes modelos, entretanto, não reproduzem a real situação de uma apneia presente na AOS devido aos períodos variados de exposição à HI (HINOJOSA-LABORDE, 2005; TAHAWI, 2001). Alguns modelos utilizaram apenas o gás nitrogênio (N_2) para causar a HI, o que fez com que os animais ao hiperventilarem, sofressem hipocapnia intermitente, enquanto que na AOS ocorre asfixia (hipercapnia e hipoxemia). O acréscimo de dióxido de carbono (CO_2) à mistura gasosa corrige este problema, pois torna a HI isocápnica ou asfíxica, permitindo uma melhor reprodutibilidade das características da doença.

O fenômeno de HI repetido centenas de vezes durante a noite leva ao desenvolvimento de estresse oxidativo (KLEIN, 2010; THOMAS, 2009; CARPAGNANO, 2005; LAVIE, 2004), à formação de radicais livres (CHUNG, 2009) e ao estímulo inflamatório (STEIROPOULOS, 2010; MCNICHOLAS, 2009; ALAM, 2007; BARCELÓ, 2005; RYAN, 2005b; GUILLEMINAULT, 2004), fatores considerados sinérgicos às complicações cardiovasculares da doença (BRAGA, 2009; FLETCHER, 2003; LAVIE, 2003; SCHNEIDER, 2000).

Os efeitos da AOS corroboram sua caracterização como doença multisistêmica (RYAN, 2009), já que mesmo breves períodos de hipóxia são capazes de desencadear respostas celulares. Identificar quais destas são protetoras e quais são prejudiciais, quais são permanentes e quais são reversíveis, é

fundamental tanto para a compreensão quanto para a prevenção das consequências da AOS. Avanços futuros no conhecimento genético possibilitarão uma melhor caracterização de seus efeitos sobre o ser humano adulto e sobre os modelos animais.

2.1.5 Diagnóstico

Existem várias formas de diagnóstico da AOS, no entanto, sinais e sintomas clínicos sugestivos da doença devem ser pesquisados através da anamnese e do exame físico. Estes incluem: ronco ruidoso durante o sono, relatos de apneia ou de engasgos, hipertensão, sonolência excessiva diurna, obesidade e tamanho da circunferência cervical (WHITE, 2006).

Esta entrevista clínica inicial tem como objetivo identificar os pacientes cujo benefício da indicação de um exame complementar pode ser significativo. Ela é de fácil realização, pois pode ser feita por qualquer profissional da saúde, não resultando em custo adicional para as instituições de saúde e para os pacientes.

O estudo de um doente com distúrbio do sono recorre a instrumentos e a métodos característicos, alguns extremamente simples, outros mais complexos. Por exemplo, o conhecimento do padrão de sono, importante na avaliação da insônia ou na suspeita de perturbação do ritmo circadiano, pode ser feita com recurso ao diário de sono onde é pedido o registo pelo período de uma ou duas semanas de uma série de dados (hora de deitar, hora de levantar, horário das refeições, prática de exercício físico, tempo de sono e apreciação diária da qualidade de sono). A transcrição gráfica do registo, muitas vezes pode esclarecer o problema (DOS SANTOS, 2006).

O diagnóstico da AOS, entretanto, requer a presença repetitiva de apneia ou de hipopneia (AMERICAN ACADEMY OF SLEEP MEDICINE, 2005). O exame considerado como padrão-áureo é a polissonografia noturna realizada em laboratórios especializados no sono. Durante o exame é realizado o registo simultâneo de múltiplos sinais (eletroencefalograma, eletro-oculograma, eletromiograma de membros inferiores, eletrocardiograma, avaliação do fluxo respiratório, registo dos movimentos tóraco-abdominais e da saturação de oxigênio). O resultado do estudo pode ser representado graficamente, permitindo a elaboração de relatórios sobre o sono (**Figura 3**)

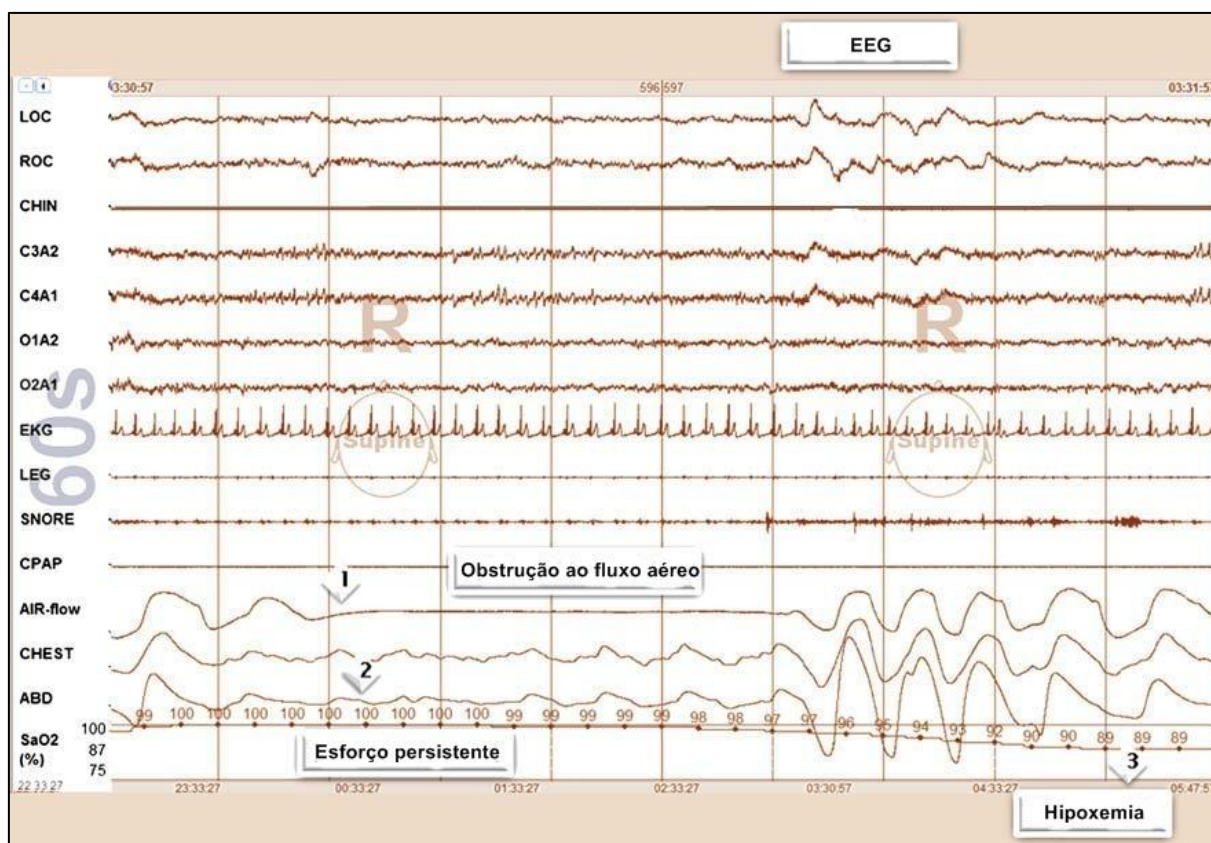


Figura 3: Representação gráfica de uma polissonografia em um paciente com AOS. A doença é caracterizada pela apneia causada pela obstrução ao fluxo aéreo (1), pela persistência do esforço respiratório (2) e pela hipoxemia (3). *Fonte:* modificado de PANOSSIAN, 2009.

A principal dificuldade na realização do estudo polissonográfico está no fato da demora do exame (mínimo de seis horas de registro contínuo), nas circunstâncias em que ele é realizado (durante a noite) e em um local com disponibilidade de recursos técnicos e humanos. Apesar disso, a polissonografia, permite uma identificação segura das apneias e das hipopneias.

Um parâmetro de grande utilidade ao diagnóstico é o estabelecimento do índice de apneia e hipopneia (IAH). Este é determinado pelo quociente entre o número total de episódios de alterações respiratórias (apneia ou hipopneia) e o número de horas de sono, sendo considerado normal quando menor do que cinco eventos por hora (AMERICAN ACADEMY OF SLEEP MEDICINE, 2005). O IAH também permite a classificação da gravidade da AOS em leve (IAH entre 5 e 14,9 eventos/hora), moderado (IAH entre 15 e 29,9 eventos/hora) e grave (IAH superior a 30 eventos/hora).

Cabe ressaltar que mesmo pacientes com AOS grave poderão dormir horas sem apneia por fatores ainda não completamente compreendidos (CHUNG, 2010),

porém quando as os eventos respiratórios se sucedem podem ocorrer com uma frequência espantosa (superior a sessenta eventos por hora).

2.1.6 Tratamento

Existe uma grande variedade de tratamentos disponíveis para a AOS. Estes incluem desde modificações comportamentais até procedimentos cirúrgicos.

Algumas modificações comportamentais podem influenciar a progressão da doença. Estas incluem a não utilização de bebidas alcoólicas e de medicamentos sedativos próximos do momento de dormir, pois estes podem agravar o processo obstrutivo. A perda de peso, como ressaltado anteriormente, também apresenta impacto sobre os sintomas, melhorando a ventilação e até mesmo eliminando a apneia em alguns pacientes (PANOSSIAN, 2009).

O principal tratamento para a AOS permanece sendo o uso do CPAP nasal. Este dispositivo funciona como suporte pneumático às VAS ao nível da faringe. Ele é eficaz em virtualmente todos os pacientes e quando usado rotineiramente pode reverter ou reduzir substancialmente a sonolência excessiva associada à doença. A qualidade de vida também melhora assim como a hipertensão arterial se presente. Os dispositivos mais modernos realizam a titulação automática, determinando constantemente os níveis mais baixos de pressão necessários para manter as vias aéreas permeáveis, evitando assim a necessidade da regulação laboratorial (GILES, 2006).

Diversos tipos de dispositivos orais foram projetados com a finalidade de avançar a mandíbula e, assim, avançar a estrutura lingual e expandir a área faríngea. Eles conseguem reduzir parcialmente, em cerca de 40% a 60% das vezes, os distúrbios ventilatórios.

O tratamento cirúrgico representa uma forma secundária de abordagem em pacientes cujas terapias anteriores não tenham obtido sucesso. A uvulopalatofaringeoplastia (UPPP) e suas variantes são as intervenções mais utilizadas e que apresentam uma taxa de melhora de 42% dos pacientes. As cirurgias mandibulares, geralmente combinadas com a UPPP, apesar de serem mais agressivas por atuarem sobre a parte óssea, apresentam altas taxas de sucesso no tratamento da doença (HOLTY, 2010).

O tratamento da AOS deve ser individualizado de acordo com a gravidade dos sintomas e com o desejo do paciente, objetivando o reestabelecimento fisiológico do ciclo do sono e a redução das alterações ventilatórias.

2.2 Sistema nervoso central

O SNC, tratado durante muito tempo como uma “caixa preta”, sempre representou um desafio para os cientistas, não apenas por sua complexidade, mas também pela sua importância (PERIN, 2011).

Cada vez mais, busca-se entender as bases biológicas do comportamento, da memória, do aprendizado, para possibilitar a explicação e o manejo dos distúrbios neurológicos tanto primários quanto secundários.

2.2.1 Desenvolvimento do sistema nervoso central

O desenvolvimento do SNC é dependente da interação entre diversos fatores, entre eles fatores ambientais, histológicos, genéticos, e moleculares (CLARKE, 2012).

Estudos embriológicos têm avaliado detalhadamente esse período inicial, abandonando o isolacionismo morfológico. Esta especificidade tem auxiliado o entendimento dos diversos mecanismos moduladores dos circuitos neuronais, propiciando sua correlação com os demais tipos celulares que integram o SNC.

Por ser um processo multirregulado, o desenvolvimento do SNC apresenta uma embriogênese extremamente complexa (SARNAT, 2000), sendo, entretanto, os estágios básicos (gastrulação, indução dorsal, indução ventral, proliferação e diferenciação celular e migração) compartilhados por todos os vertebrados (FOTOS, 2011; MOORE, 2008; KUMAR, 2008; LARSEN, 2001).

A gastrulação, iniciada na terceira semana, tem como primeiro sinal o aparecimento da estria primitiva na superfície epiblastica. Essa fase engloba o processo pelo qual o conceito torna-se uma estrutura celular trilaminar (composta por ectoderma, mesoderma e endoderma) e orientada anatomicamente.

Durante a indução dorsal, por volta da quinta semana gestacional, as células mesodérmicas migram cranialmente, estimulando assim as células ectodérmicas na formação da placa neural. Esta, após um processo morfogenético denominado

neurulação, origina o tubo neural, a partir do qual o SNC é formado (ALBERTS, 2010; COLAS, 2001; GILBERT, 2000).

A indução ventral, que ocorre entre a quinta e décima semana, consiste na fase onde as três vesículas primárias (prosencefalo, mesencefalo e rombencéfalo) se desenvolvem, culminando com a formação das diferentes áreas do SNC (KANEKAR, 2011).

O neuroepitélio primitivo é inicialmente composto apenas por células-tronco indiferenciadas. Estas, por sua vez, originarão duas linhagens celulares distintas (os neuroblastos e os glioblastos), a partir das quais ocorrerá a proliferação e a diferenciação celular (**Figura 4**). O primórdio do desenvolvimento cerebral inicia na zona ventricular do tubo neural (LAMING, 2000).

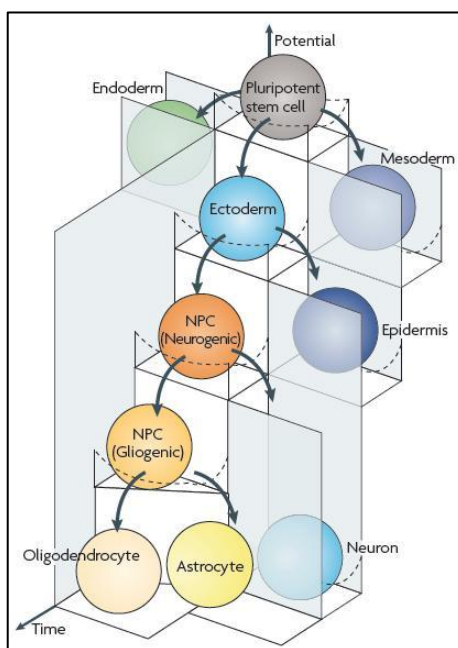


Figura 4: Diferenciação celular a partir das células-tronco pluripotentes. NPC: célula precursora neural. *Fonte:* HIRABAYASHI, 2010.

A neurogênese ocorre a partir da rápida proliferação dos neuroblastos, principalmente entre o segundo e o quarto mês gestacional, determinando ali o número neuronal presente no indivíduo adulto. Sinais ainda não completamente conhecidos induzem a saída dessas células recém-formadas do ciclo mitótico, tornando-as células permanentes (HIRABAYASHI, 2010). A gliogênese, por sua vez, atinge sua velocidade máxima apenas no período pós-natal, sendo responsável pela origem de dois grupos celulares: o astrocítico e o oligodendrocítico (HAINES, 2002).

A migração envolve basicamente os neurônios jovens quando estes se movem a partir de seu local de diferenciação até seu destino final no interior do SNC. Ela pode ser radial, quando guiada pelos processos celulares da glia radial, ou tangencial, quando ao longo dos neuritos. Nesta etapa ocorre a estratificação celular encefálica, a maturação neural e o estabelecimento dos processos dendríticos e axonais, determinando a sua participação no circuito neural local e global, muitas vezes requerendo o crescimento dirigido de um número considerável de processos celulares para múltiplos alvos específicos, algumas vezes muito distantes do corpo celular (LAMING, 2000).

Os cones de crescimento, localizados nas extremidades dos neuritos, são as estruturas capazes de realizar este processo de expansão. O seu movimento é influenciado por diversos fatores como, por exemplo, a serotonina, as moléculas de adesão da matriz extracelular e os neurotransmissores (LAMING, 2000).

O crescimento axonal é altamente específico (direcionado ao seu campo alvo), sendo as conexões desfavoráveis posteriormente eliminadas. Ao atingir seu local pré-determinado, os axônios se arborizam amplamente e estabelecem a via final de conexões envolvendo a expansão seletiva de conexões consideradas corretas e a retração dos cones considerados incorretos. O estabelecimento de uma sinapse seguindo o contato inicial de um axônio em crescimento e a sua célula alvo envolve uma elaborada troca de sinais entre neurônio e alvo, em que cada célula sustenta e induz a diferenciação de sua companheira. Tal comunicação envolve fatores de crescimento como as citocinas, o fator de crescimento neuronal e a proteína S100B (DONATO, 2009; DONATO, 2001).

A sinaptogênese ocorre tanto nos períodos pré e pós-natal, levando ao estabelecimento de conexões entre as mais diversas regiões do SNC (DONATO, 2009; LAMING, 2000). O sistema nervoso em desenvolvimento produz conexões em excesso e o refinamento das conexões funcionais específicas será efetuado pela posterior eliminação de sinapses excedentes. Neurônios pré-sinápticos competem normalmente pelo alvo pós-sináptico, porém, com a perda na competição, acabam retraindo suas sinapses e alguns acabam entrando em apoptose. O processo de eliminação de sinapses refina um modelo de conexões inicialmente difuso em um modelo adulto, onde as sinapses são altamente específicas entre elementos pré e pós-sinápticos (LICHTMAN, 1999).

Embora a densidade neuronal e as vias básicas de crescimento axonal e dendrítico sejam determinadas antes do nascimento, o remodelamento das conexões continua ao longo de toda a vida. Nesta etapa, um importante processo relacionado com o desenvolvimento da organização neuronal é a plasticidade, uma forma de regulação da comunicação sináptica. No remodelamento pós-natal estão envolvidos sinais de comunicação, como a proteína S100B, também envolvidos na formação e conexão sináptica pré-natal (LAMING, 2000). Conforme visto anteriormente, o sono também apresenta uma função importantíssima neste processo.

Evidências indicam que os astrócitos são capazes de alterar suas relações físicas com os neurônios, regulando a comunicação neuronal (LAMING, 2000). Os astrócitos podem rearranjar seus processos provocando a modulação das sinapses através do estabelecimento e da manutenção de determinados agrupamentos neuronais. Por associarem-se seletivamente a complexos sinápticos, os astrócitos podem, por apresentarem capacidade de regulação ao ambiente extracelular, modular a fisiologia sináptica.

Desta forma, fica clara a importância da relação neurônio-glia, seja durante as etapas iniciais de migração neuronal, seja ao longo do desenvolvimento, quando os astrócitos fornecem ao neurônio um ambiente fisiologicamente propício à sobrevivência e à plasticidade.

2.2.2 Componentes celulares do sistema nervoso central

O neuroanatomista Santiago Ramón y Cajal foi o pioneiro do estudo histológico do SNC. Estes demonstraram que o cérebro era um órgão como outro qualquer, ou seja, constituído por tipos histológicos distintos, mas com características peculiares, sendo a mais chamativa a imensa intercomunicação celular (RAMON Y CAJAL, 1903).

Os neurônios, o tipo histológico mais estudado, são células de origem ectodérmica capazes de transmitir sinais elétricos. Esta capacidade apenas é possível devido à passagem de correntes iônicas através de canais presentes na sua membrana. Estes podem ser seletivos, ou seja, permeáveis a cátions, como Na^{2+} , K^+ e Ca^{2+} , ou a ânions, como o Cl^- , seu representante principal. Eles são compostos pelo corpo celular (conhecido como soma), o centro metabólico da

célula. Destes partem prolongamentos celulares: os dendritos, que são receptores de sinais químicos e elétricos (pós-sinápticos), e os axônios, longos e, geralmente, únicos prolongamentos, que têm por função conduzir o impulso elétrico para as células adjacentes (pré-sináptico) (CLAPHAM, 1995).

O principal meio de comunicação entre neurônios é a sinapse, sendo que as químicas são as de maior importância. Esta comunicação é composta por um terminal pré-sináptico, capaz de liberar neurotransmissores, e uma membrana pós-sináptica, onde, em sua superfície, estão presentes receptores capazes de captar e transmitir a mensagem trazida pelos neurotransmissores.

As células da glia, ou neuroglias, foram descritas em 1946 por Virchow, como sendo mero componente de suporte estrutural para as células neuronais. Na década de 50, estudos realizados em astrócitos demonstraram que estas células davam não apenas suporte estrutural, mas também suporte metabólico aos neurônios, principalmente no metabolismo de neurotransmissores (como o glutamato) e dos íons K^+ , além do metabolismo energético, regulando assim a quantidade de glicose cerebral (OBERHEIM, 2010; ANTUNES, 2002).

A superfície ventricular cerebral em desenvolvimento é considerada a origem destas células progenitoras, sendo que a separação da linhagem celular ocorre ainda no período embrionário. Dentre as primeiras células geradas no desenvolvimento cerebral estão as da glia radial, células que apresentam importantes características dos astrócitos: a expressão de marcadores celulares como a proteína ácida fibrilar glial (GFAP), a vimentina e a proteína S100B (LAMING, 2000). O corpo das células da glia radial, primeiramente reside na zona ventricular, enquanto um processo apical expande-se levando ao espessamento do tubo neural, servindo então de substrato para a migração neuronal. Estas observações têm levado à hipótese de que o arranjo das células da glia radial talvez sirva como um andaime para a organização vertical de estruturas laminares como o hipocampo, córtex e cerebelo. Destes, o hipocampo e o cerebelo são estruturas simples, possuindo apenas duas camadas neuronais. O córtex é mais complexo, sendo formado por seis camadas celulares (HATTEN, 1999).

Enquanto todos os outros tipos celulares persistem no adulto ao longo do amadurecimento, as células da glia radial em muitas regiões cerebrais parecem ser convertidas a astrócitos e células ependimais (LAMING, 2000).

A imagem de que as células gliais apenas exerciam a função de suporte mecânico e metabólico foi modificada na década de 70, quando receptores beta-adrenérgicos foram descobertos em astrócitos. Isso mostrou que estas células, apesar de não serem excitáveis, podem responder a mudanças do meio extracelular (LAMING, 2000), contribuindo assim para a plasticidade neural.

Dentro da classificação das células gliais, temos no SNC os astrócitos, os oligodendrócitos e as micróglia, enquanto que, no sistema nervoso periférico, as células de Schwann constituem o principal componente glial (HOF, 1999).

Os oligodendroglíocitos são gerados após o nascimento e passam por uma série de fenótipos, desde células tronco indiferenciadas até células maduras formadoras de mielina (HOF, 1999). Em cultura, o progenitor O2A é dito uma célula bipolar. Estas células quando cultivadas em meio contendo baixas concentrações de soro, diferenciam-se rapidamente em oligodendrócitos maduros em um período de três a cinco dias. Por outro lado, quando cultivadas com altas concentrações de soro, diferenciam-se em astrócitos tipo 2. “*In vivo*”, a interação célula-célula do sistema nervoso em desenvolvimento, na forma de fatores de crescimento, modula o desenvolvimento normal do progenitor incluindo a diferenciação em oligodendrócitos ou astrócitos tipo 2, a extensão da divisão celular e o tempo e razão da diferenciação. As células microgliais por sua vez, seriam derivadas de monócitos que penetram no parênquima cerebral durante o desenvolvimento (HOF, 1999).

Algumas características são cruciais para a diferenciação de células gliais das neuronais. Entre estas, se destacam a incapacidade das células gliais de formarem contatos sinápticos, e a habilidade de dividir-se ao longo da vida (RAINE, 1994). Além disso, a membrana destas células difere da neuronal por não ser excitável como dito anteriormente, ter potencial de repouso mais negativo e maior permeabilidade a íons K^+ .

Os astrócitos são as células mais abundantes no SNC, correspondendo a cerca de 50% do volume cerebral. Eles são conhecidos desde o século XIX, mas durante muito tempo não despertaram o interesse dos histologistas, já que eram consideradas apenas como suporte estrutural para aos neurônios. Esta imagem tem sido modificada, pois estudos têm demonstrado que os astrócitos são células que apresentam enorme diversidade funcional encefálica (SOFRONIEW, 2010).

Os astrócitos, chamados assim pelo seu aspecto estrelar, são classificados em dois subtipos de acordo com diferenças em sua morfologia e localização

anatômica: os protoplasmáticos (**Figura 5**) e os fibrosos. Os astrócitos protoplasmáticos são encontrados por toda a substância cinzenta e foram primeiramente demonstrados através da impregnação clássica pela coloração com prata, exibindo várias ramificações de distribuição globular. Os astrócitos fibrosos são encontrados ao longo de toda a substância branca e exibem a morfologia de longas e múltiplas ramificações fibrosas. Estudos de neuroanatomia indicam que ambos os subtipos exercem extensos contatos com os vasos sanguíneos.

A imunoistoquímica tem se mostrado uma técnica muito útil na identificação e caracterização astrocitária, tanto em situações fisiológicas quanto em condições patológicas. Os marcadores mais utilizados são a GFAP e o S100B.

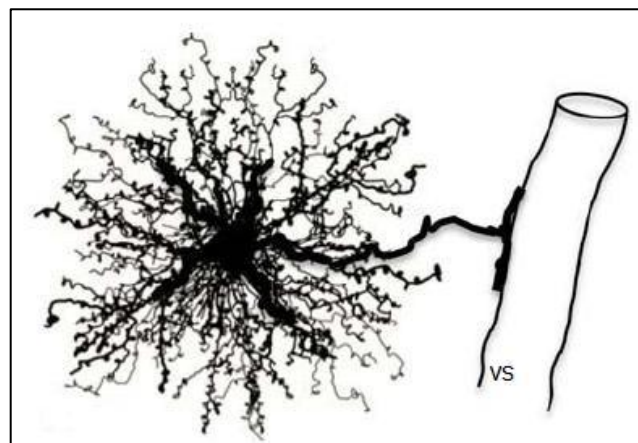


Figura 5 - Desenho mostrando um astrócitos protoplasmático originando uma densa rede de delicados processos filamentosos, alguns deles tendo contato com os vasos sanguíneos (VS). *Fonte:* SOFRONIEW, 2010.

Algumas estruturas do SNC apresentam características astrocitárias, como a glia de Bergmann no cerebelo, as células de Muller na retina e pituitócitos na glândula pituitária (SOFRONIEW, 2010).

Os astrócitos revestem o SNC de uma forma contígua e de maneira não sobreposta, ou seja, bem organizada. Não há região do SNC desprovida de astrócitos ou extremamente correlacionada com estas células. No hipocampo e em algumas regiões corticais, é estimado que os processos citoplasmáticos de um único astrócitos tenham contato com centenas de dendritos e múltiplos neurônios, além de estarem envolvidos em mais de cem mil sinapses (HALASSA, 2007; BUSHONG, 2002). É também notável que os astrócitos humanos sejam maiores, estruturalmente mais complexos e mais diversos do que os dos roedores (OBERHEIM, 2009).

Os astrócitos expressam canais de potássio e de sódio, mas ao contrário dos neurônios não são capazes de iniciar ou propagar potenciais de ação ao longo de seus processos. Isto não significa, no entanto, que sejam células silenciosas. Os astrócitos exibem aumentos regulados na concentração intracelular de Ca^{2+} o que representa uma forma de excitabilidade. Estas elevações podem ocorrer como resultado da liberação desse íon a partir de depósitos intracelulares, da ação de neurotransmissores liberados durante a atividade neuronal ou da propagação de astrócitos circunjacentes.

Muitos trabalhos têm atribuído aos astrócitos importantes funções, dentre as quais se destacam: (a) auxílio na migração de neurônios durante o desenvolvimento cerebral através da formação de fibras pela glia radial; (b) fornecimento de fatores tróficos para neurônios, antes mesmo de estes estabelecerem seus contatos sinápticos; (c) armazenamento de glicogênio, a principal reserva energética do cérebro; (d) tamponamento dos níveis iônicos extracelulares, preservando a atividade excitatória neuronal, e (e) participação no metabolismo glutamatérgico, já que é a única célula nervosa a possuir a enzima glutamina sintetase (SOFRENIUW, 2010).

Os astrócitos também possuem importante ação no processo de cicatrização nervosa, conhecida como astrogliose reativa, onde esse tipo celular torna-se mais numeroso focalmente. Este processo decorre de injúrias cerebrais, e tem sido registrado em doenças como: síndrome da imunodeficiência adquirida, encefalopatias espongiformes causadas por príons, doenças inflamatórias desmielinizantes, injúrias traumáticas agudas no cérebro e doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer. Em função da astrogliose reativa, há um aumento no conteúdo intracelular de proteínas marcadoras astrocitárias, como a S100B e a GFAP.

Com o aumento de estudos envolvendo os astrócitos e suas funções, muitas ações desenvolvidas no SNC foram demonstradas (VOLTERRA, 2005). Nas últimas décadas foram encontrados novos papéis fisiológicos para estas células e uma gama de relações destas com os neurônios, tais como, síntese e captação de neurotransmissores, auxílio na sinaptogênese, entre outras (ARAQUE, 1999).

A participação dos astrócitos nas sinapses e seus diversos papéis na funcionalidade sináptica levaram ao termo sinapse tripartite (**Figura 6**) para designar a relação existente entre estas células e os neurônios (HALASSA, 2007; ARAQUE,

1999). Os astrócitos protoplasmáticos apresentam uma estrutura bastante intrincada, diretamente ligada a sua funcionalidade, qual sejam liberação e captação de neurotransmissores. Portanto, é provável que modificações na estrutura destas células provoquem mudanças em suas funções (ARAQUE, 1999).

A GFAP contribui para a definição da forma astrocitária destas células. Esta proteína é expressa em astrócitos maduros e sua detecção ainda pode ser utilizada como um dos principais marcadores astrocitários no SNC (GARCIA-SEGURA, 2004). Mudanças na expressão ou fosforilação desta proteína podem acarretar modificações na morfologia celular, indicando uma possível mudança na funcionalidade astrocitária (GOMES, 1999).

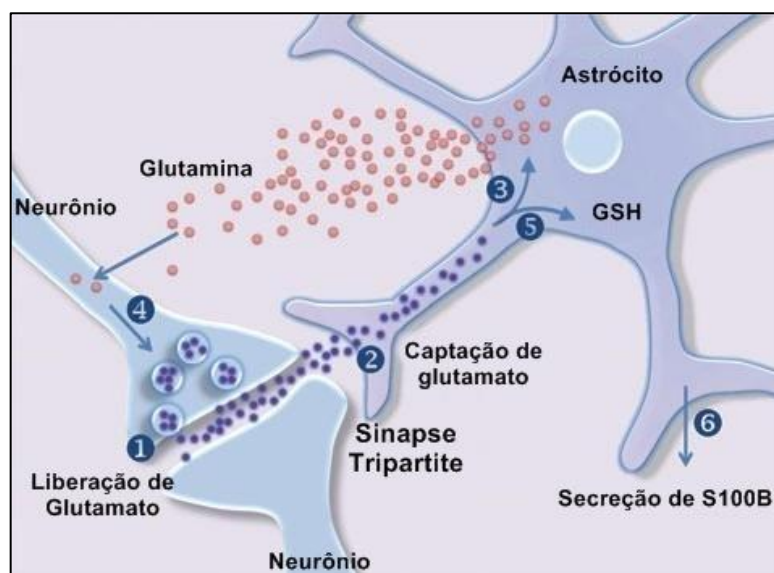


Figura 6: Desenho demonstrando a correlação celular em uma sinapse tripartite. A numeração se refere à hipótese da influência do reveratrol sobre as células neurogliais (relatado do artigo-fonte). *Fonte:* modificado de QUINCOZES-SANTOS, 2011.

Na região encefálica que abordaremos em nosso estudo, a grande maioria dos astrócitos de roedores adultos jovens apresenta um formato fusiforme, e seguem uma orientação paralela aos dendritos apicais dos neurônios piramidais da área 1 do corno de Amon (CA1). Esta região também apresenta, em menor número, alguns astrócitos esféricos e outros astrócitos com formato mais alongados (BUSHONG, 2002).

Até a década de 90, a dificuldade na observação de mudanças na expressão de GFAP, especialmente na morfologia astrocitária, frente a diferentes protocolos experimentais, era intimamente relacionada à análise observacional puramente

qualitativa. Tal análise dependia basicamente da qualidade das técnicas imunoistoquímica empregadas e da experiência prévia do observador. Recentemente, com a padronização das técnicas de imunoistoquímica e os avanços das técnicas de análise de imagens, mais especificamente as medidas de densidade óptica, análise planar e os círculos concêntricos de Scholl, é possível uma análise semi-quantitativa e quantitativa, com maior precisão e acurácia dos diferentes tipos celulares do SNC, entre eles os astrócitos S100B positivos (MARTINEZ, 2006; XAVIER, 2005). A maior parte das alterações astrocitárias geralmente ocorre em paralelo com as mudanças neuronais (THEODOSIS, 2008).

2.2.3 Hipocampo

O hipocampo é um componente cerebral com interesse crescente nas últimas décadas. Ele faz parte do sistema límbico e exerce papéis fundamentais em diversos processos fisiológicos, com especial destaque na formação, consolidação e evocação da memória (PIAZZA, 2010; SHARMA, 2010; FARIOLI-VECCHIOLI, 2008; REVSIN, 2008; ROSSATO, 2007; DERE, 2005; ASTUR, 2002).

Seu estudo anatômico e histológico iniciou na primeira década do século XX, culminando com o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1906 (RAMÓN Y CAJAL, 1904). Ele ganhou esse nome pela sua semelhança macroscópica com uma espécie de cavalo-marinho (**Figura 7**).

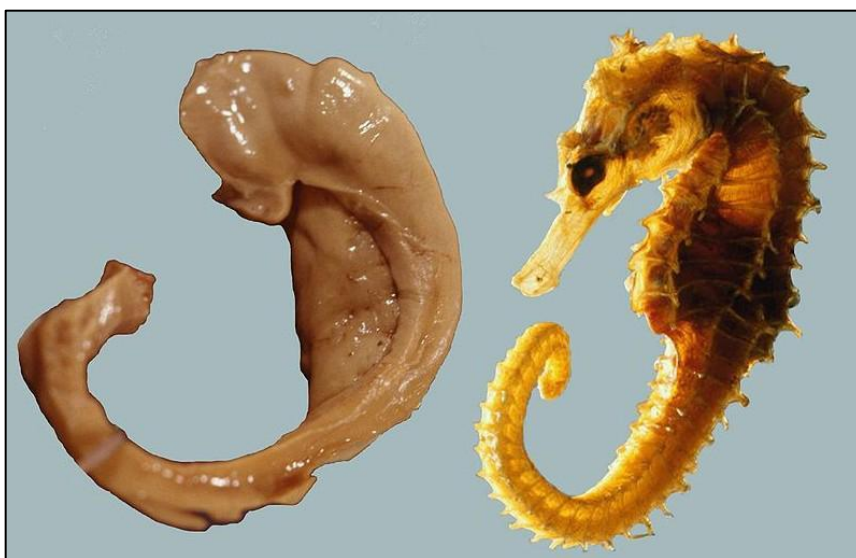


Figura 7: Hipocampo humano dissecado (à esquerda) e comparado com um espécime de cavalo-marinho (à direita). *Fonte:* ANDERSEN, 2007.

Ramón y Cajal, considerado o fundador da neurociência (ANDRES-BARQUIN, 2001), demonstrou que o hipocampo (**Figura 8**) recebe aferências através do cíngulo (a partir da área entorrinal e do giro límbico), passando pela fímbria até a região subcortical. A uniformidade de distribuição destas aferências permitiu a sua divisão em corno de Amon (CA) e em giro denteado (DG). O DG, por sua vez, é subdividido em hilo e em fáschia denteada (LANGSTON, 2010).

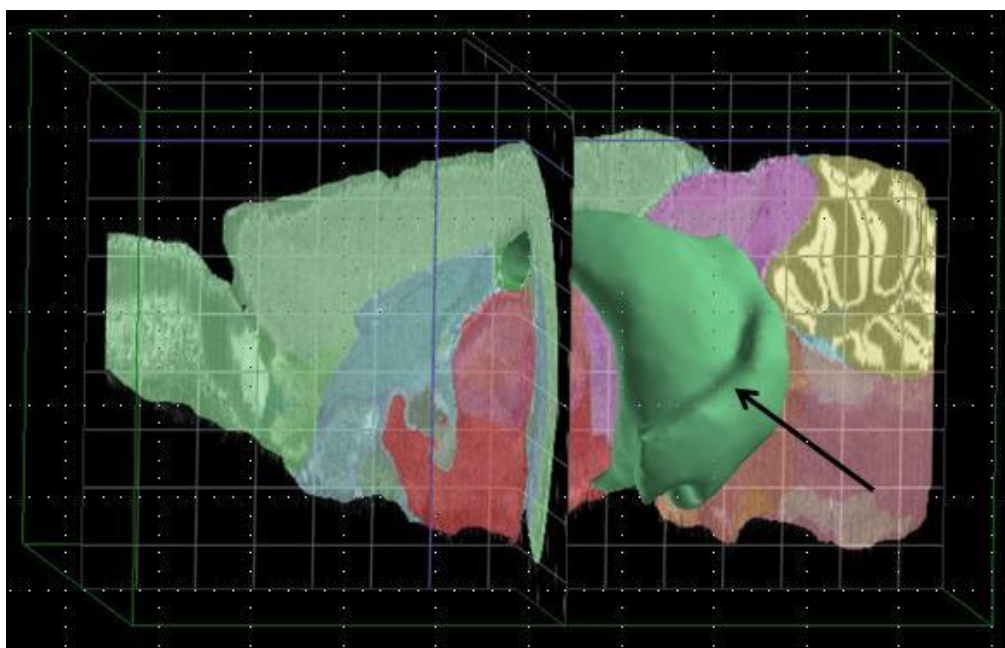


Figura 8 - Figura mostrando as principais divisões do encéfalo de um camundongo, destacando em 3D (área verde central evidenciada pela seta), o hipocampo. *Fonte:* ALLEN INSTITUTE FOR BRAIN SCIENCE, 2012.

O estudo do CA foi extremamente aprofundado, iniciando com um dos alunos de Ramón y Cajal, sendo que a terminologia atual é derivada de suas pesquisas (LORENTE DE NÓ, 1934). Coube a ele, após a observação em animais inferiores, subdividir o CA em quatro regiões (**Figura 9**): área 4 do CA (CA4), que tem encontro direto com o DG; a área 3 do CA (CA3), que fica proximal ao DG e que recebe deste as projeções das fibras musgosas; a CA1, que não recebe as fibras musgosas do DG e que emite a maioria das eferências, e a área 2 do CA (CA2), uma pequena área entre CA1 e CA3 que não tem destaque na literatura por ser considerada uma área de transição (BERNARD, 1994; GROVE, 1999).

O CA está organizado em sete camadas histologicamente distintas (LOPES DA SILVA, 1990). A primeira delas, adjacente à fissura hipocampal, é o “*stratum moleculare*” (SM), que contém essencialmente componentes dendríticos. A segunda,

“*stratum lacunosum*” (SL), consiste de feixes de fibras paralelas provenientes de células piramidais do próprio hipocampo e também de aferências externas. O “*stratum radiatum*” (SR) é a terceira camada, onde existem corpos celulares esparsos e as fibras dos colaterais de Schaffer. A quarta camada é o “*stratum pyramidale*” (SP), onde se localizam os corpos dos neurônios piramidais considerados as principais células excitatórias hipocâmpais. Abaixo desta, encontra-se a quinta camada, o “*stratum oriens*” (SO), que contém os dendritos basais das células piramidais, corpos celulares de distintos tipos celulares (interneurônios em cestos e células trilaminares horizontais), além das projeções recorrentes de CA3. A sexta camada é o “*stratum alveus*” (SA), onde estão os axônios das células piramidais que passam em direção à fímbria e ao fórnix, constituindo uma das mais importantes saídas hipocâmpais. Por fim, a sétima camada é a zona epitelial, que forma a superfície ventricular do hipocampo.

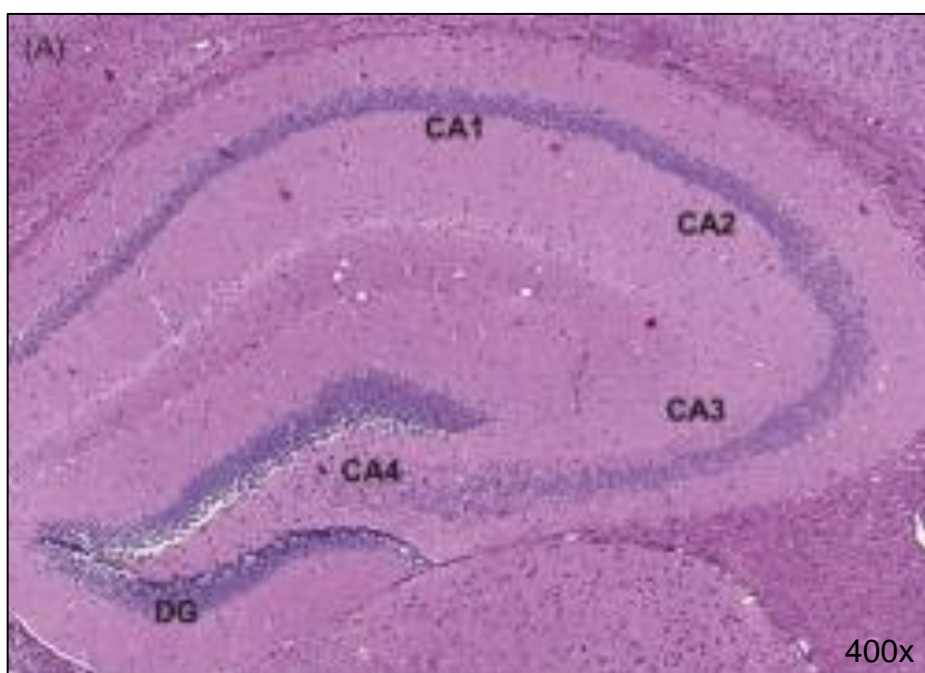


Figura 9 - Corte coronal do encéfalo de um camundongo ao nível do bregma, mostrando o hipocampo e suas regiões (coloração de hematoxilina-eosina, 400x). CA: corno de Amon; DG: giro denteado. *Fonte:* TREUTING, 2012.

Entre o SA e o SR forma-se o neurópilo (LOPES DA SILVA, 1978), onde ocorrem as sinapses e em meio ao qual existe uma grande quantidade de astrócitos dispersos (AMARAL, 1989).

Diversos pesquisadores dedicaram-se ao mapeamento do circuito hipocampal, caracterizado pela existência de alças ora paralela, ora recorrentes entre as diferentes regiões do CA. A organização hipocampal em camadas e em regiões permitiu que as células do hipocampo desempenhassem funções associativas de estímulos provenientes de diversas estruturas neocorticais e subcorticais, realizando funções multissensoriais, processando-as, e enviando-as novamente ao manto cortical e a algumas estruturas subcorticais (VAN STRIEN, 2009; KLAUSBERGER, 2008; KOGANEZAWA, 2008; CENQUIZCA, 2007; CENQUIZCA, 2006; WITTER, 2000; RISOLD, 1996; WOODHAMS, 1993; LOPES DA SILVA, 1990; SWANSON, 1978). Este complexo circuito excitatório, unidirecional e não recíproco é chamado de via trissináptica, com início no córtex entorrinal e fim no CA1 (LANGSTON, 2010; VAN STRIEN, 2009), sendo tal circuito extremamente atípico em conexões córtico-corticais (AMARAL, 1989). Os axônios dos neurônios piramidais do córtex entorrinal formam um feixe nervoso (via perfurante), que faz sinapse com os dendritos das células granulares do giro denteado. Estas emitem axônios denominados fibras musgosas para os neurônios piramidais do CA3. O fechamento do circuito se dá nas sinapses amielínicas (colaterais de Schaffer) no SR do CA1. No camundongo tais estruturas são análogas (EL-FALOUGY, 2008).

O preciso papel hipocampal nas diversas funções do sistema límbico é motivo de um historicamente acalorado debate. Atualmente, entretanto, existe unanimidade quanto a sua contribuição na formação e na consolidação da memória, além do processo de aprendizagem (LIGALI, 2010). O mecanismo celular correlacionado com estas funções é conhecido como potencialização de longo termo, que é uma forma de plasticidade sináptica caracterizada pelo prolongamento da transmissão de sinais a partir das sinapses excitatórias que persistem por longos períodos após a sua indução (LYNCH, 2004). No hipocampo, a potencialização de longo termo entre as sinapses dos neurônios piramidais localizados em CA3 e em CA1 é a mais amplamente estudada, sendo comumente utilizada como um sistema experimental para acessar a capacidade de aprendizagem e de memorização em modelos animais.

Dessa forma, podemos diretamente correlacionar as alterações hipocampais com as consequências neurológicas que acometem os pacientes com vários tipos de doenças, inclusive os com AOS.

Cabe destacar ainda que o suprimento sanguíneo não é homogêneo no hipocampo. O CA1 é a região com menor densidade de capilares, o que a torna mais suscetível aos diferentes insultos encefálicos, tornando-a uma das regiões mais pesquisadas e de grande interesse do SNC (CAVAGLIA, 2001).

2.3 Proteína S100

O Ca^{2+} é provavelmente o mais antigo (e energeticamente barato) segundo mensageiro responsável pela transdução de sinais (BERRIDGE, 2000; KRETSINGER, 1990). Seu aumento transitório intracelular apresenta um papel regulatório de diversos processos celulares, incluindo a contração, a motilidade, a diferenciação e a expressão gênica. Devido a sua propriedade de não transferência de carga e por exibir baixa afinidade por moléculas lipídicas, o Ca^{2+} interage apenas pela união a proteínas ligantes de cálcio (sendo um exemplo a S100) que atuam como moléculas moduladoras ou como moléculas tamponantes (VAN ELDIK, 2003).

De acordo com suas características estruturais, as proteínas envolvidas com esse cátion podem ser divididas em três grupos distintos: (a) a superfamília calmodulina-S100-troponina C, (b) as proteínas que apresentam domínios ligantes de cálcio do tipo “*hemolisin-like*” e, (c) a família das anexinas (ZIMMER, 1995). Dentro da primeira, a família das S100 constitui o maior subgrupo, tendo sido objetivo de extenso interesse científico nas últimas quatro décadas.

A proteína S100 foi primeiramente identificada em um experimento de mapeamento proteico (cromatografia em colunas de troca iônica seguido de eletroforese em gel de amido) de extratos solúveis de encéfalos e de fígados bovinos, onde se objetivou encontrar proteínas específicas do sistema nervoso. Uma banda proteica presente no extrato encefálico moveu-se mais rapidamente na eletroforese e despertando interesse. Como esta proteína apresentou solubilidade parcial em solução de sulfato de amônio 100% saturado e pH neutro, ela recebeu a denominação de “S100”, sendo sugerida sua origem neuronal (MOORE, 1965).

Estudos posteriores demonstraram que essa fração S100 proveniente do tecido encefálico era composta pelo arranjo de dois polipeptídios (α e β) cuja combinação constituiria as três isoformas da respectiva proteína: A0 (dímero α - α), A1 (dímero α - β) e B (dímero β - β). O compartilhamento de aproximadamente 50% de

homologia na sequência aminoácida e sua semelhança estrutural sugeriu uma proximidade evolutiva destas subunidades (ISOBE, 1981).

2.3.1 Propriedades estruturais

As proteínas S100 acabaram sendo imunodetectadas em grupos celulares específicos, não somente no SNC. Cada membro da família exibe um padrão único de expressão, porém, algumas células expressam vários membros da família (ZIMMER, 1995).

A família S100 de proteínas, assim como a família calmodulina-S100-troponina C, possui uma característica em comum: uma alça ligante de cálcio altamente conservada e flanqueada por duas α -hélices. Esse padrão “*helix-loop-helix motif*” (Figura 10) é conhecido por “*EF-hand*” (DONATO, 2009).

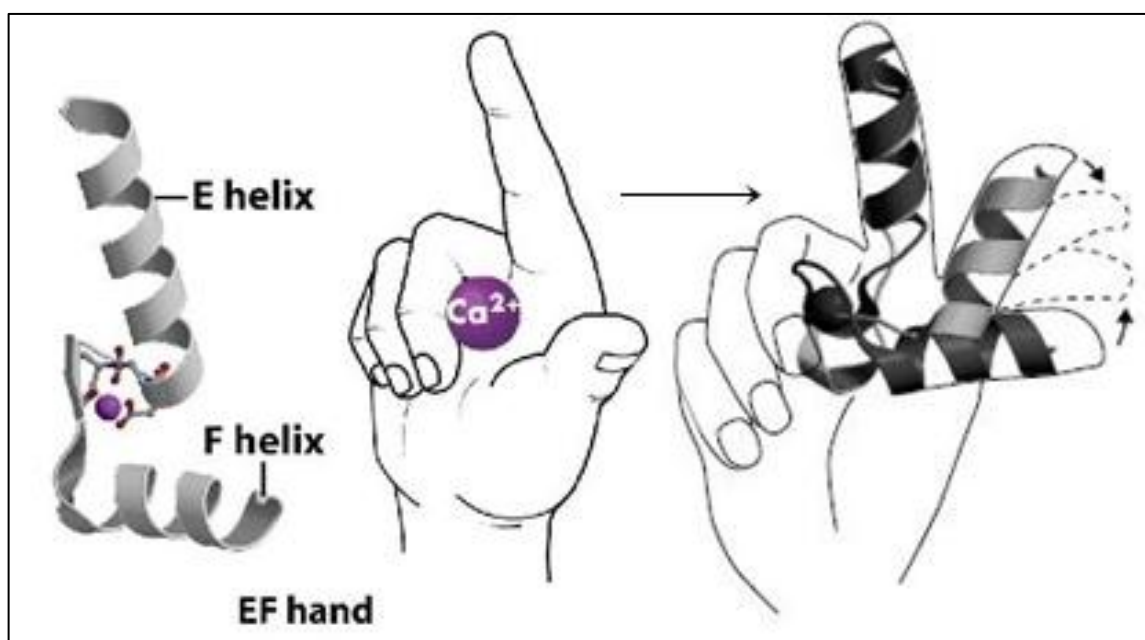


Figura 10: Configuração estrutural comum a todos os membros da família da proteína S100. Entre as hélices E e F, se encontra uma região de união, justamente onde o íon cálcio é capaz de aderir e modificar a estrutura conformacional da proteína. A mão indica um esquema da “*EF-hand*”, sendo a hélice E representada pelo dedo indicador e a hélice F representada pelo polegar. O íon cálcio ao se ligar com a região de união provoca uma ação semelhante à adução/abdução do polegar. *Fonte:* modificado de LEWIT-BENTLEY, 2000.

Estudos específicos da proteína S100 comprovaram que ela pode ligar quatro moles de Ca^{2+} por dímero de proteína em sítios específicos. Além disso, possui dois “*EF-hand*” distintos por subunidade: um na porção carbóxi terminal (sítio de ligação

de alta afinidade) e outro na porção amino terminal (sítio de baixa afinidade) (DONATO, 2001). Esses dois locais estão interconectados (**Figura 11**) por uma região “dobradiça” (DONATO, 2009).

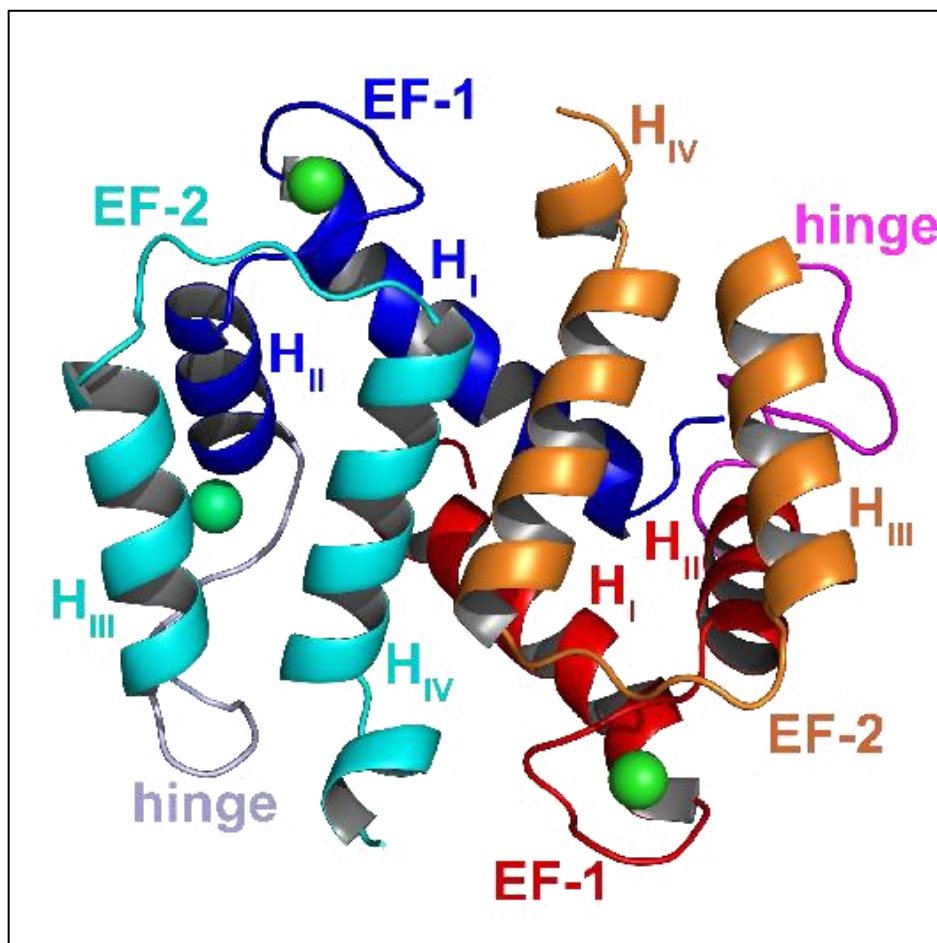


Figura 11: Desenho mostrando a localização das regiões “dobradiça” (“hinge”) da proteína S100. Fonte: DONATO, 2001.

A ligação do Ca^{2+} na proteína S100 pode ser influenciada pelo pH e pela presença de cátions metálicos. Esta induz mudanças conformacionais que provocam a exposição de resíduos hidrofóbicos que são sítios de ligação das proteínas efetoras. A exposição destas regiões altera a atividade proteica, provocando diferenças na resposta celular (HEIZMANN, 1999; ZIMMER, 1995).

2.3.2 Propriedades funcionais

Apesar de ter sido descrita há mais de quarenta anos, e de hoje compreender vinte e cinco membros, muitos deles com lócus cromossômicos distintos (**Tabela 1**),

as funções biológicas da proteína S100 ainda não foram totalmente identificadas e compreendidas. Tem sido relatado que esta família apresenta atividades tanto intracelulares quanto extracelulares, sendo estas, tipo celular dependente.

Tabela 1 - Membros da família da proteína S100 e a sua localização gênica específica.

Membros da família da proteína S100	Loci cromossômico
S100A1-S100A18; tricoilina, filagrina, repetina	1q21
S100B	21q22
S100G	Xp22
S100P	4p16
S100Z	5q14

Fonte: SEDAGHAT, 2008.

No interior das células estas têm sido relacionadas a funções biológicas como: (a) regulação da fosforilação proteica dos constituintes do citoesqueleto, (b) modulação da atividade de enzimas e, (c) modulação do ciclo celular.

2.3.3 A proteína S100B

A proteína S100B é um dos membros da família S100 de proteínas ácidas e ligantes de Ca^{2+} , do tipo “*EF-hand*”, expressa exclusivamente nos vertebrados. Ela pode ser encontrada difusamente no interior do citoplasma ou associada à membrana intracelular, aos microtúbulos e aos filamentos intermediários do tipo III (SORCI, 2010). Ela é expressa em grande quantidade no encéfalo.

Após a ligação com o Ca^{2+} , a S100B sofre uma modificação estrutural: a exposição ao solvente de uma porção hidrofóbica. Esta porção é capaz de interagir com proteínas-alvo regulando assim suas funções.

Nenhuma atividade enzimática específica é atribuída à S100B, apesar de ter sido demonstrado que proteínas da família S100 são capazes de regular a atividade enzimática. Acredita-se que a S100B exerça pequena influência no metabolismo

energético, interagindo com a adenilciclase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, frutose-1,6-bifosfato aldolase e estimulando a fosfoglicomutase (LANDAR, 1996). Outra enzima regulada pela S100B é a Ndr, uma proteína cinase nuclear importante na divisão celular e na morfologia celular.

A expressão da S100B está restrita a um número limitado de tipos celulares: astrócitos (principal), adipócitos, oligodendrócitos em maturação, células epiteliais renais, células progenitoras neurais, pituícitos, ependimócitos, certas populações neuronais, condrócitos, melanócitos, células de Langerhans, células dendríticas, algumas subpopulações de linfócitos, células musculares esqueléticas e mioblastos e células musculares satélite (TUBARO, 2010; HACHEM, 2005; DELOULME, 2004; VIVES, 2003; ARCURI, 2002; DONATO, 2001; DONATO, 1999; RAMBOTTI, 1999; SORCI, 1999). Os dois primeiros tipos celulares secretam a S100B de uma forma em que toda a quantidade expressa é liberada extracelularmente no caso de dano ou de necrose (SORCI, 2010).

Existem poucos estudos da distribuição da S100B no SNC durante o desenvolvimento embriológico humano. Apesar disso, tem sido postulado à S100B papel na maturação autocrítica e na migração neuronal (TIU, 2000). Estudos de imunistoquímica demonstraram que em hipocampo de humanos, algumas células imunorreativas para S100B aparecem a partir da décima semana de gestação, sendo que este número sofre aumento significativo até a vigésima quinta semana. Em adultos a imunorreatividade é semelhante à do recém-nascido na camada molecular hipocampal, enquanto que nas demais camadas ocorrem decréscimo do número de células positivas. No córtex entorrinal, a proteína mostrou-se imunorreativa a partir da décima quinta semana de gestação e manteve-se na mesma intensidade durante o desenvolvimento, inclusive na idade adulta. Em córtex occipital o número de células positivas para todas as camadas, foi maior que o encontrado no hipocampo e córtex entorrinal, a imunorreatividade apareceu a partir da vigésima semana e atingiu um platô na vigésima sétima semana. Adultos apresentaram valores semelhantes ao recém-nascido na camada subcortical, enquanto que na camada granular o número de células reativas aumentou (TIU, 2000). A expressão diferenciada de S100B sugere que esta proteína apresenta diferentes funções durante o desenvolvimento e durante a vida adulta.

Em camundongos é possível encontrar a proteína logo após o nascimento, sendo que seu acúmulo inicia a partir dos quatorze dias, aumentando

progressivamente e rapidamente até os seis meses de idade. A partir daí, inicia-se um período de queda quantitativa da proteína até os trinta meses.

No interior das células, a S100B funciona como sensor proteico do Ca^{2+} . Após a ligação iônica, sua hélice III de monômeros individuais se torna mais perpendicular em relação à hélice IV, expondo assim resíduos hidrofóbicos nestas duas regiões helicoidais e na extensão C-terminal que ficam expostas ao solvente (RUSTANDI, 2000). Estes resíduos, juntamente com os resíduos da hélice I no monômero oposto, definem uma fenda hidrofóbica, através da qual a S100B se liga a proteínas-alvos intracelulares. Dessa forma, ela exerce sua função biológica através da interação com outras proteínas, afetando suas atividades. Assim, a proteína S100B participa da regulação da proliferação, diferenciação e formato celular, homeostase do Ca^{2+} , fosforilação proteica, transcrição, dinâmica microtubular e dos filamentos intermediários dos tipos III, da atividade enzimática e metabólica (DONATO, 2009). Ela também regula a atividade enzimática, o estado organizacional dos componentes do citoesqueleto, os fatores de transcrição, a homeostasia do Ca^{2+} , a fosforilação e a degradação proteica, além da locomoção, proliferação e diferenciação celular (DONATO, 2009).

Apesar de existirem poucos estudos moleculares a respeito destas últimas funções da S100B, parecem ser três os sistemas envolvidos destes processos: os neurônios PC12, a linhagem celular astrocitária e a linhagem celular mioblástica (SORCI, 2010). Os astrócitos expressam quantidades relativamente elevadas de S100B (DONATO, 2009). Reduções nos níveis de expressão de S100B pelos astrócitos causam diminuição da proliferação, aquisição de um fenótipo diferenciado e redução na migração (BROZZI, 2009).

Os astrócitos secretam a S100B constitutivamente, podendo ser esta estimulada ou reduzida por uma série de condições ou fatores (DONATO, 2009). A S100B tem sido associada com a promoção da sobrevivência neuronal e com a extensão de neuritos curtos quando em níveis considerados fisiológicos, porém ela pode causar morte neuronal quando em altas concentrações (níveis submicromolares ou micromolares). Todos estes efeitos necessitam da interação da S100B com a estimulação do receptor para produtos finais da glicação avançada (RAGE) (SORCI, 2010; HUTTUNEN, 2000). O RAGE é um receptor multiligante da superfamília da imunoglobulina envolvido na resposta imunológica inata, no entanto, ele também tem um papel no desenvolvimento tecidual (RAUVALA, 2010). Os

baixos níveis da S100B protegem os neurônios contra a toxicidade da beta-amiloide via ação do RAGE. Sua alta concentração, no entanto, provoca o estímulo excessivo do RAGE nas células neuronais resultando na produção aumentada de espécies reativas de oxigênio, sendo estas capazes de causar apoptose (HUTTUNEN, 2000).

A S100B extracelularmente exerce um papel na neuroinflamação e na ativação microglial (os macrófagos sentinelas do SNC), esta última apenas quando em concentrações muito elevadas. A S100B também induz a sobre regulação do óxido nítrico sintetase e estimula a liberação de óxido nítrico (ADAMI, 2004). No entanto, a S100B regula a expressão de enzimas pró-inflamatórias (principalmente a cicloxigenase do tipo 2) nas micróglia e estimula a regulação de interleucina-1beta e fator de necrose tumoral alfa, na ausência de cofatores de forma dependente do RAGE (BIANCHI, 2010). Estudos recentes também sugerem que níveis altos da proteína estimulem a quimiotaxia microglial via indução dependente do RAGE e a secreção de certos tipos de quimiocinas. A participação da S100B na neuroinflamação é apoiada por achados multicêntricos. Neste contexto, a S100B exibe propriedades de fator de dano associado ao padrão molecular (DAMP), de sinalizador do dano tecidual e de participante no processo de resposta inflamatória. No entanto, a S100B não é apenas um fator DAMP em baixas concentrações, exercendo efeitos tróficos sobre os neurônios e neutralizando a atividade pró-inflamatória de neurotoxinas sobre astrócitos e micróglia (REALI, 2005).

Outro papel extracelular da S100B é sobre a miogênese. A S100B inibe a diferenciação mioblástica e estimula a proliferação deste tipo celular, além de reduzir a apoptose (RIUZZI, 2006). De uma forma surpreendente, estes efeitos são independentes da sinalização através do RAGE apesar dos mioblastos expressarem o RAGE.

Uma vez no meio extracelular, a S100B exerce efeito tanto autócrino quando parácrino, sendo capaz de acoplar o RAGE sobre as células responsivas (DONATO, 2007), possuindo, portanto, as funções de reguladora intracelular e de sinalização extracelular.

A ação extracelular da proteína depende da sua concentração, ela pode exercer efeitos tróficos ou tóxicos sobre o tecido no qual é secretada. Em concentração nanomolar ela exerce efeitos neurotróficos estimulando a extensão de neuritos (KLIGMAN, 1985), facilitando a sobrevivência dos neurônios durante o desenvolvimento (VAN ELDIK, 1991), além de estimular a proliferação de astrócitos

(SELINFREUD, 1991) e estimulação e interação com fatores de transcrição. Tal efeito se daria pela estimulação do fluxo de Ca^{2+} , hipótese evidenciada em experimento mostrando que o Ca^{2+} é necessário e suficiente para regular as extensões neuríticas.

Algumas especulações foram feitas a respeito da interação S100B/neuromodulina (GAP-43), sugerindo que a S100B poderia interagir com grupamentos sulfidríla dos resíduos de cistina três e quatro da GAP-43, os quais parecem ser importantes para a ligação da proteína à membrana neuronal (SKENE, 1989). Isto nos leva a levantar a interessante possibilidade de que a S100B poderia regular a extensão do neurito por ação sobre a GAP-43 na membrana neuronal. Estudos mais recentes apontam para o fato de que a atividade trófica ocorre pela ligação da S100B ao RAGE promovendo a translocação nuclear de NF-KB e superregulação do fator anti-apoptótico BCL-2 nos neurônios alvos (HUTTUNEN, 2000; ALEXANIAN, 1999). Até o presente momento, no entanto, não existem informações sobre a co-localização de GAP-43 e S100B e nem existem evidências de que o aumento da expressão da S100B seja acompanhado por um bloqueio da função sugerida para a GAP-43 na extensão do terminal sináptico (DONATO, 2001). Por ser uma proteína neuronal, talvez a S100A1 poderia exercer esta função.

Concentrações em níveis micromolares podem exercer efeitos neurotóxicos e neurodegenerativos, onde se observa apoptose de neurônios e de astrócitos. Algumas doenças neurodegenerativas apresentam elevados níveis de S100B, como a Síndrome de Down e a Doença de Alzheimer (GRIFFIN, 1989). Estes dados sugerem que a S100B pode ter alguma função na patogênese destas doenças, uma vez que o gene que codifica a S100B encontra-se na região cromossomal 21q22.3 (ALLORE, 1988); e que a proteína beta-amiloide estimula a síntese de S100B e seu mRNA em cultura de astrócitos (PEÑA, 1995). Além disso, a produção da proteína beta-amiloide pode ser estimulada em cultura de neurônios expostos à S100B (LI, 1998).

Camundongos transgênicos que expressam elevadas concentrações de S100B apresentam alterações comportamentais além de apresentar uma alta densidade de dendritos no hipocampo durante períodos precoces de desenvolvimento pós-natal e uma significativa perda de dendritos quando apresentam um ano de idades (WHITAKER-AZMITIA, 1997), sugerindo o efeito deletério da proteína em elevadas concentrações. O aumento da proteína induz uma

resposta inflamatória mediada pelo fator de transcrição nuclear em astrócitos, dessa forma a enzima de síntese de óxido nítrico passa a produzir NO (óxido nítrico), que conseqüentemente provoca morte celular com características definidas por apoptose (HU, 2000). O efeito tóxico da S100B também ocorre por interação com RAGE aumentando as espécies oxigênio-reativas, liberação de citocromo C e ativação da via da caspase. (HUTTUNEM, 2000).

Independentemente da localização, exerce inibição da fosforilação sobre outras proteínas por interagir com substratos cinases, bloqueando o acesso dessas proteínas cinases aos respectivos substratos (DONATO, 2001). Esse tipo de inibição ocorre em muitas proteínas, tais como GAP-43 (LIN, 1994), vimentina, proteína tau (BAUDIER, 1986b), GFAP, anexina do tipo II e p53. A inibição da fosforilação de GFAP e vimentina deve refletir a interação da S100B com resíduos no domínio N-terminal destas proteínas (BIANCHI, 1993). A fosforilação da GAP-43, pela proteína cinase C é reduzida na presença de S100B purificada, sugerindo que esta proteína desempenha um papel na plasticidade sináptica e extensão de neuritos (SHEU, 1994). A função dessa inibição é desconhecida até o momento, mas alguns resultados sugerem que a S100B diminui o sinal de transdução, particularmente por ligar a elevação do cálcio citosólico ao estado de fosforilação de importantes proteínas alvo. Deste modo, a habilidade da S100B de interagir com a fosforilação de outras proteínas, pode representar condições para a regulação de etapas em alguns meios de sinalização no qual a S100B tem parte como proteína alvo (DONATO, 2001).

A S100B exerce efeito sobre a homeostase do cálcio. Sugere-se que esta ação ocorra devido à regulação de proteínas efetoras, capazes de controlar os níveis de cálcio citosólico (DONATO, 2001).

Funções sobre componentes do citoesqueleto celular também são destacadas. Nos microtúbulos, atua por inibição da polimerização; filamentos intermediários, principalmente GFAP e vimentina, sofrem inibição da polimerização, bem como a despolimerização é estimulada através do sequestro de unidades não polimerizadas. Estas observações sugerem que a proteína possui função na regulação morfológica celular e na dinâmica do citoesqueleto (DONATO, 1999).

Ainda, a S100B exerce papel como marcadora de dano encefálico, possivelmente como reação ou necrose glial. Esses resultados foram constatados em estudos que utilizaram neurônios e astrócitos *in situ*. Ao mesmo tempo, foi

também detectada no líquido e no soro sanguíneo de pacientes com patologias ao nível do SNC, passando a ser considerada uma proteína biomarcadora, sendo utilizada na detecção de danos ou disfunções cerebrais e distúrbios psiquiátricos (MRAK, 2001).

Vários membros da família S100 interagem com anexinas específicas, as quais possuem capacidade de ligação a fosfolípidios, processo que ocorre de forma dependente de cálcio, portanto, ocorre participação no sinal de transdução intracelular. Essas interações têm sido demonstradas apenas “*in vivo*”, sendo ainda sua especificidade e o seu papel objetos de estudo.

A S100B é secretada por astrócitos (SHASHOUA, 1984; VAN ELDIK, 1987). Foi observado que culturas primárias de astrócitos têm a secreção estimulada em condições de ausência de soro (PINTO, 2000). Pouco se sabe sobre a liberação da S100B para o meio extracelular. Alguns estudos mostram que estímulos sob o comando do estresse metabólico estão associados à secreção aumentada da S100B. Existe a hipótese de que esse mecanismo possa estar relacionado com o Ca^{2+} e que isso resulte na exposição de um domínio hidrofóbico, permitindo interação com a membrana ou com proteínas de membrana como as anexinas.

Outro mecanismo está associado com a ação de estruturas presentes na superfície dos astrócitos, receptores extracelulares serotoninérgicos, que, após ligação com moléculas específicas, induz ao desacoplamento e à ativação de proteínas G existentes no interior da membrana plasmática destas células, levando à propagação de diversos sinais intracelulares. Como exemplo, a ativação destas vias de segundo mensageiros em receptores neuronais serotoninérgicos e glutamatérgicos metabotrópicos, iniciada por mecanismo glial, induz o aumento concomitante da expressão dos receptores $5TH_{1A}$. Por sua vez, o aumento da expressão dos receptores $5HT_{A1}$ promove a secreção e a liberação da proteína astrogliar neurotrófica S100B (WHITAKER-AZMITIA, 1997).

Diversos trabalhos demonstram a presença de transportadores para glutamato na membrana dos astrócitos (STANIMIROVIC, 1999; GEGELASHVILI, 1997). A secreção do glutamato também modula a secreção da proteína S100B pelos astrócitos, de forma que níveis tóxicos (grandes quantidades) de glutamato liberados pelos neurônios reduzem a secreção de S100B pelos astrócitos do hipocampo de ratos (TRAMONTINA, 2006). Além do glutamato a expressão da

S100B por astrócitos tem sido associada à estimulação de interleucina-1 (IL-1) e por AMP-cíclico.

Estudos demonstraram que o fator derivado da neurotropina do encéfalo (BDNF) poderia promover um processo de liberação através de vesículas, um mecanismo que não tinha sido proposto até então. De fato, a secreção de S100B continua sendo até certo ponto um enigma, pois no gene desta proteína não existe um domínio sinalizando secreção (NISHI, 2000).

A S100B é uma proteína multifacetada que exerce efeitos regulatórios tanto intracelularmente quanto extracelularmente. Uma vez liberada no meio extracelular ela pode afetar os neurônios, as micróglia e as células miogênicas de diferentes formas e na dependência de sua concentração (SORCI, 2010).

2.3.4 Aplicabilidade clínica da S100B

O gene humano que codifica a S100B está localizado no cromossomo 21q22.3 (POELMANS, 2008; MRAK, 2004; ALLORE, 1988). O aumento de sua expressão está correlacionado com uma série de situações específicas (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Fatores e/ou condições regulatórias da secreção/liberação da proteína S100B.

Fatores que aumentam a S100B	Fatores que diminuem a S100B
Fase de crescimento	Elevações na glicose
Estresse metabólico	Confluência celular
Fase aguda se dano encefálico	Inibição da Src quinase
Exercício físico vigoroso	Elevações no glutamato
Hipóxia	
Isquemia cardíaca	
Trissomia do 21	
Doença de Alzheimer	
Epilepsia crônica	
Infecção pelo HIV	
Envelhecimento	

Fonte: DONATO, 2009.

O aumento da expressão da S100B é um marcador da ativação astrocitária (SEDAGHAT, 2008). Sua secreção constitui um processo precoce durante a resposta glial ao dano metabólico provocado pela privação de oxigênio ou de glicose (GERLACH, 2006).

Lesões traumáticas encefálicas provocam aumento nos níveis séricos e líquóricos de S100B (CERVELLIN, 2012). Estes aumentos ocorrem em até 31% dos pacientes com lesões leves, mesmo na ausência de uma sintomatologia significativa (DE BOUSSARD, 2005). Suas dosagens têm sido utilizadas na avaliação destes pacientes, auxiliando como triagem para a realização de exames tomográficos complementares. Como existem outras possíveis fontes de S100B, particularmente adipócitos e condrócitos, os resultados de suas dosagens devem ser interpretados com cautela.

Nos recém-nascidos com asfixia ao nascimento, os níveis séricos de S100B fornecem um indicativo bioquímico para a presença de encefalopatia hipóxica-isquêmica (MURABAYASHI, 2008). A S100B também apresenta dosagens na artéria do cordão umbilical em neonatos com acidose ou quando padrões patológicos detectados na cardiocotografia ou na eletrocardiografia fetal durante o parto (STUART, 2008).

Níveis elevados de S100B e de GFAP após a hemorragia subaracnóidea espontânea se correlacionam diretamente com a gravidade clínica da doença, contribuindo assim para um melhor acesso inicial e seguimento destes pacientes.

As elevações séricas da S100B são também observadas em pacientes com sofrem de doenças neurodegenerativas crônicas como, por exemplo, a doença de Alzheimer (LI, 1998). Esse aumento se origina a partir do tecido necrótico ou pela amplificação da neurodegeneração provocada pela apoptose induzida pela S100B (MRAK, 2001).

Na Síndrome de Down, os níveis de S100B estão muito aumentados nas regiões cerebrais onde os astrócitos reativos circundam as placas neuríticas. Como o gene que codifica a proteína S100B está localizado no cromossomo 21, a proteína está excessivamente expressa no lobo temporal dos portadores desta síndrome. Na Síndrome de Down são observadas lesões cerebrais iniciais indistinguíveis da Doença de Alzheimer. Por esse motivo, tem sido sugerido que os elevados níveis da proteína S100B possam contribuir para a sua neuropatologia e desenvolvimento anormal do SNC na Síndrome de Down. As alterações cerebrais desta proteína

possivelmente podem se refletir em alterações dos níveis séricos e no líquido cefalorraquidiano.

Os níveis séricos de S100B podem também fornecer informações independentes sobre o risco individual de pacientes com acidente vascular agudo e com hemorragias intracranianas relacionadas com a terapia trombolítica (FOERCH, 2007).

Em pacientes com esclerose lateral amiotrófica, no entanto, a concentração sérica de S100B está diminuída. Flutuações clínicas significativas não foram notadas também nos pacientes com esclerose múltipla (KOCH, 2007).

Existem relatos que demonstram o aumento líquido dos níveis da S100 em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico com envolvimento neuropsiquiátrico (convulsões, psicose ou acidente vascular encefálico) assim como em pacientes com AOS, refletindo danos neurológicos (YANG, 2008; BRAGA, 2006; SCHENATTO, 2006). Ocorre também um aumento e uma persistência na expressão da S100B nos casos de hiperamonemia, podendo contribuir para o dano encefálico observado nos pacientes com encefalopatia hepática (LEITE, 2006). O aumento da S100B também foi observado durante as exacerbações dos distúrbios bipolares (episódios de mania e de depressão), mas não durante as fases de remissão da doença (ANDREAZZA, 2007). Além disso, também foram relatados níveis elevados em outros distúrbios psiquiátricos como a esquizofrenia (ROTHERMUNDT, 2001).

Os efeitos apoptóticos induzidos pelo NO produz danos neurodegenerativos através da indução do RNA (ácido ribonucleico) mensageiro e expressão da proteína percussora beta-amiloide (LI, 1998). Da mesma forma ocorre com níveis de cálcio intracelular, não somente alternando a função de proteínas ligantes de cálcio, como também a expressão, como documentado em doenças humanas neurodegenerativas.

O resultado dos níveis aumentados desta proteína durante condições patológicas pode estar associado tanto a efeitos lesivos quanto a ações tróficas reparadoras induzidas pelos astrócitos.

A ampla aplicabilidade da S100B nos distúrbios neurológicos tem feito com que esta proteína seja considerada uma análoga no SNC à proteína C reativa para a detecção de processos inflamatórios sistêmicos (SEN, 2007).

Diversas formas de neoplasias exibem modificações drásticas na expressão das proteínas S100. A via de sinalização S100-RAGE exerce um importante papel

na interação entre o processo inflamatório e o câncer, assim como na sobrevivência das células neoplásicas e na progressão maligna, pois tumores deficientes em RAGE são caracterizados pela apoptose acelerada, pela redução na ativação da NFκB e pela proliferação significativamente prejudicada (SEDAGHAT, 2008).

Existe uma grande secreção de S100B pelas células do melanoma maligno, refletindo diretamente um pior prognóstico e estadiamento da neoplasia (VON SCHOULTZ, 1996). A detecção das metástases desta neoplasia também se correlaciona com os níveis da S100B, tendo um valor preditivo negativo semelhante aos exames radiológicos.

Apesar de a função das proteínas S100 permanecerem desconhecidas em muitos tipos de neoplasias, a expressão de padrões específicos destas proteínas pode ser utilizada como ferramenta prognóstica (SEDAGHAT, 2008). A S100B pode se ligar ao gene supressor tumoral p53 e inibir a sua fosforilação, provocando uma baixa regulação do p53 de forma dependente do cálcio (FERNANDEZ-FERNANDEZ, 2005; MARKOWITZ, 2005).

As dosagens séricas da S100B podem também fornecer valiosas informações a respeito da ativação do sistema neuromuscular induzida pela atividade física induzida pela liberação desta tanto pelos grupamentos musculares quanto pelos segmentos nervosos envolvidos no processo (SCHULPIS, 2007).

Dessa forma, a S100B ganhou um papel complementar na avaliação, no prognóstico e no diagnóstico dos pacientes que sofreram trauma encefálico e dos pacientes com melanoma maligno.

Dessa forma, os níveis da S100B nos fluidos biológicos têm importante papel na estratificação do risco, na definição de tratamentos e no prognóstico de uma série de condições patológico, desde distúrbios perinatais até doenças neurodegenerativas (MICHETTI, 2012).

Os níveis aumentados desta proteína não somente refletem sua ligação com o dano celular específico. A síntese e a liberação da S100B parecem ser fisiologicamente reguladas e, em altas concentrações, são capazes de participar do processo inflamatório.

O SNC é a fonte natural da S100B extracelular. Os neurônios são considerados as células-alvo naturais da proteína. Nas micróglia apresenta um efeito estimulatório (BIANCHI, 2011) e sobre os astrócitos em efeito regulatório autócrino (PONATH, 2007).

É razoável levantar a hipótese de que a S100B circulante seja capaz de produzir efeitos sobre tipos celulares fora do SNC. O fato de que os níveis da S100B não sejam meramente consequência do dano celular, mas também importante efector levanta a perspectiva de que ela seja um potencial alvo terapêutico para o tratamento das condições patológicas nas quais ela esteja envolvida (MICHETTI, 2012).

A possibilidade de que a S100B esteja envolvida em condições patológicas fora do SNC, como em uma atividade sistêmica ainda desconhecida, apontam a direção das futuras pesquisas envolvendo esta desafiadora e promissora proteína (MICHETTI, 2012).

3 Justificativa

Os pacientes com AOS comumente apresentam alterações neurológicas e cognitivas, principalmente as relacionadas ao processo de memorização. Além de estarem mais sujeitos a acidentes automobilísticos e a doenças cardiovasculares, a redução da qualidade do sono e o distúrbio respiratório levam a alterações em exames de imagem, em exames morfológicos e em testes sorológicos envolvendo mais frequentemente algumas regiões encefálicas.

O estudo das alterações astrocitárias hipocámpais em pacientes com AOS é ainda um campo pouco explorado pela literatura. Devido à maior facilidade metodológica, os modelos experimentais de AOS envolvendo animais têm papel fundamental no reconhecimento de tais alterações.

A correlação entre a HI, a positividade imuno-histoquímica astrocitária ao S100B e a quantificação destas células no hipocampo ainda não foi abordada de forma conjunta na literatura.

O presente estudo, portanto, se justifica pela necessidade de avaliação tanto quantitativa, quanto qualitativa das reações astrocitárias hipocámpais associadas à HI e à AOS, visando melhorar a compreensão das alterações neurológicas e estabelecer uma forma mais simples de avaliação destes pacientes.

4 Objetivos

4.1 Objetivo geral

- Estudar as alterações hipocampais em camundongos submetidos à HI (casos) e à HIS (controles) em um modelo experimental de AOS.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar quantitativamente os astrócitos hipocampais de ambos os grupos, comparando suas densidades numéricas.

- Classificar qualitativamente e quantitativamente a imunorreatividade astrocitária hipocampal ao S100B em ambos os grupos.

- Identificar secundariamente as alterações histológicas astrocitárias e neuronais hipocampais em ambos os grupos de animais.

- Avaliar a capacidade da técnica de imunoistoquímica em reproduzir os achados quantitativos astrocitários obtidos através de outras metodologias.

- Consolidar o modelo experimental de HI descrito.

5 Materiais e métodos

5.1 Animais

Foram utilizados cinquenta e quatro camundongos CF-1 (*Mus musculus domesticus*), machos com dois meses de idade (após desmame), provenientes da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEEPS-RS).

Os animais foram divididos em dois grupos, cada um composto por vinte e sete camundongos, sendo um deles submetido à hipóxia intermitente (HI), e o outro submetido à hipóxia intermitente simulada (HIS).

Os camundongos foram alojados em um ambiente com controle de temperatura (entre 22,5°C e 24,5°C), de umidade e de iluminação (ciclo de doze horas de claro e doze horas de escuro). A água e a ração comercial padronizada (Purina-Nutripal, Porto Alegre, RS, Brasil) foram fornecidas *ad libitum*.

A manutenção dos roedores ficou a cargo da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), estando os animais sob a observação de um médico veterinário.

Os procedimentos realizados foram todos aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa institucional (projeto número 08-309) e seguiram o “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2011).

5.2 Modelo de hipóxia intermitente

Durante cinco semanas, sete dias por semana e por oito horas diárias no período de luz (das nove horas às dezessete horas), os animais foram colocados em câmaras plásticas vedadas com tampas acrílicas transparentes. Estas, por sua vez, eram conectadas ao sistema indutor de hipóxia (HI) ou ao sistema mantenedor de normóxia (HIS), sendo os animais mantidos nos respectivos grupos até o final do experimento.

O sistema de HI, desenvolvido pela Engenharia Biomédica do HCPA, consistia de um timer, de uma válvula solenoide, de pequenos ventiladores acoplados nas tampas acrílicas, de tubos conectores e de um cilindro metálico contendo a mistura de gás nitrogênio (N₂) e de gás carbônico (CO₂) na concentração de 92% e 8% respectivamente (**Figura 12**).

A válvula solenoide, responsável pela limitação do o fluxo da mistura gasosa, era do tipo “normalmente fechado”. Tal dispositivo foi selecionado com o intuito de evitar, em caso de falta de energia elétrica, que os animais não sofressem hipoxemia.

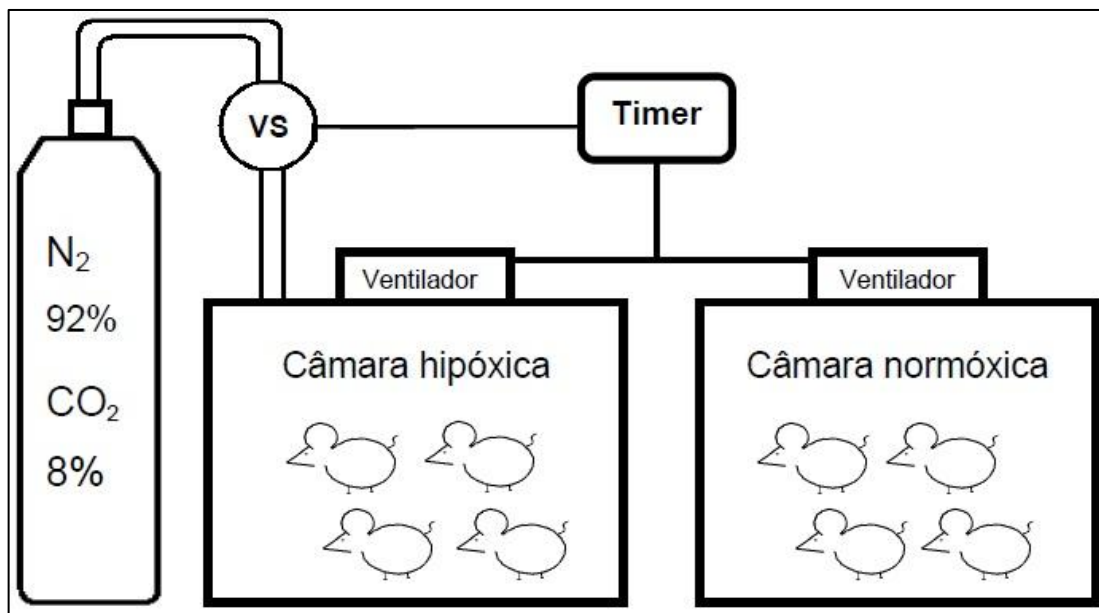


Figura 12 - Diagrama das câmaras de hipóxia intermitente (HI) e de normóxia (HIS). VS: válvula solenoide. *Fonte:* MARTINEZ, 2010.

A mistura gasosa era liberada, a um fluxo de seis litros por minuto, apenas no interior da câmara HI durante trinta segundos, reduzindo a fração de oxigênio (O₂) para 7±1% e aumentando a fração de CO₂ para 5±1%. Após, o ar atmosférico era insuflado para o interior da câmara durante outros trinta segundos. Os animais do grupo HIS permaneceram em câmaras adjacentes, sendo submetidos à mesma atividade do grupo HI, sem ter contato com a mistura gasosa, servindo dessa forma como grupo controle.

O resultado deste acionamento foi a redução da fração de oxigênio (O₂) para 7±1% e o aumento da fração de CO₂ para 2,5±1%, ocasionando uma queda na saturação de oxigênio no sangue arterial no grupo HI até o nível de 75%, valor que é observado em pacientes com AOS severa. Nos próximos trinta segundos seguintes, os ventiladores eram ativados, insuflando ar ambiente para o interior da câmara, restaurando as concentrações gasosas (normóxia) um pouco menos de dez segundos.

A temperatura no interior das câmaras foi aferida antes do início do experimento através de uma termocúpula de resposta rápida com três localizações distintas. Constatou-se que a insuflação gasosa e a atividade valvular provocavam uma redução na temperatura nas câmaras de HI em cerca de $0,2 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ em comparação com as câmaras HIS. Este efeito foi minimizado através da colocação de defletores sob os ventiladores.

Cabe ressaltar que grupo HIS passou pela mesma manipulação do grupo HI, permanecendo, porém, em normóxia no interior de suas câmaras (ar atmosférico). A finalidade da conexão das câmaras desse grupo ao sistema (apenas timer e conectores) foi controlar o efeito do estresse provocado pelos ruídos das válvulas, dos ventiladores e pela colocação da tampa acrílica sobre as câmaras (**Figura 13 e Figura 14**).



Figura 13 - Visão externa da câmara de hipóxia intermitente (HI), à esquerda, e da câmara de normóxia (HIS), à direita. O sistema pode ser comparado com o diagrama mostrado na figura anterior.

O modelo descrito já foi utilizado com sucesso em outros estudos (BARONIO, 2012; MARTINEZ, 2010).

5.3 Processamento do material biológico

Após a verificação da condição de repouso, os animais foram profundamente anestesiados com cloridrato de cetamina a 10% (100 mg/kg de peso corporal) e com cloridrato de xilazina a 2% (10 mg/kg de peso corporal), ambos administrados intraperitonealmente logo após a retirada de suas respectivas câmaras. Após a comprovação do grau de profundidade anestésica através do pinçamento da cauda, os animais foram posicionados na cuba de perfusão, imobilizados e perfundidos conforme o procedimento usual do Laboratório de Experimentação Animal do HCPA (NOGUEIRA, 2007).



Figura 14 - Local onde as câmaras dos animais ficaram alocadas dentro da Unidade de Experimentação Animal do HCPA.

A dissecação iniciou-se com um corte na pele do abdômen para a exposição do apêndice xifoide, sendo este preso por pinça de Adson com dente (12 cm) e cortado, juntamente com segmentos costais, em forma de “V”. Com uma pinça hemostática, o apêndice xifoide foi rebatido e preso na cuba de perfusão, sendo o coração exposto. A aorta descendente foi pinçada com uma pinça hemostática curva para que durante a perfusão o fixador não atingisse os membros inferiores, garantindo assim uma melhor fixação encefálica com um menor gasto de solução.

Em seguida, o ápice do coração foi seccionado, expondo o ventrículo esquerdo para a inserção de uma cânula até a aorta.

Foram injetados 15,0 mL de tampão fosfato-salino (“*phosphate-buffered saline*” - *PBS*), pH 7.4 em temperatura ambiente, com a finalidade de retirar o sangue dos vasos, evitando a formação de coágulos e possibilitando a correta penetração do fixador nos tecidos. A fixação foi realizada com perfusão de uma mistura de paraformaldeído a 4% e de ácido pícrico a 0,2% em 0,1 M de tampão fosfato. Foram utilizados 30,0 mL da solução descrita em duas etapas de infusão: a primeira em fluxo rápido (durante 5 minutos), e a segunda em fluxo lento (durante 15 minutos). Durante o processo de fixação, a região cefálica do animal foi recoberta por gelo com a finalidade de preservação da natureza química dos componentes teciduais.

Os encéfalos foram removidos depois de concluído o processo de fixação (a cerca de 4°C) e imersos em solução de formalina tamponada a 10% durante mais 24 horas (**Figura 15**).

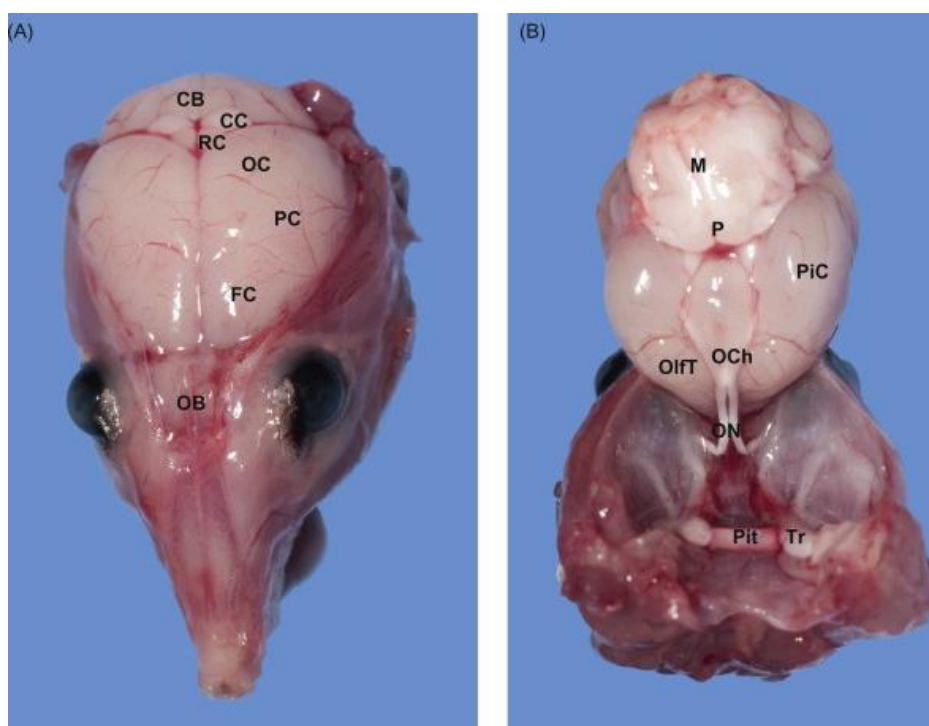


Figura 15 - Visão macroscópica do encéfalo de um camundongo adulto “*in situ*”; (A) superfície dorsal, (B) superfície ventral. OB: bulbo olfatório; FC: córtex frontal; PC: córtex parietal; OC: córtex occipital; RC: cunículo rostral; CC: cunículo caudal; CB: cerebelo; Pit: hipófise; Tr: gânglio trigeminal; ON: nervos ópticos; OlfT: tubérculos olfatórios; OCh: quiasma óptico; PiC: córtex piriforme; P: ponte; M: medula espinhal. *Fonte*: TREUTING, 2012.

5.4 Histologia e imunoistoquímica

Depois de fixado, o hipocampo foi dissecado e embocado em parafina de acordo com o processamento histológico habitual. O corte dos blocos ocorreu no sentido coronal, de ventral para dorsal, com cortes de 5 μm de espessura, com um intervalo entre os cortes de 100 μm , não restando tecido viável no interior da parafina restante. Ao total, foram obtidos três selos por lâmina, totalizando dez lâminas por animal (trinta cortes histológicos). O processamento hipocampal foi assim realizado com o intuito da obtenção de cortes correspondentes às figuras da referência eletrônica “*Allen Mouse Brain Atlas*” (ALLEN INSTITUTE FOR BRAIN SCIENCE, 2012) (Figura 16 e Figura 17).

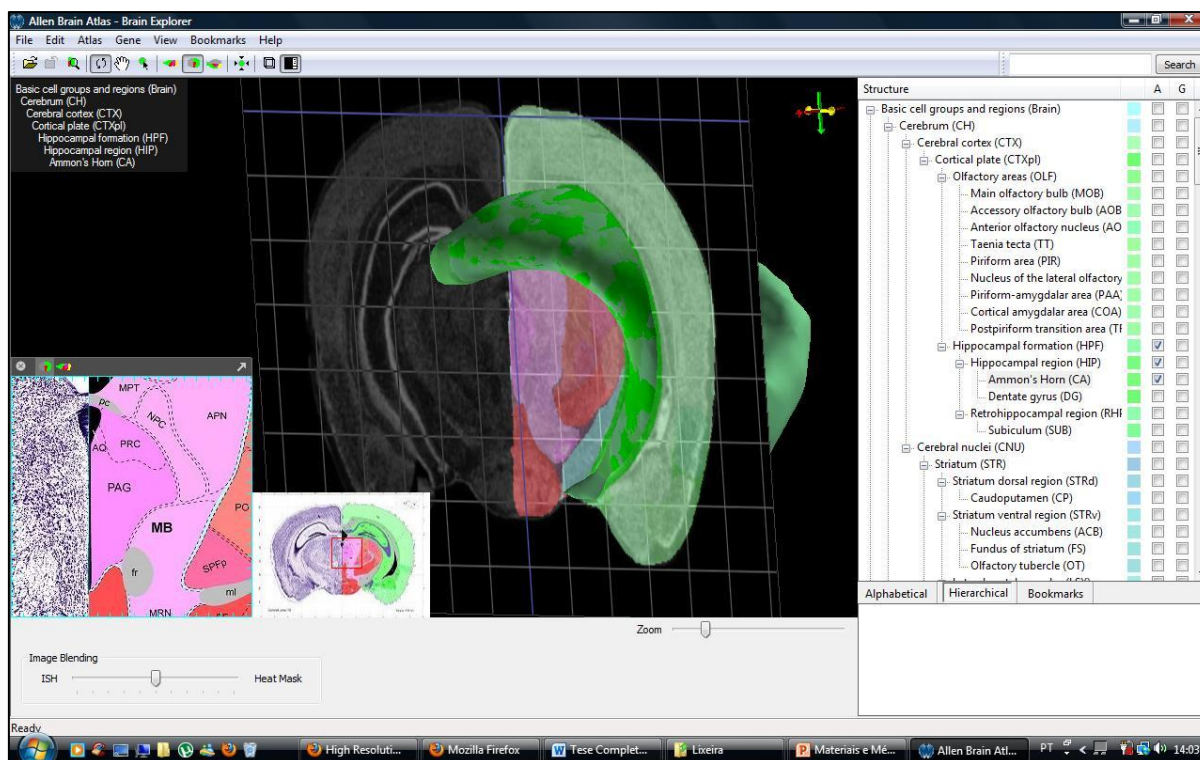


Figura 16 - Detalhamento da referência eletrônica utilizada, permitindo a visualização da área encefálica selecionada de forma tri ou bidimensional, sendo possível a identificação das diferentes regiões específicas. *Fonte:* ALLEN INSTITUTE FOR BRAIN SCIENCE, 2012.

Estas secções foram montadas e incubadas com o anticorpo monoclonal S100B (Sigma-Aldrich, referência S2532, com a diluição de 1:500), sendo anticorpos secundários biotinizados também utilizados (Vector Laboratories, EUA). A reação imunoistoquímica foi revelada pelo complexo avidina-biotina usando

diaminobenzidina como cromogene. Os cortes foram finalmente desidratados e recobertos com lamínulas.

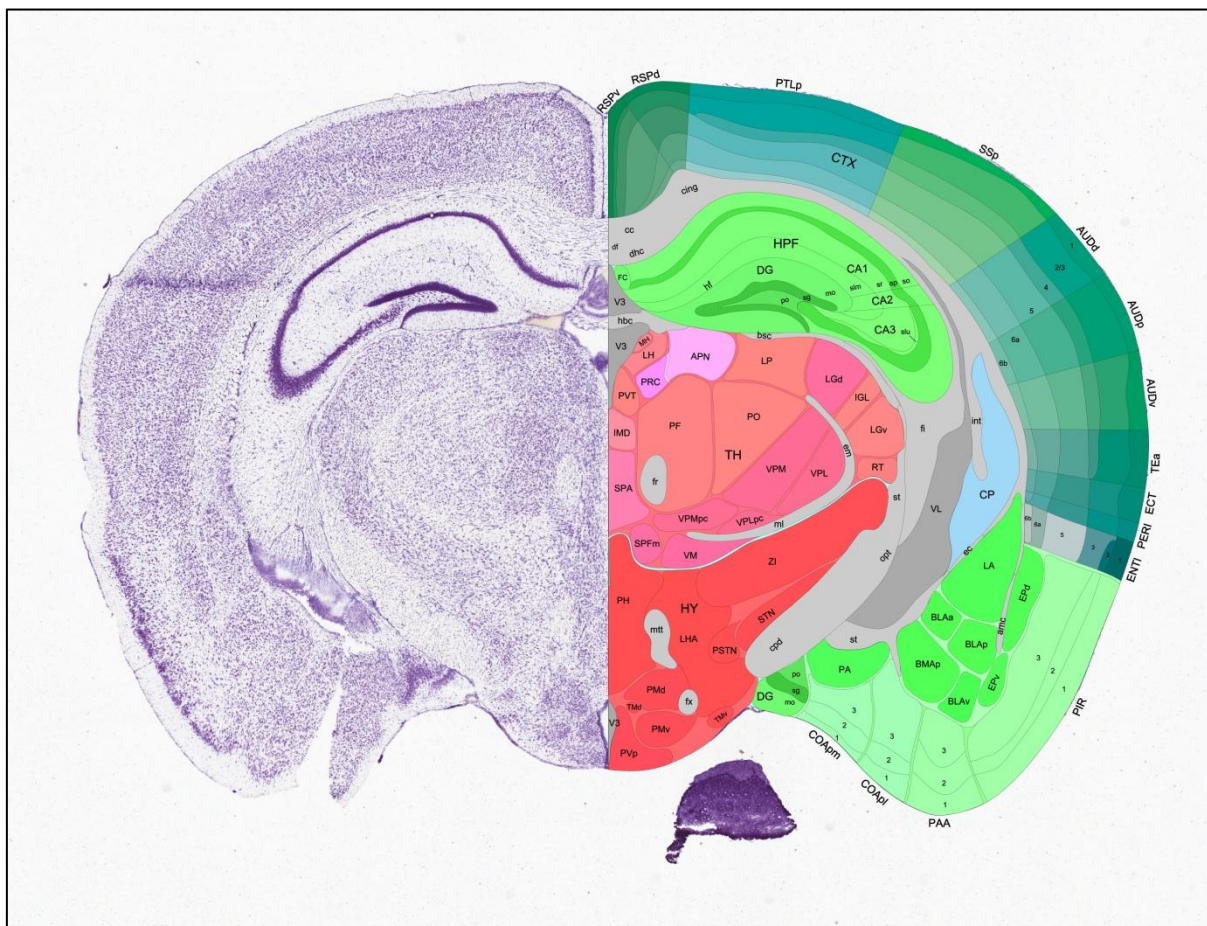


Figura 17 - Uma das opções da referência eletrônica era a comparação entre a histologia encefálica (hemisfério esquerdo) e o mapeamento das regiões correspondentes (hemisfério direito). O hipocampo (HPF) está representado em verde claro na figura, assim como suas camadas (DG, CA1, CA2 e CA3). *Fonte:* ALLEN INSTITUTE FOR BRAIN SCIENCE, 2012.

Como controle para o anticorpo S100B, foram utilizados fragmentos de encéfalos humanos provenientes do Serviço de Patologia do HCPA e que seriam descartados após a realização de necropsia acadêmica.

5.5 Procedimentos morfométricos

A análise dos cortes histológicos foi realizada por dois médicos patologistas, ambos cegos quanto aos grupos. As aferições de cada lâmina foram realizadas em ambos os hemisférios.

A densidade astrocitária foi estimada nas camadas hipocampais CA1, CA3 e giro denteado e em suas subcamadas através da contagem numérica dos corpos celulares imunorreativos ao S100B, sendo realizada uma média entre os valores de ambos os observadores. O limite entre as regiões CA1 e CA3 foi definida por uma linha reta que ligou a base do “*stratum lucidum*” (SL) e o ápice da lâmina supra piramidal do DG. As demais regiões não foram individualizadas das regiões CA1 e CA3, por haver dificuldades no estabelecimento de seus limites, e para que o presente estudo obtivesse dados passíveis de comparação com os da literatura (OGATA, 2002).

Para estimar o número de astrócitos uma área foi delimitada por uma grade fixada no interior da lente ocular do microscópio óptico. Esta consistia de um quadrado com 500 μm de lado, com uma área total de 250.000 μm^2 , sendo posicionada sobre toda a superfície hipocampal (**Figura 18**).

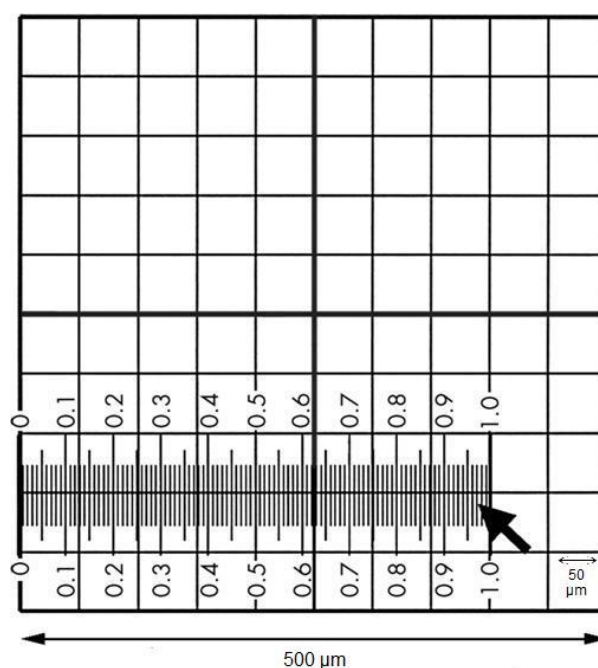


Figura 18 - Diagrama da grade utilizada para a quantificação astrocitária. Quadrados menores: 50 μm de lado; Quadrado maior: 500 μm de lado. Os traços menores servem apenas para a calibração de câmeras de imagem acopladas ao microscópio.

Os astrócitos foram reconhecidos por suas características morfológicas, ou seja, corpos celulares positivos ao S100B, por processos citoplasmáticos curtos, e por sua morfologia nuclear. Foram excluídas as células interseccionadas pelo eixo das abscissas ou pelo eixo das ordenadas e as células que não se enquadrassem nos critérios acima.

A imunorreatividade astrocitária ao S100B foi quantificada pela técnica de densitometria óptica, sendo posteriormente classificada de forma qualitativa de acordo com as médias hipocâmpais de cada grupo em três intensidades: (+), (++) e (+++). A densitometria óptica foi obtida com a utilização do “software” *Image-Pro® Plus* (versão 6.0), para *Windows™*.

As células hipocâmpais também foram analisadas secundariamente na busca por outras alterações histológicas que refletissem hipóxia, degeneração e morte (picnose, cariorrexe, adensamentos, variações de tamanho, alterações citoplasmáticas e nucleares, entre outras).

5.6 Análise estatística

O cálculo do tamanho amostral foi realizado através da utilização das médias e dos desvios-padrões dos valores de celularidade observados no estudo “*Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus*” (OGATA, 2002), visando-se um poder de 90% e uma probabilidade de erro alfa de 5%.

As medidas obtidas de cada animal foram separadas em dois grupos. As médias foram analisadas estatisticamente com a utilização do programa “*Statistic Package for Social Science®*” (SPSS), versão 16.0 (Chicago, IL).

O teste *t* de Student foi utilizado para a comparação entre as amostras independentes, sendo considerados significativos os resultados com $p < 0,001$.

O teste de Levene, por sua vez, foi utilizado para verificar a homogeneidade das variâncias entre os grupos, sendo considerados significativos os testes com o $p < 0,05$, não sendo assim aplicado o teste de ANOVA (análise de variância), pois este forneceria resultados com viés.

6 Artigos

6.1 Artigo em língua portuguesa

Efeito da hipóxia intermitente sobre a densidade numérica astrocitária hipocampal e a imunorreatividade ao S100B em um modelo de experimentação animal de apneia do sono

Dennis Baroni Cruz^{1,2,*}, Denis Martinez^{3,4,5,6}, Jane Maria Ulbrich^{1,7}

¹ Programa de Pós-Graduação em Medicina (Ciências Pneumológicas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brasil

² Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC), Brasil

³ Programa de Pós-Graduação em Medicina (Clínica Médica), UFRGS

⁴ Programa de Pós-Graduação em Medicina (Cardiologia), UFRGS

⁵ Divisão de Cardiologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), UFRGS

⁶ Laboratório Interdisciplinar de Pesquisa em Sono (LIPES), HCPA, UFRGS

⁷ Divisão de Patologia, HCPA, UFRGS

* *Correspondências para o autor:*

Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC)

Faculdade de Medicina

Avenida Independência, 2293 - CEP: 96815-900

Santa Cruz do Sul, RS, Brasil

Tel.: +55 51 3717-7300; fax: +55 51 3717-1855

Endereço de e-mail: dbaroni@unisc.br (D.B. Cruz)

Apoio financeiro: Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA)

Conflito de interesse: os autores declaram não possuir qualquer tipo de conflito de interesse com companhias/organizações dos quais produtos ou serviços possam ter sido discutidos neste artigo.

Palavras-chave: apneia obstrutiva do sono, hipocampo, S100B, astrócitos, camundongos.

RESUMO

Introdução: A apneia obstrutiva do sono (AOS) ocasiona a hipóxia intermitente (HI), causando doenças cardíacas, vasculares e neurológicas. O modelo de experimentação animal utiliza a HI para simular a AOS, permitindo a avaliação das alterações encefálicas, sendo o hipocampo uma área reconhecidamente influenciada pela hipóxia. A S100B é uma proteína de 21-kDa ligada ao cálcio, produzida e liberada principalmente pelos astrócitos no neurópilo do sistema nervoso central. Sua dosagem tem sido utilizada para compreender o envolvimento de distintos tipos celulares em determinadas condições patológicas. O presente estudo objetiva testar a hipótese de que a HI empregada em um modelo experimental de AOS em camundongos é capaz de alterar o número de astrócitos em diferentes subcamadas hipocampais (CA1, CA3 e DG), além de modificar qualitativamente a reatividade imuno-histoquímica destas células ao S100B.

Materiais e Métodos: Camundongos CF-1 foram expostos ou a 35 dias de HI ($n = 27$) ou a HIS ($n = 27$), alternando 30 segundos de hipóxia progressiva a um nadir de 7%, seguidos por 30 segundos de normóxia. Durante 8 horas, os animais sofreram um total de 480 ciclos de hipóxia/reoxigenação, equivalente a um índice de apneia de 60/hora. O encéfalo foi dissecado, sendo o hipocampo e suas subcamadas analisados histologicamente pela técnica de imuno-histoquímica com a utilização do anticorpo S100B. **Resultados:** Foi realizada a análise quantitativa dos astrócitos hipocampais imunorreagentes ao S100B. A média desta foi de $23,85 \pm 0,37$ astrócitos/ $0,25 \text{ mm}^2$ no grupo HI, enquanto no grupo HIS foi de $21,03 \pm 0,50$ astrócitos/ $0,25 \text{ mm}^2$ ($p < 0,001$). Esta diferença também foi observada de forma global nas subcamadas CA1 e CA3, sendo menos perceptível no DG. A imunorreatividade astrocitária foi maior (+++) no grupo HI, não atingindo tal intensidade no grupo HIS. A análise qualitativa secundária evidenciou a presença de cariorrexe, de picnose neuronal, além de corpos celulares astrocitários discretamente hipertróficos apenas nos animais do grupo HI. **Conclusão:** A HI aumentou a densidade numérica de astrócitos hipocampais, assim como a imunorreatividade destas células ao S100B, no processo chamado de astrogliose reativa. Alterações neuronais secundárias também foram observadas no grupo HI. Investigações futuras utilizando outras metodologias permitirão uma melhor avaliação dos resultados aqui descritos.

INTRODUÇÃO

A apneia obstrutiva do sono (AOS), caracterizada por episódios recorrentes de obstrução faríngea total ou parcial^{1,2}, ocasiona a hipóxia intermitente (HI)³. A HI é uma causa reconhecida de doenças cardiovasculares, acidentes vasculares encefálicos e déficits cognitivos⁴. A AOS, cuja prevalência atinge picos de 30% em idosos^{5,6,7}, ocasiona alterações morfológicas, bioquímicas e funcionais encefálicas. Modelos de experimentação animal utilizam a HI para simular a AOS, permitindo a avaliação das alterações encefálicas.

A S100B é uma proteína de 21-kDa ligada ao cálcio produzida e liberada principalmente pelos astrócitos no neurópilo do sistema nervoso central, exercendo papel tanto neurotrófico, quanto gliotrófico⁸. Devido à sua especificidade, a S100B é considerada um dos marcadores de dano encefálico, sendo suas dosagens utilizadas na compreensão do envolvimento de diferentes tipos celulares em condições patológicas cerebrais agudas ou crônicas, incluindo a AOS⁸.

Dentre as várias regiões encefálicas, o córtex hipocampal é particularmente sensível ao dano hipóxico⁹, além de estar associado com o processamento neural da memória¹⁰. Estudos demonstraram que a exposição crônica à HI durante o sono resulta em dano celular hipocampal¹¹, além de ocasionar perda de substância cinzenta desta região¹².

A correlação entre a HI, a positividade imuno-histoquímica astrocitária e a quantificação destas células no hipocampo ainda não foi abordada de forma conjunta na literatura. Considerando que estes fatores podem atuar sobre as causas e sobre as consequências da AOS, eles precisam ser melhores avaliados.

O presente estudo objetiva testar a hipótese de que a HI empregada em um modelo experimental de AOS em camundongos é capaz de alterar o número de astrócitos em diferentes subcamadas hipocampais, além de modificar qualitativamente sua reatividade imuno-histoquímica ao S100B.

MATERIAIS E MÉTODOS

Experimentação animal

Foram utilizados cinquenta e quatro camundongos machos CF-1 com dois meses de idade. Os animais foram divididos em dois grupos, cada um composto por vinte e sete camundongos, sendo um deles submetido à HI e o outro submetido à hipóxia intermitente simulada (HIS). Os camundongos foram alojados em um ambiente com controle de temperatura, de umidade e de iluminação (ciclo de doze horas de claro e doze horas de escuro). A água e a ração comercial padronizada foram fornecidas *ad libitum*. Os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa institucional e seguiram o “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*”¹³.

Durante cinco semanas, sete dias por semana e por oito horas diárias no período de luz, os animais foram colocados em câmaras plásticas vedadas com tampas acrílicas transparentes, que eram conectadas ou ao sistema indutor de hipóxia (HI) ou ao sistema mantenedor de normóxia (HIS), sendo os animais mantidos nos respectivos grupos até o final do experimento.

O sistema de HI consistia de um timer, de uma válvula solenoide, de pequenos ventiladores acoplados nas tampas acrílicas, de tubos conectores e de um cilindro metálico contendo uma mistura de gás nitrogênio (N₂) e de gás carbônico (CO₂) na concentração de 92% e 8% respectivamente. Esta mistura gasosa era liberada no interior da câmara HI durante trinta segundos, reduzindo a fração de oxigênio (O₂) para $7 \pm 1\%$ e aumentando a fração de CO₂ para $5 \pm 1\%$. Após, o ar atmosférico era insuflado para o interior da câmara durante outros trinta segundos. Os animais do grupo HIS permaneceram em câmaras adjacentes, sendo submetidos à mesma manipulação do grupo HI, sem ter contato com a mistura gasosa, servindo dessa forma como grupo controle.

O modelo descrito já foi utilizado com sucesso em outros estudos^{14,15}.

Amostragem tecidual

Os animais de ambos os grupos foram anestesiados intraperitonealmente com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), imediatamente após a retirada de suas respectivas câmaras. Após a confirmação da anestesia profunda, os animais foram posicionados na cuba de perfusão, imobilizados e perfundidos conforme o

procedimento usual do Laboratório de Experimentação Animal institucional. O tórax foi dissecado, o coração exposto e a aorta descendente pinçada. Em seguida, o ápice cardíaco foi seccionado, sendo inserida uma cânula através do ventrículo esquerdo até a aorta, através da qual foram injetados 15,0 mL de tampão fosfato-salino, pH 7.4, em temperatura ambiente. A fixação foi realizada com perfusão de uma mistura de paraformaldeído a 4% e de ácido pícrico a 0,2% em 0,1 M de tampão fosfato, sendo utilizados 30,0 mL desta em duas etapas de infusão: a primeira em fluxo rápido (5 minutos) e a segunda em fluxo lento (15 minutos). A região cefálica do animal foi coberta por gelo objetivando a preservação da natureza química dos componentes teciduais. Os encéfalos foram removidos depois de concluído o processo de fixação e imersos em solução de formalina tamponada a 10% durante 24 horas.

Histologia e imuno-histoquímica

Depois de fixado, o hipocampo foi dissecado e emblocado em parafina de acordo com o processamento histológico habitual. O corte dos blocos ocorreu no sentido coronal, de rostral para caudal, com cortes de 5 µm de espessura, com um intervalo entre os cortes de 100 µm, não restando tecido viável no interior da parafina restante. Ao total, foram obtidos três secções por lâmina, totalizando dez lâminas por animal (trinta cortes histológicos). O processamento hipocampal foi assim realizado com o intuito da obtenção de cortes correspondentes às figuras da referência eletrônica "*Allen Mouse Brain Atlas*"¹⁶.

Estas secções foram montadas e incubadas com o anticorpo monoclonal S100B (Sigma-Aldrich, referência S2532, com a diluição de 1:500), sendo anticorpos secundários biotinizados também utilizados (Vector Laboratories, EUA). A reação imuno-histoquímica foi revelada pelo complexo avidina-biotina peroxidase usando diaminobenzidina como cromógeno. Os cortes foram finalmente desidratados e recobertos com lamínulas.

Análise anatomopatológica

A análise dos cortes histológicos foi realizada por dois médicos patologistas, ambos cegados quanto aos grupos. As aferições de cada lâmina foram realizadas em ambos os hemisférios.

A densidade astrocitária foi estimada nas camadas hipocampais CA1, CA3 e giro denteado e em suas subcamadas através da contagem numérica dos corpos celulares imunorreativos ao S100B, sendo realizada uma média entre os valores de ambos os observadores. Para estimar o número de astrócitos uma área foi delimitada por uma grade fixada no interior da lente ocular do microscópio óptico de luz. Esta consistia de um quadrado com 500 μm de lado, com uma área total de 250000 μm^2 , sendo posicionada sobre toda a superfície hipocampal. Os astrócitos foram reconhecidos por suas características morfológicas, ou seja, corpos celulares positivos ao S100B, por processos protoplasmáticos curtos, e por sua morfologia nuclear. Foram excluídas as células interseccionadas pelo eixo das abscissas ou pelo eixo das ordenadas e as células que não se enquadrassem nos critérios acima.

A imunorreatividade astrocitária ao S100B foi quantificada pela técnica de densitometria óptica, sendo posteriormente classificada de forma qualitativa de acordo com as médias hipocampais de cada grupo em três intensidades: (+), (++) e (+++). A densitometria óptica foi obtida com a utilização do “software” *Image-Pro*[®] *Plus* (versão 6.0), para *Windows*TM.

As células hipocampais também foram analisadas secundariamente na busca por outras alterações histológicas que refletissem hipóxia, degeneração e morte (picnose, cariorrexe, adensamentos, variações de tamanho, alterações citoplasmáticas e nucleares, entre outras).

Análise estatística

O cálculo do tamanho amostral foi realizado através da utilização das médias e dos desvios-padrões dos valores de celularidade observados no estudo “*Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus*”¹⁷ visando-se um poder de 90% e uma probabilidade de erro alfa de 5%.

As medidas feitas de cada animal foram separadas em dois grupos e a média de cada grupo para análise das variáveis com distribuição normal. Para comparações de médias das variáveis estudadas entre dois grupos foi utilizado o teste t de Student para amostras independentes, assim como o teste de Levene para analisar a equidade de variâncias, sendo considerados estatisticamente os resultados com $p < 0,001$ e com $p < 0,05$, respectivamente.

RESULTADOS

Os dados da análise quantitativa (astrócitos/250000 μm^2) astrocitária, assim como suas médias hemisféricas e suas médias laminares hipocampais, são demonstradas na **Tabela 1**. Foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre as médias totais astrocitárias hipocampais entre os grupos HI ($23,85 \pm 0,37$ astrócitos/250000 μm^2) e HIS ($21,03 \pm 0,50$ astrócitos/250000 μm^2 ; $p < 0,001$). Esta diferença foi também observada de forma global nas subcamadas CA1 e CA3 (**Figura 1**).

A medida quantitativa obtida pela densitometria óptica variou entre os valores de 0,18 e 0,39. Os valores médios de cada camada hipocampal permitiram a classificação nos grupos (+++), com os valores entre 0,39 e 0,32, (++) , com os valores entre 0,31 e 0,24, e (+), com os valores entre 0,23 e 0,18. A imunorreatividade foi mais intensa, classificada como (+++) (**Figura 2**), no grupo HI (principalmente nas subcamadas CA1 e CA3), acompanhando a maior densidade astrocitária hipocampal. Cabe ressaltar que nenhuma das subcamadas do grupo HIS apresentou uma imunorreatividade classificada como (+++), ou seja, acima de 0,32, apenas como (++) ou como (+) (**Tabela 2**). A positividade também foi maior em algumas subcamadas hipocampais do hemisfério esquerdo quando comparada com o hemisfério direito no grupo intervenção.

A análise qualitativa secundária evidenciou a presença de cariorrexe e de picnose neuronal presente apenas no grupo HI (**Figura 3**), assim como a presença de corpos celulares astrocitários hipertróficos, representando a astrogliose reativa (**Figura 4**). Estas alterações não foram quantificadas em virtude da técnica histológica utilizada.

DISCUSSÃO

O modelo de experimentação animal de HI simulando os achados de pacientes com AOS severa, caracterizado por sessenta ciclos de hipóxia por hora, com um nadir de 7%, oito horas por dia, durante trinta e cinco dias, aumentou a densidade astrocitária em diferentes subcamadas hipocampais assim como a imunorreatividade qualitativa destas células ao S100B.

As evidências de que a AOS pode ocasionar alterações ao sistema nervoso central são múltiplas. Alterações neuropatológicas, neuropsicológicas e metabólicas foram identificadas por avaliações radiológicas, bioquímicas e psicológicas^{18,19,20,21,22}. As modificações histológicas, entretanto, não foram identificadas universalmente, podendo permanecer subclínicas em suas fases iniciais.

Estudos objetivaram quantificar os astrócitos hipocampais em roedores, existindo uma grande variação numérica ocasionada principalmente pela retração dos cortes histológicos^{23,24}. O trabalho de Ogata e Kosaka¹⁷ se destaca por ser o primeiro a analisar individualmente as subdivisões e camadas hipocampais utilizando o método do disector óptico, servindo seus valores como base para vários estudos posteriores. Ao compararmos os valores obtidos no presente trabalho através da imuno-histoquímica no grupo HIS (controle), a diferença encontrada se manteve praticamente constante entre todas as áreas hipocampais analisadas. Assim, mesmo com a utilização de uma técnica distinta, nossas aferições reproduziram os achados do estudo de referência. Houve uma variação mínima entre a contagem realizada pelos dois observadores que foram previamente treinados. Apesar da quantidade de campos de grande aumento (400x) por corte ser elevada, e por vezes laboriosa, a necessidade de positividade astrocitária à proteína S100B para a quantificação foi o fator responsável por essa variação.

As regiões CA1 e CA3 hipocampais, tanto em humanos quanto em camundongos, são muito sensíveis a injúrias como a hipóxia, representando locais comuns de neurodegeneração e de menor excitabilidade neuronal²⁵. Isto foi evidenciado pelas alterações quantitativas observadas globalmente nestas duas camadas quando o grupo HI foi comparado com o grupo HIS. No giro denteado e em suas subcamadas, a diferença não foi estatisticamente significativa.

Os astrócitos hipocampais dos animais submetidos à HI apresentaram aumento qualitativo na imunorreatividade ao S100B. Em concentrações nanomolares o S100B está relacionado com o desenvolvimento de neuritos e com a sobrevivência neuronal durante o desenvolvimento e após danos¹⁵. Em concentrações maiores, como a micromolar, o S100B pode levar à morte neuronal⁸. Tais constatações acabam tornando o S100B um marcador sorológico potencialmente útil na identificação e na classificação da severidade da AOS, tanto que estudos previamente realizados em pacientes demonstraram estas correlações^{26,27}.

O aumento da imunorreatividade astrocitária hipocampal no grupo HI ao S100B pode ocasionar o aumento de sua concentração sérica. Tais alterações refletem tanto o processo de astrogliose reativa quanto as alterações neuronais observadas, dados consistentes com os da literatura^{28,29}. Cabe ressaltar, entretanto, que outros tipos celulares fora do sistema nervoso central também expressam o S100B, o que não ofusca sobremaneira o papel do astrocitário.

Subcamadas hipocampais apresentaram variação quando imunorreatividade ao S100B quando ambos os hemisférios foram comparados. De certa forma, o hipocampo esquerdo sofreu maiores alterações qualitativas do que o direito, fato que acompanha estudos anteriores em humanos⁹. Não foi observada significância estatística quando os valores quantitativos de ambos os hemisférios foram comparados.

Achados histológicos analisados secundariamente acompanharam as alterações quantitativas hipocampais provocadas pela HI. Foi evidenciada a hipertrofia discreta dos corpos astrocitários em diversas subcamadas hipocampais, assim como alterações degenerativas focais (picnose e cariorrexe) em neurônios hipocampais do grupo HI.

Uma das possíveis limitações do presente estudo talvez tenha sido a possível sobreposição nuclear já que foi optada pela aplicação a técnica de processamento imunohistoquímico e histológico clássico em detrimento da técnica de dissecção óptica, entretanto, como foi demonstrado anteriormente, os achados reproduziram o estudo referência.

Foram confirmados os resultados prévios^{11,30,31,32} do efeito danoso da HI sobre os neurônios hipocampais, assim como a astrogliose reativa e o aumento de sua imunorreatividade ao S100B. Os baixos níveis de saturação de oxigênio, verificados nos pacientes que apresentam a forma severa da AOS, são capazes de

atuar sobre os astrócitos hipocampais. A proliferação astrocitária, através do processo de gliose reacional, pode ser uma das explicações ao aumento sérico da proteína S100B.

CONCLUSÕES

A HI aumentou a densidade numérica de astrócitos hipocampais, assim como a imunorreatividade destas células ao S100B. Tais achados refletem o processo de gliose reativa, além das alterações neuronais analisadas de forma secundária pelo presente estudo.

Investigações adicionais utilizando o método de dissector óptico, a técnica de imunofluorescência e a densitometria óptica, além de reduzirem as alterações ocasionadas pelo processamento histológico tradicional, permitirão a análise volumétrica dos prolongamentos citoplasmáticos astrocitários e suas correlações, além de melhor caracterizar as alterações celulares encontradas secundariamente por este estudo.

FIGURAS

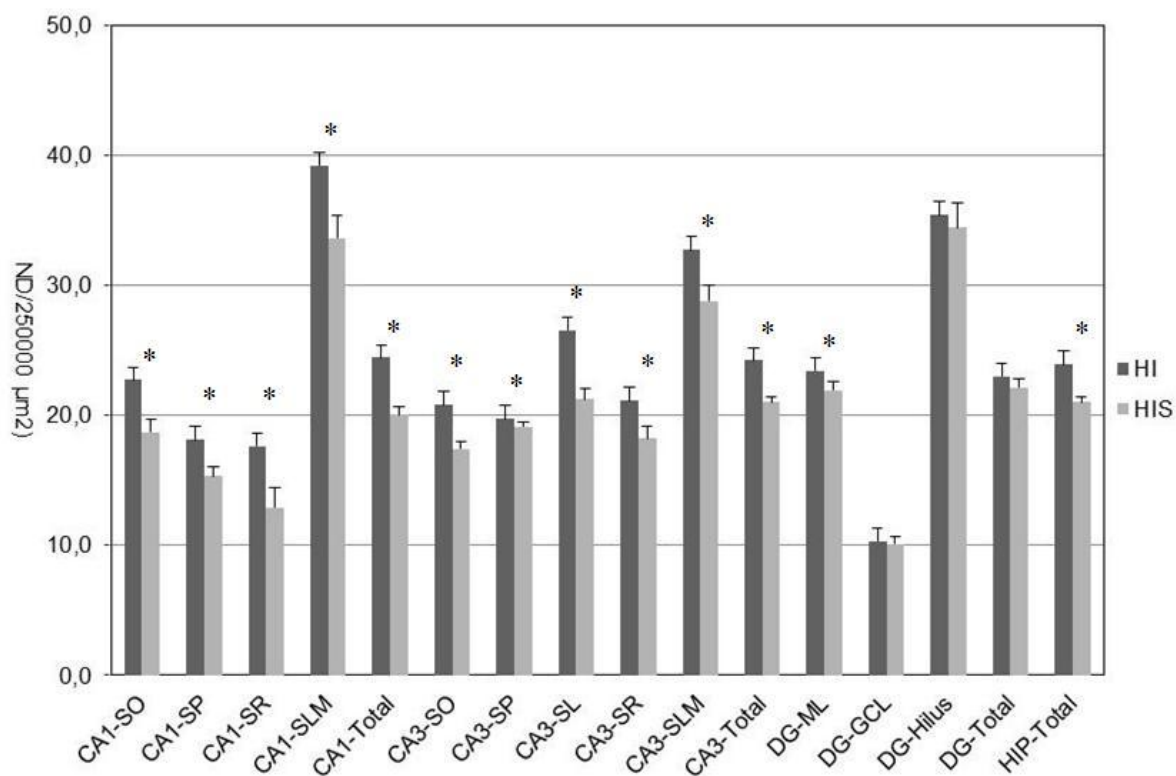


Figura 1: O histograma mostra os valores com os respectivos desvios padrões das diferenças laminares médias entre os grupos HI e HIS. * $p < 0,001$ pelo teste de Levene.

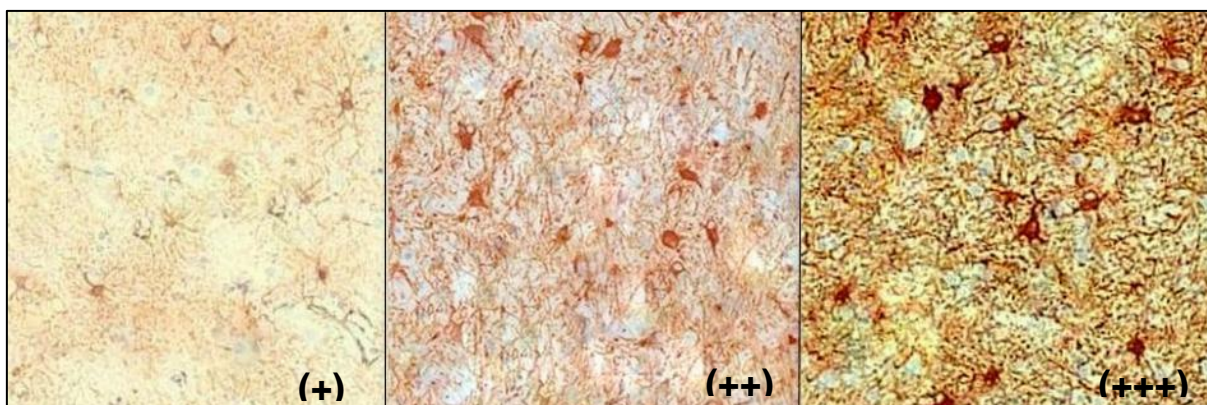


Figura 2: Escala de classificação qualitativa da imunorreatividade astrocitária hipocampal ao S100B. Coloração: S100B, 200x.

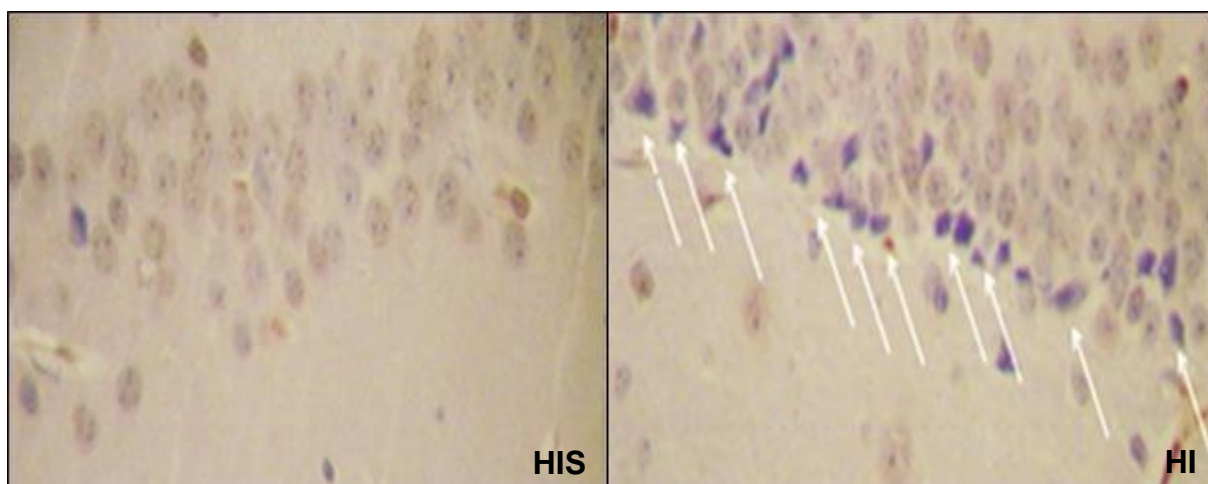


Figura 3: Alterações celulares (setas) representando a picnose e a cariorrexe em neurônios hipocâmpais do grupo HI (à direita) e a comparação com a mesma região do grupo HIS (à esquerda). Coloração: S100B, 400x.

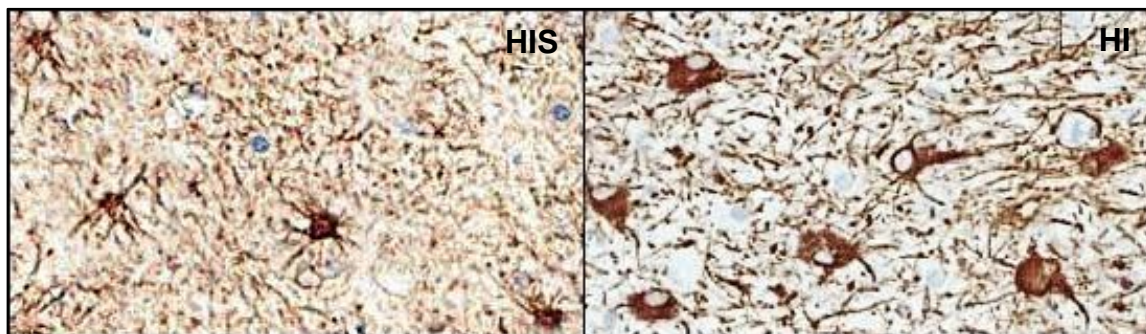


Figura 4: Diferença astrocitária entre o grupo HIS (à esquerda) e o grupo HI (à direita). A astrogliose reativa, caracterizada pela hiperplasia e pelo aumento da densidade astrocitária, se mostra destacada no segundo grupo. As fotos foram obtidas de regiões homólogas de CA1 (*stratum oriens*). Coloração: S100B, 400X.

TABELAS

Tabela 1: Diferenças laminares hipocampais na densidade numérica astrocitária imunorreativas ao S100B.

		Número de Astrócitos por 250000 μm^2					
		HI (n = 27)			HIS (n = 27)		
		HE	HD	média	HE	HD	média
CA1	SO	21,1 \pm 1,6	24,2 \pm 2,8	22,7 \pm 1,58	18,0 \pm 1,4	19,3 \pm 1,1	18,7 \pm 0,96
	SP	17,9 \pm 1,1	18,3 \pm 1,5	18,1 \pm 0,83	15,2 \pm 0,8	15,3 \pm 0,9	15,3 \pm 0,74
	SR	16,7 \pm 2,6	18,3 \pm 1,9	17,6 \pm 1,77	12,8 \pm 2,0	13,0 \pm 1,5	12,9 \pm 1,48
	SLM	38,4 \pm 3,4	39,8 \pm 0,8	39,2 \pm 1,63	33,1 \pm 0,9	33,2 \pm 0,7	33,6 \pm 1,71
	Total	23,5 \pm 1,1	25,2 \pm 0,9	24,4 \pm 0,57	19,8 \pm 0,7	20,2 \pm 0,7	20,0 \pm 0,62
CA3	SO	21,0 \pm 2,3	20,6 \pm 2,1	20,8 \pm 2,10	17,7 \pm 1,2	17,0 \pm 0,8	17,4 \pm 0,61
	SP	20,9 \pm 1,2	18,5 \pm 0,8	19,7 \pm 0,75	19,9 \pm 0,5	18,3 \pm 0,5	19,1 \pm 0,41
	SL	26,7 \pm 2,1	26,3 \pm 1,5	26,5 \pm 1,32	21,6 \pm 1,1	20,8 \pm 0,7	21,2 \pm 0,82
	SR	22,4 \pm 2,7	19,8 \pm 2,0	21,1 \pm 2,25	20,1 \pm 1,6	16,3 \pm 1,0	18,2 \pm 0,91
	SLM	34,0 \pm 3,6	31,3 \pm 1,9	32,7 \pm 2,56	30,9 \pm 2,0	26,6 \pm 1,0	28,8 \pm 1,15
	Total	25,0 \pm 0,9	23,3 \pm 0,7	24,2 \pm 0,67	22,5 \pm 0,7	19,8 \pm 0,3	21,0 \pm 0,44
DG	ML	21,9 \pm 1,6	24,8 \pm 2,1	23,4 \pm 1,54	21,5 \pm 1,3	22,2 \pm 0,5	21,9 \pm 0,63
	GCL	9,2 \pm 1,3	11,2 \pm 1,3	10,3 \pm 1,16	9,0 \pm 0,4	11,0 \pm 0,9	10,1 \pm 0,61
	hilus	34,3 \pm 3,6	36,4 \pm 3,4	35,4 \pm 3,39	33,3 \pm 2,2	35,3 \pm 2,1	34,4 \pm 1,89
	Total	21,8 \pm 1,4	24,1 \pm 1,4	23,0 \pm 1,36	21,2 \pm 0,8	22,9 \pm 0,8	22,1 \pm 0,66
Total Hipocampal		23,4 \pm 0,6	24,2 \pm 0,6	23,9 \pm 0,50	21,0 \pm 0,5	21,0 \pm 0,4	21,0 \pm 0,37

Os valores estão apresentados como média \pm desvio padrão; HE, hemisfério esquerdo; HD, hemisfério direito; CA, corno de Amon; DG, giro denteado; SO, *stratum oriens*; SP, *stratum pyramidale*; SR, *stratum radiatum*; SLM, *stratum lacunosum-moleculare*, SL, *stratum lucidum*; ML, camada molecular; GCL, camada de células granulares.

Tabela 2: Imunorreatividade astrocitária ao S100B nas diferentes subcamadas hipocâmpais.

		Imunopositividade ao S100B			
		HI (n = 27)		HIS (n = 27)	
		HE	HD	HE	HD
CA1	SO	(+++)	(+++)	(+)	(+)
	SP	(+++)	(++)	(++)	(+)
	SR	(+++)	(++)	(+)	(+)
	SLM	(++)	(++)	(+)	(+)
CA3	SO	(+++)	(+++)	(+)	(+)
	SP	(+++)	(+++)	(++)	(++)
	SL	(++)	(++)	(+)	(+)
	SR	(++)	(++)	(+)	(+)
	SLM	(++)	(++)	(+)	(+)
DG	ML	(++)	(++)	(++)	(++)
	GCL	(+)	(+)	(+)	(+)
	hilus	(+)	(+)	(+)	(+)

REFERÊNCIAS

- ¹ **American Academy of Sleep Medicine Task Force.** Sleep-related breathing disorders in adults: recommendation for syndrome definition and measurement techniques in clinical research. *Sleep*. 1999;**22**(5):667-689.
- ² **American Academy of Sleep Medicine.** International classification of sleep disorders: diagnostic and coding manual (ICSD-2). 2nd ed. Westchester: AASM, 2005.
- ³ **Dempsey JA, Veasey SC, Morgan BJ et al.** Pathophysiology of sleep apnea. *Physiol. Rev.* 2010; **90**(1):47-112.
- ⁴ **Peker Y, Hedner J, Kraiczi H et al.** Respiratory disturbance index: an independent predictor of mortality in coronary artery disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000;**162**(1):81-86.
- ⁵ **Bradley TD, Floras JS.** Obstructive sleep apnoea and its cardiovascular consequences. *Lancet.* 2009;**373**(9657):82-93.
- ⁶ **Bixler EO, Vgontzas AN, Ten Have T et al.** Effects of age on sleep apnea in men: I. Prevalence and severity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998;**157**(1):144-148.
- ⁷ **Flemons WW.** Obstructive sleep apnea. *N. Engl. J. Med.* 2002;**347**(7):498-504.
- ⁸ **Donato R, Sorci G, Riuizzi F et al.** S100B's double life: Intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009;**1793**(6):1008-1022.
- ⁹ **Morrell M, McRobbie DW, Quest RA et al.** Changes in brain morphology associated with obstructive sleep apnea. *Sleep Med.* 2003;**4**(5):451-454.
- ¹⁰ **Maguire EA, Gadian DG, Johnsrude IS et al.** Navigation-related structural changes in the hippocampi of taxi drivers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000;**97**(8):4398-4403.
- ¹¹ **Gozal D, Daniel JM, Dohaich GP.** Behavioral and anatomical correlates of chronic episodic hypoxia during sleep in the rat. *J. Neurosci.* 2001;**21**(7):2442-2450.
- ¹² **Macey PM, Henderson LA, Macey KE et al.** Brain morphology associated with obstructive sleep apnea. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002;**166**(1):1382-1387.
- ¹³ **National Research Council.** Guide for the care and use of laboratory animals. Washington DC: The National Academy Press, 2011.
- ¹⁴ **Martinez D, Fiori CZ, Baronio D et al.** Brown adipose tissue: is it affected by intermittent hypoxia? *Lipids in Health and Disease.* 2010;**9**(1):121-125.
- ¹⁵ **Baronio D, Martinez D, Fiori CZ et al.** Altered aquaporins in the brains of mice submitted to intermittent hypoxia model of sleep apnea. *Resp. Physiol. Neurobiol.* 2012. [Epub ahead to print].

- ¹⁶ **Allen Institute for Brain Science.** Allen Mouse Brain Atlas [internet], 2012. Available at: <<http://mouse.brain-map.org/>>. Multiple accesses..
- ¹⁷ **Ogata K**, Kosaka T. Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus. *Neurosci.* 2002;**113**(1):221-233.
- ¹⁸ **Bartlett DJ**, Rae C, Thompson CH et al. Hippocampal area metabolites relative to severity and cognitive function in obstructive sleep apnea. *Sleep Med.* 2004;**5**(6):593-596.
- ¹⁹ **Kotterba S**, Rasche K, Widdig W et al. Neuropsychological investigations and event-related potentials in obstructive sleep apnea syndrome before CPAP-therapy. *J. Neurol. Sci.* 1998;**159**(1):45-50.
- ²⁰ **Gale SD**, Hopkins RO. Effects of hypoxia on the brain: neuroimaging and neuropsychological findings following carbon monoxide poisoning and obstructive sleep apnea. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* 2004;**10**(1):60-71.
- ²¹ **Decary A**, Rouleau I, Montplaisir J. Cognitive deficits associated with sleep apnea syndrome: a proposed neuropsychological test battery. *Sleep.* 2000;**23**(3):69-81.
- ²² **Naegale B**, Thouvard V, Pépin JL et al. Deficits of cognitive executive functions in patients with sleep apnea syndrome. *Sleep.* 1995;**18**(1):43-52.
- ²³ **Long JM**, Kalehua AN, Muth NJ et al. Stereological analysis of astrocytes and microglia in aging mouse hippocampus. *Neurobiol. Aging.* 1998;**19**(5):497-503.
- ²⁴ **Savchenko VL**, McKanna JA, Nikonenko IR et al. Microglia and astrocytes in the adult rat brain: comparative immunocytochemical analysis demonstrates the efficacy of lipocortin 1 immunoreactivity. *Neurosci.* 2000;**96**(1):195-203.
- ²⁵ **Gozal D**, Daniel JM, Dohanich GP. Behavioral and anatomical correlates of chronic episodic hypoxia during sleep in the rat. *J. Neurosci.* 2001;**21**(7):442-450.
- ²⁶ **Braga CW**, Martinez D, Wofchuk S et al. S100B and NSE serum levels in obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep Medicine.* 2006;**7**(5):431-435.
- ²⁷ **Da Silva LG**, Mottin CC, Souza DO et al. Serum S100B but not NSE levels are increased in morbidly obese individuals affected by obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *Obesity Surgery.* 2008;**18**(8):993-999.
- ²⁸ **Ahlemeyer B**, Beier H, Semkova I et al. S-100 beta protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine-induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5 HT(1A)-receptor agonist, Bay x 3702. *Brain Res.* 2000;**858**(1):121-128.
- ²⁹ **Van Eldik LJ**, Wainwright MS. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor. Neurol. Neurosci.* 2003;**21**(3-4):97-108.

- ³⁰ **Aviles-Reyes RX**, Angelo MF, Villarreal A et al. Intermittent hypoxia during sleep induces reactive gliosis and limited neuronal death in rats: implications for sleep apnea. *Journal of Neurochemistry*. 2010;**112**(4):854-869.
- ³¹ **Pae EK**, Chien P, Harper RM. Intermittent hypoxia damages cerebellar cortex and deep nuclei. *Neuroscience Letters*. 2005;**375**(2):123-128.
- ³² **Gerlach R**, Demel G, König HG et al. Active secretion of S100B from astrocytes during metabolic stress. *Neurosci*. 2006;**141**(4):1697-1701.

6.2 Artigo em língua inglesa

Effect of intermittent hypoxia on the number density of hippocampal astrocytes and immunoreactivity to S100B in an animal experimental design on sleep apnea

Dennis Baroni Cruz^{1,2,*}, Denis Martinez^{3,4,5,6}, Jane Maria Ulbrich^{1,7}

¹ Graduate Program in Medicine (Pulmonology), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil

² Department of Pathology, School of Medicine, Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC), Brazil

³ Graduate Program in Medicine (Clinical Medicine), UFRGS

⁴ Graduate Program in Medicine (Cardiology), UFRGS

⁵ Division of Cardiology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), UFRGS

⁶ Interdisciplinary Sleep Research Laboratory (LIPES), HCPA, UFRGS

⁷ Division of Pathology, HCPA, UFRGS

* *Correspondence to the author:*

Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC)

Faculdade de Medicina

Avenida Independência, 2293 - CEP: 96815-900

Santa Cruz do Sul, RS, Brazil

Tel.: +55 51 3717-7300; fax: +55 51 3717-1855

Email: dbaroni@unisc.br (D.B. Cruz)

Financial Support: Research Incentive Fund of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA).

Conflict of interest: the authors declare that there are no conflicts of interest with any companies/organizations whose products or services may have been discussed in this article.

Key-words: obstructive sleep apnea; hippocampus; astrocytes; S100B; mice.

ABSTRACT

Introduction: Obstructive sleep apnea (OSA) causes intermittent hypoxia (IH), leading to cardiovascular and neurological diseases. The animal experimental studies use IH to simulate OSA, enabling the analysis of brain alterations, with the hippocampus recognized as an area influenced by hypoxia. S100B is a 21-kDa protein bonded to calcium, produced and secreted primarily by astrocytes in the neutrophil of the central nervous system. Levels of the protein have been used to understand the involvement of different cell types in certain pathological conditions. The present study aimed to test the hypothesis that IH used in an experimental design investigating OSA in mice can alter the number of astrocytes in different hippocampal sublayers (CA1, CA3 and dentate gyrus), in addition to quantitatively modifying the immunohistochemical reactivity of these cells. **Materials and Methods:** CF-1 mice were exposed to 35 days of either IH ($n = 27$) or SIH ($n = 27$), alternating 30 seconds of progressive hypoxia with a nadir of 7%, followed by 30 seconds of normoxia. Over a period of 8 hours, the animals were submitted to a total of 48 hypoxia/reoxygenation cycles, equivalent to an apnea index of 60/hour. The brain was dissected and the hippocampus and its sublayers were histologically analyzed by immunohistochemistry using S100B antibodies. **Results:** A quantitative analysis was performed of hippocampal astrocytes immunoreactive to S100B. The means recorded were 23.85 ± 0.37 astrocytes/ 0.25 mm^2 and 21.03 ± 0.50 astrocytes/ 0.25 mm^2 ($p < 0.001$) in the IH and SIH (simulated intermittent hypoxia) groups, respectively. This difference was also observed in sublayers CA1 and CA3 overall, and was less noticeable in the dentate gyrus. Astrocyte immunoreactivity was greater (+++) in the IH group and did not achieve this intensity in the SIH group. Secondary qualitative analysis revealed the presence of karyorrhexis, pyknotic neurons, and discretely hypertrophic astrocytes only in animals from the IH group. **Conclusion:** IH increased the number density of hippocampal astrocytes, as well as their immunoreactivity to S100B, in a process known as reactive astrogliosis. Secondary neuron alterations were also observed in the IH group. Future investigations using alternative methodologies would allow a better assessment of the results described here.

INTRODUCTION

Obstructive sleep apnea (OSA) is characterized by recurring episodes of complete or partial pharyngeal obstruction^{1,2}, resulting in intermittent hypoxia (IH)³. IH is a recognized cause of cardiovascular disease, stroke and cognitive deficits⁴. OSA, which reaches a prevalence of up to 30% in the elderly^{5,6,7}, causes morphological, biochemical and functional alterations in the brain. Animal studies use IH to simulate OSA, allowing brain alterations to be analyzed.

S100B is a 21-kDa protein bonded to calcium that is produced and secreted primarily by astrocytes in the neuropil of the central nervous system, playing both a neurotrophic and gliotrophic role⁸. Due to its specificity, S100B is considered a marker of brain damage and levels of the protein are used to understand the involvement of different cell types in acute or chronic brain disorders.

Among the many regions of the brain, the hippocampus is particularly sensitive to hypoxic damage⁹ and is also associated with memory processes¹⁰. Studies show that chronic exposure to IH during sleep results in damage to hippocampal cells¹¹ and the loss of grey matter in this region¹².

The correlation between IH, immunohistochemically positive astrocytes and the number of these cells in the hippocampus has not yet been jointly addressed in the literature. Since they can affect the causes and consequences of OSA, a better analysis of these factors is needed.

The present study aimed to test the hypothesis that IH used in an experimental design investigating OSA in mice can alter the number of astrocytes in different hippocampal sublayers (S100B and DG), as well as qualitatively modify their immunohistochemical reactivity to S100B.

MATERIALS AND METHODS:

Animal testing

Fifty-four 2-month-old male CF-1 mice were used in this experiment. The animals were divided into two groups of twenty-seven mice each, with one group submitted to IH and the other to simulated intermittent hypoxia (SIH). Mice were housed in an environment with controlled temperature, humidity and lighting (12/12 light cycle). Water and standardized commercial feed were provided *ad libitum*. The procedures performed were approved by the institutional Research Ethics Committee and were in line with the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals"¹³.

Over a period of five weeks, seven days a week and for eight hours during the light period, the animal models were placed in sealed plastic chambers with transparent acrylic lids, connected to either the induced hypoxia (IH) or normoxia system (SIH). The animals were maintained in their separate groups until the end of the experiment.

The IH system consisted of a timer, solenoid valve, small fans coupled to the acrylic lids, tubing, and a metal cylinder containing a mixture of nitrogen gas (N₂) and carbon dioxide (CO₂) at a concentration of 92% and 8%, respectively. This gas mixture was released into the IH chamber for thirty seconds, lowering the oxygen fraction (O₂) to $7 \pm 1\%$ and increasing the CO₂ fraction to $5 \pm 1\%$. Next, ambient air was blown into the chamber for a further thirty seconds. The animals from the SIH group remained in adjacent chambers and were submitted to the same manipulation as those in the IH group, but without exposure to the gas mixture, thereby serving as controls.

The model described has been successfully applied in other studies^{14,15}.

Tissue Sampling

Mice from both groups were anesthetized by intraperitoneal injection with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), immediately after removal from their respective chambers. Upon confirmation of deep sedation, the animals were immobilized and perfused according to the standard procedure applied in the institutional Pathology Laboratory. The thorax was dissected, the heart exposed and the descending aorta clamped. Next, the apex of the heart was sectioned and a tube was inserted from the left ventricle to the aorta, injecting 15.0 mL of phosphate

buffered saline, pH 7.4, at ambient temperature. Fixation was performed by perfusion, using a mixture of 4% paraformaldehyde and 0.2% picric acid in 0.1 M phosphate buffer, with 30.0 mL of this solution used in two stages of infusion: the first at a rapid flow rate (5 minutes) and the second with a slow flow rate (15 minutes). The cephalic region of the animal was covered with ice in order to preserve the chemical nature of the tissue components. The brain was removed following infusion and immersed in 10% buffered formalin for 24 hours.

Histology and immunohistochemistry

After fixation, the hippocampus was dissected and embedded in paraffin in accordance with standard histological processing. The blocks were cut into coronal sections from rostral to caudal, with cuts 5 μm thick and a distance of 100 μm between them, leaving no viable tissue inside the remaining paraffin. Three sections were obtained per slide, totaling ten slides per animal (thirty histological sections). The hippocampus was processed in this manner to achieve sections that corresponded to images from the "Allen Mouse Brain Atlas"¹⁶.

These sections were mounted and incubated with S100B monoclonal antibodies (Sigma-Aldrich, reference S2532, with dilution of 1:500). Secondary biotinylated antibodies were also used (Vector Laboratories, USA). The immunohistochemical reaction was revealed by avidin-biotin peroxidase using diaminobenzidine as chromogen. Sections were then dried and covered with coverslips.

Histopathological analysis

The histological sections were analyzed by two medical pathologists, both blinded to the groups being assessed. Measurements were taken for each slide in both hemispheres.

Astrocyte density was estimated in hippocampal layers CA1, CA3, the dentate gyrus (DG) and sublayers by counting the cell bodies immunoreactive to S100B and calculating the average between the amounts given by both observers. To estimate the number of astrocytes, an area was delimited using a reticle attached to the eyepiece of the optical microscope. This consisted of a counting grid with side measurements of 500 μm and a total area of 250000 μm^2 , positioned over the entire surface of the hippocampus. Astrocytes were identified by their morphological

characteristics, that is, S100B-positive cells, short protoplasmic processes, and by their nuclear morphology. Cells intersected by the abscissa or ordinate axes, as well as those that did not meet the above criteria, were excluded.

Astrocyte immunoreactivity to S100B was quantified by optical density and after qualitatively classified following the hippocampal means of each layer as three intensities: (+), (++) and (+++). The optical density was obtained with utilization of *Image-Pro® Plus* software (version 6.0), for *Windows™*.

Hippocampal cells were also submitted to secondary analysis in the search for other histological changes indicating hypoxia, degeneration and death (pyknosis, karyorrhexis, clustering, varying sizes, cytoplasmic and nuclear changes, among others).

Statistical analysis

Sample size was calculated using means and standard deviations of cellularity values recorded in the study “Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus”¹⁷, aiming at a power of 90% and a 5% significance level.

Measurements taken for each animal were separated into two groups and the mean for each group was used to analyze variables with normal distribution. Means for the variables studied between the two groups were compared using the Student’s t-test for independent samples, and Levene’s test was applied to assess equality of variance. Results were considered statistically significant at $p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively.

RESULTS

Data regarding the quantitative analysis of astrocytes (astrocytes/250000 μm^2), as well as means recorded for the hemispheres and hippocampus slides, are shown in **Table 1**. A statistically significant difference was observed in the overall mean values for hippocampal astrocytes between the IH (23.85 ± 0.37 astrocytes/250000 μm^2) and SIH (21.03 ± 0.50 astrocytes/250000 μm^2 ; $p < 0.001$) groups. This difference was also noted in sublayers CA1 and CA3 (**Figure 2**) overall.

The quantitative measures obtained by optic density ranged between 0.39 and 0.18. The mean of each hippocampal layer allowed the classification in the following groups: (+++), with values varying between 0.39 and 0.32; (++), with values varying between 0.31 and 0.24, and (+), with values varying between 0.23 and 0.18. More intense immunoreactivity, classified as (+++), was observed in the IH group (particularly in sublayers CA1 and CA3), accompanying the greater density in hippocampal astrocytes. It is important to note that none of the sublayers in the SIH group exhibited immunoreactivity classified as maximum (+++), in other words higher than 0.32, displaying only (++) and (+) (**Table 2**). In the intervention group, positivity was higher in hippocampal layers in the left hemisphere when compared to the right.

Secondary qualitative analysis revealed the presence of karyorrhexis and pyknotic neurons only in animals from the IH group (**Figure 3**), in addition to discretely hypertrophic astrocytes. Due to the histological technique used, these alterations were not quantified.

DISCUSSION

The IH animal experimental design simulating findings in patients with severe OSA consisted of sixty hypoxia cycles per hour, with a nadir of 7%, for eight hours a day over a period of 35 days. It was observed that astrocyte density in different hippocampal sublayers increased, as did the qualitative immunoreactivity of these cells.

There is substantial evidence that OSA can cause alterations in the central nervous system. Neuropathological, neuropsychological and metabolic changes have been identified through radiological, biochemical and psychological research^{18,19,20,21,22}. However, histological modifications have not been universally detected and may remain subclinical in initial stages.

Several studies have sought to quantify hippocampal astrocytes in rodents, with significant variations in numbers caused primarily by the shrinkage of histological sections^{23,24}. Research by Ogata and Kosaka¹⁷ stands out as the first to analyze hippocampal subdivisions and sublayers individually using the optical dissector counting technique, with resulting amounts serving as the basis for a number of future studies. When the amounts obtained in the present study were compared via immunohistochemistry in the SIH group (control), the difference recorded remained almost constant between all the hippocampal areas analyzed. Therefore, despite using a different technique, our measurements reproduced the findings of the reference study. A slight variation was observed between the counts of the two previously trained observers. Despite the elevated, and at times exhaustive, number of high-power fields (400x) per section, this was necessary in order to establish astrocyte positivity to S100B for quantification purposes.

In both humans and mice, hippocampal regions CA1 and CA3 are highly sensitive to conditions such as hypoxia and are common sites of neurodegeneration and low neural excitability²⁵. This was evidenced by the overall quantitative changes observed in these two layers when comparing the IH and SIH groups. No statistically significant differences were recorded in the dentate gyrus and its sublayers.

Hippocampal astrocytes in the mice submitted to IH showed a qualitative increase in immunoreactivity to S100B. At nanomolar concentrations, S100B is associated to the development of neurites, and neuronal survival during development and following damage¹⁵. In greater (micromolar) concentrations, S100B can lead to

neuronal death⁸. These findings make S100B a potentially useful serum marker in identifying and classifying the severity of OSA; so much so that previous studies have substantiated these correlations^{26,27}. Increased immunoreactivity of hippocampal astrocytes to S100B in the IH group may raise the serum concentration of this protein. These alterations reflect both reactive astrogliosis and the neuronal changes observed, corroborating data reported in the literature^{28,29}. Nevertheless, it is important to underscore that other types of cells outside the nervous system also express S100B, although this in no way diminishes the role of astrocytes.

Hippocampal sublayers displayed variations in immunoreactivity to S100B when comparing the two hemispheres. To a certain extent, the left hippocampus showed greater qualitative alterations than the right, in line with previous studies on humans⁹. No statistically significant differences were observed between quantitative values for the two hemispheres.

Secondary analysis of the histological findings accompanied the quantitative hippocampal changes caused by IH. Discrete hypertrophy was observed in astrocyte cell bodies in several hippocampal sublayers, in addition to focal degenerative changes (pyknosis and karyorrhexis) in hippocampal neurons of the IH group.

A potential limitation of the present study may have been possible nuclear overlap, since immunohistochemistry and classic histology were applied rather than the optical dissector technique. However, as previously mentioned, findings were in line with those of the reference study.

Prior results^{11,30,31,32} were corroborated with respect to the harmful effect of IH on hippocampal neurons, as well as reactive astrogliosis and increased immunoreactivity to S100B. The low oxygen saturation levels observed in patients suffering from severe OSA are capable of affecting hippocampal astrocytes. Astrocyte proliferation, via reactive gliosis, is a possible explanation for the rise in serum levels of the S100B protein.

CONCLUSIONS

IH increased the number density of hippocampal astrocytes, as well as their immunoreactivity to S100B. These findings reflect reactive gliosis, in addition to the neuronal changes submitted to secondary analysis in the present study.

Additional research using the optical dissector technique, immunofluorescence and optical density will reduce the changes caused by traditional histological processing and allow volumetric analysis of the cytoplasmic processes of astrocytes and their correlations, in addition to enabling better characterization of the cellular alterations found in the secondary analysis in this study.

FIGURES

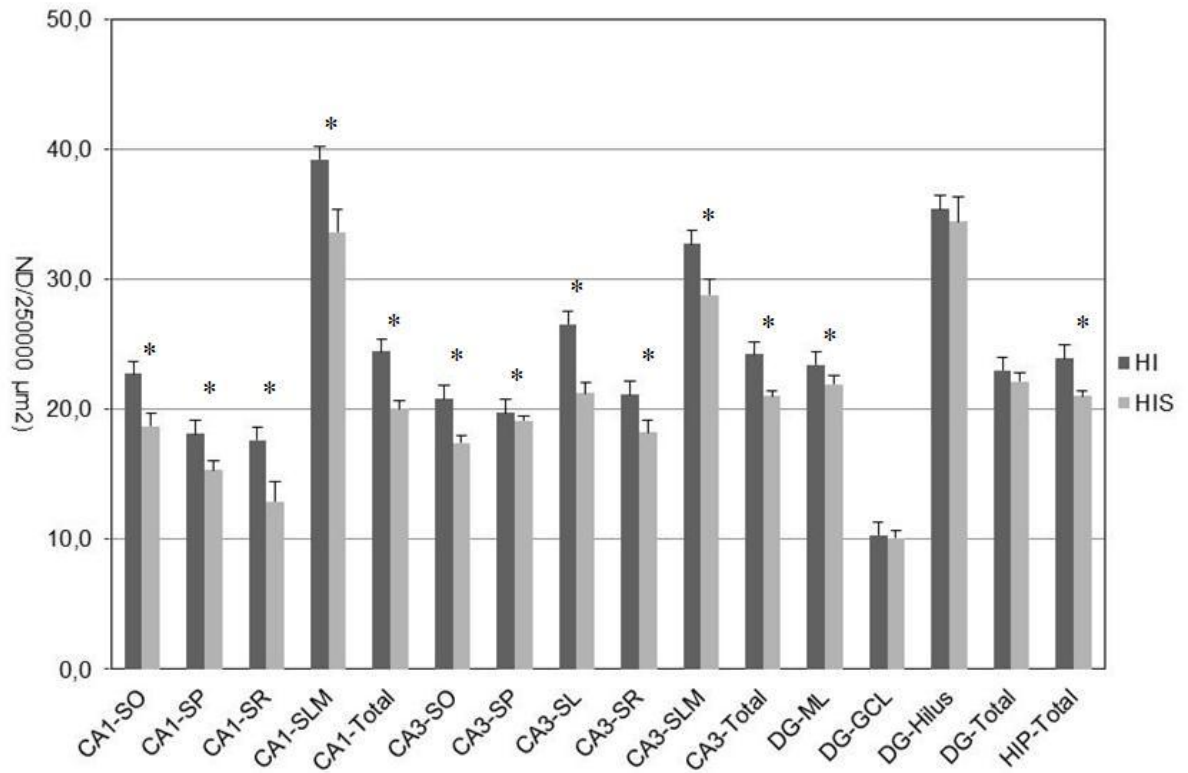


Figure 1: Histogram showing values with the respective standard deviations of mean slide differences between the IH and SIH groups. * $p < 0.001$ in Levene's test.

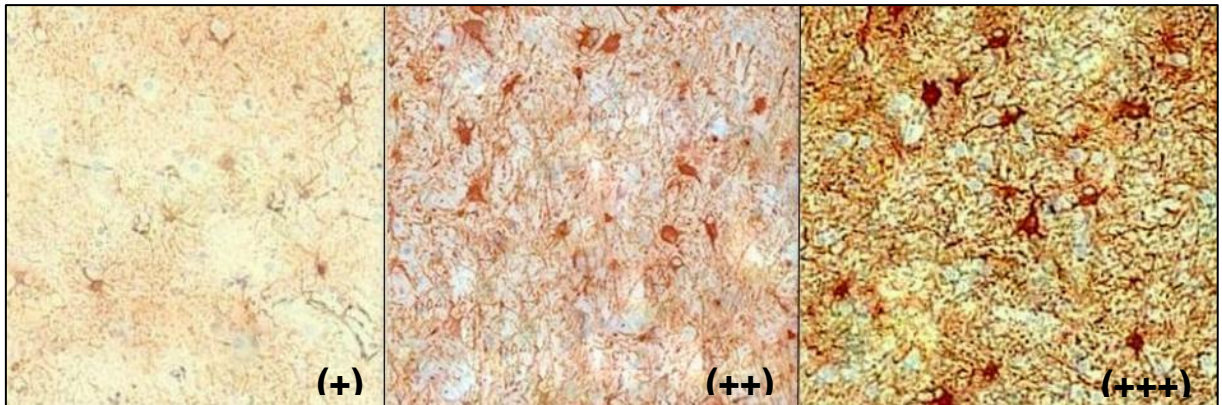


Figure 2: Qualitative grading scale for immunoreactivity of hippocampal astrocytes to S100B. On the left (+++), in the center (++), on the right (+). S100B, 200x.

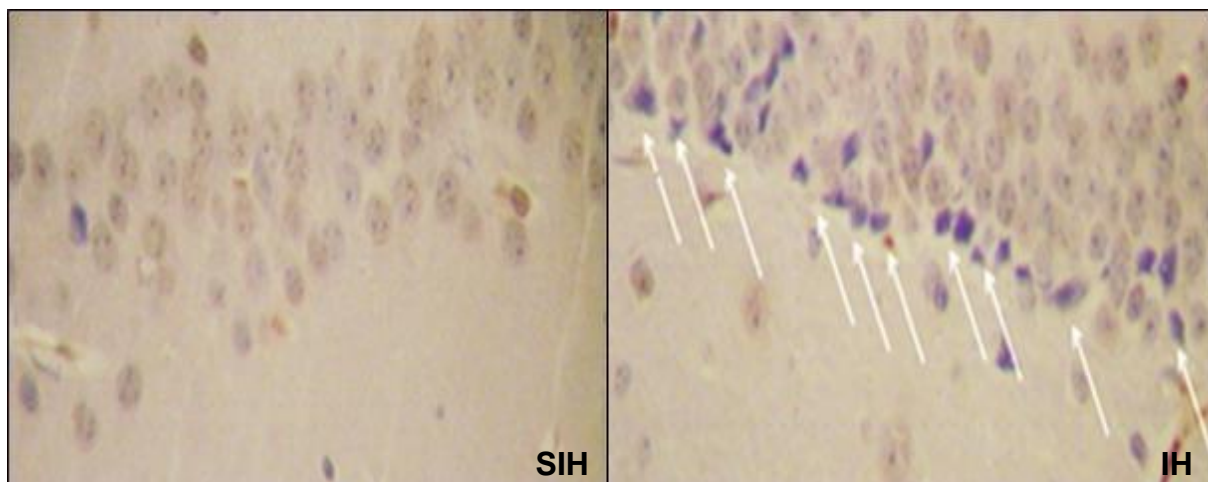


Figure 3: Cellular alterations (arrows) representing pyknosis and karyorrhexis in hippocampal neurons for the IH group (on the right) compared with the same region in the SIH group (on the left). S100B; 400x.

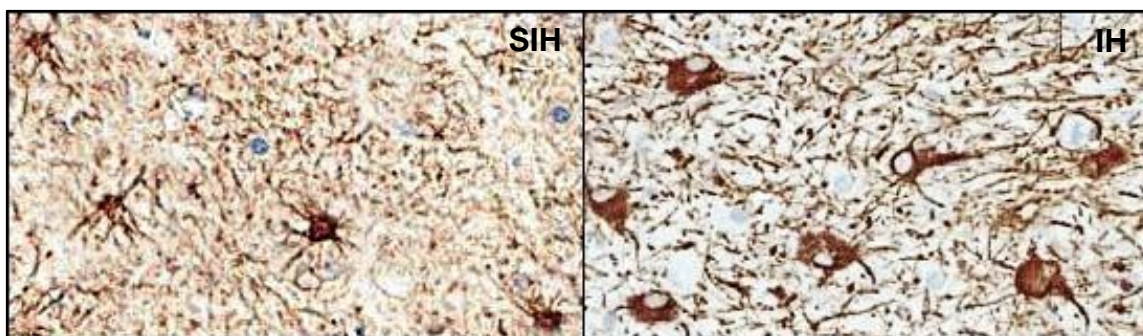


Figure 4 - Astrocytic differences between the SIH group (on the left) and IH group (on the right). The reactive astrogliosis, characterized by hyperplasia and by elevation of astrocytic density, is more evident in the second group. The pictures were taken from homologues regions of CA1 (*stratum oriens*) between animals of IH group. Coloration: S100B, 400x.

TABLES

Table 1: Hippocampal slide differences in number density of astrocytes immunoreactive to S100B.

		Number of astrocytes per 250000 μm^2					
		HI (n = 27)			SIH (n = 27)		
		LH	RH	Mean	LH	RH	Mean
CA1	SO	21.1 \pm 1.6	24.2 \pm 2.8	22.7 \pm 1.58	18.0 \pm 1.4	19.3 \pm 1.1	18.7 \pm 0.96
	SP	17.9 \pm 1.1	18.3 \pm 1.5	18.1 \pm 0.83	15.2 \pm 0.8	15.3 \pm 0.9	15.3 \pm 0.74
	SR	16.7 \pm 2.6	18.3 \pm 1.9	17.6 \pm 1.77	12.8 \pm 2.0	13.0 \pm 1.5	12.9 \pm 1.48
	SLM	38.4 \pm 3.4	39.8 \pm 0.8	39.2 \pm 1.63	33.1 \pm 0.9	33.2 \pm 0.7	33.6 \pm 1.71
	Total	23.5 \pm 1.1	25.2 \pm 0.9	24.4 \pm 0.57	19.8 \pm 0.7	20.2 \pm 0.7	20.0 \pm 0.62
CA3	SO	21.0 \pm 2.3	20.6 \pm 2.1	20.8 \pm 2.10	17.7 \pm 1.2	17.0 \pm 0.8	17.4 \pm 0.61
	SP	20.9 \pm 1.2	18.5 \pm 0.8	19.7 \pm 0.75	19.9 \pm 0.5	18.3 \pm 0.5	19.1 \pm 0.41
	SL	26.7 \pm 2.1	26.3 \pm 1.5	26.5 \pm 1.32	21.6 \pm 1.1	20.8 \pm 0.7	21.2 \pm 0.82
	SR	22.4 \pm 2.7	19.8 \pm 2.0	21.1 \pm 2.25	20.1 \pm 1.6	16.3 \pm 1.0	18.2 \pm 0.91
	SLM	34.0 \pm 3.6	31.3 \pm 1.9	32.7 \pm 2.56	30.9 \pm 2.0	26.6 \pm 1.0	28.8 \pm 1.15
	Total	25.0 \pm 0.9	23.3 \pm 0.7	24.2 \pm 0.67	22.5 \pm 0.7	19.8 \pm 0.3	21.0 \pm 0.44
DG	ML	21.9 \pm 1.6	24.8 \pm 2.1	23.4 \pm 1.54	21.5 \pm 1.3	22.2 \pm 0.5	21.9 \pm 0.63
	GCL	9.2 \pm 1.3	11.2 \pm 1.3	10.3 \pm 1.16	9.0 \pm 0.4	11.0 \pm 0.9	10.1 \pm 0.61
	hilus	34.3 \pm 3.6	36.4 \pm 3.4	35.4 \pm 3.39	33.3 \pm 2.2	35.3 \pm 2.1	34.4 \pm 1.89
	Total	21.8 \pm 1.4	24.1 \pm 1.4	23.0 \pm 1.36	21.2 \pm 0.8	22.9 \pm 0.8	22.1 \pm 0.66
Hippocampal Total		23.4 \pm 0.6	24.2 \pm 0.6	23.9 \pm 0.50	21.0 \pm 0.5	21.0 \pm 0.4	21.0 \pm 0.37

Amounts are shown as mean \pm standard deviation; LH, left hemisphere; RH, right hemisphere; AH, Ammon's horn; DG, dentate gyrus; SO, *stratum oriens*; SP, *stratum pyramidale*; SR, *stratum radiatum*; SLM, *stratum lacunosum-moleculare*, SL, *stratum lucidum*; ML, molecular layer; GCL, granule cell layer.

Table 2: Astrocyte immunoreactivity to S100B in the different hippocampal sublayers.

		Immunopositivity to S100B			
		IH (n = 27)		SIH (n = 27)	
		LH	HD	LH	RH
CA1	SO	(+++)	(+++)	(+)	(+)
	SP	(+++)	(++)	(++)	(+)
	SR	(+++)	(++)	(+)	(+)
	SLM	(++)	(++)	(+)	(+)
CA3	SO	(+++)	(+++)	(+)	(+)
	SP	(+++)	(+++)	(++)	(++)
	SL	(++)	(++)	(+)	(+)
	SR	(++)	(++)	(+)	(+)
	SLM	(++)	(++)	(+)	(+)
DG	ML	(++)	(++)	(++)	(++)
	GCL	(+)	(+)	(+)	(+)
	hilus	(+)	(+)	(+)	(+)

REFERENCES

- ¹ **American Academy of Sleep Medicine Task Force.** Sleep-related breathing disorders in adults: recommendation for syndrome definition and measurement techniques in clinical research. *Sleep*. 1999;**22**(5):667-689.
- ² **American Academy of Sleep Medicine.** International classification of sleep disorders: diagnostic and coding manual (ICSD-2). 2nd ed. Westchester: AASM, 2005.
- ³ **Dempsey JA,** Veasey SC, Morgan BJ et al. Pathophysiology of sleep apnea. *Physiol. Rev.* 2010; **90**(1):47-112.
- ⁴ **Peker Y,** Hedner J, Kraiczi H et al. Respiratory disturbance index: an independent predictor of mortality in coronary artery disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000;**162**(1):81-86.
- ⁵ **Bradley TD,** Floras JS. Obstructive sleep apnoea and its cardiovascular consequences. *Lancet.* 2009;**373**(9657):82-93.
- ⁶ **Bixler EO,** Vgontzas AN, Ten Have T et al. Effects of age on sleep apnea in men: I. Prevalence and severity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998;**157**(1):144-148.
- ⁷ **Flemons WW.** Obstructive sleep apnea. *N. Engl. J. Med.* 2002;**347**(7):498-504.
- ⁸ **Donato R,** Sorci G, RiuZZi F et al. S100B's double life: Intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009;**1793**(6):1008-1022.
- ⁹ **Morrell M,** McRobbie DW, Quest RA et al. Changes in brain morphology associated with obstructive sleep apnea. *Sleep Med.* 2003;**4**(5):451-454.
- ¹⁰ **Maguire EA,** Gadian DG, Johnsrude IS et al. Navigation-related structural changes in the hippocampi of taxi drivers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000;**97**(8):4398-4403.
- ¹¹ **Gozal D,** Daniel JM, Dohaich GP. Behavioral and anatomical correlates of chronic episodic hypoxia during sleep in the rat. *J. Neurosci.* 2001;**21**(7):2442-2450.
- ¹² **Macey PM,** Henderson LA, Macey KE et al. Brain morphology associated with obstructive sleep apnea. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002;**166**(1):1382-1387.
- ¹³ **National Research Council.** Guide for the care and use of laboratory animals. Washington DC: The National Academy Press, 2011.
- ¹⁴ **Martinez D,** Fiori CZ, Baronio D et al. Brown adipose tissue: is it affected by intermittent hypoxia? *Lipids in Health and Disease.* 2010;**9**(1):121-125.
- ¹⁵ **Baronio D,** Martinez D, Fiori CZ et al. Altered aquaporins in the brains of mice submitted to intermittent hypoxia model of sleep apnea. *Resp. Physiol. Neurobiol.* 2012. [Epub ahead to print].

- ¹⁶ **Allen Institute for Brain Science.** Allen Mouse Brain Atlas [internet], 2012. Available at: <<http://mouse.brain-map.org/>>. Multiple accesses..
- ¹⁷ **Ogata K**, Kosaka T. Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus. *Neurosci.* 2002;**113**(1):221-233.
- ¹⁸ **Bartlett DJ**, Rae C, Thompson CH et al. Hippocampal area metabolites relative to severity and cognitive function in obstructive sleep apnea. *Sleep Med.* 2004;**5**(6):593-596.
- ¹⁹ **Kotterba S**, Rasche K, Widdig W et al. Neuropsychological investigations and event-related potentials in obstructive sleep apnea syndrome before CPAP-therapy. *J. Neurol. Sci.* 1998;**159**(1):45-50.
- ²⁰ **Gale SD**, Hopkins RO. Effects of hypoxia on the brain: neuroimaging and neuropsychological findings following carbon monoxide poisoning and obstructive sleep apnea. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* 2004;**10**(1):60-71.
- ²¹ **Decary A**, Rouleau I, Montplaisir J. Cognitive deficits associated with sleep apnea syndrome: a proposed neuropsychological test battery. *Sleep.* 2000;**23**(3):69-81.
- ²² **Naegale B**, Thouvard V, Pépin JL et al. Deficits of cognitive executive functions in patients with sleep apnea syndrome. *Sleep.* 1995;**18**(1):43-52.
- ²³ **Long JM**, Kalehua AN, Muth NJ et al. Stereological analysis of astrocytes and microglia in aging mouse hippocampus. *Neurobiol. Aging.* 1998;**19**(5):497-503.
- ²⁴ **Savchenko VL**, McKanna JA, Nikonenko IR et al. Microglia and astrocytes in the adult rat brain: comparative immunocytochemical analysis demonstrates the efficacy of lipocortin 1 immunoreactivity. *Neurosci.* 2000;**96**(1):195-203.
- ²⁵ **Gozal D**, Daniel JM, Dohanich GP. Behavioral and anatomical correlates of chronic episodic hypoxia during sleep in the rat. *J. Neurosci.* 2001;**21**(7):442-450.
- ²⁶ **Braga CW**, Martinez D, Wofchuk S et al. S100B and NSE serum levels in obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep Medicine.* 2006;**7**(5):431-435.
- ²⁷ **Da Silva LG**, Mottin CC, Souza DO et al. Serum S100B but not NSE levels are increased in morbidly obese individuals affected by obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *Obesity Surgery.* 2008;**18**(8):993-999.
- ²⁸ **Ahlemeyer B**, Beier H, Semkova I et al. S-100 beta protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine-induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5 HT(1A)-receptor agonist, Bay x 3702. *Brain Res.* 2000;**858**(1):121-128.
- ²⁹ **Van Eldik LJ**, Wainwright MS. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor. Neurol. Neurosci.* 2003;**21**(3-4):97-108.

- ³⁰ **Aviles-Reyes RX**, Angelo MF, Villarreal A et al. Intermittent hypoxia during sleep induces reactive gliosis and limited neuronal death in rats: implications for sleep apnea. *Journal of Neurochemistry*. 2010;**112**(4):854-869.
- ³¹ **Pae EK**, Chien P, Harper RM. Intermittent hypoxia damages cerebellar cortex and deep nuclei. *Neuroscience Letters*. 2005;**375**(2):123-128.
- ³² **Gerlach R**, Demel G, König HG et al. Active secretion of S100B from astrocytes during metabolic stress. *Neurosci*. 2006;**141**(4):1697-1701.

7 Conclusões

A HI causou alterações estatisticamente significativas em praticamente todas as camadas e subcamadas hipocampais analisadas, influenciando tanto as células astrocitária quando os neurônios.

Os astrócitos hipocampais do grupo HI sofreram o processo de astrogliose reativa, sendo este caracterizado pelo aumento da densidade numérica que se mostrou estatisticamente significativa e de maior intensidade quando comparada com o grupo controle.

A imunorreatividade astrocitária ao S100B acompanhou, após a sua verificação quantitativa através da técnica de densitometria óptica e posterior classificação qualitativa em três grupos, o aumento da densidade numérica do grupo HI e a conseqüente astrogliose reativa. Cabe ressaltar e ela ocorreu de forma paralela às alterações detectadas por estudos anteriores que utilizaram exames de imagem na avaliação do efeito da AOS sobre diversas regiões encefálicas.

Além das alterações descritas acima, ocorreram também reações neuronais, representadas principalmente por cariorrexe e por picnose, indicando que tais células também foram sensíveis à HI.

O efeito da HI sobre os astrócitos e sobre os neurônios hipocampais possivelmente causa repercussão sobre o processo de aprendizado e de memorização, já que ambas estão intimamente correlacionadas com esta região encefálica.

Os achados do presente estudo permitem concluir que a técnica de imunohistoquímica foi eficaz, tanto na identificação das alterações hipocampais associadas à HI, quanto na reprodutibilidade dos resultados obtidos através de técnicas distintas previamente utilizadas.

O modelo de experimentação animal utilizado para simular a AOS foi, portanto, também consolidado.

8 Considerações finais

Os achados do presente estudo levantam a necessidade da realização de técnicas adicionais para a investigação complementar das alterações histológicas hipocampais.

A utilização do método de dissector óptico e da imunofluorescência, além de reduzirem as possíveis alterações ocasionadas pelo processamento histológico tradicional (principalmente a sobreposição de estruturas), possibilitará a análise volumétrica dos prolongamentos citoplasmáticos astrocitários.

A quantificação da densidade neuronal e da alteração volumétrica destas células, assim como a utilização de marcadores imunoistoquímicos da cascata apoptótica, mostram-se técnicas promissoras na investigação complementar dos achados detectados pelo presente estudo.

Os testes com os animais de ambos os grupos antes do seu sacrifício também podem ser realizados para a verificação das alterações correlacionadas com o processo de aprendizagem e de memorização, assim como possíveis alterações comportamentais.

De forma geral, a S100B tem se mostrado uma ferramenta extremamente útil principalmente na investigação de alterações neurológicas. Estudos futuros determinarão quais os distúrbios que poderão ter seu diagnóstico e seu prognóstico estabelecidos através da dosagem desta proteína nos diferentes líquidos corporais, evitando, desta forma, intervenções agressivas ou desnecessárias nestes pacientes.

9 Referências bibliográficas da tese

ADAMI, C. et al. S100B-stimulated NO production by BV-2 microglia is independent of RAGE transducing activity but dependent on RAGE extracellular domain. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1742, n. 1-3, p. 169-177, Dec. 2004.

AHLEMEYER, B. et al. S-100 beta protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine-induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5 HT(1A)-receptor agonist, Bay x 3702. **Brain Res.**, v. 858, n. 1, p. 121-128, Mar. 2000.

ALAM, I. et al. Obesity, metabolic syndrome and sleep apnoea: all pro-inflammatory states. **Obes. Rev.**, v. 8, n. 2, p. 119-127, Mar. 2007.

ALBERTS, B. et al. (Col.). **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

ALEXANIAN, A. R.; BAMBURG, J. R. Neuronal survival activity of S100betabeta is enhanced by calcineurin inhibitors and requires activation of NF-kappaB. **FASEB J.**, v. 13, n. 12, p. 1611-1620, Sep. 1999.

ALLEN INSTITUTE FOR BRAIN SCIENCE. **Allen Mouse Brain Atlas [internet]**, 2012. Disponível em: <<http://mouse.brain-map.org/>>. Múltiplos acessos.

ALLORE, R. et al. Gene encoding the beta subunit of S100 protein is on chromosome 21: implications for Down syndrome. **Science**, v. 239, n. 4845, p. 1311-1313, Mar. 1988.

AMARAL, D. G.; WITTER, M. P. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. **Neuroscience**, v. 31, n. 3, p. 571-591, 1989.

AMERICAN ACADEMY OF SLEEP MEDICINE. **International classification of sleep disorders: diagnostic and coding manual (ICSD-2)**. 2. ed. Westchester: AASM, 2005.

AMERICAN ACADEMY OF SLEEP MEDICINE TASK FORCE. Sleep-related breathing disorders in adults: recommendation for syndrome definition and measurement techniques in clinical research. **Sleep**, v. 22, n. 5, p. 667-689, Aug. 1999.

AMERICAN THORACIC SOCIETY/AMERICAN SLEEP DISORDERS ASSOCIATION. Statement on health outcomes research in sleep apnea. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 157, n. 1, p. 335-341, Jan. 1998.

ANCOLI-ISRAEL, S. et al. Cognitive effects of treating obstructive sleep apnea in Alzheimer's disease: a randomized controlled study. **J. Am. Geriatr. Soc.**, v. 56, n. 11, p. 2076-2081, Nov. 2008.

ANDERSEN, P. et al (Ed): **The Hippocampus Book**. London: Oxford University Press, 2007.

ANDREAZZA, A. C. et al. Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients. **J. Psychiatr. Res.**, v. 41, n. 6, p. 523-529, Sep. 2007.

ANDRES-BARQUIN, P. J. Ramón y Cajal: a century after the publication of his masterpiece. **Endeavour**, v. 25, n. 1, p. 13-17, Mar. 2001.

ANTUNES, D. G. Efeito do glutamato sobre a secreção da proteína S100B em cultura de astrócitos hipocâmpais. Porto Alegre: UFRGS, 2002. 70 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Bioquímica, Faculdade Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

ARAQUE, A. et al. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. **Trends. Neurosci.**, v. 22, n. 5, p. 208-215, May 1999.

ARCURI, I. et al. Annexin V, annexin VI, S100A1 and S100B in developing and adult avian skeletal muscles. **Neuroscience**, v. 109, n. 2, p. 371-388, 2002.

ASTUR, R. S. et al. Humans with hippocampus damage display severe spatial memory impairments in a virtual Morris water task. **Behav. Brain Res.**, v. 132, n. 1, p. 77-84, Apr. 2002.

AUGER, R. R.; BOEVE, B. F. Sleep disorders in neurodegenerative diseases other than Parkinson's disease. **Handb. Clin. Neurol.**, v. 99, p. 1011-1050, 2011.

AVILES-REYES, R. X. et al. Intermittent hypoxia during sleep induces reactive gliosis and limited neuronal death in rats: implications for sleep apnea. **Journal of Neurochemistry**, v. 112, n. 4, p. 854-869, Feb. 2010.

BARCELÓ, A; BARBÉ, F. Oxidative stress and sleep apnea-hypopnea syndrome. **Arch. Broncopneumol.**, v. 41, n. 7, p. 393-399, Jul. 2005.

BARONIO, D. et al. Altered aquaporins in the brains of mice submitted to intermittent hypoxia model of sleep apnea. **Resp. Physiol. Neurobiol.**, 2012. [Epub ahead to print].

BARTLETT, D. J. et al. Hippocampal area metabolites relative to severity and cognitive function in obstructive sleep apnea. **Sleep Med.**, v. 5, n. 6, p. 593-596, 2004.

BAUDIER, J.; GLASSER, N.; GERARD, D. Calcium and zinc-binding to S100 proteins. I. Calcium- and zinc-binding properties of bovine brain S100 alpha alpha, S100a (alpha beta), and S100b (beta beta) protein: Zn⁺² regulates Ca⁺² binding on S100b protein. **J. Biol. Chem.**, v. 261, n. 8, p. 8192-8203, Jun. 1986a.

BERNARD, C.; WHEAL, H. V. Model of local connectivity patterns in CA3 and CA1 areas of the hippocampus. **Hippocampus**, v. 4, n. 5, p. 497-529, Oct. 1994.

BERRIDGE M.J.; LIPP P.; BOOTMAN M.D. The versatility and universality of calcium signalling, **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 1, n. 1, p. 11-21, Oct. 2000.

BIANCHI, R.; GIAMBANCO, I.; DONATO, R. S-100 protein, but not calmodulin, binds to the glial fibrillary acidic protein and inhibits its polymerization in a Ca(2+)-dependent manner. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 17, p. 12669-12674, Jun. 1993.

BIANCHI, R. et al. S100B/RAGE-dependent activation of microglia via NF- κ B and AP- γ Co-regulation of COX-2 expression by S100B, IL-1 β and TNF- α . **Neurobiol. Aging**, v. 31, n. 4, p. 665-677, Apr. 2010.

BIANCHI, R. et al. S100B protein stimulates microglia migration via RAGE-dependent up-regulation of chemokine expression and release. **J. Biol. Chem.**, v. 286, n. 9, p. 7214-7226, Mar. 2011.

BIXLER, E.O. et al. Prevalence of sleep-disordered breathing in women: effects of gender. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 163, n. 3 Pt. 1, p. 608-613, Mar. 2001.

BONNET, M. H.; ARAND, D. L. Hyperarousal and insomnia: state of the science. **Sleep Med. Rev.**, v. 14, n. 1, p. 9-15, Feb. 2010.

BRADLEY, T. D.; FLORAS, J. S. Obstructive sleep apnoea and its cardiovascular consequences. **Lancet**, v. 373, n. 9657, p. 82-93, Jan. 2009.

BRAGA, B. et al. Sleep-disordered breathing and chronic atrial fibrillation. **Sleep Med.**, v. 10, n. 2, p. 212-216, Feb. 2009.

BRAGA, C. W. et al. S100B and NSE serum levels in obstructive sleep apnea syndrome. **Sleep Medicine**, v. 7, n. 5, p. 431-435, Aug. 2006.

BROADBENT, W. H. Cheyne-Stokes respiration in cerebral hemorrhage. **Lancet**, v. 3, p. 307-309, 1877.

BROZZI, F. et al. S100B protein regulates astrocyte shape and migration via interaction with Src kinase: implications for astrocyte development, activation, and tumor growth. **J. Biol. Chem.**, v. 284, n. 13, p. 8797-8811, Mar. 2009.

BURWELL, C.S. et al. Extreme obesity associated with alveolar hypoventilation - a Pickwickian Syndrome. **Am. J. Med.**, v. 21, n. 5, p. 811-818, Nov. 1956.

BUSHONG, E. A. et al. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. **J. Neurosci.**, v. 22, n. 1, p. 183-192, Jan. 2002.

CAPLES, S. M.; GAMI, A. S.; SOMERS, V. K. Obstructive sleep apnea. **Ann. Intern Med.**, v. 142, n. 3, p. 187-197, Feb. 2005.

CARPAGNANO, G. E. et al. Oxidative stress and cardiovascular complications in sleep apnea. **Chest**, v. 127, n. 6, p. 2294, Jun. 2005.

CARSKADON, M.A.; DEMENT, W. Normal human sleep: an overview. In: KRYGER, M. H.; ROTH, T.; DEMENT, W. C. (ed.). **Principles and practice of sleep medicine**. 5. ed. Philadelphia: Elsevier-Saunders, 2011. p. 16-26.

CASSOL, C. M. Variação sazonal da apneia do sono: evidência de uma década de polissonografia em Porto Alegre. Porto Alegre: UFRGS, 2010. 133 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

CAVAGLIA, M. et al. Regional variation in brain capillary density and vascular response to ischemia. **Brain Res.**, v. 10, n. 1-2, p. 81-93, Aug. 2001.

CENQUIZCA, L. A.; SWANSON, L. W. Analysis of direct hippocampal cortical field CA1 axonal projections to diencephalon in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 497, n. 1, p. 101-14, Jul. 2006.

CENQUIZCA, L. A.; SWANSON, L. W. Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. **Brain Res. Rev.**, v. 56, n. 1, p.1-26, Nov. 2007.

CERVELLIN, G. et al. Serum levels of protein S100B predict intracranial lesions in mild head injury. **Clin. Biochem.**, v. 45, n. 6, p. 408-411, Apr. 2012.

CHANG, E.T.; SHIAO, G.M. Craniofacial abnormalities in Chinese patients with obstructive and positional sleep apnea. **Sleep Med.**, v. 9, n. 4, p. 403-410, May 2008.

CHENG, M.H. et al. The relationship of self-reported sleep disturbance, mood, and menopause in a community study. **Menopause**, v. 15, n. 5, p. 958-962, Sep.-Oct. 2008.

CHUANG, L.P et al. Dynamic upper airway changes during sleep in patients with obstructive sleep apnea syndrome. **Acta Otolaryngol.**, v. 129, n. 12, p. 1474-1479, Dec. 2009.

CHUNG, J.W. et al. Patients with positional versus nonpositional obstructive sleep apnea: a retrospective study of risk factors associated with apnea-hypopnea severity. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 110, n. 5, p. 605-610, Nov. 2010.

CHUNG, S. et al. Endothelial dysfunction and inflammatory reactions of elderly and middle-aged men with obstructive sleep apnea syndrome. **Sleep Breath.**, v. 13, n. 1, p. 11-17, Mar. 2009.

CLAPHAM, D. E. Calcium signaling. **Cell**, v. 80, n. 2, p. 259-268, Jan. 1995.

CLARKE, P. G. H. The limits of brain determinacy. **Proc. Biol. Sci.**, v. 279, n. 1734, p. 1665-1674, May 2012.

COLAS, J-F.; SCHOENWOLFF, G. C. Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. **Dev. Dyn.**, v. 221, n. 2, p. 117-145, Jun. 2001.

DA SILVA, L. G. et al. Serum S100B but not NSE levels are increased in morbidly obese individuals affected by obstructive sleep apnea–hypopnea syndrome. **Obesity Surgery**, v. 18, n. 8, p. 993-999, Aug. 2008.

DE BOUSSARD, C. N. et al. S100 and cognitive impairment after mild traumatic brain injury. **J. Rehabil. Med.**, v. 37, n. 1, p. 53-57, Jan. 2005.

DÉCARY, A.; ROULEAU, I.; MONTPLAISIR, J. Cognitive deficits associated with sleep apnea syndrome: a proposed neuropsychological test battery. **Sleep**, v. 23, n. 3, p. 69-81, May 2000.

DELOULME, J.C. et al. Nuclear expression of S100B in oligodendrocyte progenitor cells correlates with differentiation toward the oligodendroglial lineage and modulates oligodendrocytes maturation. **Mol. Cell. Neurosci.**, v. 27, n. 4, p. 453-465, Dec. 2004.

DEMENT, W. History of sleep physiology and medicine. In: KRYGER, M.H.; ROTH, T.; DEMENT, W. (ed.). **Principles and practice of sleep medicine**. 4. ed. Philadelphia: Elsevier-Saunders, 2005. p. 1-12.

DEMPSEY, J.A. et al. Pathophysiology of sleep apnea. **Physiol. Rev.**, v. 90, n. 1, p. 47-112, Jan. 2010.

DERE, E.; HUSTON, J. P.; DE SOUZA SILVA, M. A. Episodic-like memory in mice: simultaneous assessment of object, place and temporal order memory. **Brain Res. Brain Res. Protoc.**, v. 16, n. 1-3, p. 10-19, Dec. 2005.

DICKELMANN, S.; BORN, J. The memory function of sleep. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 11, n. 2, p. 114-126, Feb. 2010.

DICKENS, C. (at.). **The Posthumous Papers of the Pickwick Club**. London: Chapman & Hall, 1837.

DONATO, R. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1450, n. 3, p. 191-231, Jul. 1999.

DONATO, R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 33, n. 7, p. 637-668, Jul. 2001.

DONATO, R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. **Microsc. Res. Tech.**, v. 60, n. 6, p. 540-551, Apr. 2003.

DONATO, R et al. RAGE: a single receptor for several ligands and different cellular responses. The case of certain S100 proteins. **Curr. Mol. Med.**, v. 7, n. 8, p. 711-724, Dec. 2007.

DONATO, R. et al. S100B's double life: Intracellular regulator and extracellular signal. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1793, n. 6, p. 1008-1022, Jun. 2009.

DOS SANTOS, J. M. Abordagem do doente com patologia do sono. **Rev. Port. Clin. Geral**, v. 22, p. 599-610, 2006.

DURÁN, J. et al. Obstructive sleep apnea-hypopnea and related clinical features in a population-based sample of subjects aged 30 to 70 yr. **Am. J. Respir. Crit. Care. Med.**, v. 163, n. 3 Pt. 1, Mar. 2001.

EICHLING, P. S.; SAHNI, J. Menopause related sleep disorders. **J. Clin. Sleep Med.**, v. 1, n. 3, p. 291-300, Jul. 2005.

EL-FALOUGY, H.; KUBIKOVA, E.; BENUSKA, J. The microscopical structure of the hippocampus in the rat. **Bratisl. Lek. Listy**, v. 109, n. 3, p. 160-110, 2008.

FAGAN, K. A. Selected Contribution: Pulmonary hypertension in mice following intermittent hypoxia. **J. Appl. Physiol.**, v. 90, n. 6, p. 2502-2507, Jun. 2001.

FARIOLI-VECCHIOLI, S. et al. The timing of differentiation of adult hippocampal neurons is crucial for spatial memory. **PLoS Biol.**, v. 6, n. 10, e246, Oct. 2008.

FERNANDEZ-FERNANDEZ, M.R. et al. Proteins of the S100 family regulate the oligomerization of p53 tumor suppressor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 102, n. 13, p. 4735-4740, Mar. 2005.

FERRIER, K. et al. Sleep-disordered breathing occurs frequently in stable outpatients with congestive heart failure. **Chest**, v. 128, n. 4, p. 2116-2122, Oct. 2005.

FIORI, C. Z. Examinando os mecanismos de perda de peso em modelo animal de apneia do sono. Porto Alegre: UFRGS, 2011. 84 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

FLEMONS, W. W. Obstructive sleep apnea. **N. Engl. J. Med.**, v. 347, n. 7, p. 498-504, Aug. 2002.

FLETCHER, E.C. Sympathetic over activity in the etiology of hypertension of obstructive sleep apnea. **Sleep**, v. 26, n. 1, p. 15-19, Feb. 2003.

FOERCH, C. et al. Elevated serum S100B levels indicate a higher risk of hemorrhagic transformation after thrombolytic therapy in acute stroke. **Stroke**, v. 38, n. 9, p. 2491-2495, Sep. 2007.

FOTOS, J.; OLSON, R.; KANEKAR, S. Embryology of the brain and molecular genetics of central nervous system malformation. **Semin. Ultrasound CT MR**, v. 32, n. 3, p. 159-166, Jun. 2011.

GALE, S. D.; HOPKINS, R. O. Effects of hypoxia on the brain: neuroimaging and neuropsychological findings following carbon monoxide poisoning and obstructive sleep apnea. **J. Int. Neuropsychol. Soc.**, v. 10, n. 1, p. 60-71, Jan. 2004.

GARCIA-SEGURA, L. M.; MCCARTHY, M. M. Minireview: role of glial in neuroendocrine function. **Endocrinology**, v. 145, n. 3, p. 1082-1086, Mar. 2004.

GASTAUT, H.; TASSINARI, C.A.; DURON, B. Polygraphic study of the episodic diurnal and nocturnal (hypnic and respiratory) manifestations of the Pickwick syndrome. **Brain Res.**, v. 1, n. 2, p. 167-186, Feb. 1966.

GASTAUT, H. et al. Mechanism of the respiratory pauses accompanying slumber in the Pickwickian syndrome. **Act. Nerv. Super. (Praha)**, v. 11, n. 3, p. 2095, 1969.

GEGELASHVILI, G.; DANBOLT, N. C.; SCHOUSBOE, A. Neuronal soluble factors differentially regulate the expression of the GLT1 and GLAST glutamate transporters in cultured astroglia. **J Neurochem.**, v. 69, n. 6, p. 2612-2615, Dec. 1997.

GENTA, P.R. et al. Ethnicity as a risk factor for obstructive sleep apnea: comparison of Japanese descendants and white males in São Paulo, Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 41, n. 8, p. 728-733, Aug. 2008.

GERLACH, R. et al. Active secretion of S100B from astrocytes during metabolic stress. **Neurosci.**, v. 141, n. 4, p. 1697-1701, Sep. 2006.

GILBERT, S. F. **Developmental biology**. 6. ed. Sunderland: Sinauer, 2000.

GILES, T. L. et al. Continuous positive airways pressure for obstructive sleep apnoea in adults. **Cochrane Database Syst. Rev.**, v. 19, n. 3, p. CD001106, Jul. 2006.

GOLDBART, A. et al. Intermittent hypoxic exposure during light phase induces changes in cAMP response element binding protein activity in the rat CA1 hippocampal region: water maze performance correlates. **Neuroscience**, v. 122, n. 3, p. 585-590, 2003a.

GOLDBART, A. et al. Intermittent hypoxia induces time-dependent changes in the protein kinase B signaling pathway in the hippocampal CA1 region of the rat. **Neurobiol. Dis.**, v. 14, n. 3, p. 440-446, Dec. 2003b.

GOMES, F. C.; PAULIN, D.; MOURA NETO, V. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 32, n. 5, p. 619-631, May 1999.

GOZAL, D.; DANIEL, J. M.; DOHAICH, G. P. Behavioral and anatomical correlates of chronic episodic hypoxia during sleep in the rat. **J. Neurosci.**, v. 21, n. 7, p. 2442-2450, Apr. 2001.

GRIFFIN, S.W.T. et al. Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a "cytokine cycle" in disease progression. **Brain Pathol.**, v. 8, n. 1, p. 65-72, Jan. 1998.

GREENBERG, H. E. et al. Chronic intermittent hypoxia increases sympathetic responsiveness to hypoxia and hypercapnia. **J. Appl. Physiol.**, v. 86, n. 1, p. 298-305, Jan. 1999.

GROVE, E. A.; TOLE, S. Patterning events and specification signals in the developing hippocampus. **Cereb. Cortex**, v. 9, n. 6, p. 551-561, 1999.

GUILLEMINAULT, C.; ELDRIDGE, F.L.; DEMENT, W.C. Insomnia with sleep apnea: a new syndrome. **Science**, v. 181, n. 102, p.856-858, Aug. 1973.

GUILLEMINAULT, C.; TILKIAN, A.; DEMENT, W.C. The sleep apnea syndrome. **Ann. Rev. Med.**, v. 27, p. 465-484, 1976.

GUILLEMINAULT, C.; KIRISOGLU, C.; OHAYON, M.M. C-reactive protein and sleep-disordered breathing. **Sleep**, v. 27, n. 8, p. 1507-1511, Dec. 2004.

HACHEM, S. et al. Spatial and temporal expression of S100B in cells of oligodendrocyte lineage. **Glia**, v. 51, n. 2, p. 81-97, Aug. 2005.

HACHUL, H. et al. Effects of hormone therapy with estrogen and/or progesterone on sleep pattern in postmenopausal women. **Int. J. Gynaecol. Obstet.**, v. 103, n. 3, p. 207-212, Dec. 2008.

HAINES, D. E. (ed.). **Fundamental neuroscience**. 2. ed. Philadelphia: Churchill-Livingstone, 2002.

HALASSA, M.M. et al. Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. **J. Neurosci.**, v. 27, n. 24, p. 6473-6477, Jun. 2007.

HATTEN, M. E.; HEINTS, N. Neurogenesis and migration. In: ZIGMOND, M. J. et al. (ed.). **Fundamental Neuroscience**. Academic Press. 1999. p. 451-479.

HAUW, J. J. et al. Neuropathology of sleep disorders: a review. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 70, n. 4, p. 243-252, Apr. 2011.

HE, J. et al. Mortality and apnea index in obstructive sleep apnea. Experience in 385 male patients. **Chest**, v. 94, n. 1, p. 9-14, Jul. 1988.

HINOJOSA-LABORDE, C.; MIFFLIN, S. W. Sex differences in blood pressure respond to intermittent hypoxia in rats. **Hypertension**, v. 46, n. 4, p. 1016-1021, Oct. 2005.

HIRABAYACHI, Y.; GOTOH, Y. Epigenetic control of neural precursor cell fate during development. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 11, n. 6, p. 377-388, Jun. 2010.

HLA, K, M. et al. Electrocardiographically indicated cardiovascular disease in sleep-disordered breathing. **Sleep Breath.**, v. 12, n. 3, p. 251-258, Aug. 2008.

- HOBSON, J. A.; PACE-SCOTT, E. F. The cognitive neuroscience of sleep: neuronal systems, consciousness and learning. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 3, p. 679-693, Sep. 2002.
- HOF, P. R. et al. The cellular components of nervous tissue. In. ZIGMOND, M.J. ET AL. (ed.). **Fundamental Neuroscience**. Academic Press. 1999, p. 41-70.
- HOLTY, J. C.; GUILLEMINAULT, C. Surgical options for the treatment of obstructive sleep apnea. **Med. Clin. North Am.**, v. 94, n. 3, p. 479-515, May 2010.
- HORA, F. et al. Clinical, anthropometric and upper airway anatomic characteristics of obese patients with obstructive sleep apnea syndrome. **Respiration**, v. 74, n. 5, p. 517-524, Dec. 2007.
- HOVORITZ, S. G. et al. Decoupling of the brain's default mode network during deep sleep. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 106, n. 27, p. 11376-11381, Jul. 2009.
- HU, F. B. et al. Snoring and risk of cardiovascular disease in women. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 35, n. 2, p. 308-313, Feb. 2000.
- HUTTUNEN, H. J. et al. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphoterin and S100 proteins through RAGE activation. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 51, p. 14998-15004, Dec. 2000.
- IBER, C. et al. **The AASM manual for the scoring of sleep and associated events: rules, terminology and technical specifications**. Westchester: American Academy of Sleep Medicine, 2007.
- ISOBE, T.; OKUYAMA, T. The amino-acid sequence of the alpha subunit in bovine brain S-100a protein. **Eur. J. Biochem.**, v. 116, n. 1, p. 79-86, May 1981.
- JORDAN, A.S.; MCEVORY, R.D. Gender differences in sleep apnea: epidemiology, clinical presentation and pathogenic mechanisms. **Sleep Med. Rev.**, v. 7, n. 5, p. 377-389, Oct. 2003.
- KANAGY, N. L.; WALKER, B. R.; NELIN, L. D. Role of endothelin in intermittent hypoxia-induced hypertension. **Hypertension**, v. 37, n. 2 Part. 2), Feb. 2001.
- KANEKAR, S.; SHIVELY, A.; HEATHER-KANEDA, D. O. Malformations of ventral Induction. **Semin. Ultrasound CT MR**, v. 32, n. 3, p. 200-210, Jun. 2011.
- KAWAGUCHI, Y. et al. Different impacts of neck circumference and visceral obesity on the severity of obstructive sleep apnea syndrome. **Obesity (Silver Spring)**, v. 19, n. 2, p. 276-282, Feb. 2011.
- KIM, J. et al. Prevalence of sleep-disordered breathing in middle-aged Korean men and women. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 170, n. 10, p. 1108-1113, Nov. 2004.

KIRKNESS, J.P. et al. Contribution of male sex, age, and obesity to mechanical instability of the upper airway during sleep. **J. Appl Physiol.**, v. 104, n. 6, p. 1618-1624, Jun. 2008.

KLAUSBERGER, T.; SOMOGYI, P. Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. **Science**, v. 321, n. 5885, p. 53-57, Jul. 2008.

KLEIN, C. et al. Carbonyl groups: bridging the gap between sleep disordered breathing and coronary artery disease. **Free Radic Res.**, v. 44, n. 8, p. 907-912, Aug. 2010.

KLIGMAN, D.; MARSHK, D. R. Purification and characterization of a neurite extension factor from bovine brain. **Proc. Nat. Scand. Sci. (USA)**, v. 82, n. 20, p. 7136-7139, Oct. 1985.

KOCH, M. et al. Plasma S100beta and NSE levels and progression in multiple sclerosis. **J. Neurol. Sci.**, v. 252, n. 2, p. 154-158, Jan. 2007.

KOGANEZAWA, N. et al. Significance of the deep layers of entorhinal cortex for transfer of both perirhinal and amygdala inputs to the hippocampus. **Neurosci. Res.**, v. 61, n. 2, p.172-181, Jun. 2008.

KOTTERBA, S. et al. Neuropsychological investigations and event-related potentials in obstructive sleep apnea syndrome before CPAP-therapy. **J. Neurol. Sci.**, v. 159, n. 1, p. 45-50, 1998.

KRISHNAN, V.; COLLOP, N.A. Gender differences in sleep disorders. **Curr. Opin. Pulm. Med.**, v. 12, n. 6, p. 383-389, Nov. 2006.

KRYGER, M. H.; ROTH, T.; DEMENT, W. C. **Principles and practice of sleep medicine**. 5. ed. Philadelphia: Elsevier-Saunders, 2011.

KUMAR, R. (ed.). **Textbook of human embryology**. New Delhi: I. K. International Publishing House, 2008.

LAMING, P. R. et al. Neuronal-glia interactions and behavior. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 24, n. 3, p. 295-340, May 2000.

LANDAR, A. et al. Identification of S100A1/S100B target protein: phosphoglucomutase. **Cell. Calcium**, v. 20, n. 3, p. 279-285, Sep. 1996.

LANGSTON, R. F. et al. The role of hippocampal subregions in memory for stimulus associations. **Behav. Brain Res.**, v. 215, n. 2, p. 275-291, Dec. 2010.

LARSEN, W. J. et al (Org.). **Human embryology**. 3. ed. New York: Churchill Livingstone, 2001.

LAVIE, L. Obstructive sleep apnoea syndrome--an oxidative stress disorder. **Sleep Med. Rev.**, v. 7, n. 1, p. 35-51, Feb. 2003.

- LAVIE, L.; VISHNEVSKY, A.; LAVIE, P. Evidence for lipid peroxidation in obstructive sleep apnea. **Sleep**, v. 27, n. 1, p. 123-128, Feb. 2004.
- LAVIE, L.; LAVIE, P. Molecular mechanisms of cardiovascular disease in OSAHS: the oxidative stress link. **Eur. Respir. J.**, v. 33, n. 6, p. 1467-1484, Jun. 2009.
- LAVIGNE, G. Physiology in sleep. In: KRYGER, M. H.; ROTH, T.; DEMENT, W. C. (ed.). **Principles and practice of sleep medicine**. 5. ed. Philadelphia: Elsevier-Saunders, 2011. p. 199-359
- LEE, R.W. et al. Differences in craniofacial structures and obesity in Caucasian and Chinese patients with obstructive sleep apnea. **Sleep**, v. 33, n. 8, p. 1075-1080, Aug. 2010a.
- LEE, R.W. Relationship between surface facial dimensions and upper airway structures in obstructive sleep apnea. **Sleep**, v. 33, n. 9, p. 1249-1254, Sep. 2010b.
- LEITE, M. C. et al. Ammonia-induced alternation in S100B secretion in astrocytes is not reverted by creatine addition. **Brain Res. Bull.**, v. 70, n. 2, p. 179-185, Jun. 2006.
- LEWIT-BENTLEY, A.; RÉTY, S. EF-hand calcium-binding proteins. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 10, n. 6, p. 637-643, Dec. 2000.
- LI, Y. K. et al. S100B increases levels of b-amyloid precursor protein and its encoding mRNA in rat neuronal cultures. **J. Neurochem.**, v. 71, n.1421-1428, Oct. 1998.
- LICHTMAN, J. W. et al. Synapse formation and elimination. In: ZIGMOND, M. J. et al (ed.). **Fundamental Neuroscience**. Academic Press, 1999. P. 547-580.
- LIGALI, P. S.; CORCORAN, C. P.; PICKETTS, D. J. Hippocampus development and function: role of epigenetic factors and implications for cognitive disease. **Clin. Genet.**, v. 78, n. 4, p. 321-333, Oct. 2010.
- LONG, J. M. et al. Stereological analysis of astrocytes and microglia in aging mouse hippocampus. **Neurobiol. Aging**, v. 19, p. 497-503, Sep-Oct.1998.
- LOPES DA SILVA, F. H.; ARNOLDS, D. E. Physiology of the hippocampus and related structures. **Ann. Rev. Physiol.**, v. 40, p. 185-216, 1978.
- LOPES DA SILVA, F. H. et al. Anatomic organization and physiology of the limbic cortex. **Physiol. Rev.**, v. 70, n. 2, p. 453-511, Apr. 1990.
- LORENTE DE NÓ, R. Studies on the structure of the cerebral cortex. II Continuation on the study of the ammonic system. **Journal fur Psychologie und Neurologie**, v. 46, p. 113-117, 1934.
- LU, B.S.; ZEE, P.C. Circadian rhythm sleep disorders. **Chest**, v. 130, n. 6, p. 1915-1925, Dec. 2006.

- LUGARESI, E. et al. Effect of tracheotomy in hypersomnia with periodic respiration. **Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.**, v. 30, n. 4, p.373-374, Apr. 1971.
- LUGARESI, E. et al. Hypersomnia with periodic breathing: periodic apneas and alveolar hypoventilation during sleep. **Bull. Physiopathol. Respir. (Nancy)**, v. 8, n. 5, p. 1103-1113, Sep-Oct. 1972.
- LYNCH, M. A. Long-term potentiation and memory. **Physiol. Rev.**, v. 84, n. 1, p. 87-136, Jan. 2004.
- MACEY, P. M. et al. Brain morphology associated with obstructive sleep apnea. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 166, p. 1382-1387, 2002.
- MAGUIRE, E. A. et al. Navigation-related structural changes in the hippocampi of taxi drivers. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 4398-4403, 2000.
- MALHOTRA, A.; WHITE, D.P. Obstructive sleep apnoea. **Lancet**, v. 360, n. 9328, p. 237-245, Jul. 2002a.
- MALHOTRA, A. et al. The male predisposition to pharyngeal collapse: importance of airways length. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 166, n. 10, p. 1388-1395, Nov. 2002b.
- MARCOWITZ, J. et al. Design of inhibitors of S100B. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 5, n. 12, p. 1093-1108, 2005.
- MARTINEZ, D. Effects of aging on peripheral chemoreceptor CO₂ response during sleep and wakefulness in healthy men. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 162, n. 2, p. 138-143, Jul. 2008.
- MARTINEZ, D.; LUMERTZ, M. S.; LENZ, M. C. Dimensions of sleepiness and their correlations with sleep-disordered breathing in mild sleep apnea. **J. Bras. Pneumol.**, v. 35, n. 6, p. 507-514, Jun. 2009.
- MARTINEZ, D. et al. Brown adipose tissue: is it affected by intermittent hypoxia? **Lipids in Health and Disease**, v. 9, n. 1, p. 121-125, Oct. 2010.
- MARTINEZ, F. G. et al. Gonadal hormone regulation of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the medial amygdala subnuclei across the estrous cycle and in castrated and treated female rats. **Brain Res.**, v. 1108, n. 1, p. 117-126, Sep. 2006.
- MARTINHO, F. L. et al. Systematic head and neck physical examination as a predictor of obstructive sleep apnea in class III obese patients. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 41, n. 12, p. 1093-1097, Dec. 2008.
- MCGUIRE, M.; BRADFORD, A. Chronic intermittent hypoxia increase haematocrit and causes right ventricular hypertrophy in the rat. **Respir. Physiol.**, v. 117, n. 1, p. 53-58, Sep. 1999.

- MCNICHOLAS, W.T. Obstructive sleep apnea and inflammation. **Prog. Cardiovasc. Dis.**, v. 51, n. 5, p. 329-399, Mar.-Apr. 2009.
- MICHETTI, F. et al. The S100B protein in biological fluids: more than a lifelong biomarker of Brain distress. **J. Neurochem.**, v. 120, n. 5, p. 644-659, Mar. 2012.
- MIGNOT, E. Why we sleep: the temporal organization of recovery. **PLoS Biol.**, v. 6, n. 4, p. e106, Apr. 2008.
- MOORE, B.W. A soluble protein characteristic of the nervous system. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 19, n. 6, p. 739-744, Jun. 1965.
- MOORE, K. The nervous system. In: MOORE, K. (Org.). **The developing human clinically oriented embryology**. 8. ed. Philadelphia: W. B. Saunders-Elsevier, 2008. p. 380-418.
- MORRELL, M. et al. Changes in brain morphology associated with obstructive sleep apnea. **Sleep Med.**, v. 4, n. 5, p. 451-454, Sep. 2003.
- MRAK, R.E.; GRIFFINBC, W.S. The role of activated astrocytes and of the neurotrophic cytokine S100B in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Neurobiol. Aging**, n. 22, n. 6, p. 915-922, Nov.-Dec. 2001.
- MRAK, R.E.; GRIFFIN, W.S. Trisomy 21 and the brain. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 63, n. 7, p. 679-685, Jul. 2004.
- MURABAYASHI, M. et al. Kinetics of serum S100B in newborns with intracranial lesions. **Pediatr. Int.**, v. 50, n. 1, p. 17-22, Feb. 2008.
- NAEGALE, B. et al. Deficits of cognitive executive functions in patients with sleep apnea syndrome. **Sleep**, v. 18, n. 1, p. 43-52, Jan. 1995.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Guide for the care and use of laboratory animals**. Washington D.C.: The National Academy Press, 2011.
- NISHI, M.; KAWATA, M.; AZMITIA, E. C. Trophic interactions between brain-derived neurotrophic factor and S100B on cultured serotonergic neurons. **Brain Res.**, v. 868, n. 1, p. 113-118, Jun. 2000.
- OBERHEIM, N. A. et al. Loss of astrocytic domain organization in the epileptic brain. **J. Neurosci.**, v. 28, n. 13, p. 3264-3276, Mar. 2008.
- OBERHEIM, N. A. et al. Uniquely hominid features of adult human astrocytes. **J. Neurosci.**, v. 29, n. 10, p. 3576-3287, Mar. 2009.
- OGATA, K.; KOSAKA, T. Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus. **Neurosci.**, v. 113, n. 1, p. 221-233, 2002.
- OLIVEN, A. et al. Collapsibility of the relaxed pharynx and risk of sleep apnoea. **Eur. Respir. J.**, v. 32, n. 5, p. 1309-1315, Nov. 2008.

ONAT, A. et al. Neck circumference as a measure of central obesity: associations with metabolic syndrome and obstructive sleep apnea syndrome beyond waist circumference. **Clin. Nutr.**, v. 28, n. 1, p. 46-51, Feb. 2009.

OSLER, W. (at.). **The principles and practice of medicine**. 6. ed. New York: Appleton, 1905.

PAE, E. K.; CHIEN, P.; HARPER, R. M. Intermittent hypoxia damages cerebellar cortex and deep nuclei. **Neuroscience Letters**, v. 375, n. 2, p. 123-128, Feb. 2005.

PALMER, L. J.; REDLINE, S. Genomic approaches to understanding obstructive sleep apnea. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 135, n. 2-3, p. 187-205, May 2003.

PANOSSIAN, L. A; AVIDAN, A. Y. Review of sleep disorders. **Med. Clin. North Am.**, v. 93, n. 2, p. 407-425, Mar. 2009.

PARISH, J. M. Sleep-related problems in common medical conditions. **Chest**, v. 135, n. 2, p. 653-572, Feb. 2009.

PATT, S. et al. Upregulation of vascular endothelial growth factor in severe chronic brain hypoxia of the rat. **Neurosci. Lett.**, v. 252, n. 3, p. 199-202, Aug. 1998.

PEKER Y. et al. Respiratory disturbance index: an independent predictor of mortality in coronary artery disease. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 162, p. 81-86, 2000.

PEÑA, L. A.; BRECHER, C. W.; MRSHAK, D. R. Amyloid regulates gene expression of glial trophic substance S100B in C6 glioma and primary astrocyte culture. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, v. 34, n. 1, p. 118-126, Dec. 1995.

PEPPARD, P. E. et al. Longitudinal study of moderate weight change and sleep-disordered breathing. **JAMA**, v. 284, p. 3015-3021, 2000.

PERIN, C. Avaliação do sono em pacientes com fibrose cística. Porto Alegre: UFRGS, 2011. 126 p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Pneumológicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

PIAZZA, F. V. et al. Enriched environment prevents memory deficits in type 1 diabetic rats. **Behavioral Brain Research**, v. 217, n. 1, p. 16-20, Feb. 2010.

PINTO, S. S. et al. Immunocontent and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology. **FEBS Lett.**, v. 486, n. 3, p. 203-207, Dec. 2000.

POELMANS, G. et al. Identification of novel dyslexia candidate genes through the analysis of a chromosomal deletion. **Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.**, v. 150B, n. 1, p. 140-147, Jan. 2009.

PONATH, G. et al. Autocrine S100B effects on astrocytes are mediated via RAGE. **J. neuroimmunol.**, v. 184, n. 1-2, p. 214-222, Mar. 2007.

QUINCOZES-SANTOS, A.; GOTTFRIED, C. Resveratrol modulates astroglial functions: neuroprotective hypothesis. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1215, p. 72-78, Jan. 2011.

RAMBOTTI, M.G. et al. S100B and S100A1 proteins in bovine retina: their calcium-dependent stimulation of a membrane-bound guanylate cyclase activity as investigated by ultracytochemistry. **Neuroscience**, v. 92, n. 3, p. 1089-1101, 1999.

RAMÓN Y CAJAL, S. **Textura del Sistema Nervioso del Hombre y de los Vertebrados**. Madrid: Moya, 1904.

RAO, M.N. et al. Association between sleep architecture and measures of body composition. **Sleep**, v. 32, n. 4, p. 483-490, Apr. 2009.

RAUVALA, H.; ROUHIAINEN, A. Physiological and pathophysiological outcomes of the interactions of HMGB1 with cell surface receptors. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1799, n. 1-2, p. 164-170, Jan.-Feb. 2010.

REALI, C. et al. S100B counteracts effects of the neurotoxicant trimethylin on astrocytes and microglia. **J. Neurosci. Res.**, v. 81, n. 5, p. 677-686, Sep. 2005.

REVSIN, Y. et al. Neuronal and astroglial alterations in the hippocampus of a mouse model for type 1 diabetes. **Brain Res.**, v. 1038, n. 1, p. 22-31, Mar. 2005.

RIHA, R.L. Regional fat distribution and sleep apnea: sex makes a difference. **Sleep**, v. 33, n. 4, p.419-420, Apr. 2010.

RISOLD, P. Y.; SWANSON, L. W. Structural evidence for functional domains in the rat hippocampus. **Science**, v. 272, n. 5267, p.1484-1486, Jun. 1996.

RIUZZI, F.; SORCI, G.; DONATO, R. The amphoterin (HMGB1)/receptor for advanced glycation end products (RAGE) pair modulates myoblast proliferation, apoptosis, adhesiveness, migration, and invasiveness. Functional inactivation of RAGE in L6 myoblast results in tumor formation in vivo. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 12, p. 8242-8253, Mar. 2006.

RODENSTEIN, D. Sleep apnea: traffic and occupational accidents--individual risks, socioeconomic and legal implications. **Respiration**, v. 78, n. 3, p. 241-248, May 2009.

ROSSATO, J. I. et al. On the role of hippocampal proteins synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Learn. Mem.**, v. 14, n. 1, p. 36-46, Jan.-Feb. 2007.

ROTH, T.; ROEHRS, T. Sleep organization and regulation. **Neurology**, v. 54, n. 5, suppl. 1, p. S2-S7, 2000.

- ROW, B. W. et al. Intermittent hypoxia is associated with oxidative stress and spatial learning deficits in the rat. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 167, n. 11, p. 1548-1553, Jun. 2003.
- RUSTANDI, R. R.; BALDISSERI, D. M.; WEBER, D. J. Structure of the negative regulatory domain of p53 bound to S100B (betabeta). **Nat. Struct. Biol.**, v. 7, n. 7, p. 570-574, Jul. 2000.
- RYAN, C. M.; BRADLEY, T. D. Pathogenesis of obstructive sleep apnea. **J. Appl. Physiol.**, v. 99, n. 6, p. 2440-2450, Dec. 2005a.
- RYAN, S.; TAYLOR, C. T.; MCNICHOLAS, W. T. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. **Circulation**, v. 112, n. 17, p. 2660-2667, Oct. 2005b.
- RYAN, S.; TAYLOR, C. T.; MCNICHOLAS, W. T. Systemic inflammation: a key factor in the pathogenesis of cardiovascular complications in obstructive sleep apnoea syndrome? **Postgrad. Med. J.**, v. 85, n. 1010, p. 693-698, Dec. 2009.
- SARNAT, H. B. Molecular genetic classification of central nervous system malformations. **J. Child Neurol.**, v. 15, n. 10, p. 675-879, Oct. 2000.
- SAVCHENKO, V. L. et al. Microglia and astrocytes in the adult rat brain: comparative immunocytochemical analysis demonstrates the efficacy of lipocortin 1 immunoreactivity. **Neurosci.**, v. 96, n. 1, p. 195-203, 2000.
- SCHARF, S.M. et al. Racial differences in clinical presentation of patients with sleep-disordered breathing. **Sleep Breath.**, v. 8, n. 4, p. 173-183, Dec. 2004.
- SCHENATTO, C. B. et al. Raised serum S100B protein levels in neuropsychiatric lupus. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 65, n. 6, p. 829-831, Jun. 2006.
- SCHNEIDER, H. et al. Neural and local effects of hypoxia on cardiovascular responses to obstructive apnea. **J. Appl. Physiol.**, v. 88, n. 3, p. 1093-1102, Mar. 2000.
- SCHULPIS, K. H. et al. The effect of alpha-tocopherol supplementation of training-induced elevation of S100B protein in sera of basketball players. **Clin. Biochem.**, v. 40, n. 12, p. 900-906, Aug. 2007.
- SEDAGHAT, F.; NOTOPOULOS, A. S100 protein family and its application in clinical practice. **Hippokratia**, v. 12, n. 4, p. 198-204, 2008.
- SEIDELL, J. C. Waist circumference and waist/hip ratio in relation to all-cause mortality, cancer and sleep apnea. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 64, n. 1, p. 35-41, Jan. 2010.
- SELINFREUD, R. H. et al. Neurotrophic protein S100 beta stimulates glial cell proliferation. **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**, v. 88, n. 9, p. 3554-3558, May 1991.

SEN, J.; BELLI, A. S100B in neuropathologic states: the CRP of the brain? **J. Neurosci. Res.**, v. 85, n. 7, p. 1373-1380, May. 2007.

SHAHAR, E. et al. Hormone replacement therapy and sleep-disordered breathing. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 167, n. 9, p. 1186-1192, May 2003.

SHAO, Y.; MACCARTHY, K. D. Plasticity of astrocytes. **Glia**, v. 11, n. 2, p. 147-155, Jun. 1994.

SHARMA, S.; RAKOCZY, S.; BROWN-BORG, H. Assessment of spatial memory in mice. **Life Sci.**, v. 87, n. 17-18, p. 521-536, Oct. 2010.

SHASHOUA, V. E.; HESSE, G. W.; MOORE, B. W. Proteins of the brain extracellular fluid: evidence for release of S100 protein. **J. Neurochem.**, v. 42, n. 6, p. 1536-1541, Jun. 1984.

SHEU, F. S. et al. Glial-derived S100b protein selectively inhibits recombinant beta protein kinase C (PKC) phosphorylation of neuron-specific protein F1/GAP-43. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, v. 21, n. 1-2, p. 62-66, Jan. 1994.

SIEGEL, J.M. The REM sleep-memory consolidation hypothesis. **Science**, v. 294, n. 5544, p. 1058-1063, Nov. 2001.

SIEGEL, J. M. The neurobiology of sleep. **Semin. Neurol.**, v. 29, n. 4, p. 277-296, Sep. 2009.

SIEGEL, J. M. Sleep in animals: a state of adaptive inactivity. KRYGER, M. H.; ROTH, T.; DEMENT, W. C. (ed.). **Principles and practice of sleep medicine**. 5. ed. Philadelphia: Elsevier-Saunders, 2011. p. 126-138.

SIMPSON, L. et al. Sex differences in the association of regional fat distribution with the severity of obstructive sleep apnea. **Sleep**, v. 33, n. 4, p. 467-474, Apr. 2010.

SKENE, J. H. P.; VIRAG, I. Posttranslational membrane attachment and dynamic fatty acylation of a neural growth cone protein, GAP-43. **J. Cell Biol.**, v. 108, n. 2, p. 613-624, Feb. 1989.

SOFRONIEW, M. V., VINTERS, H. V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathol.**, v. 119, p. 7-35, 2010.

SORCI, G. et al. Association of S100B with intermediate filaments and microtubules in glial cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1448, n. 2, p. 277-289, Dec. 1998.

SORCI, G. et al. Replicating myoblasts and fused myotubes express the calcium-regulated proteins S100A1 and S100B. **Cell Calcium**, v. 25, n. 2, p. 93-109, Feb. 1999.

SORCI, G. et al. The many faces of S100B protein: when an extracellular factor inactivates its own receptor and activates another one. **Ital. J. Anat. Embryol.**, v. 115, n. 1-2, p. 147-151, 2010.

SORIANO-CO, M. et al. Increased central adiposity in morbidly obese patients with obstructive sleep apnea. **Intern Med. J.**, v. 41, n. 7, p. 560-566, Jul. 2011.

STANIMIROVIC, D. B. et al. Developmental regulation of glutamate transporters and glutamine synthetase activity in astrocyte cultures differentiated in vitro. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v. 17, n. 3, p. 173-184, Jun. 1999.

STEIROPOULOS, P. et al. Inflammatory markers in middle-aged obese subjects: does obstructive sleep apnea syndrome play a role? **Mediators Inflamm.**, v. 2010, p. 675320, 2010.

STUART, A. et al. Fetal electrocardiographic monitoring during labor in relation to cord blood levels of the brain-injury marker protein S100. **J. Perinat. Med.**, v. 36, n. 2, p. 136-141, 2008.

SWANSON, L. M. et al. Sleep disorders and work performance: finding from the 2008 National Sleep Foundation Sleep in American poll. **J. Sleep Res.**, v. 20, n. 3, p. 487-494, Sep. 2011.

SWANSON, L. W.; WYSS, J. M.; COWAN, W. M. An autoradiographic study of the organization of intrahippocampal association pathways in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 181, n. 4, p. 681-715, Oct. 1978.

TAHAWI, Z. et al. Altered vascular reactivity in arterioles of chronic intermittent hypoxic rats. **J. Appl. Physiol.**, v. 90, n. 5, p. 2007-2013, May 2001.

TISHLER, P.V. et al. Incidence of sleep-disordered breathing in an urban adult population: the relative importance of risk factors in the development of sleep-disordered breathing. **JAMA**, v. 289, n. 17, p. 2230-2237, May 2003.

TIU, S. C. et al. Differential expression of S100B and S100A6(1) in the human fetal and aged cerebral cortex. **Brain Res.Dev. Brain Res.**, v. 119, n. 2, p. 159-168, Feb. 2000.

THEODOSIS, D. T.; POULAIN, D. A.; OLIET, S. H. Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. **Physiol. Rev.**, v. 88, n. 3, p. 983-1008, Jul. 2008.

THOMAS, R. J. et al. Prevalent hypertension and stroke in the Sleep Heart Health Study: association with an ECG-derived spectrographic marker of cardiopulmonary coupling. **Sleep**, v. 32, n. 7, p. 897-904, Jul. 2009.

THORNTON, J. D. et al. Assessing the prioritization of primary care referrals for polysomnograms. **Sleep**, v. 33, n. 9, p. 1255-1260, Sep. 2010.

TOBLER, I. Phylogeny of sleep regulation. In: KRYGER, M.H.; ROTH, T.; DEMENT, W.C. (ed.). **Principles and practice of sleep medicine**. 5. ed. Philadelphia: Elsevier-Saunders, 2011. p. 112-125.

TOGEIRO, S.M. et al. Evaluation of the upper airway in obstructive sleep apnoea. **Indian J. Med. Res.**, v. 131, p. 230-235, Feb. 2010.

TRAMONTINA, F. et al. Glutamate uptake is stimulated by extracellular S100B in hippocampal astrocytes. *Cell Mol. Neurobiol.*, v. 26, n. 1, p. 81-86, Feb. 2006.

TREGGAR, S. et al. Obstructive sleep apnea and risk of motor vehicle crash: systematic review and meta-analysis. **J. Clin. Sleep Med.**, v. 5, n. 6, p. 573-581, Dec. 2009.

TREUTING, P. M; DINTZIS, S. M. (ed.). **Comparative anatomy and histology: a mouse and human atlas**. 1 ed. London: Academic Press-Elsevier, 2012.

TUBARO, C. et al. S100B protein in myoblasts modulates myogenic differentiation via NF-kappaB-dependent inhibition of MyoD expression. **J. Cell Physiol.**, v. 223, n. 1, p. 270-282, Apr. 2010.

TUFIK, S. et al. Obstructive sleep apnea syndrome in the Sao Paulo Epidemiologic Sleep Study. **Sleep Med.**, v. 11, n. 5, p. 441-446, May 2010.

ULUALP, S. O. Snoring and obstructive sleep apnea. **Med. Clin. North Am.**, v. 94, n. 5, p. 1047-1055, Sep. 2010.

VAN CAUTER, E.; TASALI, E. Endocrine physiology in relation to sleep and sleep disturbances. In: KRYGER, M. H.; ROTH, T.; DEMENT, W. C. (ed.). **Principles and practice of sleep medicine**. 5. ed. Philadelphia: Elsevier-Saunders, 2011. p. 291-311.

VAN ELDIK, L. J.; ZIMMER, D. B. Secretion of S100 from rat C6 glioma cells. **Brain Res.**, v. 436, n. 2, p. 367-370, Dec. 1987.

VAN ELDIK, L. J. et al. Neurotrophic activity of S100B in culture dorsal root ganglia from embryonic chick and fetal rat. **Brain Res.**, v. 524, n. 2, p. 280-285, Mar. 1991.

VAN ELDIK, L.J.; WAINWRIGHT, M.S. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. **Restor. Neurol. Neurosci.**, v. 21, n. 3-4, p. 97-108, 2003.

VAN STRIEN, N. M.; CAPPAERT, N. L.; WITTER, M. P. The anatomy of the memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 10, n. 4, p. 272-282, Apr. 2009.

VASSALLI, A.; DIJK, D.J. Sleep function: current questions and new approaches. **Eur. J. Neurosci.**, v. 29, n. 9, p. 1830-1841, May 2009.

VEASEY, S. C. et al. Long-term intermittent hypoxia in mice: protracted hypersomnolence with oxidative injury to sleep-wake brain regions. **Sleep**, v. 27, n. 2, p. 194-201, Mar. 2004.

- VENNELLE, M.; ENGLEMAN, H. M.; DOUGLAS, N. J. Sleepiness and sleep-related accidents in commercial bus drivers. **Sleep Breath.**, v. 14, n. 1, p. 39-42, Feb. 2010.
- VGONTZAS, A. N.; BIXTER, E. O.; CHROUSOS, G. P. Sleep apnea is a manifestation of metabolic syndrome. **Sleep Med. Rev.**, v. 9, n. 3, p. 211-224, Jun. 2005.
- VILLANEUVA, A.T. et al. Ethnicity and obstructive sleep apnoea. **Sleep Med. Rev.**, v. 9, n. 6, p. 419-436, Dec. 2005.
- VIVES, V. et al. Visualization of S100B-positive neurons and glia in the central nervous system of EGFP transgenic mice. **J. Comp. Neurol.**, v. 457, n. 4, p. 404-419, Mar. 2003.
- VOLTERRA, A.; MELDOLESSI, J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 6, n. 8, p. 626-640, Aug. 2005.
- VON SCHOULTZ, E. et al. Prognostic value of serum analysis of S100B protein in malignant melanoma. **Melanoma Res.**, v. 6, n. 2, p. 133-137, Apr. 1996.
- WANG, H. et al. Influence of obstructive sleep apnea on mortality in patients with heart failure. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 49, p. 1625-1631, 2007.
- WEHRLE, R. et al. Functional microstates within human REM sleep: first evidence from fMRI of a thalamocortical network specific for phasic REM periods. **Eur. J. Neurosci.**, v. 25, n. 3, p. 863-871, Feb. 2007.
- WHITAKER-AZMITIA, P. M. et al. Transgenic mice overexpressing the neurotrophic factor S100B show neuronal cytoskeletal and behavioral signs of altered aging processes: implications for Alzheimer's disease and Down's syndrome. **Brain Res.**, v. 776, n. 1-2, p. 51-60, Nov. 1997.
- WITTER, M. P. et al. Cortico-hippocampal communication by way of parallel parahippocampal-subicular pathways. **Hippocampus**, v. 10, n. 4, p. 398-410, 2000.
- WOODHAMS, P. L. et al. Morphological and functional correlates of borders in the entorhinal cortex and hippocampus. **Hippocampus**, v. 3, Spec. No, p. 303-311, 1993.
- WRIGHT, J. et al. Health effects of obstructive sleep apnoea and the effectiveness of continuous positive airways pressure: a systematic review of the research evidence. **BMJ**, v. 314, p. 851-860, Mar. 1997.
- XAVIER, L. L. et al. A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the *substantia nigra pars compacta* and in the ventral tegmental area. **Brain Res. Protoc.**, v. 16, n. 1-3, p. 58-64, Dec. 2005.

YANG, X. Y. et al. Expression of S100B protein levels in serum and cerebrospinal fluid with different forms of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. **Clin. Rheumatol.**, v. 27, n. 3, p. 353-357, Mar. 2008.

YOUNG, T. et al. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. **N. Engl. J. Med.**, v. 328, n. 17, p. 123-1235, Apr. 1993.

YOUNG, T. et al. Predictors of sleep-disordered breathing in community-dwelling adults: the Sleep Heart Health Study. **Arch. Intern Med.**, v. 162, n. 8, p. 893-900, Apr. 2002.

YOUNG, T. et al. Menopausal status and sleep-disordered breathing in the Wisconsin Sleep Cohort Study. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 167, n. 9, p. 1181-1185, May 2003.

YOUNG, T.; PEPPARD, P.E.; TAHERI, S. Excess weight and sleep-disordered breathing. **J. Appl Physiol.**, v. 99, n. 4, p. 1592-1599, Oct. 2005.

ZIMMER, D.B. et al. The S100 protein family: history, function, and expression. **Brain Res. Bull.**, v. 37, n. 4, p. 417-429, 1995.

Anexos

Anexo 1 - Escala de Sonolência de Epworth (versão em português do Brasil):

ESCALA DE SONOLÊNCIA DE EPWORTH

Qual possibilidade de você cochilar ou adormecer nas seguintes situações?

Situações	Chance de cochilar - 0 a 3
1. Sentado e lendo	
2. Vendo televisão	
3. Sentado em lugar público sem atividades como sala de espera, cinema, teatro, igreja	
4. Como passageiro de carro, trem ou metro andando por 1 hora sem parar	
5. Deitado para descansar a tarde	
6. Sentado e conversando com alguém	
7. Sentado após uma refeição sem álcool	
8. No carro parado por alguns minutos no durante trânsito	
Total	

0 - nenhuma chance de cochilar

1 - pequena chance de cochilar

2 – moderada chance de cochilar

3 - alta chance de cochilar

Dez ou mais pontos – sonolência excessiva que deve ser investigada

Fonte: Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia (SBPT).

Anexo 2 - Testes de comparação entre as médias de CA1 entre os grupos HI e HIS.

		Teste t para igualdade de médias									
		Teste de Levene para igualdade de variâncias					Teste t para igualdade de médias				
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-caudas)	Diferença média	Diferença erro padrão	Intervalo de confiança de 95% da diferença		
									Superior	Inferior	
CA1 - SO	Com igualdade de variâncias	3,181	0,080	11,177	52	0,000	3,9815	0,3562	4,6963	3,2667	
	Sem igualdade de variâncias			11,177	42,936	0,000	3,9815	0,3562	4,6999	3,2631	
CA1 - SP	Com igualdade de variâncias	0,167	0,684	13,350	52	0,000	2,8519	0,2136	3,2805	2,4232	
	Sem igualdade de variâncias			13,350	51,287	0,000	2,8519	0,2136	3,2807	2,4230	
CA1 - SR	Com igualdade de variâncias	1,649	0,205	10,387	52	0,000	4,6111	0,4439	5,5019	3,7203	
	Sem igualdade de variâncias			10,387	50,481	0,000	4,6111	0,4439	5,5025	3,7197	
CA1 - SLM	Com igualdade de variâncias	0,796	0,376	12,184	52	0,000	5,5370	0,4545	6,4490	4,6251	
	Sem igualdade de variâncias			12,184	51,885	0,000	5,5370	0,4545	6,4490	4,6251	
CA1 - MÉDIA	Com igualdade de variâncias	0,682	0,413	26,895	52	0,000	4,35185	0,16181	4,67654	4,02716	
	Sem igualdade de variâncias			26,895	51,605	0,000	4,35185	0,16181	4,67660	4,02710	

Anexo 3 - Testes de comparação entre as médias de CA3 entre os grupos HI e HIS.

		Teste t para igualdade de médias									
		Teste de Levene para igualdade de variâncias					Teste t para igualdade de médias				
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-caudas)	Diferença média	Diferença de erro padrão	Intervalo de confiança de 95% da diferença		
									Superior	Inferior	
CA3 - SO	Com igualdade de variâncias	22,287	0,000	8,183	52	0,000	3,4444	0,4209	4,2891	2,5998	
	Sem igualdade de variâncias			8,183	30,414	0,000	3,4444	0,4209	4,3036	2,5853	
CA3 - SP	Com igualdade de variâncias	7,888	0,007	3,483	52	0,001	0,5741	0,1648	0,9048	0,2433	
	Sem igualdade de variâncias			3,483	40,332	0,001	0,5741	0,1648	0,9071	0,2410	
CA3 - SL	Com igualdade de variâncias	5,715	0,020	17,659	52	0,000	5,2963	0,2999	5,8981	4,6945	
	Sem igualdade de variâncias			17,659	43,569	0,000	5,2963	0,2999	5,9009	4,6917	
CA3 - SR	Com igualdade de variâncias	34,836	0,000	6,131	52	0,000	2,8704	0,4681	3,8098	1,9310	
	Sem igualdade de variâncias			6,131	34,308	0,000	2,8704	0,4681	3,8214	1,9193	
CA3 - SLIM	Com igualdade de variâncias	24,218	0,000	7,211	52	0,000	3,8889	0,5393	4,9711	2,8067	
	Sem igualdade de variâncias			7,211	36,045	0,000	3,8889	0,5393	4,9826	2,7952	
CA3 - MÉDIA	Com igualdade de variâncias	3,492	0,067	20,866	52	0,000	3,2148	0,1541	3,5240	2,9057	
	Sem igualdade de variâncias			20,866	45,004	0,000	3,2148	0,1541	3,5251	2,9045	

Anexo 4 - Testes de comparação entre as médias de DG e a média total hipocampal entre os grupos HI e HIS.

		Teste t para igualdade de médias									
		Teste de Levene para igualdade de variâncias					Teste t para igualdade de médias				
		F	Sig.	t	df	Sig. (2- caudas)	Diferença média	Diferença de erro padrão	Intervalo de confiança de 95% da diferença		
									Superior	Inferior	
DG - ML	Com igualdade de variâncias	9,001	0,004	4,681	52	0,000	1,5000	0,3205	2,1431	0,8569	
	Sem igualdade de variâncias			4,681	34,430	0,000	1,5000	0,3205	2,1510	0,8490	
DG - GCL	Com igualdade de variâncias	9,673	0,003	0,806	52	0,424	0,2037	0,2528	0,7109	-0,3035	
	Sem igualdade de variâncias			0,806	39,284	0,425	0,2037	0,2528	0,7149	-0,3074	
DG - hilus	Com igualdade de variâncias	17,171	0,000	1,388	52	0,171	1,0370	0,7473	2,5367	-0,4626	
	Sem igualdade de variâncias			1,388	40,728	0,173	1,0370	0,7473	2,5466	-0,4725	
DG - MÉDIA	Com igualdade de variâncias	13,992	0,000	3,138	52	0,003	0,9135	0,2911	1,4977	0,3294	
	Sem igualdade de variâncias			3,138	37,679	0,003	0,9135	0,2911	1,5030	0,3241	
MÉDIA TOTAL HIPOCAMPO	Com igualdade de variâncias	3,513	0,067	23,487	52	0,000	2,8267	0,1203	3,0682	2,5852	
	Sem igualdade de variâncias			23,487	47,654	0,000	2,8267	0,1203	3,0687	2,5847	