

Adriana Lebkuchen

**Estudos metabolômicos na apneia
obstrutiva do sono**

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

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Luciano Ferreira Drager

Coorientadora: Profa. Dra. Karina Helena Morais
Cardozo

São Paulo

2017

Adriana Lebkuchen

**Estudos metabolômicos na apneia
obstrutiva do sono**

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

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Luciano Ferreira Drager

Coorientadora: Profa. Dra. Karina Helena Morais
Cardozo

São Paulo

2017

Agradecimientos

A Deus, por sempre guiar meu caminho, fazendo presente em meu coração durante toda a minha vida e em especial durante o desenvolver desta tese.

Aos meus pais Carlos Eduardo Lebkuchen e Elaine Zarif Lebkuchen por todo o amor, ensinamento, paciência e por estarem ao meu lado me apoiando e incentivando em cada curva da vida e em cada degrau desta jornada.

Ao meu noivo Pedro Guimarães Martins, pela prova de amor dada durante este período, por aprender sobre esta tese comigo apenas para me ouvir, pela paciência e pelo apoio.

A toda a minha família por sempre torcerem por mim, me apoiando e muitas vezes acreditando em mim mais do que eu mesma.

Ao Prof. Dr. Luciano Ferreira Drager pela orientação, por dividir comigo todo o seu conhecimento para que essa tese fosse realizada, por acreditar e confiar em mim, pelos conselhos e ensinamentos ao longo desses anos de trabalho. Muito obrigada!

À Dra. Karina Helena Morais Cardozo, por me oferecer essa oportunidade única de crescimento, por acreditar no meu trabalho e permitir que eu explorasse e aprendesse tanto nas técnicas existentes dentro do Fleury, por compartilhar comigo todo seu conhecimento, pela amizade, paciência, conselhos e carinho que sempre teve desde que a conheci. Não tenho palavras para agradecer!

Ao Grupo Fleury pelo auxílio financeiro disponibilizado, por abrirem as portas do IPD para mim com imenso carinho, fazendo como se eu me sentisse parte da família enquanto eu era colaboradora externa, e pelo carinho que tem comigo até hoje. Agradecimentos especiais ao time CROM, Dra. Alessandra Dellavance, Dr. David do Santos Marco Antônio e Dra. Maria Carolina Pintão. Sem vocês não saberia o que teria sido deste trabalho.

Aos amigos Dr. Valdemir Malechco Carvalho, Jéssica S. Salgueiro, Luciana Godoy Viana e Fabio Matsuo Lima, por toda a ajuda mesmo cheios de trabalho, pela paciência, horas de conversas, desabafos e amizade, por me ensinarem muito e por estarem sempre disponíveis.

À Gabriela Venturini, Kallyandra Padilha e Pamella Malagrino por permitirem o uso do GC-MS², por me ajudarem no processamento dos dados e por todo o apoio dado para que eu realizasse parte desta tese.

Ao Laboratório de genética do InCor por abrirem as portas do laboratório para que eu pudesse processar minhas amostras após a coleta de sangue.

Ao Laboratório do sono do InCor, especialmente ao Dr. Geraldo Lorenzi-Filho e Dr. Franco C. Martins por acolherem todos os pacientes destinados à essa pesquisa, e por todo o carinho que tiveram com os dados e desenvolvimento deste processo.

Aos colegas de trabalho, Lunara S. Freiras, Valéria Hong, Thiago Macedo e Fernanda Bernardes, que contribuíram muito para a realização deste trabalho, sem essa parceria sei que não chegaríamos a metade do que conseguimos juntos!

Ao Dr. Lucas Petri Damiani por todo o trabalho estatístico realizado permitindo as descobertas aqui relatadas.

Ao CNPQ pelo auxílio financeiro de projeto de pesquisa.

E a todas as pessoas, que de alguma forma auxiliaram na conclusão e desenvolver desse trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!

Epígrafe

“(…) Não temas, porque eu sou contigo;
não te assombres, porque eu sou teu
Deus: eu te esforço, e te ajudo, e te
sustendo com a destra da minha justiça.
(…)”

Isaías 41:10

Normalização adotada

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

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

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

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

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Símbolos

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	15
2.1. Objetivos gerais.....	16
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	17
3.1. Seleção de pacientes.....	18
3.2. Polissonografia.....	19
3.3. Avaliação clínica.....	21
3.4. Amostras biológicas.....	22
3.5. Perfil clínico.....	24
3.6. Análises metabólicas.....	26
3.6.1. Reagentes e padrões.....	27
3.6.2. Soluções de padrões.....	28
3.6.3. Controles de qualidade.....	29
3.6.4. Preparo de amostras.....	30
3.6.5. Métodos de aquisição.....	31
3.6.6. Instrumentação.....	34
3.6.7. Processamento dos dados.....	34
3.7. Análise estatística.....	35
4 RESULTADOS.....	38
5 DISCUSSÃO.....	54
6 CONCLUSÃO.....	65
7 ANEXOS.....	67
8 REFERÊNCIAS.....	97

Lista de Abreviaturas

AOS	apneia obstrutiva do sono
AUC	área sob a curva (do inglês “ <i>area under the curve</i> ”)
Cer	ceramidas
CQ	controle de qualidade
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	ensaio de imun absorção enzimática
GC	cromatografia gasosa (do inglês “ <i>gas chromatography</i> ”)
GC-MS	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (do inglês “ <i>gas chromatography coupled to mass spectrometry</i> ”)
HDL	lipoproteína de alta densidade (do inglês “ <i>high density lipoprotein</i> ”)
HIF	fator de indução a hipóxia (do inglês “ <i>hypoxia-inducible factors</i> ”)
IAH	índice de apneia-hipopneia
IC	intervalo de confiança
IL-6	interleucina-6
IMC	índice de massa corpórea
LC	cromatografia líquida (do inglês “ <i>liquid chromatography</i> ”)
LDL	lipoproteína de baixa densidade (do inglês “ <i>low density lipoprotein</i> ”)
LPC	lisofosfatidilcolina
LPE	lisofosfatidiletanolamina
MALDI	ionização/dessorção a laser auxiliada por matriz (do inglês “ <i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i> ”)
MS	espectrometria de massas (do inglês “ <i>mass spectrometry</i> ”)
MS²	espectrometria de massas sequencial

TOF	tempo de voo (do inglês “ <i>time off light</i> ”)
PA	ácido fosfatídico
PAD	pressão arterial diastólica
PAS	pressão arterial sistólica
PC	fosfatidilcolina
PCA	análise de componentes principais (do inglês “ <i>principal component analysis</i> ”)
PCR	proteína C-reativa
PE	fosfatidiletanolamina
PI	fosfatidilinositol
PLA	fosfolipase A
PLS-DA	análise discriminante por regressão dos mínimos quadrados parciais (do inglês “ <i>partial least squares discriminant analysis</i> ”)
PS	fosfatidilserina
PSG	polissonografia
ROC	<i>receiver operating characteristic</i>
SM	esfingomielina
SMase	esfingomielina sintase (do inglês “ <i>sphingomyelin synthase</i> ”)
TSH	hormônio estimulante da tireoide (do inglês “ <i>thyroid-stimulating hormone</i> ”)
TTS	tempo total de sono
VIP	predição de variável de importância (do inglês “ <i>variable importance in projection</i> ”)
VLDL	lipoproteína de densidade muito baixa (do inglês “ <i>very low density lipoprotein</i> ”)

Lista de Figuras

Figura 1 – Esquema representando potenciais vias pelas quais a apneia obstrutiva do sono (AOS) pode aumentar o risco cardiovascular.

Figura 2 – Caracterização das ciências “ômicas” no sistema biológico.

Figura 3 – Fluxograma de análises em metabolômica direcionada e não direcionada.

Figura 4 – Fluxograma mostrando as diversas etapas de um estudo metabolômico.

Figura 5 – Fluxograma de seleção de pacientes.

Figura 6 – Avaliação por análise discriminante por regressão dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA) em 3D do perfil dos controles de qualidade (azul) em conjunto com as amostras dos grupos com apneia obstrutiva do sono (AOS) (verde) e sem AOS (vermelho) adquiridos durante a análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS).

Figura 7 – Gráfico de escores do modelo de análise discriminante por regressão dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA) dos metabólitos significativos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS) do grupo sem AOS (Δ) e com AOS (+).

Figura 8 – Gráfico de escores do modelo de análise discriminante por regressão dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA) mostrando a eficiência da separação das frações de lipídios por cromatografia líquida de um *pool* de amostras de plasma extraído em triplicata. F_n identifica as frações coletadas, onde o n é o número da fração.

Figura 9 – Curvas ROC obtidas após avaliação do NoSAS score (a), com acréscimo dos metabólitos estatisticamente significantes ao NoSA score (b) e com acréscimo dos lipídios estatisticamente significantes ao NoSAS score (c).

Figura 10 – Síntese de moléculas de sinalização lipídica por ativação da enzima fosfolipase A2.

Figura 11 – Proposta teórica de ativação da via do metabolismo de esfingolípido pela apneia obstrutiva do sono (AOS). Em destaque as moléculas com diferença estatística destacada entre os grupos do estudo em questão, e as enzimas supostamente influenciadas pela hipóxia.

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Gradiente de eluição utilizado na separação cromatográfica das classes lipídicas para posterior análise por ionização/dessorção a laser auxiliada por matriz (MALDI-MS). Para detalhes das fases móveis utilizadas, vide texto.

Tabela 2 – Avaliação clínica dos participantes selecionados. Representação das médias e desvio-padrão de cada analito dividido por grupo de estudo, junto com o valor de p obtido, o intervalo de confiança (IC) de 95%, assim como a avaliação da especificidade e sensibilidade (AUC) com IC de 95%. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes(*).

Tabela 3 – Avaliação dos exames de perfil clínico dos participantes selecionados realizados por exames do portfólio do Grupo Fleury. Representação das médias e desvio-padrão de cada analito dividido por grupo de estudo, junto com o valor de p obtido, o intervalo de confiança (IC) de 95%, assim como a avaliação da especificidade e sensibilidade (AUC) com IC de 95%. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes(*).

Tabela 4 – Avaliação das moléculas quantificadas por imunoenaios dos participantes selecionados. Representação das médias e desvio-padrão de cada analito dividido por grupo de estudo, junto com o valor de p obtido, o intervalo de confiança (IC) de 95%, assim como a avaliação da especificidade e sensibilidade (AUC) com IC de 95%. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes(*).

Tabela 5 – Avaliação do cortisol salivar nos três períodos de coleta dos participantes selecionados. Representação das médias e desvio-padrão de cada analito dividido por grupo de estudo, junto com o valor de p obtido, o intervalo de confiança (IC) de 95%, assim como a avaliação da especificidade e sensibilidade (AUC) com IC de 95%. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes(*).

Tabela 6 – Avaliação de catecolaminas urinárias dos participantes selecionados. Representação das médias e desvio-padrão de cada analito dividido por grupo

de estudo, junto com o valor de p obtido, o intervalo de confiança (IC) de 95%, assim como a avaliação da especificidade e sensibilidade (AUC) com IC de 95%. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes(*).

Tabela 7 – Avaliação de aminoácidos no plasma dos participantes selecionados. Representação das médias e desvio-padrão de cada analito dividido por grupo de estudo, junto com o valor de p obtido, o intervalo de confiança (IC) de 95%, assim como a avaliação da especificidade e sensibilidade (AUC) com IC de 95%. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes(*).

Tabela 8 – Identificação dos metabólitos significativamente alterados obtidos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS) após análise estatística.

Tabela 9 – Perfil de fragmentação por espectrometria de massas sequencial (MS^2) observado para as classes de lipídios analisados e validados para o método de fracionamento por cromatografia em fase normal.

Tabela 10 – Identificação dos lipídios estatisticamente significantes responsáveis pela distinção dos grupos de estudo. Representação das médias e desvio-padrão das áreas normalizadas de cada analito dividido por grupo de estudo, junto com o valor de p obtido e o VIP score, o intervalo de confiança (IC) de 95%, assim como a avaliação da especificidade e sensibilidade (AUC) com IC de 95%. Valores de $p < 0,05$ e $VIP > 2$ foram considerados estatisticamente significantes.

Tabela 11 – Resultado estatístico para alto risco de predição para a apneia obstrutiva do sono (AOS) a partir de questionários de pré-seleção habitualmente aplicados e a presença subjetiva de ronco. Representação das médias e desvio-padrão junto com o valor de p obtido, assim como a avaliação da especificidade e sensibilidade (AUC) com IC de 95%. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes(*).

Tabela 12 – Correlação de Pearson junto aos marcadores de gravidade da apneia obstrutiva do sono (AOS) para os metabólitos significantes proveniente das análises metabolômicas e avaliação clínica.

Tabela 13 – Correlação de Pearson junto aos marcadores de gravidade da apneia obstrutiva do sono (AOS) para os lipídios significantes proveniente das análises lipidômicas.

Tabela 14 – Perfil de metabólitos que combinados ao questionário NoSAS aumentam a sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da apneia obstrutiva do sono (AOS).

Tabela 15 – Perfil de lipídios que combinados ao questionário NoSAS aumentam a sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da apneia obstrutiva do sono AOS.

Lista de Símbolos

Da	dalton
ev/h	eventos por hora de sono
g	giros
°C	grau "Celsius"
°C/min	grau "Celsius" por minuto
Hz	Hertz
h	hora
m	metro
µg/mL	micrograma por mililitro
µL	microlitro
µm	micrometro
mg/mL	miligrama por mililitro
mL	mililitro
mL/min	mililitro por minuto
mm	milimetro
mol/L	mol de soluto por litro de solução
ppm	partes por milhão
psi	<i>pounds per square inch</i> (medida de pressão)
kg/m²	quilograma por metro ao quadrado
m/z	relação massa/carga
v/v	relação volume/volume

v/v/v relação volume/volume/volume

rpm rotação por minuto

scan/s *scan* por segundo

Resumo

Lebkuchen A. Estudos metabolômicos na apneia obstrutiva do sono [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Introdução: A apneia obstrutiva do sono (AOS) é uma condição clínica comum, embora subdiagnosticada na prática clínica, que está associada de forma independente com um aumento na morbimortalidade cardiovascular. Evidências recentes sugerem que o aumento do risco cardiovascular atribuído à AOS pode ser parcialmente explicado pela desregulação metabólica. No entanto, pouco se sabe sobre o perfil metabólico detalhado destes pacientes e se estes metabólitos podem servir como potenciais biomarcadores para a AOS. **Objetivos:** O objetivo primário do estudo foi avaliar o perfil metabólico de pacientes com AOS por meio de diferentes estratégias metabolômicas. Como objetivo secundário, avaliamos se o painel de metabólitos selecionados poderia agregar valor diagnóstico ao uso de questionários tradicionalmente empregados para a triagem da AOS. **Métodos:** Participantes do sexo masculino sem doença cardiovascular prévia ou uso de medicamentos foram submetidos à polissonografia noturna e divididos em 2 grupos pareados por idade e índice de massa corpórea (IMC): sem AOS (índice de apneia e hipopneia [IAH] <15 eventos/h) e com AOS (IAH ≥15 eventos/h). Além da avaliação clínica, foi aplicado dois questionários para triagem da AOS usados na prática clínica (questionário Berlim e o escore NoSAS). A quantificação de aminoácidos (AA) no plasma foi realizada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS²) previamente desenvolvido e validado no Grupo Fleury. Para as análises metabolômicas e lipidômicas foram utilizados cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massas (GC-MS) e cromatografia líquida (LC) *off-line* com detecção por ionização/dessorção a laser auxiliada por matriz (MALDI-MS), respectivamente. Para avaliação dos marcadores que estariam associados à AOS foram utilizados teste *t* de *student* ($p < 0,05$) e *VIP score* >2 (predição de variável de importância). A sensibilidade e especificidade foram avaliadas por meio da curva *receiver operating characteristic* (ROC) e modelos de regressão logística em associação com o melhor questionário de triagem para a AOS. **Resultados:** 53 participantes foram estudados (16 sem AOS e 37 com AOS). Como proposto, a idade média (36 ± 6 vs. 39 ± 7 anos) e o IMC ($30,3 \pm 3,5$ vs. $30,6 \pm 3,4$ kg/m²) foram semelhantes entres os grupos sem e com AOS, respectivamente. A quantificação dos AA permitiu observar uma diferença significativa nos níveis de ácido glutâmico, que foram maiores nos pacientes com AOS ($83,5 \pm 22,5$ μM) quando comparados ao grupo sem AOS ($66,7 \pm 24,5$ μM), $p = 0,023$. A avaliação do perfil metabolômico resultou em 28 analitos significantes. Seis desses analitos foram provenientes da análise por GC-MS: pacientes com AOS apresentaram maiores níveis de 6-deoxi-D-glicose; 2,6-difenil-1,7-diidrodipirrolo [2,3-b:3',2'-e] piridina, ácido 9 (Z)-hexadecenóico e ácido araquidônico e menores níveis de 5,5'-bifitalato e glutamina quando comparados ao grupo sem AOS ($p < 0,05$). A análise lipidômica (LC *off-line* e MALDI-MS) resultou em 22 lipídios significantes subdivididos nas seguintes classes: ceramidas (Cer), fosfatidiletanolamina (PE), lisofosfatidilcolina (LPC), e esfingomiélnina (SM) com níveis mais elevados em pacientes com AOS em comparação ao grupo sem AOS ($p < 0,05$). Diacilglicerol (DAG), fosfatidilcolina

(PC) e ácido fosfatídico (PA) tiveram níveis significativamente diminuídos nos pacientes com AOS em comparação aos sem AOS. Em relação ao objetivo secundário, o questionário com melhor desempenho para triar a AOS foi o escore NoSAS com uma área sob a curva (AUC) de 0,724. A combinação dos 4 metabólitos (ácido glutâmico, glutamina, 6-deoxi-D-glicose e ácido araquidônico) ou dos 3 lipídios (LPE 35:1, SM d18:1/12:0 e LPC 27:1) selecionados pelo modelo de regressão logística ao escore NoSAS positivo resultou em uma AUC de 0,917 e 0,951, respectivamente, para a detecção da AOS. **Conclusão:** A aplicação da metabolômica permitiu a identificação de potenciais biomarcadores precoces para a AOS em homens jovens. Estes achados não são explicados por fatores de confusão como a idade, IMC e composição corporal. Este estudo confirma o achado de que os questionários habitualmente usados para a triagem da AOS não apresentam um bom desempenho. A combinação dos metabólitos selecionados aumentou a sensibilidade e especificidade para detecção da AOS em relação ao questionário isolado. Neste contexto, novos estudos são necessários para avaliar se estes biomarcadores poderão ser úteis para a predição do risco cardiovascular e melhora do diagnóstico da AOS.

Descritores: Apneia obstrutiva do sono; biomarcadores; metabolômica; lipídios; doenças cardiovasculares; espectrometria de massas.

Abstract

Lebkuchen A. *Metabolomic profile of obstructive sleep apnea* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

Introduction: Obstructive sleep apnea (OSA) is a common clinical condition, although frequently underdiagnosed in clinical practice. OSA is independently associated with an increased risk of cardiovascular morbidity and mortality. Recent evidence suggests that the cardiovascular risk attributed to OSA may be partially explained by metabolic dysregulation. However, little is known about the detailed metabolic profile of these patients and whether these metabolites may serve as potential biomarkers for OSA. **Objectives:** The primary objective of the study was to evaluate the metabolic profile of OSA patients through different metabolomics strategies. As a secondary objective, we evaluated whether the panel of selected metabolites could improve diagnostic value to the use of questionnaires traditionally used for OSA screening. **Methods:** Male participants with no previous cardiovascular diseases and under no medications were submitted to a nocturnal polysomnography and divided into 2 groups matched by age and body mass index (BMI): no OSA (apnea and hypopnea index [AHI] <15 events/h) an OSA (AHI ≥15 events/h). In addition to the clinical evaluation, was applied two questionnaires to screening OSA in the clinical practice (Berlin questionnaire and the NoSAS score). The quantification of amino acids (AA) in plasma was performed by liquid chromatography coupled to sequential mass spectrometry (LC-MS/MS) previously developed and validated in the Fleury Group. To the metabolomics and lipidomics analysis, we used gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and off-line liquid chromatography (LC) with matrix-assisted laser ionization/desorption detection (MALDI-MS), respectively. *Student's t test* ($p < 0.05$) and VIP score > 2 (significance variable prediction) were used to evaluate the markers associated with OSA. Sensitivity and specificity were evaluated using the receiver operating characteristic (ROC) curve and logistic regression models in association with the best screening questionnaire for OSA. **Results:** 53 participants were studied (16 with no OSA and 37 with OSA). As proposed, mean age (36 ± 6 vs. 39 ± 7 years) and BMI (30.3 ± 3.5 vs. 30.6 ± 3.4 kg/m²) were similar between the groups without and with OSA, respectively. The quantification of AA showed a significant difference in the glutamic acid levels, which were higher in patients with OSA (83.5 ± 22.5 μM) when compared to the group with no OSA (66.7 ± 24.5 μM), $p = 0.023$. Metabolomics profile analysis resulted in 28 significant analytes. Six of these analytes came from GC-MS analysis: patients with OSA had higher levels of 6-deoxy-D-glucose, 2,6-diphenyl-1,7-dihydrodipyrrolo [2,3-b:3',2'-e] pyridine, 9-hexadecenoic acid (Z) and arachidonic acid and lower levels of 5,5'-bipthalide and glutamine when compared to the no OSA group ($p < 0.05$). The lipidomics analysis (LC off-line and MALDI-MS) resulted in 22 significant lipids subdivided into the following classes: glycerophosphoethanolamine (PE), lysophosphosphatidylcholine (LPC), and sphingomyelin (SM) with higher levels in patients with OSA when compared to the no OSA group ($p < 0.05$). Diacylglycerol (DAG), glycerophosphocholine (PC) and phosphatidic acid (PA) had significantly decreased levels in patients with OSA compared to those with no OSA. Regarding to the secondary endpoint, the best performing questionnaire for screening OSA was the NoSAS score with an area under the curve (AUC) of

0.724. The combination of the 4 metabolites (glutamic acid, glutamine, 6-deoxy-D-glucose and arachidonic acid) or the 3 lipids (LPE 35:1, SM d18:1/12:0 and LPC 27:1) previously selected by logistic regression model to the NoSAS positive score resulted in an AUC of 0.917 and 0.951, respectively, for the OSA detection.

Conclusion: The application of metabolomics strategies allowed the identification of potential early biomarkers for OSA in young male subjects. These findings are not explained by confounding factors such as age, BMI and body composition. This study confirms previous findings that the questionnaires commonly used for screening OSA do not have a good performance. The combination of the selected metabolites increased the sensitivity and specificity to OSA detection in relation to the use of sleep questionnaire only. In this context, further studies are necessary to assess whether these biomarkers may be useful for predicting cardiovascular risk and improving the OSA diagnosis.

Descriptors: Sleep apnea, obstructive; biomarkers; metabolomics; lipids; cardiovascular diseases; mass spectrometry.

1. Introdução

A apneia obstrutiva do sono (AOS) é uma condição clínica caracterizada por obstruções repetitivas das vias aéreas superiores durante o sono com consequente redução da pressão intratorácica, dessaturações de oxigênio e fragmentação do sono¹. Cada vez mais comum, esta condição é em parte explicada pela epidemia de sobrepeso e obesidade verificada nas últimas décadas. Um exemplo claro deste aumento na população foi a reavaliação da prevalência da AOS pelo grupo do *Wisconsin Sleep Cohort Study*, 20 anos após a sua primeira publicação², resultando em um aumento de 9% para 13% nas formas moderada e importante no sexo masculino³. Estudos nacionais realizados na cidade de São Paulo mostraram que a AOS está presente em cerca de 1/3 da população adulta⁴, enquanto que outro estudo populacional recente, envolvendo 2 121 participantes na cidade de Lausanne, Suíça, encontrou uma prevalência ainda maior que o estudo brasileiro: 49,7% de prevalência da AOS moderada a importante para homens e 23,4% para mulheres⁵.

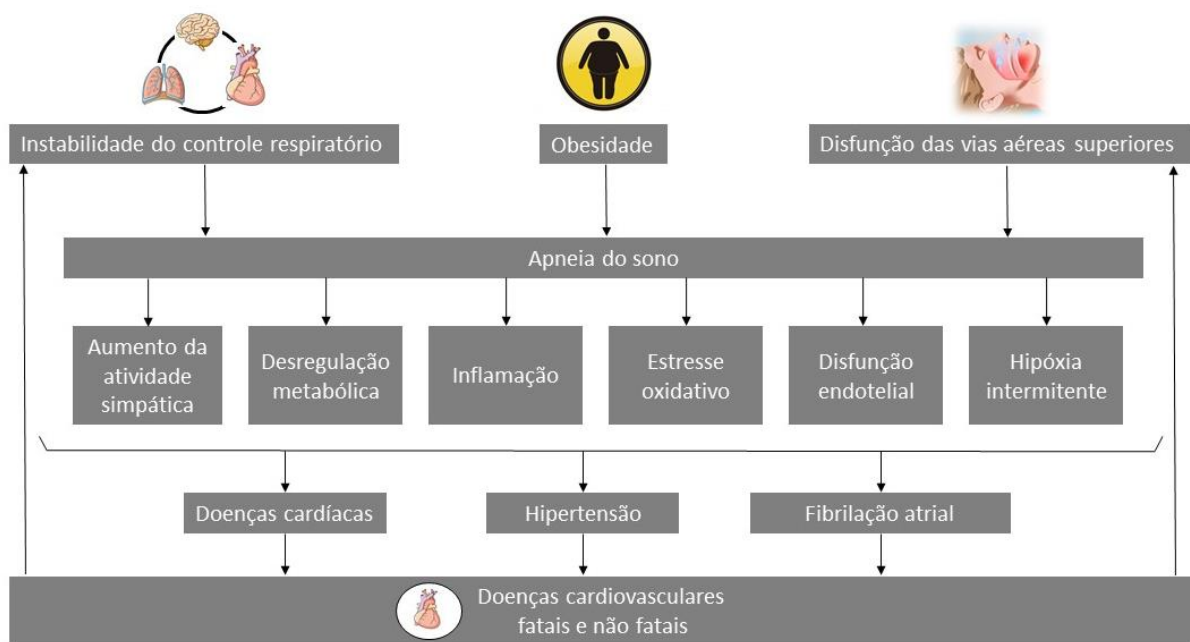
Entre os pacientes com doença cardiovascular já estabelecida, a prevalência de AOS assume também proporções muito elevadas. Por exemplo, a frequência da AOS entre os pacientes hipertensos é estimada em 30 a 56%, chegando à 83% nos casos de hipertensão arterial resistente ao tratamento⁶⁻⁸. Já em pacientes com insuficiência cardíaca e fibrilação atrial, a prevalência chega a cerca de 50%⁹⁻¹¹.

Mais do que frequente, estudos epidemiológicos sugerem que a AOS está independentemente associada ao aumento da morbimortalidade cardiovascular¹¹⁻¹⁶. De forma interessante, um estudo observacional mostrou que o tratamento da AOS empregando a pressão positiva contínua de vias

aéreas superiores (do inglês “*Continue Positive Airway Pressure*”, CPAP), considerada o tratamento de escolha para a AOS, reduziu a incidência de eventos cardiovasculares fatais e não fatais em um seguimento médio de 10 anos¹².

A despeito destas evidências, os mecanismos pelos quais a AOS promove a doença cardiovascular permanecem ainda muito desconhecidos. Sabe-se que os potenciais efeitos deletérios dos distúrbios respiratórios do sono são múltiplos. Como já ressaltado, as apneias e/ou hipopneias recorrentes causam hipóxia, redução da pressão intratorácica e micro despertares do sono. Cronicamente, estes múltiplos eventos podem promover o aumento da atividade simpática, instabilidade da pressão arterial, disfunção endotelial, inflamação, entre outros^{11,16,17}. Embora a atenção inicial tenha sido voltada para as consequências hemodinâmicas promovidas pela AOS, evidências mais recentes em humanos e em modelos animais sugerem que a AOS pode promover a doença cardiovascular por induzir uma desregulação metabólica caracterizada por resistência à insulina, intolerância à glicose, dislipidemia e alterações no metabolismo lipídico, que ultimamente vão contribuir para a progressão da aterosclerose¹⁸⁻²⁵. Neste sentido, é possível encontrar estudos focados em explorar o potencial impacto da AOS na síndrome metabólica e em marcadores de aterosclerose. Por exemplo, Drager et al.²⁶⁻²⁷ mostrou que a AOS estava associada de forma independente com dois critérios da síndrome metabólica (glicemia e triglicérides) bem como outros parâmetros metabólicos e inflamatórios (aumento da relação colesterol/lipoproteína de alta densidade (HDL), aumento do ácido úrico e proteína C reativa (PCR))²⁶. Em outra

publicação, foi descrito que marcadores de aterosclerose como a espessura da camada íntima-média da carótida e da rigidez arterial (velocidade de onda de pulso carótida-femoral) estavam significativamente aumentados nos pacientes com síndrome metabólica e AOS comparado aos pacientes com síndrome metabólica sem AOS²⁷. A Figura 1 resume as principais vias pelas quais a AOS pode aumentar o risco cardiovascular²⁸.



Fonte – Adaptado de Javaheri et al²⁸.

Figura 1 – Esquema representando potenciais vias pelas quais a apneia obstrutiva do sono (AOS) pode aumentar o risco cardiovascular.

Apesar dos progressos obtidos nesta importante área de pesquisa, a AOS ainda continua sendo subdiagnosticada na prática clínica e o seu papel nas alterações metabólicas ainda não está totalmente definido²⁹. Há estudos sobre o metaboloma humano na privação de sono³⁰, porém não existem estudos que façam uma análise mais detalhada do perfil metabólico de pacientes com AOS.

Além disto, pelo fato da AOS potencialmente representar um fator de risco cardiovascular independente da obesidade, torna-se imperativo explorar potenciais marcadores que possam servir tanto para sugerir a presença da AOS em uma população como prever eventos cardiovasculares nestes pacientes. O estudo de um perfil metabólico detalhado, pode oferecer não apenas um diagnóstico mais preciso, mas a possibilidade de um marcador precoce e esclarecimento de vias envolvidas nas repercussões cardiovasculares da AOS.

A metabolômica é uma das ciências “ômicas” que tem como objetivo estudar o perfil global ou parcial de metabólitos presentes em um sistema biológico em um determinado tempo (Figura 2)^{31,32}. Considerada uma ciência nova, as primeiras publicações datam de 1984^{31,32}. O metaboloma humano ainda é muito desconhecido, porém estima-se um número entorno de 20 000 metabólitos endógenos e exógenos, os quais incluem aminoácidos, peptídeos, lipídios, ácidos orgânicos, nucleotídeos, entre outros. Esses metabólitos estão presentes em uma ampla faixa de concentração atingindo nove ordens de magnitude³³.

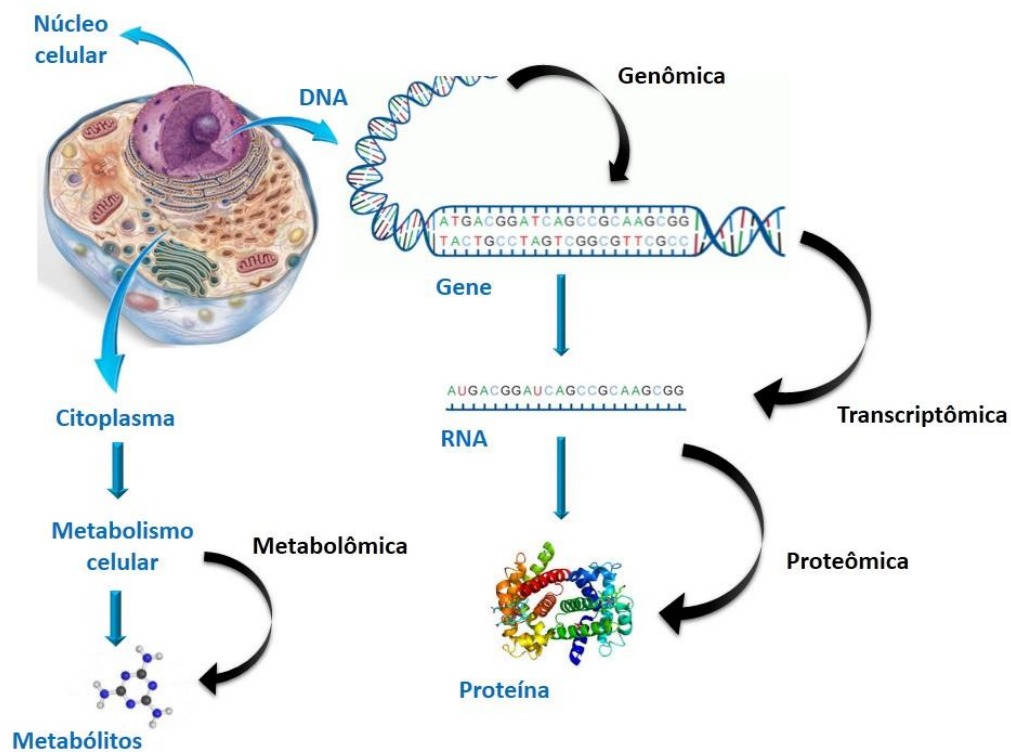
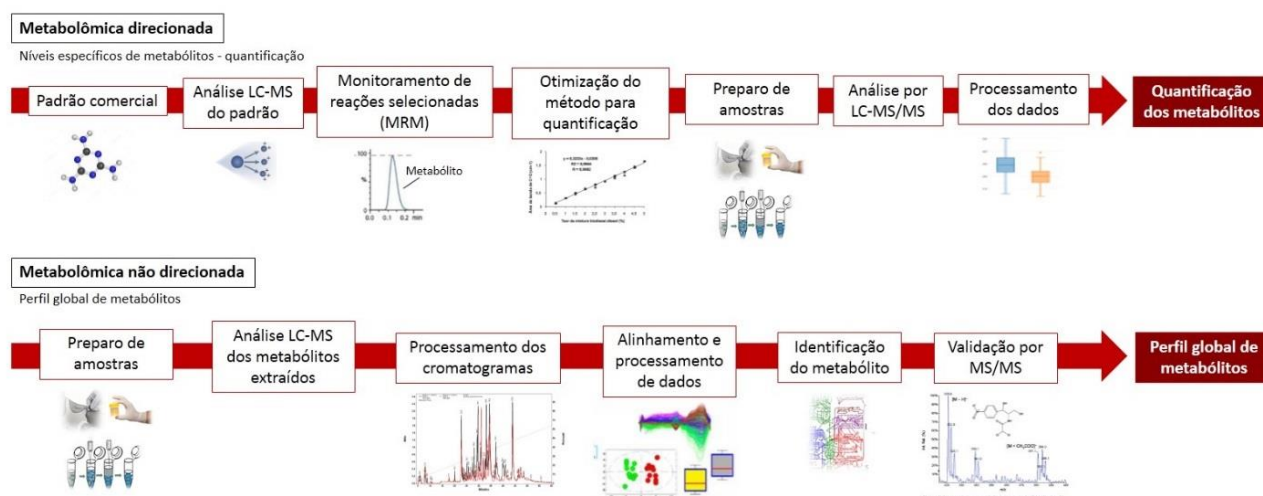


Figura 2 – Caracterização das ciências “ômicas” no sistema biológico.

Dentro da metabolômica, especial atenção vem sendo dada a lipidômica. Os lipídios têm sido crescentemente relacionados a diversas doenças e recentemente, estudos focados na compreensão e influência dos lipídios nos sistemas biológicos vêm sendo publicados³⁴. Estima-se a existência de aproximadamente 600 espécies moleculares distintas no plasma humano, devidamente quantificados e reportados, divididas em seis diferentes classes³⁵.

O estudo compreensivo de um perfil metabólico é um grande desafio analítico. A imensa diversidade química dos compostos analisados, bem como a ampla faixa de concentração em que eles estão presentes nas diferentes matrizes biológicas (tecido, sangue, urina, etc.), faz com que não seja possível

o uso de uma única plataforma de análise³⁶⁻³⁸. Essas análises podem ser divididas em três estratégias: metabolômica direcionada (do inglês “*targeted metabolomic*”), metabolômica semi-direcionada (do inglês “*semi-targeted metabolomic*”) e metabolômica não direcionada (do inglês “*untargeted metabolomic*”)³² (Figura 3). As análises direcionadas são focadas em classes específicas de metabólitos que são isolados e detectados de acordo com suas propriedades químicas semelhantes. Nessa estratégia, um número pré-definido de metabólitos (aproximadamente 20) são quantificados com alta precisão e exatidão, e normalmente são análises dirigidas por hipóteses biológicas ou análises confirmatórias de um estudo prévio de análises não direcionadas. A abordagem semi-direcionada é similar a abordagem direcionada porém esta estratégia quantifica um número maior de metabólitos (aproximadamente 100). Os métodos não direcionados analisam um grande número de metabólitos não específicos que são quantificados de forma relativa entre os grupos, maximizando o número de analitos detectados por ensaio; abordagens não direcionadas são comumente aplicadas em métodos analíticos desenvolvidos e validados para um estudo de interesse, sendo reprodutíveis e robustos para comparações de dados de forma fidedigna^{32,38-42}.



Fonte – Adaptado de Patti et al³².

Figura 3 – Fluxograma de análises em metabolômica direcionada e não direcionada.

As plataformas analíticas frequentemente utilizadas nas análises metabolômicas, sejam elas direcionadas ou não, são a espectrometria de massas (MS) combinada a técnicas cromatográficas (gasosa – GC – e líquida – LC), a ressonância magnética nuclear (RMN) e a ionização/dessorção a laser auxiliada por matriz (MALDI)³⁷⁻⁴⁴.

A espectrometria de RMN permite a análise de muitos metabólitos em uma única amostra com ou sem pré-tratamento analítico. Trata-se de uma técnica não destrutiva, onde o material não perde suas propriedades e não altera sua forma, que oferece informações precisas a respeito da estrutura química de diferentes compostos. Entretanto, esta técnica apresenta baixa sensibilidade quando comparada a MS. Além disso, os espectros de RMN de amostras complexas podem ser difíceis para interpretação devido à sobreposição dos sinais dos diferentes componentes⁴⁵. A cromatografia gasosa acoplada a MS

(GC-MS) oferece diversas vantagens como alta resolução cromatográfica, reprodutibilidade e sensibilidade. A GC-MS é limitada a análise de compostos termoestáveis e voláteis e necessita de derivação para compostos não voláteis⁴⁶. Específica para análises metabolômicas, a biblioteca Fiehn RTL⁴⁷ foi desenvolvida para facilitar o estudo de metabólitos por meio da GC-MS. Essa biblioteca apresenta espectros de massas de ionização por elétrons de aproximadamente 700 compostos de baixo peso molecular com tempos de retenção indexados, o que permite após a análise por método específico, a identificação dos metabólitos⁴⁷. A LC acoplada à MS (LC-MS) é outra ferramenta poderosa nos estudos metabolômicos e permite a análise da maioria dos metabólitos existentes após um protocolo mais simples de preparo de amostra se comparado ao GC⁴⁸. Seu uso em metabolômica se dá com o acoplamento ao MS com fontes de ionização por eletrospray (ESI) e ionização química a pressão atmosférica (APCI). Quando associada a um amplo universo de diferentes colunas analíticas, principalmente colunas de partículas sub 2 µm, permite a separação de muitos metabólitos em um curto espaço de tempo⁴⁸. A espectrometria de massas por MALDI é uma plataforma de análise rápida (60 segundos por amostra, aproximadamente) e sensível capaz de analisar desde moléculas de grande peso molecular, como proteínas intactas, até moléculas de baixo peso molecular. Utiliza um processo de ionização branda por *laser*, o qual necessita de matrizes específicas para ionização do composto de interesse. Seu acoplamento com MS do tipo tempo de voo (ToF) torna-se uma plataforma de escolha para análise de biomoléculas uma vez que a combinação do ToF das moléculas e o pulso do *laser* permite a identificação de compostos monocarregados na faixa de massas de até 30 000 Da com grande exatidão e

precisão⁴⁹. Esses valores de massas fornecem algumas fórmulas empíricas como possíveis candidatos que, dentro de uma faixa de erro de 3-5 ppm, reduzem significativamente o número de estruturas prováveis para os metabólitos analisados. As diferentes técnicas apresentam vantagens e desvantagens, e em estudos metabolômicos é importante a combinação de diferentes plataformas no intuito de maximizar o número de metabólitos identificados.

O planejamento de um estudo metabolômico é complexo e inclui várias etapas pré-analítica, analítica e pós-analítica que devem ser padronizadas antes do início do projeto. Essas etapas incluem a seleção dos pacientes, coleta, transporte (quando necessário) e armazenamento das amostras, processamento analítico, processamento dos dados e interpretação dos resultados (Figura 4).

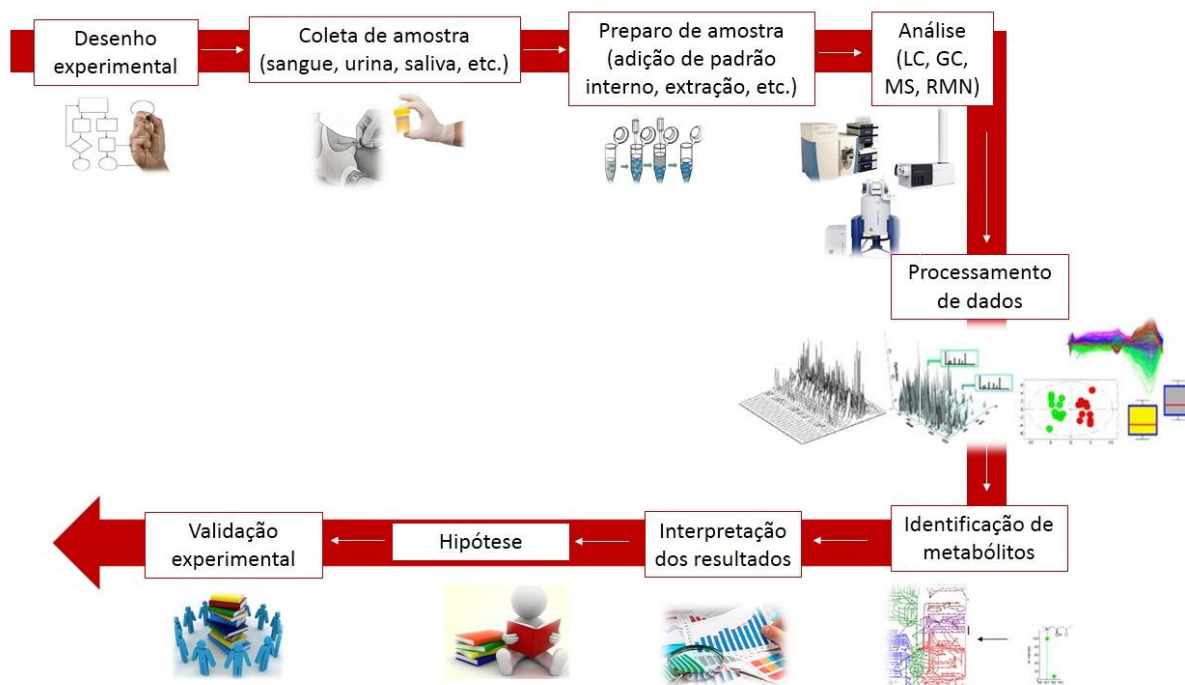


Figura 4 – Fluxograma mostrando as diversas etapas de um estudo metabolômico.

A seleção dos grupos de pacientes é uma das etapas pré-analíticas mais importantes dentro de um estudo metabolômico. Com o objetivo de descobrir biomarcadores ou preditores de alguma condição clínica e entender os mecanismos de ação⁵⁰, é de suma importância selecionar grupos de pacientes com características similares e estabelecer critérios de inclusão e exclusão de pacientes que possam isolar a patologia em estudo de outras hipóteses diagnósticas que podem diminuir o poder estatístico do estudo em questão.

A escolha da matriz biológica deve ser cuidadosamente selecionada^{32,51}, uma vez que muitos contaminantes químicos de baixo peso molecular apresentam propriedades semelhantes a metabólitos, sendo recomendado uma atenção especial no procedimento de coleta das amostras (similaridade de tubos e demais frascos de coleta e armazenamento), processamento, transporte e temperatura de armazenamento para minimizar qualquer artefato que possa impactar o estudo. As possibilidades de matrizes biológicas que podem ser exploradas em análises metabolômicas são vastas, porém soro e plasma são as matrizes mais utilizadas⁵⁰⁻⁵¹. Ambas apresentam composição química semelhantes com boa estabilidade⁵⁰.

A extração das amostras é uma etapa do processo analítico, e tem como objetivo a extração do maior número de metabólitos presentes na amostra (análise não direcionada), ou a extração dos metabólitos pré-definidos no estudo (análise direcionada), evitando supressão de íons adjacentes⁵²⁻⁵³. Diferentes métodos de extração podem ser utilizados, e são escolhidos de acordo com a finalidade do estudo. Exemplos como extração líquido-líquido e extração em fase

sólida são as mais utilizadas podendo ser acompanhadas ou não de derivação após a extração para a análise⁵⁰.

O processamento dos dados é uma etapa pós-analítica de alta complexidade visto que estudos metabolômicos resultam em uma grande quantidade de informações. Para a sistematização e interpretação deste enorme universo de dados é necessário o uso de ferramentas estatísticas e computacionais. Análises estatísticas multidimensionais e multivariadas, bem como programas de reconhecimento de padrões, vêm sendo desenvolvidos neste intuito⁵⁴. Além disto, a criação e disponibilização de bancos de dados que podem armazenar, gerenciar e analisar a imensa quantidade de informações geradas nos estudos metabolômicos vem auxiliando os pesquisadores de diversas áreas. Estão disponíveis bancos de dados tanto gratuitos como comerciais que oferecem informações a respeito das estruturas química, das propriedades físico-químicas e farmacológicas, dos padrões espectrais, das metodologias empregadas e das funções biológicas de diversos metabólitos⁵⁴. Mais recentemente, o desenvolvimento da bioinformática tem tornado esse processo relativamente automatizado, facilitando a identificação de *features* diferencialmente expressos por meio de *softwares* como XCMS (Metlin), Progenesis (Waters Corporation, Milford, MA, USA), AMDIS (NIST *standard reference data program*, Gaithersburg), *Compound Discovery* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) e a plataforma R⁵⁵⁻⁵⁸. Esses *features*, após processados, podem então ser identificados por diferentes bancos de dados como Metlin⁵⁶, NIST, *The Human Metabolome Database*⁵⁰, LipidMaps³⁴⁻³⁵, entre outros. Como

resultado final é possível obter uma lista contendo vários compostos identificados e a concentração relativa dos mesmos entre os grupos de estudo.

Nos últimos anos, houve um rápido crescimento no número de aplicações da metabolômica em medicina, principalmente na busca de biomarcadores que possam ser empregados no diagnóstico clínico de diferentes patologias³⁸. Há relatos da aplicação desta ciência para diagnóstico precoce de Alzheimer, sinalizando alguns lipídios como biomarcadores quando analisados grupos de estudo com diagnóstico para a doença de Alzheimer comparados com grupos sem a doença⁵⁹⁻⁶⁰. Também pode-se encontrar o uso da metabolômica como ferramenta investigativa na busca de biomarcadores para diferentes tipos de câncer, e desenvolvimento de tratamentos para a doença⁶¹. Dentro da cardiologia também é possível encontrar a exploração destas biomoléculas de baixo peso. Há estudos que investigaram o plasma de pacientes com infarto do miocárdio e como resultado apresentaram metabólitos significativamente diferenciados, responsáveis pelas alterações, sendo possível traçar um perfil diagnóstico para o caso⁶²⁻⁶⁵. Outro estudo avaliou a resposta metabolômica ao esforço cardiovascular para prognóstico de doenças cardiovasculares⁶⁶. Focado na análise de marcadores para a AOS, poucos estudos podem ser encontrados na literatura e os que foram publicados, muitas vezes apresentam limitações quanto as etapas pré-analíticas e de seleção de pacientes. Ferrarini et al.⁶⁷ aplicou metabolômica não direcionada por LC-MS para investigação do metaboloma humano em uma população com presença de AOS e encontrou significância estatística para 14 metabólitos divididos entre as classes de fosfolipídios, porfirinas, ácidos graxos, eicosanoides, aminoácidos e peptídeos.

Por outro lado, Xu et al⁶⁸ publicou um estudo similar ao desenvolvido neste trabalho, porém com maior heterogeneidade dos grupos. Xu et al⁶⁸ observou 31 metabólitos significantes responsáveis pela biossíntese de fosfolipídios, pelo metabolismo dos carboidratos, glutamato e ácidos nucleicos, entre outros, com sensibilidade e especificidade de até 85% e 80%, respectivamente. Estudos apontando algumas proteínas e peptídeos como possíveis biomarcadores para a AOS, assim como da análise de exomas ressaltando miRNA como potenciais marcadores para AOS foram publicados recentemente⁶⁹⁻⁷⁰.

É notória a crescente evolução da aplicação da metabolômica e lipidômica como ferramenta para descobrir preditores, biomarcadores e tratamentos para diferentes condições clínicas bem como o estudo das vias metabólicas envolvidas. Com isso, utilizar tal ferramenta para explorar mecanismos de ação, buscar alternativas de diagnóstico, auxiliar no tratamento (medicina personalizada) e prognóstico para uma doença tão importante e subdiagnosticada como a AOS, torna-se indispensável.

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

O objetivo primário do estudo foi avaliar o perfil metabólico de pacientes com AOS por meio de diferentes estratégias metabolômicas. Como objetivo secundário, foi avaliado se o painel de metabólitos selecionados poderia agregar valor diagnóstico ao uso de questionários tradicionalmente empregados para a triagem da AOS.

3. Casuística e Métodos

Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob o número CAAE 21075413.6.0000.0068 (Anexo 1).

3.1. Seleção de pacientes

Os participantes destinados a essa pesquisa foram voluntariados após serem devidamente esclarecidos quanto à natureza, objetivo e riscos do mesmo e, quando em concordância, assinaram o termo de consentimento (Anexo 2) para prosseguimento no protocolo.

Foram convocados participantes do sexo masculino com diagnóstico positivo e/ou negativo para AOS por meio de questionário de pré-seleção utilizado atualmente (Berlim)⁷¹⁻⁷², e que não preenchiam os critérios de exclusão pré-estabelecidos para o estudo. A opção pela inclusão restrita de homens justifica-se não só pelo fato de que a AOS é muito mais comum em homens, mas, de forma destacada, pela potencial influência do ciclo hormonal, uso de contraceptivos/reposição hormonal e menopausa sobre os metabólitos analisados.

Além do sexo feminino, os critérios de exclusão incluíam participantes menores de 18 anos, que faziam uso de álcool, tabagistas em um período de até 6 meses, pacientes com predominância de apneias centrais ou mistas, presença de diabetes *mellitus*, uso crônico de medicações, portadores de doenças neurológicas, portadores de insuficiência coronariana, insuficiência cardíaca descompensada, doença pulmonar crônica (obstrutiva ou restritiva), doença

renal crônica (taxa de filtração glomerular inferior a 60 mL/min) e pacientes com índice de massa corpórea (IMC) maior que 40 kg/m².

Os participantes selecionados foram encaminhados ao exame de polissonografia (PSG) noturna e, após confirmada a presença ou ausência de AOS, foram divididos em dois grupos para estudo: sem AOS e com AOS (ver adiante).

Para que os grupos descritos pudessem ter idade e IMC semelhantes, foi realizada a seguinte estratégia de pareamento: para cada paciente com alto risco para a AOS, ou diagnóstico prévio de AOS, selecionado, procurou-se ativamente voluntários com baixo risco para a AOS utilizando o questionário de Berlim⁷¹, com idade no intervalo de ± 5 anos e IMC de ± 3 kg/m² entre os dois grupos. Após a seleção, os mesmos eram encaminhados para a PSG e se confirmada a ausência da AOS, eram então incluídos no estudo. É importante destacar que o uso prévio do questionário não foi crucial para a escolha dos grupos. Isto significa que o paciente com baixo risco para a AOS pelo questionário, mas com AOS por meio da PSG, era estudado obviamente dentro do grupo com AOS. O oposto foi realizado para pacientes com alto risco que não confirmaram a AOS na PSG.

3.2. Polissonografia

A PSG noturna consiste em um sistema de registro de diversos parâmetros fisiológicos durante o sono por meio da utilização de multicanais que monitoriza, em ambiente calmo e apropriado, o eletroencefalograma (EEG),

eletroculograma (EOG), eletromiograma (EMG), saturação de oxigênio, fluxo de ar, esforço respiratório e frequência cardíaca.

Todos os pacientes pré-selecionados e incluídos neste estudo foram submetidos à PSG completa no Laboratório do Sono do InCor.

No presente protocolo, foi utilizado o aparelho de marca Embla (Flagahf Medical Devices, Reykjavik Iceland) para a realização dos exames. As fases do sono foram monitorizadas usando EEG, EOG (em ambos os olhos) e EMG em região submentoniana para detectar, por exemplo, os períodos de hipotonia que ajudam a identificar o surgimento do sono “*rapid eyes movement*” (REM). Esses parâmetros permitem também estabelecer as porcentagens de cada fase do sono, bem como sua latência e períodos de despertar. As diferentes fases do sono estão classificadas em sono não-REM (sendo subdividida nas fases 1, 2 e 3) e sono REM, de acordo com o manual de regras da *American Academy of Sleep Medicine* (AASM 2012)⁷³. As mudanças no fluxo de ar foram registradas pelo uso de sensor térmico, o qual sente alterações da troca de calor por meio de um cateter nasal conectado a um transdutor de pressão e um pequeno microfone localizado na região cervical para a detecção de roncos. A saturação de oxigênio arterial foi detectada pela oximetria. Para a monitorização da frequência cardíaca e de possíveis arritmias durante o sono, foi utilizado o eletrocardiograma com uma derivação.

Para evitar a variabilidade inter-observador, um mesmo médico especialista em medicina do sono analisou todas as PSG.

A apneia foi definida como a redução de 90% do fluxo aéreo por mais de 10 segundos, sendo subclassificada como central ou obstrutiva baseada na presença ou ausência de esforço respiratório, respectivamente. Classificou-se uma apneia mista quando houve ausência de esforços respiratórios no início do evento, seguido pelo surgimento de esforços respiratórios na segunda parte do evento. A hipopneia foi definida por uma redução do fluxo oro nasal maior ou igual a 30% por mais de 10 segundos, seguida de queda da saturação de oxigênio maior ou igual a 3% ou seguida de microdespertar⁷³. A soma dos eventos de apneia e hipopneia resultaram no índice de apneia-hipopneia (IAH) por hora de sono.

Os grupos de estudo foram definidos de acordo com as seguintes classificações de IAH:

- IAH <15 eventos por hora de sono (ev/h): **sem AOS**;
- IAH ≥15 eventos por hora de sono (ev/h): **com AOS**.

A escolha do critério da AOS por um IAH ≥15 ev/h foi justificada por diversos estudos que mostram a ausência de consequências cardiovasculares observada em pacientes com AOS leve⁷⁴.

3.3. Avaliação clínica

Os pacientes de todos os grupos tiveram registradas suas medidas de altura, peso, circunferência de cintura, circunferência de pescoço e circunferência de quadril, assim como raça, escolaridade, estado civil, ocupação e avaliação de bioimpedância (massa muscular, massa e % de gordura, área de

gordura visceral – AGV – e taxa metabólica basal – TMB) (InBody S10, Trepel, Portugal).

A pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) foram obtidas a partir da média de três medidas sequenciais com o paciente sentado após um período de repouso apropriado. Foram utilizados aparelhos digitais (*Omron* – modelo HEM-742INT) com manguitos adequados à circunferência do braço para mensuração.

Para diminuir o efeito de artefatos e limitações nas medidas, tais como o arredondamento dos valores, o peso e altura dos pacientes foram aferidos na mesma balança pelo pesquisador, e as medições das circunferências de cintura e pescoço foram realizadas também pelo pesquisador seguindo técnicas adequadas: circunferência de pescoço, medida por uma fita métrica envolvendo perpendicularmente o pescoço sobre a cartilagem cricóide e ponto médio na região posterior do pescoço, com a cabeça na posição horizontal de Frankfort⁷⁵; circunferência de cintura, medida por uma fita métrica no ponto médio entre a crista ilíaca superior e a última costela⁷⁶.

3.4. Amostras biológicas

As amostras de plasma e soro foram coletadas utilizando tubos de coleta à vácuo (BD Vacutainer®, Becton, Dickinson and Company, NJ, USA) com diferentes anticoagulantes. Para as análises metabólicas e lipídicas foram utilizados tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA)⁵¹, para as dosagens de glicemia, perfil lipídico, hormônio estimulante da tireoide (TSH) e

marcador inflamatório (PCR ultra-sensível) foram utilizados tubos com gel separador e para mensuração de leptina, interleucina-6 (IL-6), adiponectina e ácidos graxos livres e totais foram utilizados tubos sem gel separador.

Marcadores de estresse, como cortisol e catecolaminas, foram analisados pela coleta de saliva por meio de tubos específicos de coleta (Salivettes) em três períodos diferentes do dia (entre as 7 h e 9 h, entre as 16 h e 17 h e entre as 23 h e 24 h)⁷⁷⁻⁷⁸, e de urina 24 h realizada em frascos com conservante (10 mL de ácido acético 8 mol/L), respectivamente.

As coletas de sangue foram realizadas sempre no mesmo horário (entre 8 h e 9 h), com o mesmo tempo de jejum para todos os pacientes, e apenas uma enfermeira foi responsável pela coleta durante todo o estudo. A mesma foi previamente treinada pelo Grupo Fleury, seguindo todas as normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Patologia Clínica Medicina Laboratorial⁷⁹ e Secretaria Municipal de Saúde de São Paulo⁸⁰.

O processamento das amostras, como centrifugação e aliquotagem, foi realizado no laboratório de genética do InCor. Para tal, muitos treinamentos foram realizados nos centros de distribuição do Grupo Fleury, no intuito de padronizar a coleta e processamento das amostras na fase pré-analítica. A padronização e controle na qualidade (CQ) na fase pré-analítica são muito importantes para garantir a integridade da amostra. Os plasmas e soros foram obtidos após centrifugação das amostras por 15 minutos em uma centrífuga Thermo Scientific Sorvall ST16R (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) a 3 500 g. Os tubos com gel separador e os Salivettes foram centrifugados a 4 °C enquanto que os demais foram centrifugados a temperatura ambiente. Alíquotas

de diferentes volumes foram feitas para evitar ciclos de descongelamentos das amostras para cada análise. Após a aliquotagem, as amostras foram imediatamente transportadas para o Grupo Fleury. As alíquotas obtidas do tubo com gel separador e da coleta de urina foram transportadas dentro de caixas térmicas refrigeradas com gelo reciclável a uma temperatura aproximada de 10 °C, enquanto que as demais alíquotas foram transportadas dentro de caixas térmicas com gelo seco.

Todas as alíquotas foram devidamente armazenadas até o processamento. As amostras destinadas às análises metabólicas e lipidômicas e para as dosagens de catecolaminas plasmáticas e cortisol salivar foram armazenadas a -80 °C. Já as amostras para análise de leptina e IL-6 permaneceram a -20 °C, enquanto que as amostras para a análise de adiponectina e ácidos graxos livres e totais foram armazenadas em nitrogênio líquido. As alíquotas provenientes do tubo com gel separador para análise do perfil clínico foram analisadas no mesmo dia da coleta sem armazenamento prévio.

3.5. Perfil clínico

O perfil clínico dos pacientes foi obtido a partir da análise de glicose, insulina, TSH, perfil lipídico (colesterol total, HDL, lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), colesterol não-HDL e triglicérides), PCR ultrasensível, IL-6, adiponectina, leptina e ácidos graxos livres e totais.

As análises de glicose, insulina, TSH, perfil lipídico e PCR, foram realizadas pelo setor de automação do Grupo Fleury. Métodos de análise enzimáticos foram utilizados nas dosagens de glicose (kit comercial *Glucose HK Gen.3*, Cobas© Systems/Roche Diagnostics GmbH, Alemanha), colesterol total (kit comercial *Cholesterol Gen.2*, Cobas© Systems/Roche Diagnostics GmbH, Alemanha), triglicérides (kit comercial *Triglycerides*, Cobas© Systems/Roche Diagnostics GmbH, Alemanha), e HDL (kit comercial *HDL-Cholesterol Plus 3rd generation*, Cobas© Systems/Roche Diagnostics GmbH, Alemanha); métodos eletroquimioluminométricos foram utilizados nas dosagens de insulina (kit comercial *Insulin*, Elecsys and Cobas© Systems/Roche Diagnostics GmbH, Alemanha) e TSH (kit comercial TSH, Elecsys and Cobas© Systems/Roche Diagnostics GmbH, Alemanha); imunoturbidimetria ultrasensível foi empregado na dosagem de PCR (kit comercial *C-Reactive Protein Gen.3*, Cobas© Systems/Roche Diagnostics GmbH, Alemanha); LDL e VLDL foram calculados por fórmula de Friedewald enquanto que o colesterol não-HDL foi calculado pela subtração do colesterol HDL do colesterol total. Adiponectina, leptina e IL-6 foram quantificados pelos seguintes kits ELISA (kit comercial *Human Adiponectin/Acrp30* ELISA, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), (kit comercial *Human Leptin* ELISA, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), (kit comercial *Human IL-6 sR* ELISA, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e os ácidos graxos livres e totais foram quantificados por kit de imunoensaio (kit comercial *Free Fatty Acid Quantitation* kit, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha).

3.6. Análises metabolômicas

As análises metabolômicas foram conduzidas por duas abordagens diferentes: metabolômica direcionada (*targeted*) e metabolômica não-direcionada (*untargeted*).

As análises direcionadas foram realizadas por meio de métodos disponibilizados no portfólio do Grupo Fleury devidamente validados segundo normas da *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI). Aminoácidos no plasma⁸¹, cortisol salivar⁸² e catecolaminas urinárias (*Catecholamines in Urine*, ChromSystemsCE Instruments & Chemicals GmbH, Alemanha) foram os metabólitos quantificados por estes métodos.

Na abordagem não direcionada foram desenvolvidos métodos visando a análise global de metabólitos de baixo peso molecular (metabolômica) e mais focados na extração e análise de lipídios (lipidômica). As etapas do desenvolvimento consistiram em: **(a)** otimizar a extração das amostras biológicas, **(b)** desenvolver o método com padrões comerciais e aplicar nas matrizes biológicas de interesse, **(c)** analisar a reprodutibilidade do método, assim como demais critérios de aceitação para uma análise fidedigna, **(d)** realizar o processamento dos dados e **(e)** interpretar os resultados³¹.

Todas as amostras, independente da abordagem aplicada, foram analisadas de forma randomizada, descongeladas sob controle de temperatura e extraídas em um único lote para a análise em cada uma das metodologias.

3.6.1. Reagentes e padrões

Todos os solventes utilizados foram de grau cromatográfico. Os solventes metanol (MeOH), isopropanol (IPA), diclorometano (DCM) e acetonitrila (ACN) foram obtidos da J.T. Baker, isooctano da Macron e éter metil-terc-butilico (MTBE) da Tedia. Cloridrato de metoxiamina, piridina, N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida com 1% de clorotrimetilsilano (MSTFA+1 % TMCS), ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoroacético (TFA), acetato de amônio, ácido 2,5-dihidroxibenzóico (DHB), ácido α -cianocinâmico (CHCA), 9-aminoacridina (9-AA) foram obtidos da Sigma Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), e solução de calibração “MassPrep calibration MALDI” da Waters (Waters Corporation, Milford, MA, USA). A água ultrapura utilizada no preparo de soluções e reagentes foi obtida do sistema de purificação Milli-Q da Millipore (Millipore Cork, Upstate, USA).

Os padrões utilizados nas análises direcionadas foram: **(a)** cortisol salivar: 4-Pregnen-11 β ,17,21-triol-3,20-dione obtido da Steraloids (Steraloids Inc, Newport, USA) e cortisol-d₄ obtido da Cambridge Isotope Laboratories (Cambridge Isotope Laboratories Inc, Tewksbury, MA, USA), **(b)** aminoácidos no plasma: padrão de aminoácidos fisiológicos, L-allo-isoleucina, L-glicina, L-asparagina, L-glutamina e os respectivos padrões isotópicos foram obtidos da Sigma-aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), **(c)** catecolaminas urinárias: obtido do kit *Catecholamines in Urine*, (ChromSystemsCE Instruments & Chemicals GmbH, Alemanha).

Os padrões comerciais utilizados para o desenvolvimento dos métodos não direcionados foram: **(a)** metabolômica GC: *fatty acid methyl ester* (FAME)

obtido da Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), **(b)** lipidômica: fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), fosfatidiletanolamina (PE), ácido fosfatídico (PA), cardiolipina, lisofosfatidiletanolamina (LPE), lisofosfatidilcolina (LPC), ceramidas (Cer), esfingomiéline (SM), triglicérides (6:0, 8:0, 10:0, 12:0, 14:0, 16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 20:0) obtidos da Larodan (Larodan AB, Solna, Sweden). Padrão isotópico foi utilizado apenas na análise metabólica por GC: ácido-d27-mirístico obtido da Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha).

3.6.2. Soluções de padrões

Nas análises por metabólica direcionada foram utilizadas soluções de calibradores e padrões internos previamente preparados pelo setor de cromatografia, utilizando os padrões mencionados no item 3.6.1.

Na análise metabólica por cromatografia gasosa foi utilizado como padrão interno uma solução de 3 mg/mL de ácido-d27-mirístico em H₂O:IPA:MeOH (2:2:5; v/v/v) e foi adicionado uma solução de 3 mg/mL de FAME em clorofórmio.

Na análise lipidômica por LC *off-line* e MALDI-MS foram utilizados os padrões citados no item 3.6.1 em MeOH em duas concentrações diferentes: 0,1 mg/mL e 50 µg/mL.

3.6.3. Controles de qualidade

Para checar a sensibilidade e reprodutibilidade dos métodos aplicados, foram preparados controles de qualidade (CQ).

As análises metabolômicas direcionadas fizeram uso de CQ específico para cada aplicação. Para análise de cortisol salivar foram preparados *pools* de saliva com e sem adição de uma concentração conhecida de padrão. A análise de catecolaminas urinárias fez uso de CQ comercial em dois níveis (controles Bio-Rad – *Lyphocheck*) (Bio-rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA) e *pool* de urina, assim como a análise de aminoácidos no plasma, a qual utilizou controle comercial “*ClinCheck Plasma Control for Amino Acids*” (RECIPE Chemicals+Instruments GmbH, München, Alemanha) em dois níveis.

Os CQ para a análise metabolômica por GC foram preparados combinando 30 amostras de plasma previamente descaracterizadas e que foram coletadas em tubos com EDTA. Para a análise lipidômica, três controles distintos foram preparados: **1)** *pool* das amostras de pacientes do grupo sem AOS; **2)** *pool* das amostras de pacientes do grupo com AOS e **3)** *pool* de todas as amostras de pacientes do estudo.

Os CQ foram extraídos, analisados e processados da mesma forma que as amostras dos pacientes.

3.6.4. Preparo de amostras

O preparo das amostras nos métodos direcionados (aminoácidos no plasma, catecolaminas no plasma e cortisol na saliva) seguiram os protocolos estabelecidos em rotina (reportados em documentos internos no setor) os quais foram validados segundo normas da CLSI.

O processo de extração para a análise metabolômica não direcionada por GC foi otimizado por meio de um planejamento experimental fatorial (DOE, do inglês “*design of experiment*”, vide Anexo 4) que testou diversos protocolos de precipitação de proteína. A condição final otimizada utilizou 100 µL de plasma nos quais foram adicionados 6 µL de uma solução de padrão interno (item 6.3.1) e 400 µL de uma solução gelada de MeOH:IPA (1:1 v/v). As amostras foram submetidas a banho de ultrassom por 5 minutos e agitação por 20 minutos a 4 °C e 700 rpm. Após agitação, as amostras foram centrifugadas a 4 °C por 10 minutos a 15 800 g e o sobrenadante (350 µL) foi seco em *SpeedVac*. Ao extrato seco foram adicionados 3 µL do padrão FAME e o mesmo foi derivado pela adição de 50 µL de uma solução de metoxiamina em piridina à 40 mg/mL com incubação sob agitação constante de 600 rpm por 16 h a 25 °C. Uma segunda derivação (trimetilsililação) foi realizada por meio da adição de 100 µL de MSTFA+1% TMCS com incubação sob agitação constante de 600 rpm por 1 h a 25 °C. Após a derivação as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a temperatura ambiente à 15 800 g e 100 µL do sobrenadante foi transferido para um *vial* para análise imediata. Os CQ foram extraídos da mesma maneira que as amostra dos pacientes.

Para a análise de lipídios, 250 μ L de plasma foram desproteinizados pela adição de 250 μ L de água e 1,25 mL de MeOH, seguido de agitação por 20 segundos e centrifugação à 3 500 g por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante (1 mL) foi transferido para um tubo de polipropileno de 5 mL e 1,5 mL de MTBE foi adicionado para extração líquido-líquido. As amostras foram então incubadas por 15 minutos a 20 °C sob agitação constante à 800 rpm seguido da adição de 1 mL de água para separação das fases. As amostras foram novamente centrifugadas a 3 500 g por 10 minutos a temperatura ambiente e 600 μ L da fase orgânica foi seca em *SpeedVac*. Os extratos secos foram ressuspensos em 50 μ L de isooctano e submetidos à cromatografia líquida de fase normal para fracionamento. Após o fracionamento nas diferentes classes lipídicas, cada fração foi seca em *SpeedVac* e o extrato seco foi ressuspensado em 10 μ L de uma solução de matriz para a análise por espectrometria de massas de alta resolução com ionização por MALDI. As frações de 2 a 6 foram ressuspensas em DHB a 1 mol/L em 90% MeOH e as demais frações em 9-AA a 10 mg/mL em IPA:ACN (6:4 v/v).

3.6.5. Métodos de aquisição

A análise de cortisol salivar e aminoácidos no plasma foram realizadas por métodos de LC-MS² seguindo protocolos internos previamente validados segundo normas da CLSI, enquanto que a análise de catecolaminas urinárias foi realizada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com detecção eletroquímica seguindo o método descrito no kit *Catecholamines in Urine*, (ChromSystemsCE Instruments & Chemicals GmbH, Alemanha).

Para a análise metabolômica não direcionada por GC foi utilizado um sistema composto por um cromatógrafo a gás modelo 7890B acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo modelo MSD 5977A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) com amostrador modelo 7693. O controle dos módulos e aquisição dos dados foi efetuado pelo programa Mass Hunter (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). O método de análise foi o desenvolvido na plataforma RTL Fiehn da Agilent⁴⁷. Nessa plataforma, adiciona-se um padrão interno nas amostras e o tempo de retenção (TR) dos metabólitos são relativos ao TR do padrão interno que é fixo. A utilização de um tempo de retenção fixo do padrão interno (RTL, do inglês “*retention time locking*”) reduz a variabilidade no tempo de retenção em cada amostra e essa informação, junto aos espectros de massas por ionização por elétrons, são empregados para a identificação dos metabólitos pela biblioteca disponível no *software* (Agilent Fiehn GC/MS Metabolomics RTL Library versão A.01.00). No método utiliza-se uma coluna DB-5MS (30 m x 250mm x 0,25 µm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) com 10 m de pré-coluna DuraGuard (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), e temperatura inicial do forno de 60 °C. Essa temperatura é mantida por 1 minuto e após esse período é elevada a 320 °C em uma velocidade de 10 °C/min. A temperatura final é mantida por 10 minutos. O tempo total de corrida foi de 37 minutos. O volume injetado foi de 1 µL no modo *splitless* com temperatura do injetor de 250 °C. Como gás de arraste foi utilizado hélio a um fluxo de 0,735 mL/min (8 psi). A temperatura de interface entre o GC e o espectrômetro de massas foi de 310 °C. As análises no espectrômetro de massas foram no modo *full scan* na faixa de relação massa/carga (*m/z*) 50-550

com solvente *delay* de 6,5 minutos. A temperatura da fonte e do quadrupolo foram de 280 °C e 180 °C, respectivamente.

Para a análise de lipídios foi utilizado um sistema cromatográfico ACQUITY UPLC I-Class (bomba binária Acquity, amostrador FTN, forno de colunas, detector PDA) (Waters Corporation, Milford, MA, USA) acoplado a um pipetador automático programado para coletar as frações *off-line* (Liquid Handler 215 da Gilson Inc., França). Para a identificação e quantificação relativa dos lipídios foi utilizado um espectrômetro de massas de alta resolução do tipo híbrido quadrupolo-tempo de voo (Q-ToF) Synapt G1 operando com fonte de ionização por MALDI (Waters Corporation, Milford, MA, USA). A separação cromatográfica dos lipídios foi realizada utilizando diclorometano (fase A) e MeOH com adição de 0,2% de ácido acético (fase B) a um fluxo de 0,9 mL/min. O volume de 10 µL de amostra foi injetado na coluna Luna Sílica (3 µm x 100 mm x 2 mm, Phenomenex) condicionada a 40 °C, seguindo o gradiente de eluição e as coletas de frações descrito na Tabela 1. Diversos gradientes foram testados para a obtenção da melhor separação entre as classes lipídicas (Anexo 3).

Tabela 1: Gradiente de eluição utilizado na separação cromatográfica das classes lipídicas para posterior análise por ionização/dessorção a laser auxiliada por matriz (MALDI-MS). Para detalhes das fases móveis utilizadas, vide texto.

Tempo (min)	% Fase móvel B	Fração
0-2,5	0	F1
2,5-4,5	25	F2
4,5-8,5	50	F3 a F6 (1/minuto)
8,5-12,5	100	F7 e F8 (1/2 minutos)
12,5-17,5	100	F9 e F10 (1/ 2,5 minutos)
17,5-20,5	0	
20,5-23,0	0	

O espectrômetro de massas foi operado com fonte de ionização por MALDI, utilizando como matriz: DHB 1 mol/L em 90% MeOH para as frações 2 a 6, e 9-AA 10 mg/mL em IPA:ACN (6:4 v/v) para as demais frações. A aquisição foi feita no modo espiral com 90 segundos de aquisição e 1 *scan/s* na faixa de *m/z* 100 – 2 000. *Firing rate*, *step rate* e *lazer energy* aplicados foram 200, 20 e 300 Hz, respectivamente. Foi utilizado uma mistura de PEG como *lockmass* para correção posterior das *m/z* obtidas. O método foi validado com *pool* de amostras descaracterizadas e parâmetros como precisão e identificação das classes por espectros de MS² foram avaliados para cada uma das frações isoladas por LC.

3.6.6. Instrumentação

Outros instrumentos foram utilizados para preparo das amostras, sendo eles: Thermomixer *Confort* com suporte para tubos de 0,5 mL e 5 mL e Centrífuga 5810R (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha); *Multitherm Heat Shake* (Benchmark Scientific, Inc, Edison, NJ); banho de ultrassom Elmasonic P (Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Alemanha); *Positive Pressure-96* (Waters Corporation, Milford, MA, USA); *SpeedVac Concentrator Savant SPD131DDA* com *Refrigerator Vapor Trap Savant RVT5105* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

3.6.7. Processamento dos dados

Os dados adquiridos por meio das plataformas desenvolvidas para o projeto foram processados em *softwares* específicos para estudos

metabolômicos. Foram utilizados os *softwares* Mass Hunter (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) para os estudos metabolômicos não direcionados por GC-MS e para os estudos lipidômicos a plataforma R, utilizando o pacote MALDIquant com adaptações desenvolvidas pela equipe de tecnologia em informática do Grupo Fleury.

Tais *softwares* realizaram funções de integração, deconvolução de picos, alinhamento do conjunto de dados, correção de diferença de massa e detecção dos picos e íons diferencialmente expressos. Após o processamento, os dados foram exportados em tabelas no formato “.xls” com as respectivas *m/z* e intensidades para cada amostra.

3.7. Análise estatística

Os marcadores que estariam independentemente associados a AOS foram apresentados com as respectivas médias e desvio-padrão, mediana ou porcentagem quando apropriados, e os seguintes testes estatísticos foram aplicados:

1. Às análises direcionadas (perfil clínico, imunoensaios, aminoácidos, cortisol e catecolaminas), avaliação clínica e bioimpedância, foram comparadas as médias e desvio-padrão entre as amostras/grupo por teste *t*, assim como avaliação de especificidade e sensibilidade por curva *receiver operating characteristic* (ROC) avaliando a área sob a curva (AUC) individual para cada analito/variável de estudo.

2. As análises não direcionadas (metabolômica e lipidômica) tiveram seus dados tratados utilizando métodos de análise discriminante por regressão dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA) conjuntamente em vários marcadores para avaliar a diferença entre os grupos de estudo, e uma lista de predição de variável de importância (VIP) foi responsável por apontar os metabólitos diferencialmente expressos. Este processamento contou com aplicação de filtros analítico e biológico de 75%, normalização dos dados por escalonamento *pareto* e imputação de menor valor às lacunas zeradas. Em paralelo, os dados foram comparados através das médias e desvio-padrão entre as amostras/grupo por teste *t*, assim como avaliação de especificidade e sensibilidade por curva ROC avaliando a AUC individual para cada analito/variável de estudo.

Para ambos os casos, foram considerados significantes os metabólitos que apresentaram um $p < 0,05$ para o teste *t*, e $VIP\ score > 2,0$ ⁸³⁻⁸⁴.

Os metabólitos significantes foram submetidos à correlação de Pearson com marcadores habitualmente utilizados para diagnóstico da AOS (IAH, saturação mínima de O₂ e tempo total de sono (TTS) <Sat O₂ 90%), e os metabólitos com correlação significativamente diferente de zero foram submetidos a regressão logística construídos a partir do método Stepwise Backward segundo o critério de Akaike (AIC)⁸⁵⁻⁸⁶. Foram avaliados os metabólitos individualmente e em combinação, buscando o melhor perfil de metabólitos que descrevesse as alterações ocasionadas pela doença em estudo. Questionários usualmente utilizados para diagnóstico da AOS foram levados em consideração para a avaliação estatística dos metabólitos.

O processamento estatístico foi realizado utilizando a plataforma R e o *software on-line* Metaboanalystic 3.0.

4. Resultados

Um total de 53 participantes foram incluídos no estudo dos 73 indivíduos previamente selecionados. Desses 53 participantes, 16 fizeram parte do grupo sem AOS (IAH <15 ev/h) e 37 do grupo com AOS (IAH ≥15 ev/h). Os 20 participantes excluídos apresentaram predomínio de apneia central diagnosticada no exame de PSG, idade e IMC não pareados, doenças cardiovasculares assintomáticas e subdiagnosticadas ou praticavam atividades físicas regularmente. Dos 25 participantes pré-diagnosticados com baixo risco para a AOS por meio do questionário de Berlim, apenas 11 tiveram seu diagnóstico comprovado após o exame de PSG permanecendo no grupo sem AOS, enquanto que 14 foram diagnosticados com alto risco por PSG, passando a compor o grupo com AOS. O mesmo ocorreu aos pacientes pré-selecionados com alto risco. Dos 38 encaminhados à PSG, 10 foram excluídos conforme citado anteriormente e 5 apresentaram baixo IAH sendo classificados como sem AOS (Figura 5). A amostragem selecionada contava com 3,8% de indivíduos de raça amarela, 66% brancos, 9,4% negros e 20,8% pardos.

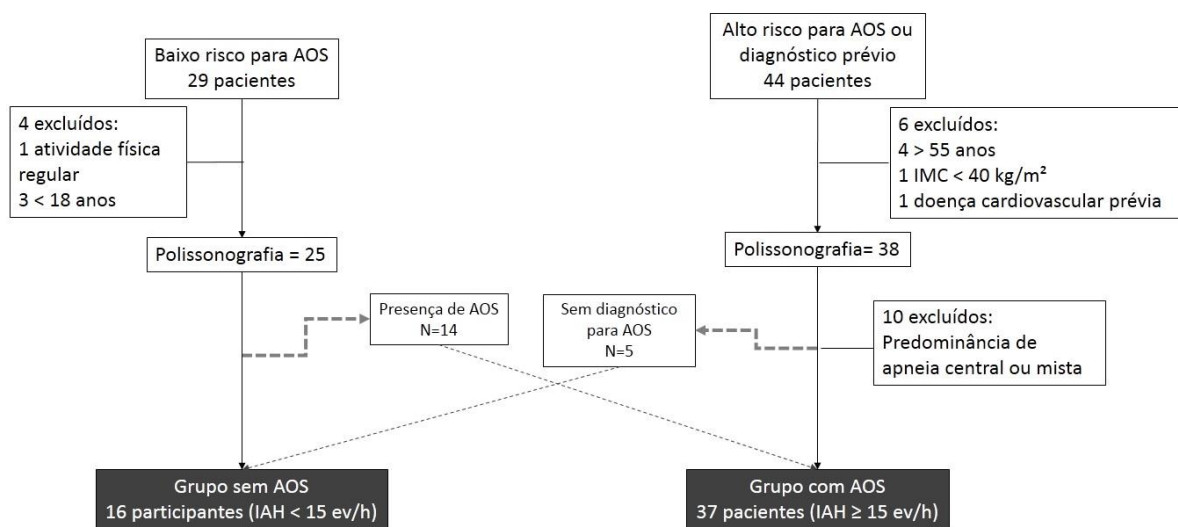


Figura 5 – Fluxograma de seleção de pacientes.

As tabelas de 2 a 7 reportam os resultados obtidos para as análises quantitativas quando comparados os dois grupos de estudo. Tais análises englobam:

- (a) discriminação dos participantes obtida por meio dos parâmetros de avaliação clínica, exame de bioimpedância e PSG (Tabela 2), os dados individuais dos pacientes podem ser vistos no Anexo 5;

Tabela 2 – Avaliação clínica dos participantes selecionados. Representação das médias e desvio-padrão de cada analito dividido por grupo de estudo, junto com o valor de *p* obtido, o intervalo de confiança (IC) de 95%, assim como a avaliação da especificidade e sensibilidade (AUC) com IC de 95%. Valores de *p* <0,05 foram considerados estatisticamente significantes(*).

Parâmetros	Sem AOS (n=16)	Com AOS (n=37)	Valores de <i>p</i>	IC 95%	AUC (IC 95%)
Idade (anos)	36 ± 6	39 ± 7	0,151	[-7,14; 0,81]	0,626 (0,786 - 0,466)
IMC (kg/m ²)	30,3 ± 3,5	30,6 ± 3,4	0,399	[-2,46; 1,79]	0,574 (0,748 - 0,401)
Circunf. de pescoço (cm)	40,9 ± 2,4	42,5 ± 2,1	0,027*	[-2,92; -0,07]	0,693 (0,869 - 0,518)
Circunf. de cintura (cm)	104,9 ± 9,5	106,1 ± 9,7	0,405	[-7,01; 4,64]	0,573 (0,746 - 0,401)
Circunf. de quadril (cm)	109,5 ± 9,1	108,2 ± 8,5	0,946	[-4,16; 6,81]	0,507 (0,684 - 0,330)
PAS (mm Hg)	123,3 ± 8,1	126,3 ± 10,7	0,204	[-8,48; 2,4]	0,611 (0,781 - 0,442)
PAD (mm Hg)	79,6 ± 7,5	85,7 ± 10,7	0,047*	[-11,24; -0,86]	0,674 (0,828 - 0,520)
IAH geral (ev/h)	7,4 ± 3,9	39,1 ± 23,5	<0,001*	[-39,75; -23,61]	1,000 (1,000 - 1,000)
Sat. Mínima (%)	88,8 ± 2,8	79,7 ± 7,5	<0,001*	[6,27; 11,95]	0,907 (0,991 - 0,823)
TTS c/ Sat<90% (%)	0,1 ± 0,1	7,4 ± 11,9	<0,001*	[-11,27; -3,30]	0,930 (0,998 - 0,862)
Massa Muscular (kg)	36,9 ± 2,7	36,7 ± 5,1	0,727	[-2,04; 2,31]	0,531 (0,689 - 0,374)
Massa Gordura (kg)	27,2 ± 11,5	29,2 ± 8,2	0,178	[-8,58; 4,57]	0,618 (0,798 - 0,439)
% Gordura	28,7 ± 7,4	30,8 ± 5,9	0,237	[-6,42; 2,18]	0,604 (0,783 - 0,424)
AGV (cm ²)	115,2 ± 41,3	122,1 ± 34,4	0,314	[-31,21; 17,40]	0,589 (0,769 - 0,408)
TMB (kcal)	1770,7 ± 100,8	1765,9 ± 184,1	0,713	[-74,39; 83,98]	0,533 (0,691 - 0,375)

AOS: apneia obstrutiva do sono; **AUC:** área sob a curva; **AGV:** área de gordura visceral; **IAH:** índice de apneia-hipopneia; **IC:** intervalo de confiança; **IMC:** índice de massa corpórea; **PAD:** pressão arterial diastólica; **PAS:** pressão arterial sistólica; **TMB:** taxa metabólica basal; **TTS:** tempo total de sono.

(b) avaliação do perfil clínico (Tabela 3) e marcadores analisados por kits de imunoensaios (Tabela 4), os dados individuais dos pacientes podem ser vistos no Anexo 6 e 7, respectivamente;

Tabela 3 – Avaliação dos exames de perfil clínico dos participantes selecionados realizados por exames do portfólio do Grupo Fleury. Representação das médias e desvio-padrão de cada analito dividido por grupo de estudo, junto com o valor de p obtido, o intervalo de confiança (IC) de 95%, assim como a avaliação da especificidade e sensibilidade (AUC) com IC de 95%. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes(*).

Perfil Clínico	Sem AOS (n=16)	Com AOS (n=37)	Valores de p	IC 95%	AUC (IC 95%)
Glicose (mg/dL)	94,6 ± 9,6	90,4 ± 5,4	0,159	[-1,18; 9,56]	0,623 (0,804 - 0,442)
Proteína C reativa (mg/dL)	0,27 ± 0,21	0,32 ± 0,33	0,907	[-0,20; 0,10]	0,511 (0,682 - 0,34)
Colesterol total (mg/dL)	184,1 ± 32,4	192,6 ± 26,1	0,265	[-27,53; 10,35]	0,598 (0,784 - 0,412)
Colesterol HDL (mg/dL)	40,1 ± 7,8	40,3 ± 11,3	0,756	[-5,72; 5,14]	0,528 (0,697 - 0,359)
Colesterol VLDL (mg/dL)	28,1 ± 17,8	30,7 ± 14,0	0,309	[-12,92; 7,77]	0,590 (0,768 - 0,411)
Colesterol LDL (mg/dL)	115,9 ± 24,2	121,8 ± 28,3	0,318	[-21,42; 9,65]	0,588 (0,759 - 0,416)
Triglicérides (mg/dL)	140,2 ± 88,5	153,3 ± 70,0	0,304	[-64,62; 38,47]	0,590 (0,768 - 0,413)
Colesterol não-HDL (mg/dL)	144,0 ± 32,8	152,3 ± 31,8	0,197	[-28,22; 11,63]	0,613 (0,792 - 0,434)
TSH (mU/l)	2,1 ± 1,1	1,9 ± 0,8	0,485	[-0,43; 0,89]	0,562 (0,75 - 0,373)
Insulina (mU/l)	14,5 ± 7,9	15,5 ± 8,8	0,801	[-5,99; 3,96]	0,523 (0,706 - 0,34)
Índice HOMA-IR	3,4 ± 1,9	3,4 ± 2,0	0,946	[-1,24; 1,18]	0,507 (0,693 - 0,321)

AOS: apneia obstrutiva do sono; **AUC:** área sob a curva; **IC:** intervalo de confiança; **HDL:** lipoproteína de alta densidade; **LDL:** lipoproteína de baixa densidade; **VLDL:** lipoproteína de densidade muito baixa; **TSH:** hormônio tireoide estimulante.

Tabela 4 – Avaliação das moléculas quantificadas por imunoensaios dos participantes selecionados. Representação das médias e desvio-padrão de cada analito dividido por grupo de estudo, junto com o valor de p obtido, o intervalo de confiança (IC) de 95%, assim como a avaliação da especificidade e sensibilidade (AUC) com IC de 95%. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes(*).

Imunoensaios	Sem AOS (n=16)	Com AOS (n=37)	Valores de p	IC 95%	AUC (IC 95%)
Ácidos Graxos Livres e Totais (nmol)	0,6 ± 0,2	0,6 ± 0,3	0,839	[-0,18; 0,11]	0,519 (0,702 - 0,335)
Adiponectina (ug/mL)	718,9 ± 400,8	667,1 ± 373,4	0,498	[-189,38; 293]	0,560 (0,746 - 0,374)
Leptina (ng/mL)	6,3 ± 10,7	3,9 ± 7,1	0,140	[-3,63; 8,47]	0,628 (0,794 - 0,463)
Interleucina-6 (ng/mL)	72,1 ± 13,3	68,8 ± 10,9	0,361	[-4,54; 11,06]	0,581 (0,772 - 0,390)

AOS: apneia obstrutiva do sono; **AUC:** área sob a curva; **IC:** intervalo de confiança.

(c) metabólica direcionada (*targeted*) realizada por avaliação do cortisol salivar (Tabela 5), catecolaminas urinárias (Tabela 6) e aminoácidos no plasma (Tabela 7), os dados individuais dos pacientes podem ser vistos no Anexo 8, 9 e 10, respectivamente.

Tabela 5 – Avaliação do cortisol salivar nos três períodos de coleta dos participantes selecionados. Representação das médias e desvio-padrão de cada analito dividido por grupo de estudo, junto com o valor de p obtido, o intervalo de confiança (IC) de 95%, assim como a avaliação da especificidade e sensibilidade (AUC) com IC de 95%. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes(*).

Cortisol (ng/dL)	Sem AOS (n=16)	Com AOS (n=37)	Valores de p	IC 95%	AUC (IC 95%)
Manhã	239,5 ± 119,8	256,4 ± 185,5	0,822	[-103,72; 69,89]	0,521 (0,687 - 0,355)
Tarde	67,9 ± 40,5	76,8 ± 70,7	0,717	[-40,19; 22,33]	0,533 (0,696 - 0,37)
Noite	33,5 ± 40,6	22,8 ± 17,2	0,766	[-11,59; 32,89]	0,473 (0,649 - 0,297)

AOS: apneia obstrutiva do sono; **AUC:** área sob a curva; **IC:** intervalo de confiança;

Tabela 6 – Avaliação de catecolaminas urinárias dos participantes selecionados. Representação das médias e desvio-padrão de cada analito dividido por grupo de estudo, junto com o valor de p obtido, o intervalo de confiança (IC) de 95%, assim como a avaliação da especificidade e sensibilidade (AUC) com IC de 95%. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes(*).

Catecolaminas (µg/24h)	Sem AOS (n=16)	Com AOS (n=37)	Valores de p	IC 95%	AUC (IC 95%)
Noradrenalina	33,3 ± 18,2	40,1 ± 20,8	0,277	[-18,32; 4,86]	0,596 (0,771 - 0,422)
Adrenalina	5,5 ± 5,8	6,4 ± 5,8	0,289	[-4,46; 2,61]	0,590 (0,752 - 0,427)
Dopamina	144,9 ± 81,1	180,4 ± 84,3	0,186	[-85,74; 14,65]	0,617 (0,794 - 0,439)

AOS: apneia obstrutiva do sono; **AUC:** área sob a curva; **IC:** intervalo de confiança;

Tabela 7 – Avaliação de aminoácidos no plasma dos participantes selecionados. Representação das médias e desvio-padrão de cada analito dividido por grupo de estudo, junto com o valor de p obtido, o intervalo de confiança (IC) de 95%, assim como a avaliação da especificidade e sensibilidade (AUC) com IC de 95%. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes(*).

Aminoácidos (μM)	Sem AOS (n=16)	Com AOS (n=37)	Valores de p	IC 95%	AUC (IC 95%)
Ácido aspártico	4,7 \pm 1,0	5,1 \pm 1,5	0,467	[-1,05; 0,40]	0,564 (0,734 - 0,395)
Ácido glutâmico	83,5 \pm 22,5	66,7 \pm 24,5	0,023*	[2,70; 30,92]	0,698 (0,847 - 0,549)
Alanina	333,8 \pm 61,1	339,7 \pm 71,2	0,723	[-45,07; 33,25]	0,532 (0,710 - 0,354)
Aloisoleucina	3,9 \pm 1,4	3,4 \pm 1,4	0,378	[-0,42; 1,30]	0,578 (0,750 - 0,405)
Arginina	57,6 \pm 10,6	63,6 \pm 14,1	0,119	[-13,15; 1,10]	0,637 (0,803 - 0,471)
Asparagina	36,2 \pm 4,8	36,0 \pm 8,1	0,691	[-3,34; 3,9]	0,535 (0,693 - 0,378)
Citrulina	30,0 \pm 5,3	29,6 \pm 7,0	0,642	[-3,17; 3,93]	0,541 (0,703 - 0,38)
Fenilalanina	44,6 \pm 16,5	46,3 \pm 20,9	0,846	[-12,61; 9,13]	0,518 (0,678 - 0,358)
Glicina	208,4 \pm 52,2	211,1 \pm 41,4	0,574	[-33,11; 27,71]	0,550 (0,734 - 0,366)
Glutamina	585,2 \pm 61,9	633,5 \pm 93,7	0,067	[-92,43; -4,32]	0,660 (0,812 - 0,509)
Hidroxi prolina	10,4 \pm 4,0	11,6 \pm 4,3	0,318	[-3,71; 1,27]	0,588 (0,762 - 0,414)
Histidina	69,8 \pm 10,5	73,6 \pm 6,8	0,215	[-9,82; 2,10]	0,609 (0,794 - 0,424)
Isoleucina	84,8 \pm 15,4	85,3 \pm 16,5	0,757	[-10,17; 9,06]	0,528 (0,710 - 0,346)
Leucina	152,9 \pm 24	152,0 \pm 24,0	0,946	[-13,82; 15,64]	0,507 (0,695 - 0,319)
Lisina	173,7 \pm 34,2	180,0 \pm 31,4	0,342	[-26,80; 14,24]	0,584 (0,757 - 0,411)
Metionina	25,1 \pm 3,1	26,4 \pm 2,9	0,337	[-3,14; 0,61]	0,584 (0,754 - 0,415)
Ornitina	81,5 \pm 18,8	80,5 \pm 19,5	0,794	[-10,59; 12,69]	0,524 (0,707 - 0,34)
Prolina	200,1 \pm 48,8	205,7 \pm 39	0,611	[-34,11; 22,86]	0,546 (0,732 - 0,359)
Serina	100,6 \pm 11,2	94,8 \pm 18,2	0,104	[-2,46; 14,05]	0,643 (0,794 - 0,492)
Taurina	28,1 \pm 25,4	28,8 \pm 21,6	0,969	[-15,71; 14,23]	0,496 (0,679 - 0,312)
Tirosina	52,4 \pm 19,1	56,5 \pm 17,1	0,584	[-15,41; 7,35]	0,549 (0,728 - 0,37)
Treonina	91,2 \pm 12,1	93,6 \pm 17,5	0,786	[-10,82; 6,04]	0,476 (0,639 - 0,312)
Triptofano	71,5 \pm 11,4	71,2 \pm 8,4	0,713	[-6,28; 6,89]	0,533 (0,733 - 0,332)
Valina	252,8 \pm 29,3	252,6 \pm 37,6	0,698	[-19,24; 19,63]	0,465 (0,632 - 0,299)

AOS: apneia obstrutiva do sono; **AUC:** área sob a curva; **IC:** intervalo de confiança.

A respeito da análise metabólica por GC-MS, é possível observar a diferença dos grupos por meio do gráfico de PLS-DA. A análise dos CQ avaliados durante o procedimento não apresentou diferença significativa, confirmando a alta precisão e robustez do método. Na Figura 6 é possível observar o perfil dos CQ avaliados em conjunto com as amostras dos grupos com e sem AOS.

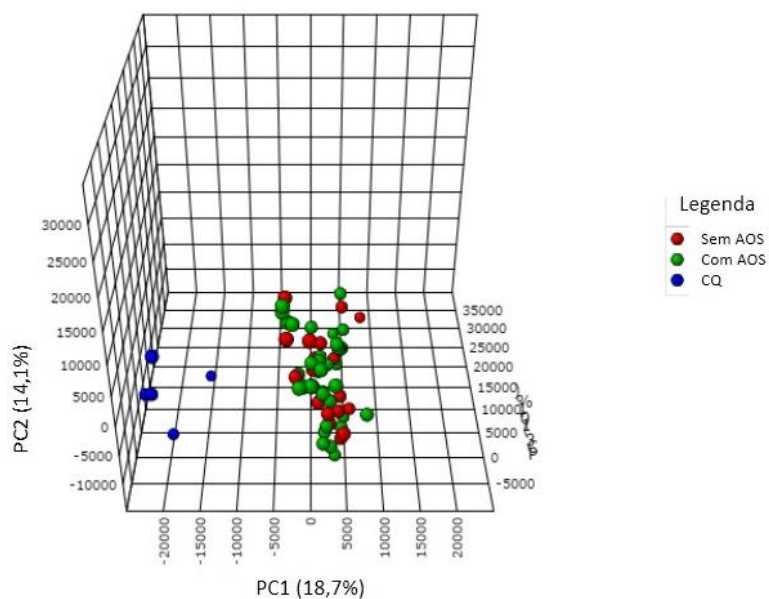


Figura 6 – Avaliação por análise discriminante por regressão dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA) em 3D do perfil dos controles de qualidade (azul) em conjunto com as amostras dos grupos com apneia obstrutiva do sono (AOS (verde) e sem AOS (vermelho) adquiridos durante a análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS).

As áreas dos padrões internos adicionados às amostras foram também avaliadas como outro critério de CQ e foram observadas variações inferiores a 20% para todas as replicatas analisadas. A Figura 7 mostra a separação dos grupos com uma acurácia de 70,7% para os metabólitos analisados por GC-MS, validada pelos modelos R^2 (0,9933) e Q^2 (0,6551).

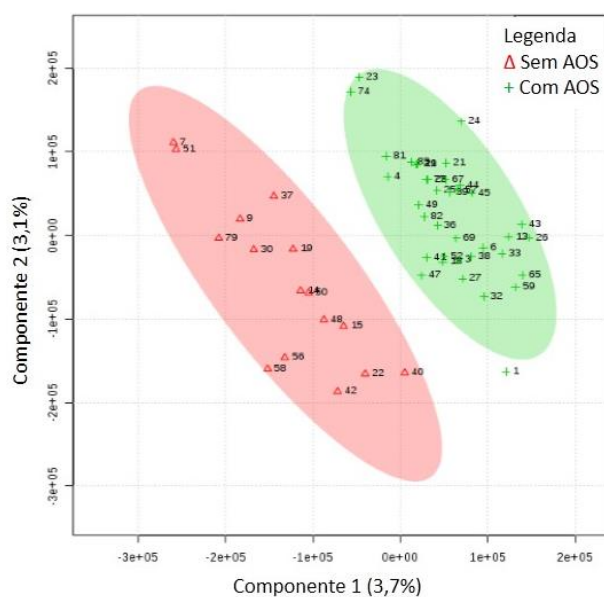


Figura 7 – Gráfico de escores do modelo de análise discriminante por regressão dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA) dos metabólitos significativos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS) do grupo sem AOS (Δ) e com AOS (+).

Os metabólitos responsáveis por essa distinção foram avaliados estatisticamente por meio dos testes t e VIP score e foram considerados significantes aqueles que, quando comparados entre os grupos de estudo, apresentaram um valor de $p < 0,05$ concomitantemente com um $VIP > 2$. A Tabela 8 descreve os metabólitos que apresentaram significância estatística entre os grupos. Nela estão representadas as médias das áreas absolutas e os respectivos desvio-padrão de cada metabólito, assim como os valores de discriminação estatística dentro de IC de 95%. No Anexo 11 é possível visualizar todos os metabólitos avaliados pela plataforma de GC-MS.

Tabela 8: Identificação dos metabólitos significativamente alterados obtidos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS) após análise estatística.

Metabólitos	Sem AOS (n=16)	Com AOS (n=37)	Valores de <i>p</i>	IC 95%	AUC (IC 95%)	VIP
6-deoxi-D-glicose	2,6 ± 1,8	4,4 ± 2,5	0,021	[-2,96; -0,48]	0,694 (0,834 - 0,555)	2,637
Glutamina	65,9 ± 31,1	62,7 ± 25	0,008	[-14,91; 21,38]	0,732 (0,883 - 0,582)	2,806
2,6-Difenil-1,7-dihidrodipirrólo [2,3-b:3',2'-e]piridina	9,2 ± 3,2	10,2 ± 3,4	0,021	[-3,06; 0,95]	0,703 (0,854 - 0,551)	3,046
5,5'-Biphthalide	2,2 ± 1,9	1,6 ± 2,1	0,019	[-0,67; 1,70]	0,702 (0,859 - 0,544)	2,229
Ácido 9-hexadecenóico	73,3 ± 13,2	77,4 ± 13,7	0,011	[-12,34; 3,98]	0,720 (0,875 - 0,565)	2,837
Ácido araquidônico	7,3 ± 2,5	10,1 ± 11,9	0,036	[-6,87; 1,39]	0,682 (0,827 - 0,538)	2,381

AOS: apneia obstrutiva do sono; **AUC:** área sob a curva; **IC:** intervalo de confiança; **VIP:** predição de variável de importância.

O estudo lipidômico contou com processos experimentais mais laborosos, com fracionamento por cromatografia em fase normal e posterior análise por MALDI-MS. A análise dos CQ adquiridos durante o experimento não apresentou diferenças ao serem avaliados por PLS-DA (Anexo 12). A reprodutibilidade e robustez do método foram também avaliados por meio da análise de *pool* de amostras descaracterizadas. A Figura 8 mostra a separação das frações lipídicas coletadas em triplicata a partir de um *pool* de amostras descaracterizadas sendo possível observar que não houve coeluição das frações no método cromatográfico desenvolvido.

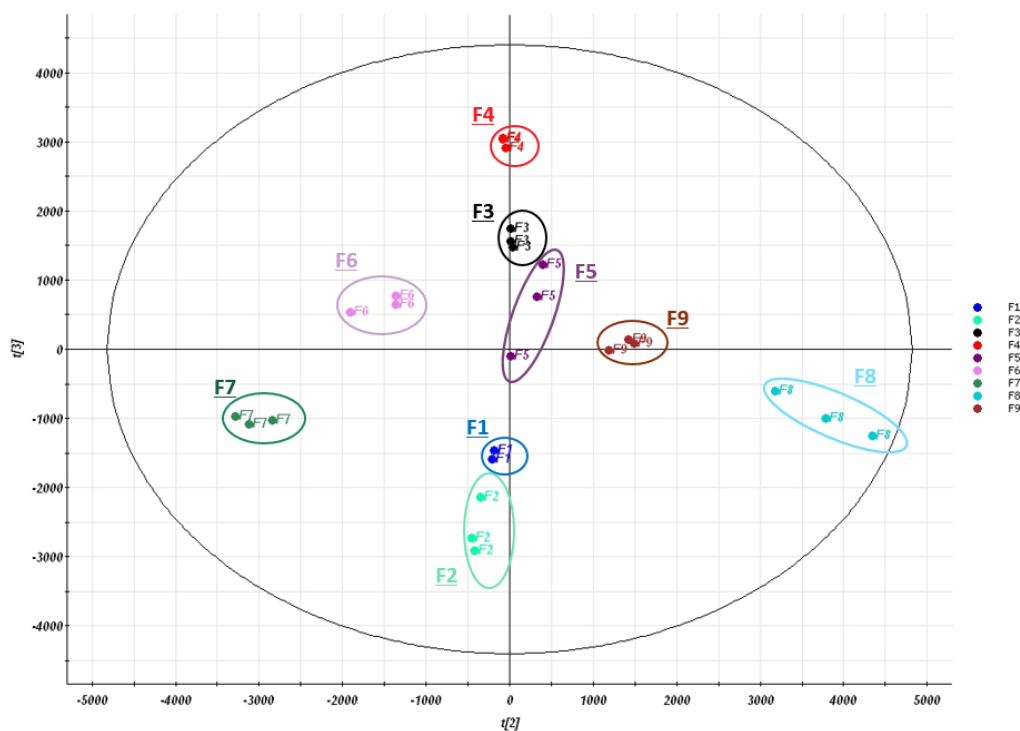


Figura 8 – Gráfico de escores do modelo de análise discriminante por regressão dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA) mostrando a eficiência da separação das frações de lipídios por cromatografia líquida de um *pool* de amostras de plasma extraído em triplicata. F_n identifica as frações coletadas, onde o n é o número da fração.

Para a detecção e identificação das classes por MALDI-MS, o método foi desenvolvido utilizando aquisição dependente de dados, no qual o perfil de fragmentação dos lipídios presentes em cada fração foi monitorado e confirmado com padrões de alguns lipídios disponíveis comercialmente (Tabela 9).

Tabela 9 – Perfil de fragmentação por espectrometria de massas sequencial (MS²) observado para as classes de lipídios analisados e validados para o método de fracionamento por cromatografia em fase normal.

Classes de lipídios		Íons produtos característicos			
PC e LPC	<i>m/z</i> 184	<i>m/z</i> 125	<i>m/z</i> 60	<i>m/z</i> 86	
PE e LPE	M-141	<i>m/z</i> 164	M-43		
PI	<i>m/z</i> 283	<i>m/z</i> 287			
PS	M-184	M-87	M-179		
SM	<i>m/z</i> 184	<i>m/z</i> 125	[M+Na] ⁺ – 183	[M+Na] ⁺ -N(CH ₃) ₃	
Cer	<i>m/z</i> 264	<i>m/z</i> 165			
PA		Apenas íons precursores			
CL		Apenas íons precursores			
TG	<i>m/z</i> 144	<i>m/z</i> 57	<i>m/z</i> 189		

Cer: ceramidas; **CL:** cardiolipinas; **LPC:** lisofosfatidilcolina; **LPE:** lisofosfatidiletanolamina; **M:** massa do composto; **Na:** sódio; **PA:** ácido fosfatídico; **PC:** fosfatidilcolina; **PE:** fosfatidiletanolamina; **PI:** fosfatidilinositol; **PS:** fosfatidilserina; **SM:** esfingolielina; **TG:** triglicérides.

A análise das amostras no estudo lipidômico foi realizada após a avaliação dos CQ e foi possível visualizar a separação dos grupos nas diferentes frações coletadas por LC *off-line* (Anexo 13). Os lipídios responsáveis por essa distinção foram avaliados por meio do teste *t* e *VIP score* assim como na análise metabolômica e a significância foi atribuída do mesmo modo. A Tabela 10 descreve os lipídios que apresentaram significância estatística com respectivas médias das intensidades de cada analito normalizadas após o processamento e desvio-padrão, assim como os valores de discriminação estatística com IC de 95%.

Tabela 10 – Identificação dos lipídios estatisticamente significantes responsáveis pela distinção dos grupos de estudo. Representação das médias e desvio-padrão das áreas normalizadas de cada analito dividido por grupo de estudo, junto com o valor de p obtido e o VIP score, o intervalo de confiança (IC) de 95%, assim como a avaliação da especificidade e sensibilidade (AUC) com IC de 95%. Valores de $p < 0,05$ e VIP > 2 foram considerados estatisticamente significantes.

Lipídios	Sem AOS (n=16)	Com AOS (n=37)	Valores de p	IC 95%	AUC (IC 95%)	VIP score
DG(45:8)	0,17 ± 0,05	0,14 ± 0,03	0,022	[-0,14; 5,23]	0,699 (0,875 - 0,523)	2,016
Cer(d18:1/16:0)	0,24 ± 0,05	0,27 ± 0,04	0,044	[-5,63; 0,13]	0,676 (0,836 - 0,515)	2,540
PA(35:2)	0,14 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,064	[-0,05; 2,42]	0,662 (0,828 - 0,497)	3,780
PE(36:5)	0,18 ± 0,07	0,25 ± 0,10	0,023	[-11,69; -1,50]	0,698 (0,850 - 0,545)	3,426
PE(35:1)	0,15 ± 0,09	0,22 ± 0,11	0,018	[-12,92; -1,30]	0,704 (0,856 - 0,553)	3,516
PE(38:6)	0,17 ± 0,11	0,26 ± 0,15	0,032	[-16,44; -1,46]	0,688 (0,842 - 0,535)	3,893
PE(38:5)	0,16 ± 0,13	0,27 ± 0,16	0,019	[-18,93; -2,04]	0,705 (0,858 - 0,552)	4,301
PE(37:3)	0,17 ± 0,09	0,25 ± 0,13	0,018	[-14,44; -1,74]	0,704 (0,857 - 0,552)	3,768
PE(37:2)	0,19 ± 0,13	0,29 ± 0,17	0,024	[-18,77; -1,78]	0,696 (0,850 - 0,542)	4,180
PE(39:4)	0,12 ± 0,06	0,16 ± 0,07	0,040	[-8,25; -0,67]	0,679 (0,838 - 0,52)	2,749
PC(33:3)	0,88 ± 0,33	0,74 ± 0,29	0,030	[-4,92; 34,14]	0,694 (0,850 - 0,539)	3,761
PC(36:4)	1,64 ± 0,36	1,49 ± 0,34	0,021	[-6,86; 36,31]	0,706 (0,860 - 0,551)	3,548
PC(35:5)	1,09 ± 0,24	0,98 ± 0,23	0,019	[-4,39; 24,70]	0,709 (0,865 - 0,554)	2,974
PC(34:0)	0,93 ± 0,29	0,79 ± 0,26	0,022	[-4,41; 30,31]	0,704 (0,856 - 0,551)	3,505
PC(37:7)	0,85 ± 0,19	0,79 ± 0,19	0,074	[-5,24; 17,79]	0,661 (0,817 - 0,505)	2,055
PC(37:6)	1,08 ± 0,24	0,98 ± 0,23	0,030	[-4,86; 24,70]	0,694 (0,852 - 0,537)	2,883
PC(36:1)	1,00 ± 0,19	0,91 ± 0,22	0,037	[-3,62; 21,58]	0,687 (0,833 - 0,541)	2,730
SM(d18:1/12:0)	0,24 ± 0,09	0,30 ± 0,08	0,025	[-12,35; -1,06]	0,694 (0,860 - 0,529)	2,449
SM(d18:1/24:0)	0,25 ± 0,09	0,31 ± 0,05	0,038	[-10,78; -0,46]	0,681 (0,855 - 0,507)	2,304
SM(d18:1/26:1(17Z))	0,28 ± 0,09	0,33 ± 0,04	0,058	[-10,50; 0,16]	0,666 (0,84 - 0,491)	2,157
LPC(27:1)	0,18 ± 0,05	0,22 ± 0,05	0,008	[-7,41; -1,27]	0,730 (0,882 - 0,578)	2,955
LPC(27:0)	0,24 ± 0,09	0,29 ± 0,09	0,051	[-10,90; -0,10]	0,671 (0,828 - 0,513)	2,837

AOS: apneia obstrutiva do sono; **AUC:** área sob a curva; **Cer:** ceramidas; **DG:** diacilglicérides; **IC:** intervalo de confiança; **LPC:** lisofosfatidilcolina; **PA:** ácido fosfatídico; **PC:** fosfatidilcolina; **PE:** fosfatidiletanolamina; **VIP:** predição de variável de importância.

Os questionários de pré-seleção aplicados habitualmente no diagnóstico prévio para a AOS (NoSAS score e questionário de Berlin) também foram avaliados estatisticamente. Os resultados podem ser vistos na Tabela 11 a qual reporta valores estatísticos para alto risco de predisposição para a AOS com os respectivos valores de p e AUC para o diagnóstico da AOS.

Tabela 11 – Resultado estatístico para alto risco de predição para a apneia obstrutiva do sono (AOS) a partir de questionários de pré-seleção habitualmente aplicados e a presença subjetiva de ronco. Representação das médias e desvio-padrão junto com o valor de p obtido, assim como a avaliação da especificidade e sensibilidade (AUC) com IC de 95%. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes(*).

	Sem AOS (n=16)	Com AOS (n=37)	Valores de p	AUC (IC 95%)
Berlim (alto risco)	5/16 (31,2%)	23/37 (62,2%)	0,077	0,655 (0,074 – 0,927)
NoSAS	9 ± 3 (n=16)	11 ± 2 (n=37)	0,003*	0,724 (1,102 – 1,774)
Presença de ronco	11/16 (68,8%)	35/37 (94,6%)	0,035*	0,629 (1,491 – 61,319)

AOS: apneia obstrutiva do sono; **AUC:** área sob a curva; **IC:** intervalo de confiança.

As variáveis estatisticamente significantes foram submetidas à correlação de Pearson junto aos marcadores de gravidade da AOS (IAH, saturação mínima de O₂ e TTS < Sat de O₂ 90%) (Tabela 12 e 13) e aqueles que apresentaram uma correlação significativamente diferente de zero foram selecionados para a geração dos modelos de regressão logística⁸⁵.

Tabela 12 – Correlação de Pearson junto aos marcadores de gravidade da apneia obstrutiva do sono (AOS) para os metabólitos significantes proveniente das análises metabolômicas e avaliação clínica.

	IAH	Sat mínima O ₂	TTS < Sat O ₂ 90%
IAH	1,000		
Sat mínima O ₂	-0,741*	1,000	
TTS < Sat O ₂ 90%	0,782*	-0,861*	1,000
Circunferência de pescoço	0,299*	-0,345*	0,429*
Pressão arterial diastólica	0,200	-0,061	0,106
Ácido glutâmico	-0,224	0,102	-0,068
Glutamina	0,365*	-0,392*	0,403*
2,6-Difenil-1,7-dihidrodipirroló[2,3-b:3',2'-e]pyridina	-0,153	0,209	-0,209
Ácido 9-Hexadecenóico	0,196	-0,267	0,163
6-deoxi-D-glicose	0,351*	-0,209	0,203
5,5'-Biftalato	-0,275*	0,187	-0,269
Ácido araquidônico	-0,310*	0,397*	-0,204

*Correlação significativamente diferente de zero.

IAH: índice de apneia-hipopneia; **Sat:** saturação; **TTS:** tempo total de sono

Tabela 13 – Correlação de Pearson junto aos marcadores de gravidade da apneia obstrutiva do sono (AOS) para os lipídios significantes proveniente das análises lipidômicas.

	IAH	Sat mínima O ₂	TTS < Sat O ₂ 90%
IAH	1,000*		
Sat mínima O ₂	-0,741*	1,000*	
TTS < Sat O ₂ 90%	0,782*	-0,861*	1,000*
DG (45:8)	-0,269	0,257	-0,308*
GlcCer (d18:1/16:0)	0,266	-0,119	0,152
PA (35:2)	-0,384*	0,392*	-0,395*
PE (36:5)	0,254	-0,170	0,129
PE (35:1)	0,279*	-0,153	0,110
PE (38:6)	0,242	-0,138	0,095
PE (38:5)	0,258	-0,150	0,133
PE (37:3)	0,259	-0,147	0,099
PE (37:2)	0,252	-0,171	0,130
PE (39:4)	0,254	-0,144	0,088
PC (33:3)	-0,211	0,114	-0,066
PC (36:4)	-0,246	0,190	-0,227
PC (35:5)	-0,239	0,184	-0,212
PC (34:0)	-0,211	0,141	-0,107
PC (37:7)	-0,297*	0,112	-0,180
PC (37:6)	-0,400*	0,247	-0,267
PC (36:1)	-0,253	0,137	-0,099
SM (d18:1/12:0)	0,328*	-0,183	0,094
SM (d18:1/24:0)	0,242	-0,227	0,178
SM (d18:1/26:1(17Z))	0,106	-0,191	0,064
LPC (27:1)	0,229	-0,107	0,167
LPC (27:0)	0,145	0,027	-0,007

*Correlação significativamente diferente de zero.

DG: diacilglicerol; **IAH:** índice de apneia-hipopneia; **LPC:** lisofosfatidilcolina; **PA:** ácido fosfatídico; **PAD:** pressão arterial diastólica; **PE:** fosfatidiletanolamina; **PC:** fosfatidilcolina; **Sat:** saturação; **SM:** esfingomielina **TTS:** tempo total de sono.

Os modelos de regressão logística foram construídos levando em consideração os questionários de diagnóstico com acréscimo dos metabólitos significantes. Para seleção do melhor modelo responsável por explicar a AOS, foi utilizado o método *stepwise backward* por critério de Akaike (AIC)⁸⁶. Os modelos de regressão logística selecionados que descreveram o perfil de

metabólitos com maior especificidade e sensibilidade para diagnóstico da AOS podem ser vistos nas Tabelas 14 (análise metabolômica) e 15 (análise lipidômica). Na Figura 9 estão apresentadas as curvas ROC dessas análises. A avaliação da predição da AOS por meio dos metabólitos individualmente selecionados combinados ao questionário de pré-seleção NoSAS podem ser vistos no Anexo 14.

Tabela 14 – Perfil de metabólitos que combinados ao questionário NoSAS aumentam a sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da apneia obstrutiva do sono (AOS).

	Coeficiente	Erro	OR	IC inferior	IC superior	Valores de p	VIF
Intercepto	0,961	1,861				0,605	
NoSAS	0,478	0,197	1,613	1,141	2,550	0,015	1,669
Ácido glutâmico	-0,060	0,023	0,942	0,894	0,980	0,009	1,813
Glutamina	0,704	0,922	2,021	0,315	13,191	0,445	1,120
6-deoxi-D-glicose	2,398	1,057	11,006	1,791	126,966	0,023	1,314
Ácido araquidônico	-1,531	0,975	0,216	0,024	1,254	0,116	1,102
AUC	0,917						

AUC: área sob a curva; **IC:** intervalo de confiança; **OR:** odds ratio; **VIF:** Variância do fator de inflação

Tabela 15 – Perfil de lipídios que combinados ao questionário NoSAS aumentam a sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da apneia obstrutiva do sono AOS.

	Coeficiente	Erro	OR	IC inferior	IC superior	Valores de p	VIF
Intercepto	-9,054	3,976				0,023	NA
NoSAS	1,088	0,436	2,968	1,542	8,732	0,013	4,715
PE (35:1)	0,817	0,366	2,265	1,313	5,779	0,026	4,139
SM (d18:1/12:0)	0,680	0,281	1,973	1,260	3,919	0,015	2,864
LPC (27:1)	1,169	0,486	3,218	1,540	10,853	0,016	5,146
AUC	0,951						

AUC: área sob a curva; **IC:** intervalo de confiança; **LPC:** lisofosfatidilcolina; **OR:** odds ratio; **PE:** fosfatidiletanolamina; **SM:** esfingomiéline; **VIF:** Variância do fator de inflação.

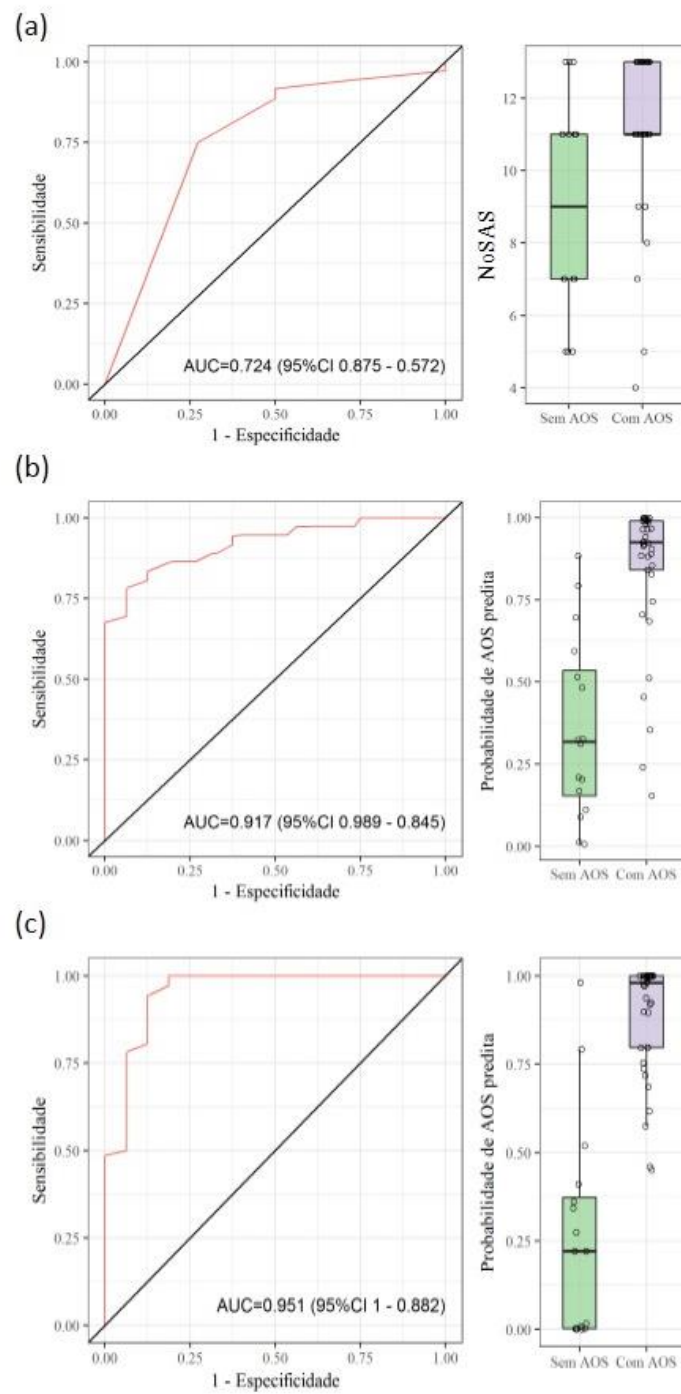


Figura 9: Curvas ROC obtidas após avaliação do NoSAS score (a), com acréscimo dos metabólitos estatisticamente significantes ao NoSA score (b) e com acréscimo dos lipídios estatisticamente significantes ao NoSAS score (c).

5. Discussão

O proposto estudo foi realizado em voluntários do sexo masculino com e sem a AOS. Foi avaliado em detalhes o perfil metabólico destes participantes que não tinham doença cardiovascular prévia, não faziam uso de medicações e eram pareados para idade, IMC e composição corpórea. Dentro deste contexto, foram identificados 4 metabólitos no grupo com AOS envolvidos no metabolismo inflamatório e glicídico (ácido glutâmico, glutamina, 6-deoxi-D-glicose e ácido araquidônico) além de 3 lipídios (PE 35:1, SM d18:1/12:0 e LPC 27:1) responsáveis pelas alterações metabólicas nesses pacientes. Este estudo confirma achados anteriores de que os questionários habitualmente usados para a triagem da AOS não apresentam um bom desempenho. Dentre eles, o NoSAS score foi o que apresentou melhor desempenho na identificação da AOS, estando de acordo com o recente estudo de validação deste questionário⁸⁷. No entanto, a combinação dos metabólitos selecionados aumentou de forma expressiva a sensibilidade e especificidade para detecção da AOS em relação ao questionário NoSAS isoladamente. Estes achados sugerem potenciais biomarcadores estreitamente relacionados à AOS e geram hipóteses para novos estudos no intuito de avaliar se estes biomarcadores poderão ser úteis para a predição do risco cardiovascular e factíveis para melhorar o diagnóstico da AOS.

Para a obtenção do painel de biomarcadores envolvidos com a AOS apresentado neste trabalho, este estudo contou com uma fase muito destacada no desenvolvimento e validação de ferramentas da metabolômica⁸⁸, uma técnica relativamente recente e não padronizada entre os vários centros. A otimização dos parâmetros do método por GC-MS permitiu a detecção de um maior número de metabólitos uma vez que foi avaliado, cuidadosamente, qual protocolo seria mais apropriado para o processo de desproteínização e recuperação dos

metabólitos. Por outro lado, o desenvolvimento da plataforma analítica para separação e detecção dos lipídios foi importante para a análise das moléculas separadas por classe, excluindo possíveis supressões iônicas proveniente das classes lipídicas endógenas mais abundantes. O desenvolvimento da detecção por MALDI no modo MS² permitiu a confirmação das classes fracionadas para posterior identificação fidedigna das classes quando analisadas no modo MS. O uso da detecção por MALDI permitiu uma análise rápida, conforme discutido anteriormente, e com o uso de matrizes específicas e otimizadas, foi possível aumentar o número de lipídios identificados com erros sub 10 ppm.

Sabe-se que estudar a composição e alterações de vias metabólicas em humanos requer um tratamento controlado e sistemático, uma vez que qualquer alteração na rotina de coleta, como trajetos diferenciados entre os participantes, estresse no momento da punção, assim como a variedade da qualidade do material de coleta, processamento amostral, entre outros, podem levar a artefatos que comprometem a interpretação dos resultados e as conclusões obtidas no estudo. Nesse sentido, as fases pré-analíticas bem como a seleção dos pacientes formam etapas extremamente padronizadas. Os equipamentos e materiais de coleta e armazenamento foram os mesmos do início ao final do projeto. A escolha de tubos com anticoagulante EDTA para os estudos metabolômicos e lipidômicos foi tomada devido a reprodutibilidade e estabilidade reportada por estudos prévios⁵⁰, assim como por apresentar menor ruído em técnicas como espectrometria de massas quando comparados a plasmas coletados em tubos com heparina⁸⁸. Desta forma, o conhecimento, desenvolvimento e a validação gerados com esta Tese será potencialmente útil

para novas pesquisas na área da metabolômica com múltiplas possibilidades de aplicação.

Como já foi mencionado anteriormente, estudos mostram que a AOS é frequentemente subdiagnosticada e o seu papel na alteração metabólica ainda não está totalmente definido²⁹. Os resultados repostados neste estudo corroboraram com tais informações, uma vez que 38% dos participantes diagnosticados com AOS por meio do exame de PSG (padrão ouro para diagnóstico de AOS) foram pré-selecionados com baixo risco quando aplicado o questionário de sonolência de Berlin (AUC=0,6550) – ferramenta utilizada como triagem para diagnóstico da AOS. A vantagem da facilidade da aplicação dos questionários habitualmente explorados para triagem de pacientes com AOS é importante, porém o uso deles isoladamente pode não selecionar adequadamente pacientes e controles. Isto é especialmente verdade em um contexto onde o ronco é um relato de terceiros (familiares, companheiros e companheiras, etc.) e sintomas como a sonolência não estão sempre presentes. Além do questionário de Berlin, o questionário NoSAS e a presença de ronco foram aplicados (Tabela 11). Apenas o questionário NoSAS apresentou uma melhor significância e resultados mais concordantes com o exame de PSG, mesmo que com sensibilidade e especificidade limitadas para diagnóstico (AUC=0,7240) quando comparados com o IAHI resultante do exame de PSG (AUC=1,000). A presença subjetiva de ronco foi específica em 94,6% dos casos com AOS, mas em 68,8% dos casos sem AOS. Estes dados sugerem que novas formas de melhorar a triagem da AOS para realmente selecionar pacientes que vão para a PSG, um exame de custo relativamente elevado e com longas filas de espera, são necessários.

Evidências crescentes apontam para a existência de uma desregulação metabólica na AOS, porém, como já ressaltado, muitos mecanismos ainda são desconhecidos e alguns trabalhos são inconsistentes. Por exemplo, não há consenso na literatura se a AOS está independentemente associada com um perfil metabólico alterado⁸⁹. Neste estudo, o qual envolveu pessoas jovens do sexo masculino e sem comorbidades, o perfil lipídico e glicídico usado na prática clínica não apresentou diferenças entre os grupos. Diante da plausibilidade biológica que respalda a relação entre a AOS e as alterações metabólicas, estes achados podem ser um reflexo da relativa pouca exposição dos pacientes aos efeitos da AOS. Da mesma forma, outros marcadores importantes de estresse e estado inflamatório como catecolaminas, cortisol, adiponectina, leptina e IL-6 também não apresentaram resultados significativos apesar da tendência encontrada na diferenciação dos grupos (Tabelas 4 a 6). No entanto, os dados gerados com as análises metabolômicas (incluindo a lipidômica) confirmam a maior sensibilidade desta técnica em detectar alterações precoces na AOS não observadas nos exames usados na prática clínica atual. A importância da detecção precoce justifica-se por evidências recentes de que os impactos cardiovasculares causados pela AOS podem não ser reversíveis com posterior tratamento da AOS⁹⁰. Um estudo randomizado mostrou que o tratamento da AOS não reverteu as doenças cardiovasculares pré-existentes nos pacientes do estudo⁹¹. Com isso, a necessidade de explorar marcadores precoces para a AOS, assim como potenciais vias metabólicas pelas quais a AOS aumenta o risco cardiovascular torna-se imprescindível.

A baixa concentração de oxigênio observada durante eventos de apneia, devido à hipóxia intermitente, faz com que mecanismos de suporte à falta de

oxigênio sejam ativados⁹². Enzimas que requerem oxigênio para ativação são ótimos sensores desta condição, assim como canais de íons sensíveis ao oxigênio e vias de transporte de elétrons⁹³. O fator de transcrição mais importante envolvido na resposta celular à hipóxia é o fator de indução a hipóxia (p.e.: HIF- α)⁹⁴⁻⁹⁵. Quando ativado, HIF- α aumenta a atividade enzimática glicolítica alterando o metabolismo e o transporte da glicose⁹⁵. Um estudo realizado por He et al⁹⁶ mostrou um aumento na expressão enzimática do metabolismo da glicose sob condições de hipóxia quando comparados a condições aeróbicas em células pancreáticas cancerígenas em proliferação e apoptose. A ativação das enzimas glicolíticas, assim como o aumento de sua concentração, acarretam no aumento dos níveis de glicose e de moléculas análogas presentes nas vias metabólicas⁹⁷. No nosso estudo, foi observado um aumento na concentração de 6-deoxi-D-glicose (6-DOG), molécula análoga à glicose⁹⁷⁻⁹⁸. 6-DOG, também conhecido como D-quinovose, é classificado como um monossacarídeo não metabolizado. Sabe-se que a AOS está associada a um desequilíbrio entre a produção de oxidantes e a atividade antioxidante⁹⁹. Esta superabundância de oxidantes pode estar associada à etiologia multifatorial de distúrbios metabólicos, incluindo a resistência à insulina. De fato, a AOS está associada à resistência à insulina¹⁰⁰. Mecanismos adicionais e implicações clínicas sobre níveis mais elevados de 6-deoxi-D-glicose na AOS não estão claros, porém os achados neste estudo têm plausibilidade biológica para esta associação.

O estudo também apontou para muitas moléculas envolvidas em vias inflamatórias agregando valor à hipótese de que a AOS promove um estado inflamatório que pode ser parcialmente explicado pelo aumento do risco

cardiovascular observado em pacientes com tal comorbidade²⁴. Sob baixas concentrações de oxigênio, como por exemplo em evento de isquemia do miocárdio, o déficit de energia e as falhas de membrana ocorrem devido a mudanças das concentrações de sódio e potássio intra- e extracelular, assim como por um afluxo de cálcio¹⁰¹. Embora as altas concentrações sistólicas de cálcio possam alterar diversas funções intracelulares, a ativação de enzimas fosfolipases (p.e. fosfolipase A1 (PLA1), A2 (PLA2) e C (PLC)) é considerada a condição mais prejudicial sob hipóxia¹⁰¹. Um estudo desenvolvido em Chicago¹⁰² mostrou a correlação da ativação da enzima PLA2 em crianças portadoras de AOS e obesas com a presença da disfunção endotelial. Em paralelo, outro estudo mostrou que o tratamento da AOS promove a inibição da PLA2¹⁰³.

Sabe-se que a PLA2 é uma importante enzima no reparo e remodelamento de membranas celulares e estão envolvidas na síntese das moléculas de sinalização lipídica por hidrólise da ligação éster *sn*-2 dos glicerofosfolipídios, formando ácidos graxos de cadeia longa e lisofosfolipídios¹⁰³ (Figura 10). Tal reação corrobora com os resultados deste estudo, uma vez que o grupo sob hipóxia (com AOS) apresentou elevadas concentrações de LPC e ácido araquidônico e diminuição das concentrações de PC, como observado na Tabela 10. O ácido araquidônico livre resultante da ativação da enzima PLA2 pode servir como substrato para síntese de ciclo-oxigenase 1 e 2 (COX-1 e COX-2) para geração de prostaglandina E2¹⁰⁴, a qual acredita-se estar envolvida nos mecanismos que regulam a resistência vascular, isquemia miocárdica, miocardites e outras doenças cardiovasculares¹⁰⁵. Por outro lado, estudos realizados em células gliais mostraram que o ácido araquidônico é responsável

por uma lenta inibição do ácido glutâmico – principal neurotransmissor excitatório no cérebro¹⁰⁶.

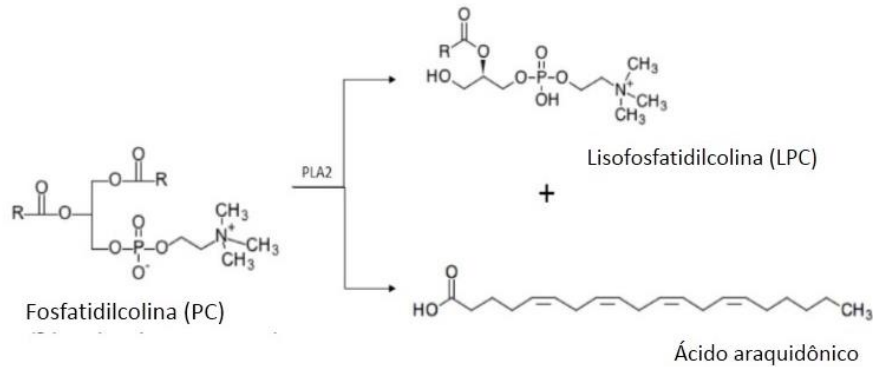


Figura 10 – Síntese de moléculas de sinalização lipídica por ativação da enzima fosfolipase A2.

Outro aminoácido inibido em nossos resultados foi a glutamina. Assim como o ácido glutâmico, a glutamina vem sendo constantemente reportada como marcador para diversos tipos de câncer por ser uma fonte crucial de nitrogênio, substrato para a rápida proliferação celular¹⁰⁷. Sabe-se que a glutamina é considerado o aminoácido mais abundante no sangue e, assim como a glicose, contribui para a produção de energia em processos anabólicos por meio da glutaminólise no ciclo de Krebs¹⁰⁸⁻¹⁰⁹. Além disso, ela é tida como precursor e produto de importantes vias metabólicas¹⁰⁹. Vale ressaltar também que sua variação biológica, assim como o ácido glutâmico, é demasiada grande, e sua capacidade de ciclização em ácido piroglutâmico, frente à artefatos analíticos, é constantemente presente, tornando seu estudo peculiar. Por isso, sinalizar apenas uma via responsável pela sua inibição é uma tarefa difícil, cabendo a nós apenas a sinalização da sua inibição em baixas concentrações de oxigênio.

Assim sendo, sua inibição junto a demais alterações metabólicas observadas, elevam a especificidade e sensibilidade ao diagnóstico da AOS.

Outra classe de moléculas envolvida na resposta à hipóxia são os esfingolipídios e sua respectiva via de ativação. Essas moléculas estão fortemente associadas com a resposta inflamatória sendo constantemente observadas em lesões ateroscleróticas¹¹⁰. Elas também estão envolvidas nos processos de apoptose celular por ação de citocinas pró inflamatórias, como por exemplo TNF- α , interleucina-1, e altas concentrações de colesterol LDL oxidado, as quais são ativadas por meio da enzima esfingomielina sintase (SMase, do inglês “*sphingomyelin synthase*”) associado à membrana celular¹¹¹. Uma das possibilidades de vias para a síntese dos esfingolipídios é a do “metabolismo dos esfingolipídios”¹¹⁰⁻¹¹¹. Há estudos que mostram que dependendo da severidade da hipóxia pode-se encontrar aumento nas concentrações de ceramidas e esfingolipídios devido à ativação da enzima SMase, além do aumento nos níveis de esfingosina-1-fosfato (S1P) e etanolaminas¹¹¹. Nosso estudo corrobora com tais relações de concentração dos analitos uma vez que foi mostrado elevadas concentrações de ceramidas e esfingomielinas assim como de fosfatidiletanolaminas no grupo com AOS. A Figura 11 descreve uma proposta da ativação da via do “metabolismo dos esfingolipídios” por meio da AOS. Os achados sugerem: a AOS (e seus componentes) ativam a coenzima A palmitoil, a qual é responsável pela síntese de ácidos graxos insaturados na posição 9 (p.e. ácido 9-hexadecenóico, subsequentemente aumentado no grupo com AOS)¹¹². Sequencialmente, pudemos observar um aumento nos níveis de ceramidas e fosfatidiletanolaminas dando continuidade à ativação da via sob

hipóxia, e para finalizar, o aumento nos níveis de esfingomielinina sugeririam a ativação da atividade enzimática SMase.

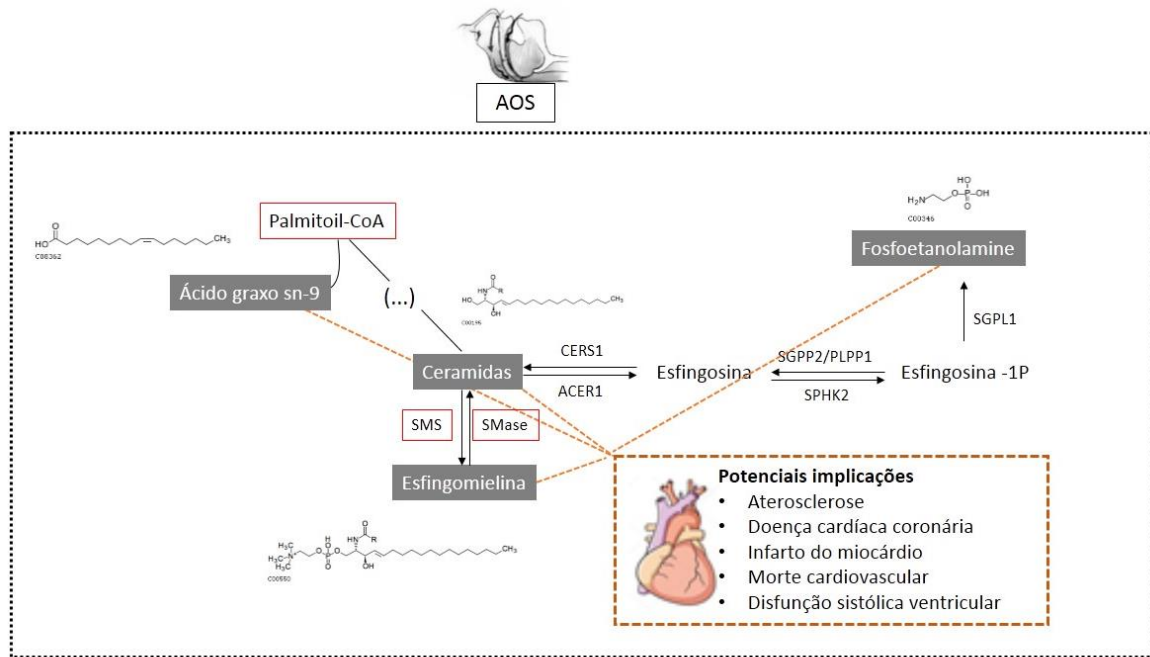


Figura 11: Proposta teórica de ativação da via do metabolismo de esfingolípido pela apneia obstrutiva do sono (AOS). Em destaque as moléculas com diferença estatística entre os grupos com e sem AOS, e as enzimas supostamente influenciadas pela hipóxia.

Este estudo apresentou algumas vantagens e limitações que merecem descrição. Entre as vantagens deste estudo podemos citar: 1) O estudo fez uso do exame de PSG padrão, o qual é considerado o método de escolha para o diagnóstico da AOS; 2) Foram tomados os devidos cuidados em selecionar participantes pareados para evitar os impactos de fatores de confusão nas análises metabólicas; 3) No contexto analítico, foi empregado plataformas amplamente utilizadas em estudos metabólicos e lipidômicos. Entretanto, algumas limitações foram evidenciadas. Primeiramente, o estudo exploratório

compreendeu um grupo relativamente pequeno de homens jovens sem uso de medicações; esses fatos podem limitar a generalização dos resultados obtidos. Embora fosse possível explorar potenciais vias relacionadas a AOS *per se*, os resultados expostos podem não ser verdadeiros para o sexo feminino, assim como para pacientes com comorbidades significantes. Em segundo lugar, esse estudo trata-se de um estudo transversal, ou seja, nenhuma relação causa e efeito pode ser reivindicada nesta investigação. Finalmente, compartilhamos da opinião de que os biomarcadores são mais úteis para esclarecimento de vias, na ajuda à resposta terapêutica (dentro do contexto da chamada medicina personalizada) e para prever o risco cardiovascular do que para serem incorporados no diagnóstico da AOS. É bem conhecida a utilidade de exames objetivos de avaliação do sono (polissonografia e poligrafia). No entanto, as limitações dos métodos de triagem existentes e as dificuldades da realização do exame objetivo do sono, já destacadas anteriormente, abrem perspectivas para novas tecnologias. Neste sentido, o uso do painel de biomarcadores encontrados neste presente estudo poderia ser potencialmente empregado como método de triagem alternativos da AOS, após validação dos mesmos por análises direcionadas. E neste contexto, a dosagem destes marcadores por meio de métodos direcionados para aplicação na prática clínica passa a ser factível considerando aspectos como custo e tempo de resposta (TAT do inglês “*turnaround time*”). Novos estudos são desejáveis para desenvolvimento de biomarcadores que possam ter múltiplas utilidades no contexto da AOS.

6. Conclusão

Este estudo identificou metabólitos no plasma significativamente alterados em pacientes com AOS quando comparados ao grupo sem AOS utilizando plataformas de análise metabolômica e lipidômica. Foi observado um aumento nas concentrações de 6-deoxi-D-glicose, ácido araquidônico, LPC (27:1), LPE (35:1) e SM (d18:1/12:0) no grupo com AOS em comparação ao grupo sem AOS e diminuição nas concentrações de ácido glutâmico e glutamina no grupo com AOS em comparação ao grupo sem AOS. Tais metabólitos estão relacionados com vias inflamatórias e glicolíticas. Resumidamente, a ativação das enzimas glicolíticas, fosfolipase e SMase foram suficientes para propor uma resposta à baixas concentrações de oxigênio em resposta à hipóxia nos pacientes com AOS. Foi possível identificar a partir dos resultados um painel de marcadores, que quando avaliados em conjunto com questionário de pré-seleção para a AOS (NoSAS) alcançam um poder diagnóstico de até 95,1% (AUC) para a AOS. Uma vez visto que as vias relatadas estão diretamente relacionadas com potenciais consequências cardiovasculares, e que esses marcadores propostos não são explicados no estudo por fatores de confusão como idade e gordura corporal, nossos resultados sugerem alguns possíveis biomarcadores para a AOS, que somados a questionários simples já empregados na prática clínica, podem agregar valor ao diagnóstico de AOS além de prever potenciais riscos cardiovasculares e estratégias para a prevenção das consequências cardiovasculares deste importante distúrbio do sono.

Anexo 1: Parecer consubstanciado da comissão de ética e pesquisa para o projeto apresentado.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

TO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudos metabólicos da apneia obstrutiva do sono

Pesquisador: Luciano Ferreira Drager **Área**

Temática:

Versão: 1

CAAE: 21075413.6.0000.0068

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio Fleury S.A

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 435.626 **Data da**

Relatoria: 16/10/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto transversal de comparação entre 3 grupos que incluirá 45 pacientes. O estudo é clinicamente relevante e está adequadamente escrito. O estudo é uma parceria com o Laboratório Fleury

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar os perfis metabólicos de pacientes com apnéia obstrutiva do sono (AOS) com diferentes gravidades.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há risco para o paciente porque serão realizados 2 coletas: a polissonografia e uma coleta de sangue

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: sem

comentários adicionais

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: adequado

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP



Continuação do Parecer: 435.626

Página 01 de 02

Recomendações: aprovação

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: sem pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

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

SAO PAULO, 25 de Outubro de 2013

Assinador por:
Luiz Eugênio Garcez Leme
(Coordenado)

)

Anexo 2: Termo de consentimento livre e esclarecido aplicado aos participantes do projeto de pesquisa.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA Estudos metabólicos da apneia obstrutiva do sono

PESQUISADOR: Adriana Lebkuchen.....

CARGO/FUNÇÃO: Pós-Graduanda.....

UNIDADE DO HCFMUSP: Unidade de Hipertensão – InCor.....

PESQUISADOR: Thaís Bittencourt de Oliveira Pires.....

CARGO/FUNÇÃO: Médica Preceptora..... INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 131 456.....

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório do Sono – InCor.....

PESQUISADOR: Luciano F. Drager.....

CARGO/FUNÇÃO: Médico Assistente..... INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 95187.....

UNIDADE DO HCFMUSP: Unidade de Hipertensão – InCor.....

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO x RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 4 anos.....

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que tem por objetivo avaliar o perfil de diversas substâncias metabólicas no sangue (incluindo o colesterol) em pacientes com a chamada apneia do sono que são atendidos no Instituto do Coração (InCor). As pessoas que são portadoras de apneia apresentam roncos à noite, sonolência durante o dia, cansaço que podem piorar sua qualidade de vida e de seus companheiros. A apneia do sono é uma doença comum, mas pouco diagnosticada e tratada. Para esta pesquisa, também incluiremos pessoas sem apneia do sono para comparação dos resultados obtidos.

Para a identificação da apneia do sono, você será convidado para realização de um exame chamado polissonografia (caso o(a) senhor(a) não tenham realizado este exame recentemente). Esse exame é a melhor maneira de diagnosticar a apneia do sono e, além disso, pode detectar outros problemas do sono. A polissonografia é um exame que necessita que você durma no laboratório do sono aqui no InCor, em um quarto individual, em que um técnico qualificado irá montar esse aparelho. Colocaremos algumas cintas na região da barriga e do peito, monitorizaremos a sua respiração e as fases do sono enquanto o(a) senhor (a) estiver dormindo. É um exame feito normalmente na rotina e que não lhe causará dor, choque ou algo prejudicial a sua saúde.

Após realização do exame, você poderá seguir para suas atividades habituais. Em seguida, um especialista em medicina do sono vai laudar o exame e marcar uma consulta com você para entrega do resultado do exame. Você poderá, nesse momento, tirar dúvidas em relação ao seu sono. Nesta consulta, o (a) senhor (a) fará uma avaliação médica com medidas de pressão arterial, medidas do peso e da altura. Marcaremos uma data para a coleta de exames de sangue em jejum.

Benefícios para o participante: Potencialmente poderemos identificar distúrbios do sono nos pacientes participantes desta pesquisa. Em caso positivo, o senhor (a) receberá instruções pelos pesquisadores envolvidos nesta pesquisa;

Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: Não há.

Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr Luciano Drager que pode ser encontrado no endereço do InCor (Av Eneas de Carvalho Aguiar, 44 Telefone(s) 11-26615084. *Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20 – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br.*

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

Existe uma possibilidade de utilização do material biológico coletado (sangue) armazenado para ser utilizado futuramente para novas pesquisas. Para estas novas análises, a confidencialidade será sempre respeitada e somente dados clínicos e resultados destes novos exames serão utilizados. O tempo de armazenamento do material será autorizado pela Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq).

Para fins de conhecimento e decisão do (a) senhor (a) solicito a gentileza de responder à seguinte pergunta:

Há necessidade de consultá-lo para autorizar o uso deste material doado em outras pesquisas científicas?

(.....) SIM. Eu quero ser consultado para autorizar a cada pesquisa futura na qual será utilizado com o meu material.

(....) NÃO. Eu dispenso a autorização futura para cada pesquisa e estou informado(a) que a Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) irá examinar a nova pesquisa e decidir sobre a utilização ou não do material que eu estou doando.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Estudos metabólicos da apneia obstrutiva do sono”.

Eu discuti com o Dr. Thaís Bittencourt de Oliveira Pires / Dr Luciano Drager / Adriana Lebkuchen sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto):

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

Anexo 3 - Testes de gradiente de eluição para desenvolvimento do método cromatográfico em fase normal para separação das classes de lipídios.

(a) Método 1

Fase A: hexano 50% hidratado*

Fase B: hexano:isopropanol (1:1 v/v)

Fluxo: 0,5 mL/min

Gradiente

Tempo (min)	Fase móvel B (%)
0 a 10	0-100
10 a 12	100-0
12 a 16	0

(b) Método 2

Fase A: hexano:isopropanol (1:1 v/v)*

Fase B: isopropanol

Fluxo: 0,5 mL/min

Gradiente

Tempo (min)	Fase móvel B (%)
0 a 2	50
2 a 5	100
5 a 8	50
8 a 10	50

(c) Método 3

Fase A: hexano:isopropanol (1:1 v/v)*

Fase B: isopropanol

Fluxo 0,5 mL/min

Gradiente

Tempo (min)	Fase móvel B (%)
0 a 2	50
2 a 6	100
6 a 8	100
8 a 8,5	50
8,5 a 10	50

(d) Método 4

Fase A: diclorometano

Fase B: metanol + 0,2% ácido acético

Fluxo 0,9 mL/min

Gradiente

Tempo (min)	Fase móvel B (%)
0 a 2	0
2 a 10	100
10 a 15	100
15 a 18	0
18 a 19	0

(e) Método 5

Fase A: diclorometano

Fase B: metanol + 0,2% ácido acético

Fluxo 0,9 mL/min

Gradiente	
Tempo (min)	Fase móvel B (%)
0 a 2,5	0
2,5 a 4,5	25
4,5 a 8,5	50
8,5 a 12,5	100
12,5 a 17,5	100
17,5 a 20,5	0
20,5 a 23	0

*500 mL de hexano misturado com sílica hidratada, adicionado a 500 mL de hexano puro.

Anexo 4: Planejamento experimental (DOE) para desproteínização das amostras para as análises metabolômicas.

Frente à diversidade de solventes e procedimento reportados na literatura para extração de amostras em metabolômica, e tendo em vista que múltiplos parâmetros afetam a estratégia de extração, foram aplicados planejamentos fatoriais baseado em *design of experiment* (DOE). Nessa técnica, diversos parâmetros são combinados em um único experimento e analisados estatisticamente para revelar a melhor combinação de fatores, que neste caso, implica na maior recuperação de metabólitos e uma remoção eficaz de proteínas.

O DOE foi construído com o auxílio do *software* JMP Statistics e as condições de extração incluíam 100 μL de pool de plasma descaracterizado adicionado de 400 μL de solvente orgânico, dentre eles: acetona, etanol (EtOH), metanol (MeOH), acetonitrila (ACN) e isopropanol (IPA), combinados binariamente, e aplicação ou não de banho de ultrassom por 5 minutos (Tabela 1A). As extrações foram realizadas em duplicatas e de forma randomizadas.

Tabela 1A: Combinação aleatória das condições de análise randomizadas pelo *software* JMP para avaliação do melhor protocolo de extração e remoção de proteínas para os estudos metabolômicos não direcionados.

Solvente 1 (200 μL)	Solvente 2 (200 μL)	Ultrassom (5 min)
Acetona	Isopropanol	Sim
Acetona	Etanol	Sim
Metanol	Isopropanol	Sim
Etanol	Acetona	Não
Acetonitrila	Isopropanol	Sim
Metanol	Metanol	Não
Isopropanol	Acetona	Não
Acetonitrila	Acetonitrila	Não

Acetona	Etanol	Não
Acetona	Metanol	Sim
Acetona	Isopropanol	Não
Isopropanol	Metanol	Não
Isopropanol	Acetonitrila	Sim
Isopropanol	Etanol	Sim
Isopropanol	Acetonitrila	Não
Isopropanol	Etanol	Não
Etanol	Etanol	Sim
Etanol	Acetona	Sim
Acetona	Acetonitrila	Sim
Acetona	Acetona	Sim
Acetonitrila	Metanol	Sim
Isopropanol	Isopropanol	Não
Acetonitrila	Metanol	Não
Etanol	Acetonitrila	Sim
Acetonitrila	Etanol	Não
Metanol	Acetona	Sim
Acetonitrila	Acetona	Sim
Acetona	Metanol	Não
Acetonitrila	Etanol	Sim
Metanol	Etanol	Não
Etanol	Metanol	Sim
Metanol	Acetonitrila	Não
Metanol	Etanol	Sim
Etanol	Etanol	Não
Metanol	Acetonitrila	Sim
Etanol	Isopropanol	Sim
Acetona	Acetona	Não
Etanol	Isopropanol	Não
Acetonitrila	Acetonitrila	Sim
Metanol	Metanol	Sim

Isopropanol	Isopropanol	Sim
Acetonitrila	Acetona	Não
Acetona	Acetonitrila	Não
Etanol	Metanol	Não
Acetonitrila	Isopropanol	Não
Metanol	Acetona	Não
Metanol	Isopropanol	Não
Isopropanol	Metanol	Sim
Etanol	Acetonitrila	Não
Isopropanol	Acetona	Sim

Após a extração, as amostras foram centrifugadas a 4 °C por 10 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos de alíquota e posteriormente analisados por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS), e os precipitados foram secos, analisados por análise gravimétrica e processados pelo *software* JMP.

As análises por LC-MS foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida de ultra performance (UPLC) Acquity I-Class (Waters Corporation, Milford, MA, USA) acoplado a espectrômetro de massas do tipo híbrido (Q-TOF) Synapt G1 (Waters Corporation, Milford, MA, USA) equipado com fonte de eletrospray operando no modo positivo. O método testado empregou uma coluna de fase reversa ACQUITY UPLC BEH C18 (1,7 um x 2,1 x 50 mm) a 40 °C e um gradiente linear exploratório partindo de 95% de fase A composta por água adicionada de 0,1% de ácido fórmico em água até 100% de fase B constituída por ACN adicionada de 0,1% de ácido fórmico. 5 µL de amostra foram injetados no sistema cromatográfico e o tempo total de análise foi de 15 minutos. O processamento das amostras foi realizado pelo *software* MarkerLynx™ (Waters Corporation, Milford, MA, USA).

Os resultados processados no *software* JMP mostraram que a combinação dos solventes MeOH:IPA (1:1 v/v) com aplicação de banho de ultrassom por 5 minutos foi o mais eficiente na

desproteinização do plasma (massa proteica pesada de 0,1507 g) (Figura 1A). Foi assumido que quanto maior o valor de massa do precipitado mensurado pela análise gravimétrica, melhor a combinação de solvente e ultrassom para desproteinização.

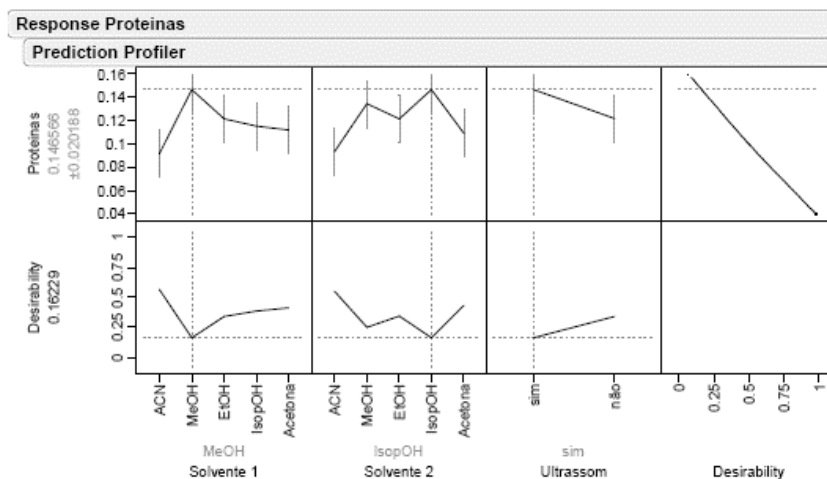


Figura 1A: Gráficos da correlação de solventes, aplicação de ultrassom e análise gravimétrica na avaliação do melhor protocolo de precipitação de proteínas para extração das amostras para análises metabômicas.

Em contrapartida, a análise por LC-MS da fase orgânica não resultou em uma contagem de íons e lista de m/z destoante entre as condições de desproteinização, sendo esta análise desconsiderada para a escolha do melhor protocolo.

Anexo 5: Dados individuais da discriminação dos participantes incluídos no estudo (Continua).

Grupos	Idade (anos)	Raça	IMC (kg/m ²)	CP (cm)	CC (cm)	CQ (cm)	média PAS (mmHg)	média PAD (mm/Hg)	IAH geral (ev/h)	Sat. Mínima (%)	TTS c/ Sat <90% (s)	Massa Muscular (magra) (Kg)	Massa Gordura (gorda) (kg)	% Gordura (Massa Gorda/Total)	AVG (cm ²)	BMR(kcal)
	52	Branca	27,66	41,00	100,67	98,7	129	86	28,6	86	3,92	25,1	25,8	36	128,6	1361
	46	Negra	30,28	43,33	102,83	105,5	122	69	97,2	74	32,41	44,8	21,5	21,6	85,8	2061
	40	Negra	29,46	40,33	102,50	108,0	132	81	27,1	80	3,08	37,8	27,6	29,3	109,2	1805
	35	Branca	34,44	41,00	115,67	114,7	120	74	43,2	78	15,17	37,8	35,1	34,4	144,5	1814
	49	Parda	26,85	40,83	92,33	96,7	120	84	37	77	14,89	31,9	16	22,2	75,8	1580
	29	Branca	36,12	45,17	120,67	123,8	138	91	29,8	80	2,21	44,7	42,7	35,6	150,7	2039
	42	Branca	30,87	40,50	114,00	113,0	115	80	19,9	84	0,22	31,9	36,5	38,8	152,8	1612
	33	Parda	26,44	42,67	92,67	101,8	127	78	50,5	83	15,70	34,9	16,2	21	66,6	1684
	31	Amarela	28,30	40,83	91,23	104,0	128	86	28,2	89	0,06	35	20,6	25,1	84,1	1696
	40	Parda	33,85	49,00	106,83	111,3	112	71	31,7	77	8,20	49	26,7	23,8	33,8	2213
	28	Branca	33,49	43,00	109,33	106,7	130	73	17,6	83	3,00	31,5	37,5	40,2	154,5	1572
	31	Branca	31,40	42,50	116,83	109,5	127	84	87,8	82	3,69	40,6	34,7	32,8	139	1910
	48	Parda	27,62	40,67	94,33	100,0	118	77	30,2	60	9,15	27,5	25	33,7	122,4	1429
	30	Parda	28,90	41,33	99,83	111,7	129	87	33,3	87	0,18	39,5	24,7	26,3	103,6	1867
	53	Negra	28,76	43,00	105,17	105,7	109	73	21,7	82	0,69	33,2	31,3	34,4	143,2	1659
	51	Branca	31,23	42,00	107,70	108,3	119	76	49,6	64	37,80	37,2	23,4	26,3	92,7	1787
	52	Parda	29,46	42,50	103,67	107,0	154	101	20,2	87	0,59	34,5	25,8	29,6	128,3	1693
	42	Branca	25,91	41,00	90,67	98,2	128	86	24	82	0,73	30,8	16,7	23,4	79,9	1549
Com AOS	46	Branca	29,73	41,83	100,17	110,3	131	85	33,4	74	2,39	36,4	28,4	30,8	120,4	1744
	36	Branca	27,22	41,50	103,33	112,7	120	81	38,6	74	4,05	32,1	30,6	35	130,2	1596
	32	Branca	24,38	41,00	92,50	102,0	115	75	15,9	89	0,10	41,5	30,1	29,5	119,8	1922
	33	Branca	30,72	44,20	112,20	107,0	122	80	92,3	71	2,60	41,2	31,6	30,7	131,9	1913
	36	Branca	36,00	44,20	116,17	114,3	148	107	58,7	86	1,27	41,4	33,7	31,8	148,4	1932
	38	Parda	34,22	46,33	104,50	109,7	129	79	30,4	73	8,78	35,6	32,2	34,2	142,7	1711
	34	Branca	37,75	46,50	130,33	128,0	127	94	16,1	85	8,37	45,6	51,4	39	197,6	2111
	42	Branca	31,99	43,20	116,20	78,3	136	89	19,2	83	2,88	36,9	40,3	38,4	163,5	1768
	29	Branca	32,64	42,33	114,60	117,5	130	121	18,1	78	2,13	35,6	35,8	36,5	139,9	1715
	47	Branca	28,96	43,00	107,70	108,0	128	97	95,2	72	57,12	40,3	22,4	24,1	98,6	1895
	45	Branca	31,12	42,30	104,50	105,8	140	94	40,8	85	2,85	36,4	27,1	29,8	113,6	1750
	44	Parda	29,51	43,00	109,30	106,3	133	90	33,1	70	6,26	34,9	27,3	30,7	126,8	1702
	39	Branca	36,41	46,17	116,83	114,0	94	99	21,5	87	0,62	34,9	39,2	38,8	171,3	1703
	31	Branca	30,02	42,33	105,00	109,8	127	82	31,8	64	1,57	35,4	25,6	29,1	114	1718
	44	Parda	24,07	38,30	90,30	105,7	133	89	20,1	89	0,00	33,6	15,1	20,4	65,8	1642
	33	Branca	32,96	41,20	120,30	125,2	134	96	79,0	79	16,11	42,3	37,9	33,6	150,9	1991
	37	Branca	33,87	41,20	113,00	110,70	133	91	41,3	83	0,31	34,1	33,8	36	142,5	1669
	35	Branca	27,65	39,70	100,00	108,00	119	78	21,2	90	0,00	41,0	18,6	20,7	82,5	1912
	36	Parda	31,72	42,00	102,33	106,2	119	86	62,7	82	3,17	32,3	33,1	36,5	160,8	1613

Anexo 5: Dados individuais da discriminação dos participantes incluídos no estudo (continuação).

Grupos	Idade (anos)	Raça	IMC (kg/m ²)	CP (cm)	CC (cm)	CQ (cm)	média PAS (mmHg)	média PAD (mm/Hg)	IAH geral (ev/h)	Sat. Mínima (%)	TTS c/ Sat <90% (s)	Massa Muscular (magra) (Kg)	Massa Gordura (gorda) (kg)	% Gordura (Massa Gorda/Total)	AVG (cm ²)	BMR(kcal)
Sem AOS	34	Branca	27,49	37,83	90,50	97,7	113	67	0,2	90	0,01	37,3	13,4	17,2	52,6	1765
	51	Amarela	27,18	40,50	99,50	98,2	118	84	9,2	81	0,20	34,4	19,4	24,3	78,5	1678
	47	Negra	28,86	39,50	97,17	105,0	119	76	6,5	89	0,07	35,5	18,2	22,5	88,6	1727
	34	Branca	28,54	42,83	101,17	106,2	125	84	10,3	85	0,36	40,6	21,9	23,5	92,4	1906
	35	Branca	26,21	39,00	99,50	104,0	123	75	13,6	89	0,04	36,7	20,6	24,1	90,3	1770
	32	Parda	28,09	42,17	100,83	103,3	123	77	11,3	88	0,14	37,4	26,1	28,4	110,6	1793
	29	Branca	34,07	44,33	109,33	114,2	131	78	2,3	90	0,00	32,9	36,8	38,7	160,9	1628
	35	Branca	29,33	38,17	100,83	111,0	127	84	11,1	88	0,05	34,2	27,9	31,7	120,6	1669
	38	Branca	32,13	43,17	110,67	111,2	130	85	9,2	89	0,10	33,9	17,4	22,5	84,4	1658
	35	Branca	29,28	41,30	104,67	107,7	114	69	9,9	91	0,00	40,9	24	25	100,4	1925
	39	Branca	39,90	46,00	129,17	136,7	140	91	8,0	89	0,09	42,5	58,6	44,1	219,1	1977
	29	Negra	33,24	40,80	109,83	112,2	117	71	4,1	90	0,00	36,7	33,7	34,1	144,5	1780
	32	Branca	28,65	37,50	103,50	106,5	112	77	4,3	91	0,00	37,4	21,8	25	101,9	1779
	30	Branca	28,81	40,50	99,17	110,0	118	77	11,2	87	0,12	37,5	24,6	27,3	107,4	1783
	41	Branca	28,67	39,50	102,00	109,8	129	86	4,9	91	0,00	33,9	26,6	30,7	117,6	1670
	35	Branca	33,76	42,30	121,00	119,0	134	93	2,8	93	0,00	38,1	44,8	40	172,9	1823

Anexo 6: Concentrações dos analitos utilizados para discriminação do perfil clínico para cada participante incluído no estudo

Grupos	Glicose mg/dL	PCR (mg/dL)	Colesterol total (mg/dL)	Colesterol HDL (mg/dL)	Colestero I VLDL (mg/dL)	Colesterol LDL (mg/dL)	Triglicérides (mg/dL)	Colesterol não-HDL (mg/dL)	TSH (mU/l)	Insulina (mU/l)	HOMA-IR
	91	0,23	189	39	27	123	133	150	1,8	12	2,7
	97	0,42	158	36	15	107	73	122	1,5	7	1,7
	102	0,26	195	33	31	131	157	162	1,4	13	3,2
	93	0,27	171	47	19	105	93	124	4,0	8	1,8
	89	0,04	209	45	21	143	103	164	1,8	4	0,9
	90	1,43	195	43	13	139	66	152	2,3	17	3,7
	84	0,33	181	39	29	113	143	142	2,3	9	1,8
	89	0,19	170	46	24	100	118	124	1,6	13	2,8
	89	0,05	182	43	37	102	186	139	1,5	14	3,0
	85	0,03	189	62	11	116	56	127	1,4	11	2,3
	86	0,37	181	57	26	98	130	124	3,7	24	5,0
	100	0,29	218	31	54	139	268	187	3,2	24	5,9
	92	0,29	203	32	33	138	163	171	1,1	11	2,5
	102	0,05	202	45	20	137	98	157	1,0	12	3,0
	92	0,34	182	52	23	107	115	130	2,0	17	3,8
	87	1,49	155	32	25	98	125	123	0,9	9	1,9
	86	0,76	213	40	17	156	84	173	0,6	10	2,1
	90	0,18	182	45	17	120	83	137	2,1	4	0,9
Com AOS	94	0,38	226	27	70	129	350	199	1,1	11	2,5
	89	0,37	197	34	22	141	111	163	1,5	21	4,6
	94	0,15	139	45	16	78	82	94	1,7	30	6,9
	87	0,26	231	27	48	156	241	204	2,7	30	6,4
	86	0,07	133	85	23	25	115	48	1,8	8	1,7
	79	0,37	208	42	24	142	122	166	1,5	18	3,5
	95	0,29	194	34	31	129	155	160	1,8	50	11,6
	91	0,21	193	31	33	129	163	162	1,0	10	2,2
	82	0,21	190	32	27	131	136	158	0,9	15	3,0
	94	0,09	173	33	48	92	242	140	0,8	15	3,4
	85	0,33	206	35	36	135	178	171	2,4	25	5,2
	88	0,79	192	23	69	100	344	169	2,0	22	4,7
	93	0,08	210	44	28	138	142	166	2,1	24	5,5
	86	0,05	220	46	35	139	176	174	1,6	11	2,3
	95	<0.03	167	33	39	95	197	134	1,9	10	2,3
	84	0,42	226	48	21	157	107	178	2,5	13	2,7
	96	0,33	246	34	36	176	181	212	2,4	14	3,3
	86	0,11	241	41	43	157	214	200	3,7	10	2,1
	98	0,25	161	32	45	84	223	129	2,9	18	4,3
	87	0,45	137	35	20	82	99	102	2,3	7	1,5
	114	0,16	185	34	47	104	233	151	2,7	15	4,2
	114	0,45	237	40	52	145	261	197	4,1	9	2,5
	82	0,14	248	40	30	178	151	208	0,8	13	2,6
	96	0,05	152	28	26	98	129	124	4,8	12	2,8
	95	0,39	169	35	22	112	108	134	2,8	19	4,4
	83	0,24	196	42	24	130	118	154	1,0	13	2,6
Sem AOS	92	0,26	215	30	78	107	388	185	2,3	27	6,1
	87	0,08	217	53	20	144	102	164	1,0	11	2,3
	93	0,10	196	33	31	132	154	163	2,3	13	3,0
	100	0,26	182	53	25	104	126	129	1,9	24	5,9
	86	0,31	150	50	8	92	38	100	1,2	5	1,1
	90	0,17	158	40	17	101	86	118	2,4	4	0,9
	103	0,07	183	41	28	114	139	142	2,0	28	7,0
	93	0,31	166	49	12	105	62	117	2,0	7	1,6
	99	0,90	154	38	10	106	50	116	0,6	25	6,1

Anexo 7: Concentrações dos analitos quantificados por kit de imunoenensaio para cada participante incluído no estudo.

Grupos	Ácidos Graxos Livres e Totais (nmol)	Adiponectina (ug/mL)	Interleucina-6 (ng/mL)	Leptina (ng/mL)
	1,0683	649,9746	81,4642	1,2959
	0,5379	409,2760	69,0750	1,1634
	1,1087	611,8618	58,4484	2,2704
	0,5680	358,2682	61,4148	4,2446
	0,4874	376,7232	61,7831	1,0214
	0,7121	157,5471	61,8861	2,3222
	0,5589	248,5020	61,3911	1,4317
	0,3738	1169,7626	85,6296	0,9681
	0,3281	1165,4766	68,0317	0,9945
	0,5801	809,9933	58,7150	1,2807
	1,2389	488,3190	56,9798	2,5017
	0,6348	1128,3093	63,7251	1,3011
	0,5260	1135,9920	58,8314	0,9644
	0,4697	577,2600	65,8970	0,9819
	0,3224	205,7995	55,5428	3,3799
	0,7497	928,1489	72,1333	1,0453
	1,3758	579,3548	78,8321	0,9689
	0,6533	561,4448	60,4049	1,1294
Com AOS	0,4638	1043,3165	81,9500	2,2877
	0,2551	1191,9938	76,7151	7,7575
	0,2914	544,2809	66,5717	1,2506
	0,5529	96,8601	106,3225	4,3501
	0,5861	1188,3036	86,7829	3,7323
	0,6440	858,1145	54,1781	1,4532
	0,5952	846,2293	86,3982	32,5250
	1,0649	554,6854	67,7718	23,7245
	0,6625	1102,5169	71,8122	1,3366
	0,3027	368,8663	66,4976	0,9516
	0,8966	285,3290	72,4011	0,9696
	0,5170	1169,7626	61,7902	1,4187
	0,4963	776,7653	68,8088	3,7639
	0,7876	1152,6651	66,5974	1,0410
	0,5439	196,8684	65,0708	1,1370
	0,8130	343,8636	60,0889	23,9492
	0,6996	1068,1316	76,0848	0,9520
	0,5861	258,6598	59,5593	0,9602
	0,4200	72,6467	71,8492	0,9472
	0,5200	177,5874	73,2619	1,3537
	0,6872	546,0836	70,2993	1,0635
	0,6379	521,7673	69,1096	0,9476
	0,5922	169,0631	61,2556	1,5204
	0,9850	187,7267	86,5924	1,0805
	0,6165	881,7401	57,4935	1,9521
	0,6718	1206,2636	87,7398	1,8733
	0,7434	1154,0042	88,8326	2,1947
Sem AOS	0,8707	698,8061	56,2735	6,2990
	0,8003	362,9490	68,7508	2,3491
	0,2802	1191,9938	58,6608	20,1494
	0,2746	628,2196	52,1627	2,5509
	0,2607	1206,2636	76,1295	2,4558
	0,8098	386,5356	98,7298	13,0323
	0,2690	979,7708	75,0055	0,9724
	0,6287	1203,4449	73,5217	41,0793

Anexo 8: Concentração de cortisol salivar para cada participante incluído no estudo.

Grupos	Cortisol manhã (ng/dL)	Cortisol tarde (ng/dL)	Cortisol noite (ng/dL)
	164,6	168,4	26,5
	155,4	221,5	41,8
	326,4	34,2	16,5
	617,8	19,6	15,4
	94,4	8,7	24,7
	450	125,9	40
	409,9	31,5	17,1
	719,3	276,3	22,4
	26,3	32,7	25
	217,4	20,9	7,5
	115,1	34,5	21,8
	356,1	162,1	12,6
	270,4	17,5	26,9
	67,2	27,2	19,2
	193,3	30,6	20,1
	160,5	158	71,7
	227,5	80	33,4
Com AOS	213,6	49,9	7,3
	700,3	28,8	20,4
	174,1	36,9	24,5
	390,8	121	13
	457	43,6	12,8
	137	48,5	7,5
	179,7	50,8	43,1
	85,4	6,7	17,1
	278,6	95,4	32,1
	136,6	84,4	5,1
	67,4	95,7	3,7
	322,7	41,1	6,7
	188,7	56,4	18,5
	466,2	94,5	55
	102,1	97,9	10,6
	97,7	270,8	27,9
	56,7	14,6	1,4
	73,5	16,1	71,9
	530,3	62,7	0,9
	240,2	99	19,2
	424,1	80,8	8,6
	169,4	106,8	23,4
	314,3	40,2	8,5
	38,9	16,2	12,3
	218,4	60	34,1
	376	41,6	88,4
	272	96,5	164,2
Sem AOS	151,7	161	15,8
	46,7	79,3	15,7
	144,2	47,7	6,1
	176,2	60,3	16,1
	210,9	117	16,9
	373,6	36,4	30,4
	252,8	25,6	19,7
	422,2	17,8	56,4

Anexo 9: Concentração de catecolaminas urinárias para cada participante incluído no estudo.

Grupos	Noradrenalina ($\mu\text{g}/24\text{h}$)	Adrenalina ($\mu\text{g}/24\text{h}$)	Dopamina ($\mu\text{g}/24\text{h}$)
	49,461	4,847	211,506
	26,669	4,034	174,639
	16,630	< 3	161,853
	6,578	<3	48,528
	34,249	< 3	87,247
	45,737	< 3	150,254
	60,355	8,268	237,132
	34,536	5,367	188,546
	69,336	< 3	169,997
	34,579	< 3	112,212
	29,121	7,519	209,585
	18,394	31,314	180,461
	29,808	4,547	66,407
	71,966	< 3	120,989
	62,205	< 3	299,444
	33,304	6,767	117,677
	48,106	< 3	111,285
	37,395	4,432	244,219
Com AOS	13,472	<3	80,201
	30,319	< 3	218,165
	14,201	< 3	144,061
	110,389	11,914	205,590
	35,116	5,340	182,039
	60,951	7,865	166,505
	18,382	< 3	102,549
	37,581	4,648	108,229
	62,064	6,544	375,015
	30,831	7,775	157,422
	22,595	21,189	99,353
	41,239	<3	295,094
	44,348	6,148	270,352
	59,729	12,518	373,458
	36,887	4,853	274,724
	31,862	2,16	176,539
	57,833	15,647	186,557
	14,178	<3	46,38
	52,32	7,324	321,828
	14,145	1,746	61,248
	16,402	< 3	45,061
	29,858	< 3	234,061
	49,600	6,018	184,931
	58,813	< 3	194,085
	67,435	< 3	168,622
	7,810	6,419	46,930
Sem AOS	43,931	< 3	79,598
	31,240	< 3	217,301
	43,459	< 3	89,567
	54,723	6,333	242,271
	21,401	3,839	153,149
	22,360	4,133	64,396
	11,547	25,851	166,008
	21,626	< 3	68,780
	39,185	8,94	302,203

Anexo 10: Concentração de aminoácidos no plasma para cada participante incluído no estudo (Continua).

Grupos	Asp (uM)	Glu (uM)	Ala (uM)	Aloisoleucina (uM)	Arg (uM)	Asn (uM)	Cit(uM)	Phe (uM)	Gly (uM)	Gln (uM)	Pro-OH (uM)	His (uM)	Ile (uM)	Leu (uM)	Lis (uM)	Met (uM)	Orn (uM)	Pro (uM)	Ser (uM)	Tau (uM)	Tyr (uM)	Thr (uM)	Trp (uM)	Val (uM)
	2,75	39,27	337,17	4,00	59,57	35,43	35,30	58,30	235,50	691,60	12,77	65,80	93,45	155,00	216,05	28,47	86,95	267,10	112,65	21,10	75,85	94	87,03	219,27
	5,30	69,70	303,97	4,67	47,93	44,87	20,67	37,65	226,30	525,23	12,27	60,77	80,30	127,25	126,00	23,93	54,15	170,80	93,80	0,30	48,25	73,77	58,25	218,9
	4,70	77,20	231,45	4,30	49,20	37,40	29,33	49,70	149,45	557,37	10,10	66,10	83,95	158,70	158,20	28,63	70,00	204,55	91,75	8,80	47,45	92,87	78,63	272
	3,50	58,63	364,50	3,97	69,23	39,23	38,37	39,55	200,40	524,07	11,67	74,73	73,50	123,00	180,55	23,70	71,65	182,75	85,45	2,05	63,65	125,4	71,73	235,53
	5,90	53,10	324,95	3,70	58,97	44,40	25,73	13,95	213,50	554,70	17,33	72,40	67,50	151,20	213,65	24,27	73,20	166,85	105,57	20,10	42,95	79,97	69	226,47
	2,00	31,03	349,40	4,27	56,87	37,05	26,67	16,50	147,90	520,47	11,13	62,43	90,73	163,30	177,13	24,87	79,20	247,75	92,75	0,00	25,55	89,07	60,37	238,47
	4,70	31,10	324,30	1,90	54,30	29,10	39,70	62,50	225,30	720,50	9,30	71,60	79,50	134,20	145,20	25,10	88,60	225,40	75,40	46,10	57,9	118	70,7	271,9
	4,50	31,20	325,60	4,80	63,50	38,70	21,13	70,20	216,50	682,90	12,90	79,80	84,00	154,10	162,50	25,90	56,20	214,85	90,70	36,60	54,6	74,8	68,87	278,6
	3,60	63,10	332,00	3,37	49,90	36,40	21,30	15,25	145,55	539,57	11,17	65,07	72,60	137,40	191,50	21,07	83,00	163,20	99,10	3,60	35,15	56,67	65,77	211,17
	3,83	43,83	364,30	4,53	52,80	43,20	38,20	27,55	194,65	514,33	14,83	71,67	119,70	198,90	226,40	30,63	87,90	247,90	94,70	14,40	37,25	111,2	91,67	273
	5,90	94,90	328,40	4,10	60,30	30,40	21,93	53,00	199,70	568,30	7,50	65,10	72,20	107,70	136,00	23,90	68,05	191,85	103,25	45,70	81,3	81,3	74	235,2
	10,13	125,30	250,20	4,67	74,50	34,35	35,73	67,00	176,20	547,60	20,60	70,40	115,40	181,10	182,40	24,10	117,40	224,70	86,83	47,40	68,4	92,6	63,8	301,9
	4,07	76,55	570,80	4,93	63,57	50,40	31,80	19,60	271,30	740,43	19,80	79,73	104,40	191,35	214,95	28,75	92,40	302,45	149,15	14,30	54,1	103,8	69	249,13
	4,00	97,10	376,37	3,80	61,27	42,13	21,03	32,85	187,55	564,17	6,37	72,77	71,75	147,60	208,55	29,77	69,60	240,15	113,60	3,10	99,5	103,7	72,2	220,27
	3,57	56,07	322,40	4,20	62,07	41,95	31,17	24,00	320,70	674,40	18,63	78,85	84,25	144,90	179,20	26,07	77,15	198,00	93,40	9,70	50,5	117,07	70,8	249,57
	5,80	69,00	299,20	2,80	61,30	21,60	26,70	76,40	225,80	623,70	15,80	64,20	79,70	136,00	136,90	21,30	98,80	178,10	85,60	54,60	51	91,1	44,9	267,6
	4,40	92,05	406,80	4,40	60,83	46,50	49,87	20,65	234,15	598,77	17,80	70,00	73,35	152,40	238,10	26,80	119,15	252,50	134,25	18,30	31	94,27	73,97	204,47
	3,95	51,45	340,47	4,37	60,27	47,30	31,10	36,10	288,40	658,60	13,07	70,53	65,25	140,70	140,20	25,33	65,85	190,35	113,40	4,10	55,15	89,9	71,63	219,27
Com AOS	4,40	47,10	347,10	4,80	51,97	38,15	23,17	39,25	163,85	545,83	13,97	76,80	77,00	143,40	166,97	23,33	64,97	222,30	76,87	8,60	47,85	108,07	61,03	237,2
	4,70	93,90	317,30	4,77	71,10	38,45	26,03	41,25	207,90	664,70	12,10	81,50	89,50	162,40	203,60	28,33	77,30	174,50	97,10	40,20	78,25	84,3	87,5	343,13
	5,90	61,90	456,35	3,23	83,03	50,30	28,83	24,87	225,70	669,13	5,70	73,60	67,75	146,30	195,80	25,63	58,40	171,05	121,10	30,90	30,27	83,03	69,37	172
	5,30	45,10	393,80	3,10	65,90	26,50	31,60	63,20	194,20	693,00	7,00	76,20	82,00	142,40	157,40	25,70	88,80	194,10	73,90	48,60	62,2	91,7	67,8	278,6
	3,35	53,65	421,20	3,73	70,50	43,90	36,40	17,00	163,50	494,73	9,00	76,25	68,70	124,05	194,90	27,90	78,60	238,85	105,25	9,00	24,9	131,7	77	206,47
	5,73	81,65	483,60	5,83	53,10	52,57	38,30	18,00	261,25	620,80	20,60	68,33	126,45	215,80	209,85	35,80	125,65	276,00	120,85	14,10	31,6	111,1	73,1	281,9
	5,05	74,15	346,03	5,30	68,67	35,25	27,07	37,05	227,40	577,53	8,83	69,63	86,75	160,40	213,20	27,73	82,90	174,20	100,55	5,10	51,2	83,9	70,37	300,23
	7,70	103,60	395,2	1,20	70,00	26,50	18,90	60,80	170,90	631,50	9,30	72,90	73,40	129,90	192,10	28,00	72,10	213,40	68,30	70,00	57,3	77,6	61,9	243,1
	4,10	60,45	311,70	5,07	26,80	31,57	19,20	24,40	143,40	462,70	9,45	62,63	102,00	181,80	239,25	22,90	92,90	195,85	101,15	14,10	74,95	74,9	77,2	231,4
	6,10	73,80	234,90	1,60	49,40	28,70	39,00	63,50	252,60	718,00	9,20	81,90	95,10	160,40	167,10	28,30	93,80	206,90	81,40	37,50	62,8	106,1	75,6	266,6
	6,6	122,1	212,6	1,6	80,1	28	34,2	79,00	159,7	672,9	8,1	76,8	90,1	171	170,6	28,4	93,8	161,4	104,3	39	73,3	105	76,2	279,7
	6,9	95,6	320,1	1,8	55,1	28,2	31,2	64,6	211,5	821,5	10,3	79,9	86,3	158,9	193	23,6	127,3	203,8	78,6	36	59,6	90,1	69,7	270,4
	4,5	74,1	347,4	1,4	67,1	26,7	25,3	65,6	204,5	658	10,6	72,3	79,8	135,7	132,2	24,8	66,5	155,6	84,3	36,8	82,2	86,9	71,3	250,8
	7,2	60,6	269,4	0,4	71,8	25,3	22	58,7	188,6	624	9	86	71,5	115,2	137,9	25,3	45,7	153,2	67,8	39,1	62,1	74,5	73,1	229,3
	5,3	55,6	362,9	1,2	86,8	34,4	26,3	56,7	221	777,8	7,8	79,8	72,6	135,6	151,7	25,2	53,7	181,4	79,8	38,8	51,9	113,7	75,3	227,1
	5,9	81,3	298,6	1,6	101,1	27,6	29,2	68,8	229,7	790,3	6,5	86,3	84,7	145,5	200,2	28,3	78,1	277,4	91	59,3	66,5	76,3	67,2	258,3
	5,6	48,3	270,3	0,9	81,2	28,8	26,8	70	209,6	793,4	8,3	83,5	74,4	138,3	177,4	29,5	61,2	141,2	71,2	62,9	70,4	72,6	71,1	240,6
	4,7	41,4	379,6	2,8	45,2	30,4	31,5	65,9	259,4	647,7	5	77,6	84,9	149,7	136	23,9	77	219,4	75,1	49,1	57,5	77,3	68,4	274,9
	5,5	33,8	247,7	3,9	89,3	28,8	35,3	74,5	258,9	770,4	14,9	80,6	132,3	201,1	186,7	29,8	78,8	182	89,3	77,9	65,3	123,7	80,4	361,6

Anexo 10: Concentração de aminoácidos no plasma para cada participante incluído no estudo (continuação).

Grupos	Asp (uM)	Glu (uM)	Ala (uM)	Aloisoleucina (uM)	Arg (uM)	Asn (uM)	Cit(uM)	Phe (uM)	Gly (uM)	Gln (uM)	Pro-OH (uM)	His (uM)	Ile (uM)	Leu (uM)	Lis (uM)	Met (uM)	Orn (uM)	Pro (uM)	Ser (uM)	Tau (uM)	Tyr (uM)	Thr (uM)	Trp (uM)	Val (uM)
	4,65	75,10	446,40	4,27	49,77	36,50	23,53	33,35	325,20	596,23	12,77	59,00	80,77	127,20	176,83	19,00	84,10	201,70	97,00	6,60	44,25	101,2	63,87	229,3
	5,05	110,03	407,95	5,20	59,13	36,55	33,47	53,95	200,15	595,63	9,57	80,60	88,35	168,50	203,25	27,13	88,20	191,95	106,10	5,30	72,2	99,87	79,2	277,3
	4,17	53,70	324,00	3,97	49,23	40,63	41,15	40,05	158,80	550,03	15,70	71,50	87,65	161,40	178,30	26,57	113,90	177,80	94,65	9,70	66,15	106,6	68,87	286
	3,55	91,70	267,87	4,90	53,77	35,60	30,43	43,30	130,30	552,57	11,93	80,47	122,10	204,95	234,65	24,80	97,05	249,15	111,15	2,10	32,7	90,1	80,07	306,7
	4,25	96,23	313,65	5,67	42,77	36,15	25,73	20,55	151,80	599,83	8,07	64,40	99,53	170,53	168,90	23,10	64,60	188,55	103,10	3,50	23,2	101	58,97	261,07
	6,40	87,17	433,87	3,40	50,53	34,55	31,77	24,60	272,10	516,97	9,33	66,83	66,80	139,73	132,25	28,40	71,05	268,20	106,30	14,50	34,65	104,97	92,07	226,67
	4,15	61,53	401,80	4,07	41,60	42,55	31,73	41,30	278,65	519,83	7,67	65,17	89,30	162,60	184,80	26,10	106,25	138,65	115,30	53,00	50,25	87,03	78,5	243,6
Sem AOS	6,40	113,17	329,70	2,50	56,00	40,05	36,60	61,10	191,20	601,37	7,93	81,30	91,50	172,00	132,90	26,17	83,15	268,15	84,87	50,70	72,7	81,2	84,6	291,05
	3,65	127,30	316,30	4,83	67,00	38,25	28,77	67,60	258,90	543,07	16,43	70,70	86,30	140,30	161,90	24,27	87,10	229,40	92,20	56,20	72,8	82,63	76,2	238,67
	3,97	94,45	364,90	4,30	73,30	40,00	29,75	39,55	209,55	594,83	10,13	87,90	96,60	180,75	249,40	28,00	99,25	162,30	119,95	11,20	61	104,45	80,65	242,47
	5,80	83,00	346,6	1,90	74,50	30,50	28,20	68,90	183,10	746,40	6,50	74,80	78,20	133,50	170,70	30,80	103,80	171,20	80,40	47,90	77,3	66,9	72,2	228,7
	3,35	57,45	279,50	5,97	52,17	37,27	34,65	15,70	193,60	518,90	18,80	62,33	94,65	168,75	194,65	25,10	66,75	187,25	112,65	16,50	14,55	72,7	47,5	239,77
	5,20	55,30	300,15	3,07	62,30	41,90	32,73	43,60	226,75	561,03	5,65	74,33	56,90	117,20	131,70	25,67	59,15	130,45	102,10	20,80	52,35	95,93	75,35	191,57
	6,17	85,90	254,30	3,77	54,30	30,85	27,60	62,00	181,70	659,80	12,60	44,90	71,30	131,30	149,40	21,70	62,20	143,25	94,20	80,20	44,6	89,6	62,8	265,17
	3,70	55,57	274,43	3,53	60,10	34,75	21,57	37,80	205,35	546,07	6,07	70,85	70,70	132,57	158,20	19,50	59,20	202,70	88,83	10,80	52,95	79,15	64,37	243,85
	5,3	88,9	278,8	0,6	75,3	23,7	22,3	59,9	168	659,9	6,7	61,3	75,5	134,7	151,4	25,1	58,3	290,9	101,4	60,7	67,5	95,5	59,5	272,7

Anexo 11: Metabólitos analisados por GC-MS comparados por grupos de estudo. Representação do teste t e lista VIP, segundo os critérios discriminantes citados, junto com as respectivas médias e desvio-padrão, avaliação da sensibilidade e especificidade (AUC) e intervalo de confiança de 95%.

Metabólitos	Sem OSA (n=16)	Com OSA (n=37)	Valores de <i>p</i>	VIP	IC. 95%	AUC (IC 95%)
(R*,R*)-2,3-Dihydroxybutanoic acid, tris(trimethylsilyl)-	3.9 ± 2.2	3.6 ± 2.8	0.479	0.634	[-1.45; 1.5]	0.531 (0.715 - 0.347)
.alpha.-D-Galactopyranose, 2,3,4,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)- , bis(trimethylsilyl) phosphate	4.7 ± 2.8	5.0 ± 3.3	0.930	0.149	[-2.56; 0.97]	0.579 (0.763 - 0.394)
.alpha.-Tocopherol, TMS derivative	48 ± 24.4	49 ± 17.8	0.607	0.354	[-5.73; 15.48]	0.568 (0.768 - 0.367)
.beta.-D-Galactofuranose, 1,2,3,5,6-pentakis-O- (trimethylsilyl)-	3.7 ± 1.5	3.3 ± 1.5	0.366	0.877	[-0.65; 0.9]	0.525 (0.726 - 0.323)
.beta.-Gentiobiose, octakis(trimethylsilyl) ether, methyloxime (isomer 1)	0.2 ± 0.2	0.3 ± 0.3	0.171	1.213	[-0.16; 0.18]	0.549 (0.758 - 0.34)
.beta.-Tocopherol, TMS derivative	1.0 ± 0.4	1.2 ± 0.6	1.000	1.235	[-0.47; -0.02]	0.692 (0.859 - 0.525)
.delta.-Tocopherol, TMS derivative	0.2 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.198	0.777	[-0.12; 0.11]	0.504 (0.74 - 0.268)
.gamma.-Tocopherol, TMS derivative	5.1 ± 1.1	6.1 ± 2.1	0.437	0.356	[-1.85; -0.05]	0.671 (0.819 - 0.522)
[1015] O-phosphocolamine [16.232]	9.4 ± 2.5	8.7 ± 2.4	0.236	1.690	[-0.84; 2.14]	0.6 (0.774 - 0.425)
[1023] pyrophosphate [14.993]	37.3 ± 9.	36.8 ± 10.5	0.977	0.107	[-5.44; 6.5]	0.502 (0.674 - 0.329)
[10467] arachidic acid [22.367]	1.5 ± 0.8	1.1 ± 0.9	0.246	0.344	[-0.39; 0.63]	0.574 (0.77 - 0.379)
[1101] L- sorbose 1 [17.187]	16.7 ± 11.6	13.5 ± 8.0	0.244	1.106	[-3.12; 10]	0.593 (0.818 - 0.367)
[1110] succinic acid [10.509]	10.4 ± 4.0	10.0 ± 3.9	0.268	1.140	[-1.07; 3.14]	0.607 (0.776 - 0.438)
[1175] uric acid 1 [19.331]	203.9 ± 51.2	196.4 ± 46.1	0.871	0.183	[-23.13; 38.06]	0.539 (0.72 - 0.358)
[169019] D-threitol [12.954]	8.5 ± 6.3	11.1 ± 4.1	0.304	0.111	[-3.97; 3.3]	0.599 (0.81 - 0.388)
[18950] D-mannose 1 [17.287]	45.4 ± 9.6	45.0 ± 12.2	0.931	0.081	[-5.95; 6.75]	0.508 (0.679 - 0.338)
[219984] 1,5-anhydro-D-sorbitol [16.967]	178.8 ± 65.9	180.4 ± 59.7	0.962	0.541	[-41.08; 37.74]	0.52 (0.694 - 0.346)
[236] L-asparagine 2 [14.984]	4.7 ± 1.7	5.0 ± 1.9	0.508	0.463	[-1.38; 0.74]	0.562 (0.729 - 0.396)
[311] citric acid [16.615]	65.5 ± 13.9	68.9 ± 19.1	0.625	0.674	[-12.91; 6.06]	0.515 (0.693 - 0.337)
[33032] L-glutamic acid 2 [14.398]	25.8 ± 9.8	20.7 ± 9.2	0.331	0.303	[-0.89; 10.96]	0.659 (0.824 - 0.494)
[3893] lauric acid [14.789]	3.8 ± 1.2	3.9 ± 2.8	0.285	0.793	[-1.26; 0.96]	0.574 (0.746 - 0.403)
[4114] xanthotoxin 2 [20.715]	109.2 ± 32.3	117.4 ± 36.1	0.471	0.532	[-28.65; 12.24]	0.554 (0.721 - 0.387)
[439746] 6-deoxy-D-glucose 2 [15.751]	2.6 ± 1.8	4.4 ± 2.5	0.021	2.637*	[-2.35; 0.28]	0.667 (0.883 - 0.451)
[445638] palmitoleic acid [18.728]	23 ± 10.1	24.6 ± 13.9	0.625	0.097	[-8.44; 5.33]	0.505 (0.679 - 0.331)
[5280450] linoleic acid [20.399]	100.3 ± 42.8	96.4 ± 47.3	0.811	0.253	[-23.15; 30.81]	0.539 (0.705 - 0.372)

[5364509] methyl oleate [19.44]	150 ± 75.6	138.0 ± 50.4	0.414	0.253	[-30.9; 54.94]	0.537 (0.72 - 0.354)
[5460407] threonic acid [13.652]	21.8 ± 10.7	20.9 ± 16.8	0.529	0.721	[-8.03; 7.58]	0.557 (0.719 - 0.395)
[5780] D-sorbitol [17.898]	2.9 ± 5.0	2.2 ± 2.0	0.429	0.433	[-3.13; 6.67]	0.496 (0.761 - 0.23)
[5810] trans-4-hydroxy-L-proline 1 [12.615]	6.7 ± 2.7	7.5 ± 3.1	0.962	0.174	[-2.73; 0.64]	0.618 (0.792 - 0.444)
[5962] L-lysine 2 [17.643]	103.8 ± 26.6	107.1 ± 19.4	0.680	0.041	[-18.58; 11.96]	0.483 (0.675 - 0.291)
[6057] tyrosine 1 [17.354]	22.6 ± 7	26.8 ± 8.3	0.024	1.308	[-6.88; -0.74]	0.697 (0.853 - 0.542)
[6057] tyrosine 2 [17.871]	94.6 ± 25.1	93.3 ± 18.5	0.392	1.235	[-13.25; 15.69]	0.524 (0.714 - 0.334)
[6137] L-methionine 2 [13.188]	5.4 ± 0.9	6.0 ± 1.3	0.313	0.521	[-1.19; 0.08]	0.627 (0.794 - 0.46)
[614] L-proline 2 [10.341]	34.3 ± 20.4	29.5 ± 17.5	0.338	0.972	[-10.21; 12.28]	0.522 (0.757 - 0.286)
[6161490] trans-13-octadecenoic acid [20.608]	33.2 ± 24.6	30.9 ± 26.8	0.448	0.601	[-13.06; 17.78]	0.566 (0.737 - 0.395)
[6274] L-histidine 3 [17.658]	23 ± 8.8	23.9 ± 6.8	0.260	1.072	[-4.32; 4.89]	0.481 (0.661 - 0.301)
[6287] L-valine 2 [9.151]	7.7 ± 9.3	9.9 ± 9.2	0.264	0.641	[-9.52; 12.69]	0.447 (0.727 - 0.167)
[6288] L-threonine 1 [10.224]	84.5 ± 43.9	79.9 ± 45	0.854	0.185	[-16.28; 32.07]	0.583 (0.766 - 0.4)
[6305] L-tryptophan 2 [20.466]	64.9 ± 25.6	68.6 ± 28.0	0.598	0.672	[-19.76; 12.33]	0.552 (0.714 - 0.391)
[637517] elaidic acid [20.508]	228.2 ± 56.7	213.7 ± 56.6	0.129	0.812	[-20.16; 49.21]	0.566 (0.738 - 0.394)
[643801] methyl palmitoleate [17.466]	63.1 ± 45.2	56.3 ± 30.6	0.723	0.440	[-18.93; 32.5]	0.498 (0.68 - 0.316)
[64956] DL-3-aminoisobutyric acid 2 [12.457]	12.1 ± 5.3	10.8 ± 3.9	0.197	0.336	[-0.58; 4.5]	0.655 (0.853 - 0.458)
[65098] norvaline 2 [9.468]	60.8 ± 13.7	60.5 ± 14.1	0.962	0.154	[-8.23; 8.69]	0.502 (0.675 - 0.328)
[6665] 5alpha-Cholesterol [27.436]	2.6 ± 1.4	2.4 ± 1.4	0.432	0.314	[-0.32; 1.15]	0.662 (0.848 - 0.476)
[67678] L-cystine 2 [20.862]	7.3 ± 2.6	7.2 ± 2.9	0.371	0.521	[-1.57; 1.7]	0.52 (0.702 - 0.338)
[67678] L-cystine 3 [21.104]	10.0 ± 3.6	10.0 ± 3.8	0.277	0.861	[-2.22; 2.25]	0.49 (0.666 - 0.314)
[738] L-glutamine 3 [16.092]	65.9 ± 31.1	62.7 ± 25.0	0.008*	2.806*	[-11.82; 22.72]	0.556 (0.742 - 0.37)
[7405] L-pyroglutamic acid [13.218]	76.7 ± 28.8	60.7 ± 29.1	0.367	1.080	[-9.69; 24.66]	0.554 (0.737 - 0.372)
[750] glycine [10.456]	59.5 ± 19.5	55.0 ± 15.3	0.520	0.758	[-6.8; 15.83]	0.443 (0.619 - 0.266)
[754] glycerol 1-phosphate [16.056]	26.2 ± 18.7	31.4 ± 32.0	0.414	0.565	[-19.4; 8.91]	0.534 (0.703 - 0.365)
[827] ribitol [15.66]	5.4 ± 2.4	5.5 ± 2.9	0.708	0.010	[-1.64; 1.5]	0.542 (0.725 - 0.359)
[8343] dioctyl phthalate [23.163]	32.5 ± 15.3	29.6 ± 12.0	0.508	0.501	[-5.96; 11.84]	0.556 (0.743 - 0.369)
[8897] iminodiacetic acid 1 [12.487]	40.6 ± 16.3	42.5 ± 12.3	0.962	0.548	[-11.34; 7.47]	0.586 (0.778 - 0.395)
[892] myo-inositol [19.354]	55.9 ± 16.3	54.8 ± 21.2	0.124	1.285	[-9.85; 11.87]	0.554 (0.725 - 0.383)
[92824] D-malic acid [12.794]	3.7 ± 1.6	3.5 ± 2.3	0.425	1.147	[-0.97; 1.25]	0.562 (0.722 - 0.403)
[9316] methyl linolenate [19.432]	73.6 ± 45.9	64.6 ± 34.4	0.184	0.977	[-20.31; 32.62]	0.529 (0.717 - 0.34)
[938] nicotinic acid [10.27]	2.5 ± 1.3	2.9 ± 1.2	0.170	1.198	[-0.64; 0.48]	0.528 (0.72 - 0.336)

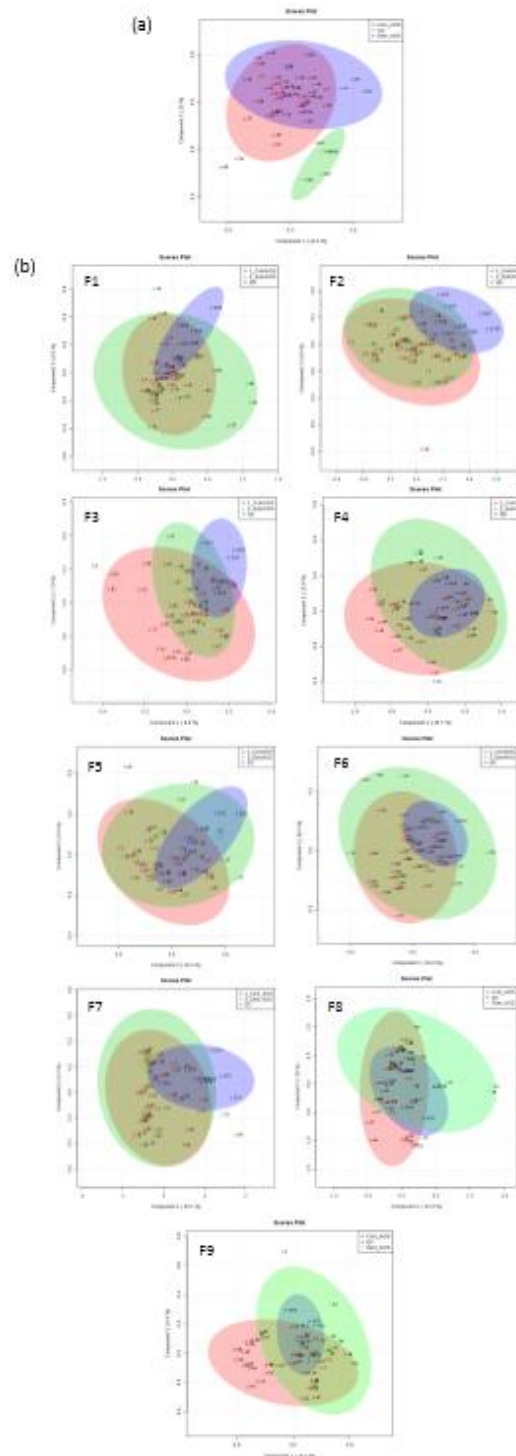
[9750] citrulline 2 [16.691]	1.4 ± 0.8	1.3 ± 0.8	0.158	1.222	[-0.53; 0.48]	0.513 (0.715 - 0.311)
[985] palmitic acid [18.846]	134.3 ± 34.1	143.3 ± 30.8	0.931	1.238	[-29.39; 11.41]	0.596 (0.768 - 0.424)
[RTL] Myristic Acid d27 [16.727]	289.5 ± 44.1	296 ± 41.8	0.886	0.812	[-33.16; 20.16]	0.551 (0.728 - 0.373)
{4-Methoxy-2-[(trimethylsilyl)oxy]phenyl}{2-[(trimethylsilyl)oxy]phenyl}methanone	1.6 ± 1.0	1.5 ± 1.0	0.913	0.182	[-0.73; 0.43]	0.63 (0.832 - 0.429)
1-(Trifluoroacetyl)-L-proline, TMS derivative	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.2	0.846	0.234	[-0.02; 0.18]	0.64 (0.814 - 0.466)
1,2-Dipalmitin, TMS derivative	6.4 ± 4.9	6.0 ± 4.1	0.886	0.180	[-2.54; 3.27]	0.505 (0.693 - 0.317)
1,3-Dipalmitin, TMS derivative	5.9 ± 2.8	6.2 ± 3.5	0.425	0.664	[-2.11; 1.6]	0.485 (0.672 - 0.297)
1,3-Propanediol, 2TMS derivative	47.3 ± 16.4	42.2 ± 16.8	0.392	0.384	[-4.97; 15.25]	0.618 (0.791 - 0.445)
1,5-Diformyl-2,6-dimethoxy-anthracene	2.4 ± 1.6	2.6 ± 1.4	0.535	0.624	[-0.66; 1.15]	0.584 (0.816 - 0.353)
10-Heptadecenoic acid, (Z)-, TMS derivative	0.5 ± 0.4	0.8 ± 0.6	0.106	1.327	[-0.56; 0.12]	0.628 (0.859 - 0.397)
13-Docosenoic acid, methyl ester, (Z)-	79.0 ± 45.7	71.3 ± 35.6	0.124	1.561	[-18.78; 34.26]	0.559 (0.736 - 0.382)
1-Chloromethyl-1-hexadecyloxy-1-silacyclohexane	50.6 ± 78.6	70.6 ± 74.4	0.307	1.325	[-75.03; 67.01]	0.421 (0.705 - 0.136)
1-Heptanol, TMS derivative	6.0 ± 2.4	6.1 ± 2.1	0.529	0.173	[-1.59; 1.02]	0.582 (0.789 - 0.375)
1H-Indole-2,3-dione, 1-(tert-butyldimethylsilyl)-7-propyl-, 3-(O-methyloxime)	2.6 ± 2.2	2.6 ± 1.8	1.000	0.195	[-1.26; 1.8]	0.539 (0.745 - 0.333)
1H-Pyrazole, 4-nitro-	9.2 ± 2.1	8.7 ± 2.6	0.708	0.542	[-1; 1.7]	0.557 (0.73 - 0.385)
1-Monomyristin, 2TMS derivative	58.1 ± 11.2	56.1 ± 9.9	0.285	1.276	[-4.7; 8.65]	0.53 (0.711 - 0.35)
2-(Methylamino)ethanol, tert-butyldimethylsilyl ether	7.1 ± 2.8	4.4 ± 2.9	0.069	1.915	[-0.16; 3.28]	0.654 (0.832 - 0.476)
2,3-Dihydroxypropyl icosanoate, 2TMS derivative	8.4 ± 1.5	8.6 ± 1.5	0.840	0.072	[-1.08; 0.79]	0.529 (0.71 - 0.347)
2,5-Di-tert-butyl-4-((trimethylsilyl)oxy)phenol	3.0 ± 0.9	2.9 ± 0.9	0.900	0.165	[-0.46; 0.41]	0.515 (0.699 - 0.331)
2,6-Bis(tert-butyl)phenol, TMS derivative	5.7 ± 3.4	5.0 ± 2.6	0.811	0.151	[-1.33; 2.56]	0.537 (0.718 - 0.356)
2,6-Diphenyl-1,7-dihydrodipyrrolo[2,3-b:3',2'-e]pyridine	9.2 ± 3.2	10.2 ± 3.4	0.021*	3.046*	[-3.64; 0.15]	0.693 (0.872 - 0.514)
2-Ethyl-3-hydroxypropionic acid, di-TMS	1.7 ± 0.8	1.6 ± 0.9	0.502	0.433	[-0.37; 0.44]	0.544 (0.743 - 0.344)
2H,8H-Benzo[1,2-b:3,4-b']dipyran-6-propanoic acid, 5-methoxy-2,2,8,8-tetramethyl-	1.0 ± 0.5	0.9 ± 0.6	0.272	1.212	[-0.48; 0.1]	0.672 (0.886 - 0.457)
2-Ketoisocaproic acid mo-tms	19.3 ± 5.9	18.4 ± 5.1	0.086	1.470	[-2.6; 4.39]	0.47 (0.645 - 0.294)
2-Monostearin, 2TMS derivative	99.5 ± 25.9	95.8 ± 27.2	1.000	0.286	[-12.3; 19.81]	0.554 (0.725 - 0.383)
2-Palmitoylglycerol, 2TMS derivative	124.1 ± 23.4	126.6 ± 32.4	0.625	0.354	[-18.6; 13.43]	0.519 (0.686 - 0.351)
2-Propanol, 1,3-dibromo-	5.1 ± 3.3	4.9 ± 3.2	0.897	0.488	[-0.61; 1.88]	0.538 (0.738 - 0.337)
3-.alpha.-Mannobiose, octakis(trimethylsilyl) ether (isomer 2)	35.9 ± 26.5	38.3 ± 23.6	0.620	0.441	[-12.27; 18.03]	0.539 (0.743 - 0.335)
3-[3-(4-Hydroxyphenyl)-3-oxoprop-1-en-1-yl]-6-methylchromen-4-one	2.1 ± 1.3	2.0 ± 1.3	0.594	0.489	[-0.58; 0.76]	0.481 (0.701 - 0.261)
3-Indoleacetic acid, 2TMS derivative	2.7 ± 1.6	3.2 ± 1.8	0.454	0.633	[-1.38; 0.5]	0.581 (0.779 - 0.382)

3-Pyridinol, TMS derivative	2.5 ± 2.7	5.2 ± 5.1	0.063	1.283	[-4.68; 0.78]	0.569 (0.765 - 0.373)
4-Bromo-1-butanol, TBDMS derivative	32.3 ± 11.7	28.4 ± 11.9	0.102	1.687	[-3.98; 10.32]	0.566 (0.745 - 0.387)
5,5'-Biphtalide	2.2 ± 1.9	1.6 ± 2.1	0.019*	2.229*	[-1.41; 1.41]	0.528 (0.739 - 0.317)
6-Hydroxy-.alpha.-methylnaphthaleneacetic acid, di-TMS	125.7 ± 23.8	135.4 ± 26.0	0.013	1.230	[-24.59; 5.26]	0.62 (0.78 - 0.46)
9-Hexadecenoic acid, (Z)-, TBDMS derivative	73.3 ± 13.2	77.4 ± 13.7	0.011*	2.837*	[-12.34; 3.98]	0.605 (0.776 - 0.434)
9H-Purin-6-ol, 2TMS derivative	1.1 ± 0.5	0.7 ± 0.5	0.058	0.867	[-0.12; 0.42]	0.649 (0.838 - 0.46)
Acetamide, TMS derivative	7.1 ± 1.7	6.0 ± 3.2	0.099	2.474	[-1.57; 0.6]	0.555 (0.736 - 0.373)
Aminomalonic acid, tris(trimethylsilyl)-	8.4 ± 6.9	9.7 ± 5.3	0.432	1.061	[-4.44; 4.31]	0.535 (0.763 - 0.308)
Anthraquinone, 1-(o-chlorophenyl)-	9.2 ± 2.1	9.5 ± 3.2	0.977	0.046	[-1.8; 1.15]	0.507 (0.668 - 0.346)
Arachidonic acid, TMS derivative	7.3 ± 2.5	10.1 ± 11.9	0.036*	2.381*	[-6.87; 1.39]	0.596 (0.758 - 0.435)
Cholest-7-en-3-ol, (3.beta.,5.alpha.)-, TMS derivative	2.6 ± 0.8	3.4 ± 1.5	0.115	1.362	[-1.43; -0.13]	0.647 (0.801 - 0.493)
Cholestanol, 5,6-epoxy-, acetate(ester)	3.9 ± 1.3	3.7 ± 1.8	0.211	1.106	[-1.18; 0.52]	0.55 (0.728 - 0.373)
Cholesterol, TMS derivative	161.5 ± 72.0	163.9 ± 85.3	0.776	0.136	[-49.19; 24.33]	0.532 (0.73 - 0.334)
Cyclodecasiloxane, eicosamethyl-	149.5 ± 113.7	123.5 ± 99.9	0.154	1.529	[-21.94; 114.48]	0.664 (0.826 - 0.502)
Cyclohexene, 3-butyl-3,5,5-trimethyl-1-(trimethylsilyloxy)-	2.7 ± 0.9	2.8 ± 1.0	0.309	0.940	[-0.52; 0.31]	0.54 (0.728 - 0.353)
Cyclononasiloxane, octadecamethyl-	19.6 ± 20.5	14.9 ± 18.3	0.900	0.037	[-6.08; 20.01]	0.615 (0.796 - 0.435)
Cyclooctasiloxane, hexadecamethyl-	17.7 ± 17.2	15.2 ± 16.3	0.078	1.598	[-5.31; 17.27]	0.652 (0.82 - 0.484)
Diethanolamine, 2TMS derivative	5.4 ± 1.3	4.7 ± 1.5	0.162	1.255	[-0.23; 1.42]	0.618 (0.787 - 0.449)
DL-Ornithine, 3TMS derivative	18.6 ± 7.1	17.8 ± 6.5	0.437	0.648	[-3.49; 4.98]	0.542 (0.713 - 0.372)
DL-Phenylalanine, TMS derivative	26.6 ± 5.8	26.4 ± 4.5	0.855	0.297	[-3.19; 3.55]	0.495 (0.674 - 0.316)
Doconexent, TMS derivative	1.6 ± 1.0	2.2 ± 1.2	0.268	0.684	[-0.97; 0.26]	0.588 (0.803 - 0.373)
Edetic Acid, 4TMS derivative	176.8 ± 67.0	183.4 ± 60.8	0.392	0.372	[-46.63; 33.55]	0.578 (0.754 - 0.402)
Ethanol, 2-(methylamino)-, N-trifluoroacetyl, O-(tert-butyl)dimethylsilyl)	42.8 ± 28.3	41.6 ± 24.5	0.937	0.105	[-13.66; 18.79]	0.524 (0.749 - 0.299)
Ethanolamine, 3TMS derivative	28.3 ± 16.9	30.8 ± 14.5	0.691	0.304	[-10.35; 7.81]	0.494 (0.686 - 0.301)
Glucose, 5TMS derivative	26.3 ± 37.6	27.5 ± 33.8	0.438	0.994	[-27.37; 35.46]	0.559 (0.767 - 0.351)
Glyceric acid, 3TMS derivative	10.6 ± 3.5	9.6 ± 4.8	0.737	0.112	[-1.41; 3.37]	0.593 (0.755 - 0.431)
Glycine, 2TMS derivative	8.1 ± 4.4	8.9 ± 4.0	0.946	0.309	[-2.26; 2.35]	0.516 (0.711 - 0.321)
Heptadecanoic acid, glycerine-(1)-monoester, bis-O-trimethylsilyl-	4.3 ± 0.9	4.3 ± 1.0	0.855	0.224	[-0.64; 0.5]	0.5 (0.678 - 0.322)
Heptadecanoic acid, TMS derivative	2.3 ± 1.6	2.0 ± 1.1	0.219	1.684	[-0.6; 1.24]	0.522 (0.722 - 0.322)
Hexadecane	4.9 ± 4.0	3.6 ± 3.2	0.184	1.046	[-1.52; 3.48]	0.583 (0.77 - 0.396)
Hydroxylamine, 3TMS derivative	4.9 ± 2.0	4.8 ± 2.5	0.058	1.824	[-1.42; 1.19]	0.509 (0.678 - 0.339)

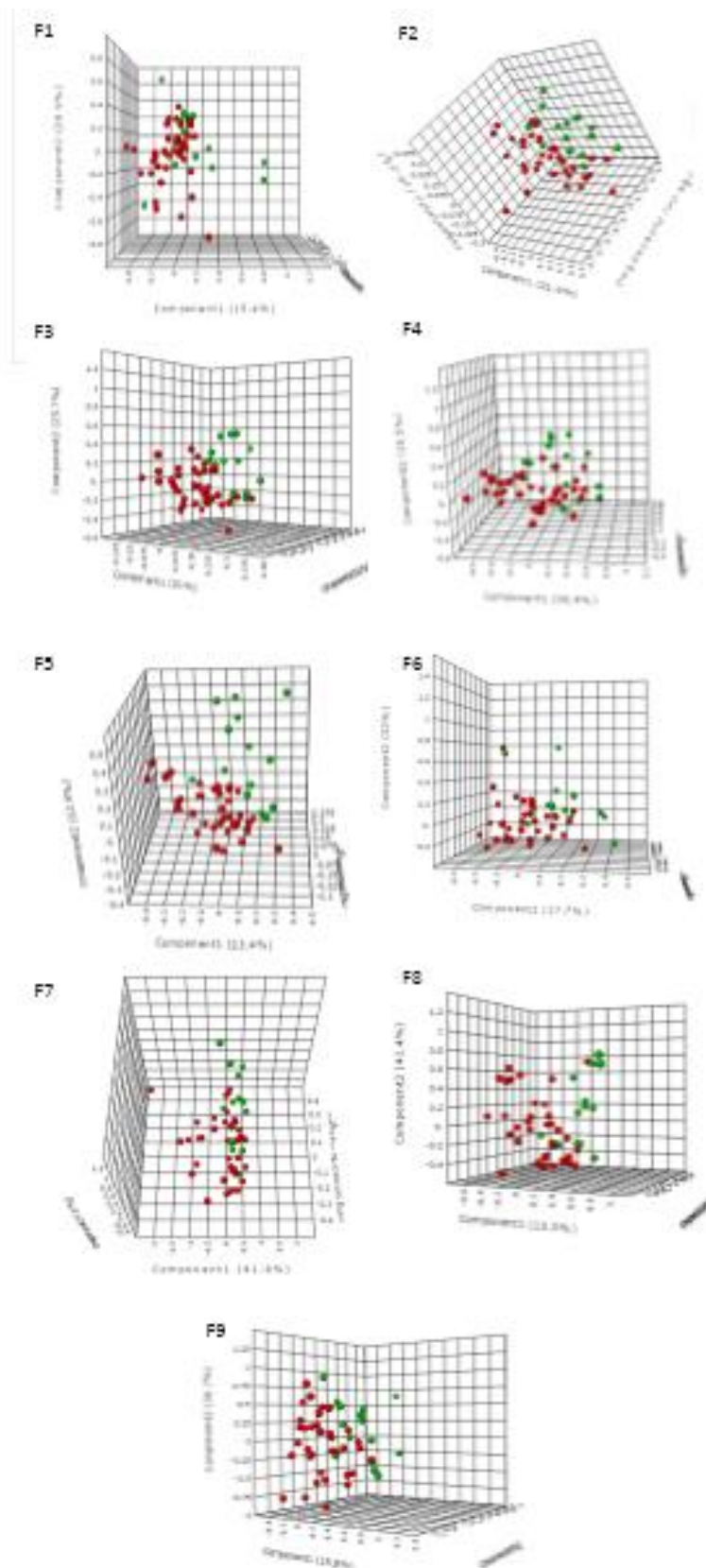
Lactic Acid, 2TMS derivative	105.5 ± 69.7	104 ± 76.6	0.142	0.821	[-42.28; 37.08]	0.493 (0.681 - 0.306)
L-Alanine, 2TMS derivative	26.4 ± 14.4	28 ± 12.5	0.120	0.798	[-10.06; 6.97]	0.579 (0.748 - 0.411)
L-Alanine, TMS derivative	15.2 ± 5.0	14.3 ± 6.2	0.274	0.407	[-3.22; 3.12]	0.52 (0.699 - 0.341)
L-Aspartic acid, 2TMS derivative	15.5 ± 11.1	10.8 ± 5.9	0.962	0.508	[-1.45; 10.86]	0.649 (0.83 - 0.467)
L-Isoleucine, 2TMS derivative	31.4 ± 9.9	36.4 ± 16.2	0.826	0.436	[-12.29; 2.38]	0.578 (0.745 - 0.41)
L-Leucine, TMS derivative	53.9 ± 15.0	44.8 ± 18.5	0.187	1.007	[-2.76; 12.18]	0.613 (0.788 - 0.438)
L-Methionine, TMS derivative	11.0 ± 2.3	10.3 ± 2.3	0.351	1.209	[-0.66; 2.17]	0.59 (0.766 - 0.413)
L-Phenylalanine, 2TMS derivative	29.9 ± 8.6	30.2 ± 5.6	0.871	0.041	[-5.19; 4.59]	0.508 (0.717 - 0.3)
L-Proline, 2TMS derivative	45.9 ± 26.8	35.9 ± 13.6	0.886	0.340	[-4.81; 24.78]	0.598 (0.785 - 0.411)
L-Proline, TMS derivative	75.2 ± 14.5	69.0 ± 16.3	0.520	0.011	[-4.05; 13.69]	0.616 (0.797 - 0.435)
L-Serine, 2TMS derivative	40.4 ± 15.1	37.9 ± 17.3	0.207	0.816	[-7.11; 12.12]	0.578 (0.749 - 0.406)
L-Threonine, 3TMS derivative	54.5 ± 18.7	57.2 ± 17.6	0.855	0.315	[-13.94; 8.59]	0.458 (0.641 - 0.274)
L-Valine, TMS derivative	67.0 ± 24.6	53.4 ± 23.1	0.124	1.437	[-1.24; 28.44]	0.671 (0.832 - 0.509)
Methoxyamine, TMS derivative	44.8 ± 27.1	47.3 ± 24.7	0.663	0.386	[-16.48; 14.99]	0.529 (0.718 - 0.341)
Methyl 2-[2-(4-chlorophenyl)-5-methyl-1H-imidazol-1-yl]dithiobenzoate	4.9 ± 7.3	3.1 ± 3.5	0.375	0.727	[-3.14; 6.05]	0.495 (0.686 - 0.303)
Monolaurin, 2TMS derivative	5.9 ± 1.0	6.2 ± 1.0	0.313	0.986	[-0.86; 0.31]	0.596 (0.762 - 0.43)
Myo-Inositol, 1,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, bis(trimethylsilyl) phosphate	2.3 ± 1.1	2.6 ± 1.4	0.688	0.197	[-0.82; 0.23]	0.589 (0.773 - 0.405)
N-(2-Acetamido)iminodiacetic acid, 3TMS derivative	13.8 ± 7.2	16 ± 6.6	0.946	0.307	[-5.61; 2.64]	0.576 (0.763 - 0.388)
Nonanoic acid, TMS derivative	3.8 ± 2.8	3.4 ± 1.7	0.389	0.320	[-0.91; 2.41]	0.54 (0.757 - 0.323)
Oxalic acid, 2TMS derivative	180.5 ± 34.3	183.3 ± 54.9	0.694	0.075	[-27.88; 22.33]	0.549 (0.718 - 0.38)
Pentadecanoic acid, TMS derivative	2.5 ± 0.7	2.6 ± 0.9	0.766	0.239	[-0.65; 0.29]	0.468 (0.64 - 0.296)
Pentanedioic acid, 2-(methoxyimino)-, bis(trimethylsilyl) ester	10.0 ± 4.9	9.1 ± 4.9	0.572	1.000	[-2.09; 3.13]	0.549 (0.754 - 0.345)
Pentasiloxane, dodecamethyl-	4.7 ± 3.1	4.3 ± 2.1	0.930	0.111	[-0.24; 3.04]	0.669 (0.854 - 0.484)
Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-, phosphite (3:1)	4.2 ± 1	4.4 ± 1.0	0.680	0.344	[-0.78; 0.45]	0.473 (0.648 - 0.298)
Phosphoric acid, 2-[(trimethylsilyloxy)-1,3-propanediyl tetrakis(trimethylsilyl) ester	36.0 ± 20.9	44.9 ± 18.9	0.085	1.825	[-11.66; 11.42]	0.504 (0.769 - 0.239)
Phosphoric acid, bis(trimethylsilyl)monomethyl ester	4.4 ± 1.1	4.5 ± 0.8	0.694	0.113	[-0.4; 0.59]	0.553 (0.728 - 0.378)
Pseudo uridine penta-tms	7.9 ± 1.8	7.4 ± 2.2	0.268	0.208	[-0.62; 1.69]	0.633 (0.799 - 0.468)
Pyrazine, 2,3,5-tris-(trimethylsilyloxy)-	1.2 ± 0.8	1.1 ± 0.7	0.443	1.123	[-0.43; 0.58]	0.495 (0.706 - 0.285)
Serine, 3TMS derivative	40.7 ± 10.3	42.1 ± 10.4	0.708	0.606	[-7.65; 4.98]	0.47 (0.647 - 0.292)
Silanamine, N,N'-methanetetraylbis[1,1,1-trimethyl-	5.8 ± 2.5	5.2 ± 2.6	0.123	1.725	[-0.94; 1.63]	0.576 (0.765 - 0.387)
Silane, diethyldecyloxyhexadecyloxy-	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.2	0.181	1.254	[-0.1; 0.11]	0.538 (0.724 - 0.353)

Silanol, trimethyl-, phosphate (3:1)	167.1 ± 37.4	156.5 ± 45.5	0.840	0.096	[-16.65; 29.98]	0.557 (0.74 - 0.375)
Tetrasiloxane, decamethyl-	1.4 ± 0.3	1.4 ± 0.4	0.757	0.233	[-0.17; 0.13]	0.502 (0.67 - 0.334)
Undecane, 2,10-dimethyl-	2.6 ± 1.3	2.2 ± 1.3	0.073	1.781	[-0.72; 0.81]	0.492 (0.676 - 0.308)

Anexo 12: Avaliação dos controles de qualidade (CQ) para o método de lipidômica por gráfico de análise dos componentes principais (PCA). (a) CQ das alíquotas pré separação por cromatografia líquida, (b) CQ dos controles de qualidade separados por fração pós separação por cromatografia líquida. F_n indica as frações coletadas, onde n é o número da fração.



Anexo 13: Avaliação da separação dos grupos por fração coletada nas análises de lipídios. Sem AOS (vermelho) e com AOS (verde).



Anexo 14: Avaliação da predição da AOS por meio dos metabólitos individuais adicionados do questionário NoSAS de pré-seleção significativa para diagnóstico

	Coeficiente	Erro	OR	IC inferior	IC superior	Valores de p	VIF
Intercepto	-0,222	1,478				0,88	
NoSAS	0,414	0,139	1,514	1,176	2,055	0,003	1,237
Ácido glutâmico,	-0,042	0,016	0,959	0,925	0,988	0,011	1,237
AUC	0,814						

	Coeficiente	Erro	OR	IC inferior	IC superior	Valores de p	VIF
Intercepto	-1,370	1,403				0,329	
NoSAS	0,223	0,131	1,250	0,969	1,637	0,089	1,144
Glutamina,	0,001	0,001	1,001	1,000	1,003	0,085	1,144
AUC	0,787						

	Coeficiente	Erro	OR	IC inferior	IC superior	Valores de p	VIF
Intercepto	-2,453	1,345				0,068	
NoSAS	0,336	0,131	1,399	1,099	1,855	0,010	1,043
6-deoxi-D-glicose,	0,002	0,001	1,002	1,000	1,003	0,024	1,043
AUC	0,781						

	Coeficiente	Erro	OR	IC inferior	IC superior	Valores de p	VIF
Intercepto	-2,267	1,255				0,071	
NoSAS	0,314	0,121	1,369	1,089	1,765	0,009	1,013
Ácido araquidônico	-0,001	0,001	0,999	0,997	1,000	0,052	1,013
AUC	0,791						

	Coeficiente	Erro	OR	IC inferior	IC superior	Valores de p	VIF
Intercepto	-3,248	1,447				0,025	
NoSAS	0,416	0,144	1,516	1,170	2,084	0,004	1,268
PE (35:1)	0,333	0,138	1,395	1,095	1,899	0,015	1,268
AUC	0,804						

	Coeficiente	Erro	OR	IC inferior	IC superior	Valores de p	VIF
Intercepto	-3,194	1,448				0,027	
NoSAS	0,413	0,143	1,511	1,166	2,068	0,004	1,154
SM (d18:1/12:0)	0,389	0,147	1,475	1,136	2,050	0,008	1,154
AUC	0,823						

	Coeficiente	Erro	OR	IC inferior	IC superior	Valores de p	VIF
Intercepto	-2,774	1,388				0,046	
NoSAS	0,366	0,134	1,441	1,127	1,934	0,007	1,094
LPC (27:1)	0,434	0,165	1,543	1,142	2,212	0,009	1,094
AUC	0,809						

8. Referências

1. Dempsey JA, Veasey SC, Morgan BJ, O'Donnell CP. Pathophysiology of sleep apnea. *Physiol Rev.* 2010;90(1):47-112. Erratum in: *Physiol Rev.*2010;90(2):797-8.
2. Young T, Palta M, Dempsey J, *et al.* The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N Engl J Med* 1993;328(17):1230-35.
3. Peppard PE, Young T, Barnet JH, *et al.* Increased prevalence of sleep-disordered breathing in adults. *Am J Epidemiol* 2013;177:1006–14.
4. Tufik S, Santos-Silva R, Taddei JA, Bittencourt LR. Obstructive sleep apnea syndrome in the Sao Paulo Epidemiologic Sleep Study. *Sleep Med.* 2010;11(5):441-6.
5. Heinzer R, Vat S, Marques-Vidal P, *et al.* Prevalence of sleep-disordered breathing in the general population: the HipnoLaus study. *Lancet Respir Med* 2015;3:310-18.
6. Sjöström C, Lindberg E, Elmasry A, *et al.* Prevalence of sleep apnea and snoring in hypertensive men: a population based study. *Thorax* 2002;57:602-8.
7. Drager, LF, Ladeira RT, Neto AB, Lorenzi GF, Benseñor IM. Síndrome da apneia obstrutiva do sono e sua relação com a hipertensão arterial sistêmica. Evidências atuais. *Arq Bras Cardiol* 2002;78(5):531-6.
8. Drager LF, Genta PR, Pedrosa RP, *et al.* Characteristics and predictors of obstructive sleep apnea in patients with systemic hypertension. *Am J Cardiol.* 2010;105(8):1135-9.
9. Gami AS, Pressman G, Caples SM, *et al.* Association of atrial fibrillation and obstructive sleep apnea. *Circulation.* 2004;110(4):364-7.
10. Sin DD, Fitzgerald F, Parker JD, *et al.* Risk factors for central and obstructive sleep apnea in 450 men and women with congestive heart failure. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1101-6.
11. Bradley TD, Floras JS. Sleep apnea and heart failure: Part I: obstructive sleep apnea. *Circulation.* 2003;107(12):1671-8.
12. Marin JM, Carrizo SJ, Vicente E, Agusti AGN. Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study. *The Lancet.* 2005;365(9464):1046-53.
13. Yaggi HK, Concato J, Kernan WN, *et al.* Obstructive sleep apnea as a risk factor for stroke and death. *N Engl J Med* 2005;353:2034-42.

14. Young T, Finn L, Peppard PE, Coxe MS, Austin D, *et al.* Sleep disordered breathing and mortality: Eighteen-year follow-up of the wisconsin sleep cohort. *Sleep* 2008;31(8):1071-8.
15. Marshall NS, Wong KKH, Liu PY, *et al.* Sleep apnea as a independent risk factor for all-cause mortality: the Busselton Health Study. *Sleep* 2008;31(8):1079-86.
16. Somers VK, White DP, Amin R, *et al.* Sleep Apnea and Cardiovascular Disease: An American Heart Association/American College of Cardiology Foundation Scientific Statement From the American Heart Association Council for High Blood Pressure Research Professional Education Committee, Council on Clinical Cardiology, Stroke Council, and Council on Cardiovascular Nursing In Collaboration With the National Heart, Lung, and Blood Institute National Center on Sleep Disorders Research (National Institutes of Health). *Circulation*. 2008;118(10):1080-111.
17. Bradley TD, Floras JS. Obstructive sleep apnea and its cardiovascular consequences. *Lancet* 2009;373:82-93.
18. Ip MSM, Lam B, Ng MMT, *et al.* Obstructive sleep apnea is independently associated with insulin resistance. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:670-6.
19. Carneiro G, Filho FFR, Togeiro SM, Tufik S, Zanella MT. Interações entre síndrome da apneia obstrutiva do sono e resistência à insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2007;51(7):1035-40.
20. Carneiro G, Fontes FH, Togeiro SMGP. Consequências metabólicas na SAOS não tratada. *J Bras Pneumol* 2010;36(2):43-6.
21. Drager LF, Li J, Reinke C, Bevans-Fonti S, Jun JC, Polotsky VY. Intermittent hypoxia exacerbates metabolic effects of diet-induced obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 2011;19(11):2167-74.
22. Drager LF, Jun J, Polotsky VY. Obstructive sleep apnea and dyslipidemia: implications for atherosclerosis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2010;17(2):161-5.
23. Drager LF, Li J, Shin MK, *et al.* Intermittent hypoxia inhibits clearance of triglyceride-rich lipoproteins and inactivates adipose lipoprotein lipase in a mouse model of sleep apnoea. *Eur Heart J*. 2012;33(6):783-90.
24. Drager LF, Polotsky VY, Lorenzi-Filho G. Obstructive sleep apnea: an emerging risk factor for atherosclerosis. *Chest*. 2011;140(2):534-42.

25. Togeiro SM, Carneiro G, Ribeiro Filho FF, *et al.* Consequences of Obstructive Sleep Apnea on Metabolic Profile: A Population-Based Survey. *Obesity*. 2012;21(4):845-51
26. Drager LF, Lopes HF, Maki-Nunes C, *et al.* The impact of obstructive sleep apnea on metabolic and inflammatory markers in consecutive patients with metabolic syndrome. *PLoS One*. 2010;5(8):e12065.
27. Drager LF, Bortolotto LA, Maki-Nunes C, *et al.* The incremental role of obstructive sleep apnoea on markers of atherosclerosis in patients with metabolic syndrome. *Atherosclerosis*. 2010;208(2):490-5.
28. Javaheri S, Barbe F, Campos-Rodriguez F, *et al.* Sleep Apnea: Types, Mechanisms, and Clinical Cardiovascular Consequences. *J Am Coll Cardiol*. 2017;69(7):841-858.
29. Costa LE, Uchôa CH, Harmon RR, *et al.* Potential underdiagnosis of obstructive sleep apnoea in the cardiology outpatient setting. *Heart*. 2015;101(16):1288-92.
30. Davies SK, Ang JE, Revell VL, *et al.* Effect of sleep deprivation on the human metabolome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(29):10761-6.
31. Nordstrom A, Lewensohn R. Metabolomics: moving to the clinic. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2010;5(1):4-17.
32. Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G. Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(4):263-9.
33. Giovane A, Balestrieri A, Napoli C. New insights into cardiovascular and lipid metabolomics. *J Cell Biochem*. 2008;105(3):648-54.
34. Watson AD, Geffen D. Lipidomics: A global approach to lipid analysis in biological systems. *J Lipid Res* 2013;47:2101-11.
35. Quehenberger O, Armando AM, Brown AH, *et al.* Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. *J Lipid Res*. 2010;51(11):3299-305.
36. Harrigan GG, Goodacre R. Metabolic profiling: its role in biomarker discovery and gene function analysis. Springer Science & Business media. 2012; Chapter 17:312-316.
37. Oresic M, Puig AV, Hänninen V. Metabolomic approaches to phenotype characterization and applications to complex diseases. *Expert Rev Mol Diagn* 2006,6(4),575-85.

38. Vinayavekhin N, Homan EA, Saghatelian A. Exploring Disease through Metabolomics. *ACS Chem Biol* 2009;5(1):91-103.
39. Lu X, Zhao X, Bai C, *et al.* Zhao C, Lu G, Xu G. LC-MS-based metabolomics analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2008;866(1-2):64-76.
40. Abdelnur PV. Meabolômica e Espectrometria de massas. *Embrapa* 2011, Circular técnica, ed. 1.
41. Gowda GAN, Zhang S, Gu H, *et al.* Metabolomics-based methods for early disease diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2008;8(5):617-33.
42. Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev.* 2007;26(1):51-78.
43. Want EJ, Masson P, Michopoulos F, *et al.* Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC-MS. *Nat Protoc.* 2013;8(1):17-32.
44. Theodoridis GA, Gika HG, Want EJ, Wilson ID. Liquid chromatography-mass spectrometry based global metabolite profiling: a review. *Anal Chim Acta.* 2012;711:7-16.
45. Aranibar N, Ott KH, Roongta V, Mueller L. Metabolomic analysis using optimized NMR and statistical methods. *Analytical Biochemistry* 2006;355:62-70.
46. Issaq HJ, Abbott E, Veenstra TD. Utility of separation science in metabolomic studies. *Journal of Separation Science* 2008;31:1936-47.
47. Palazoglu M, Fiehn O. Metabolite Identification in Blood Plasma Using GC-MS and the Agilent Fiehn Metabolomics RTL Libray. *Application note* Agilent Technologies 2009.
48. Willoughby R, Sheehan E, Mitrovich S. *A global view of LC/MS. How to solve your most challenging analytical problems.* 2nd ed. Pensilvânia: Pittsburgh; 2002
49. Mass spectrometry – principles and applications 3a ed.
50. Dunn WB, Broadhurst D, Begley P, *et al.* Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat Protoc.* 2011;6(7):1060-83.
51. Wedge DC, Allwood JW, Dunn W, *et al.* Is serum or plasma more appropriate for intersubject comparisons in metabolomic studies? An assessment in patients with small-cell lung cancer. *Anal Chem.* 2011;83(17):6689-97.

52. Dunn WB, Wilson ID, Nicholls W, Broadhurst D. The importance of experimental design and QC samples in large-scale and MS-driven untargeted metabolomic studies of humans. *Bioanalysis* 2012;4(18):2249-64.
53. Mushtaq MY, Choi YH, Verpoorte R, Wilson EG. Extraction for metabolomics: access to the metabolome. *Phytochem. Anal.* 2014;25(4):291-306.
54. Want E, Masson P. Metabolic profile methods and protocols. Ed. Metz T. Capítulo 17; 277-298. 2011.
55. Tautenhahn R, Patti GJ, Rinehart D, Siuzdak G. XCMS Online: a web-based platform to process untargeted metabolomic data. *Anal Chem.* 2012; 84:5035-5039.
56. Zhu ZJ, Schultz AW, Wang J, et al. Liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry characterization of metabolites guided by the METLIN database. *Nat Protoc.* 2013;8(3):451-460.
57. Sussulini A. Metabolomics: from fundamentals to clinical applications; 6 ed, UNICAMP – IQ, Campinas, Brazil.
58. Meyer MR, Peters FT, Maurer HH. Automated mass spectral deconvolution and identification system for GC-MS screening for drugs, poisons, and metabolites in urine. *Clin Chem.* 2010;56(4):575-584.
59. Sato Y, Suzuki I, Nakamura T, et al. Identification of a new plasma biomarker of Alzheimer's disease using metabolomics technology. *J Lipid Res* 2012; 53(3):567-76.
60. Han X, Rozen S, Boyle SH, et al. Metabolomics in early Alzheimer's disease: identification of altered plasma sphingolipidome using shotgun lipidomics. *PLoS ONE* 2011;6(7):e21643.
61. Patel S, Ahmed S. Emerging field of metabolomics: big promise for cancer biomarker identification and drug discovery. *J Pharmaceutical Biom An* 2014;25(107):63-74.
62. Lewis GD, Wei R, Liu E, et al. Metabolite profiling of blood from individuals undergoing planned myocardial infarction reveals early markers of myocardial injury. *J Clin Invest.* 2008;118:3503-12.
63. Griffin JL, Atherton H, Shockcor J, Atzori L. Metabolomics as a tool for cardiac research. *Nature Rev Cardiol* 2011;8:630-43.
64. Waterman CL, Kian-Kai C, Griffin JL. Metabolomic strategies to study lipotoxicity in cardiovascular disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 2010;1801(3):230-4.

65. Rhee EP, Gerszten RE. Metabolomics and cardiovascular biomarker discovery. *Clin Chem* 2012;58(1):139-47.
66. Lewis GD, Farrell L, Wood MJ, *et al.* Metabolic signatures of exercise in human plasma. *Sci Transl Med.* 2010;2:33ra7.
67. Ferrarini, A, Rupérez, FJ, Erazo, M, *et al.* Fingerprinting-based metabolomic approach with LC-MS to sleep apnea and hypopnea syndrome: A pilot study. *Electrophoresis* 2013;34(19):2873-81.
68. Xu H, Zheng X, Qian Y, *et al.* Metabolomics profiling for obstructive sleep apnea and simple snorers. *Sci Rep.* 2016;6:30958.
69. Feliciano A, Torres VM, Vaz F, *et al.* Overview of proteomics studies in obstructive sleep apnea. *Sleep Med* 2015;16(4):437-45.
70. Khalyfa A., Kheirandish-Gozal L., Gozal D.. Circulating exosomes in obstructive sleep apnea as phenotypic biomarkers and mechanistic messengers of end-organ morbidity. *Respir Physiol Neurobiol.* 2017; S1569-9048 (17)30119-2.
71. Netzer NC, Stoohs RA, Netzer CM, *et al.* Using the Berlin Questionnaire to identify patients at risk for the sleep apnea syndrome. *Ann Intern Med.* 1999;131(7):485-91.
72. Soler HM, Vidal PM, Vollenwider P, *et al.* The NoSAS score for screening of sleep-disordered breathing: a derivation and validation study. *The lancet* (2016);4(9):742-748.
73. Berry RB, Brooks R, Gamaldo CE, *et al.* The AASM Manual for the scoring of sleep and associated events. Rules, terminology and technical specifications. *Am Academ Sleep Med* 2012, version 2.0.
74. Chowdhuri S, Quan SF, Almeida F. *et al.* An Official American Thoracic Society Research Statement: Impact of Mild Obstructive Sleep Apnea in Adults. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016;193(9):e37-54.
75. Yang GR, Yuan SY, Fu HJ, *et al.* Neck circumference positively related with central obesity, overweight, and metabolic syndrome in chinese subjects with type 2 diabetes: Beijing Community Diabetes Study 4. *Diabetes Care* 2010;33:2465-7.
76. The Practical Guide: Identification, Evaluation and Treatment of Overweight and Obesity in Adults. *National Institutes of Health* 2000:1-80.
77. Bozovic D, Racic M, Ivkovic N. Salivary Cortisol Levels as a Biological Marker of Stress Reaction. *Medical Archives.* 2013;67(5):374.

78. DeSantis AS, DiezRoux AV, Hajat A, *et al.* Associations of salivary cortisol levels with inflammatory markers: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Psychoneuroendocrinology*. 2012;37(7):1009-18.
79. Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial para coleta de sangue venoso, 2. ed. Barueri-SP: Minha Editora, 2010.
80. Coleta de exames laboratoriais/Secretaria da saúde. CODEPPS-Assistência laboratorial, Coordenadoria de Atenção Básica e PSF. Coordenação de Desenvolvimento de Programas e Políticas de Saúde - Coordenação de Vigilância em Saúde - CONVISA. São Paulo, SMS, 2005.
81. Salgueiro JS. *Nova estratégia bioanalítica baseada em cromatografia líquida e espectrometria de massas em tandem para a quantificação de aminoácidos em matrizes biológicas: uma ferramenta clínica e experimental*. São Paulo: USP; 2015.
82. Vieira JGH, Nakamura OH, Carvalho VM. Determination of cortisol and cortisone in human saliva by a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2014; 58(8):844-850.
83. Vinaixa M, Samino S, Saez I, *et al.* A Guideline to Univariate Statistical Analysis for LC/MS-Based Untargeted Metabolomics-Derived Data. *Metabolites* 2012;2:775-795.
84. Wang X, Zhang A, Han Y. Urine Metabolomics Analysis for Biomarker Discovery and Detection of Jaundice Syndrome in Patients With Liver Disease. *Mol Cell Proteomics*. 2012;11(8):370–380.
85. Hosmer DW, Lemeshow S, Sturdivant RX. *Applied Logistic Regression*, 3ª edição, Wiley.
86. Venables WN, Ripley BD. *Modern Applied Statistics with S (Statistics and Computing)*, 4ª edição, Springer.
87. Marti-Soler H, Hirotsu C, Marques-Vidal P, *et al.* The NoSAS score for screening of sleep-disordered breathing: a derivation and validation study. *Lancet Respir Med*. 2016;4(9):742-748.
88. Dudzik D, Barbas-Bernardos C, Garcia A, Barbas C, Quality Assurance Procedures for Mass Spectrometry Untargeted Metabolomics.A review, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017:S0731-7085(17)31591-1.
89. Drager LF, Jun J, Polotsky VY. Obstructive sleep apnea and dyslipidemia: implications for atherosclerosis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2010;17(2):161-5.

90. Cortese, R. Gileles-Hillel A, Khalyfa A. *et al.* Aorta macrophage inflammatory and epigenetic changes in a murine model of obstructive sleep apnea: potential role of CD36. *Sci. Rep.* 7, 43648; 10.1038/srep43648 (2017).
91. McEvoy, R. D. Nick A. Antic, MD. *et al.* CPAP for prevention of cardiovascular events in obstructive sleep apnea. *N. Engl. J. Med.* 2016;375:919–931.
92. Rita L, Bittencourt A, Caixeta EC. Critérios diagnósticos e tratamento dos distúrbios respiratórios do sono: SAOS. *J. bras. Pneumol* 2010;36(2):23-7.
93. Giaccia AJ, Simon MC, Johnson R. The biology of hypoxia : the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease. *Genes Dev.* 2004;18(18):2183–94.
94. Semenza GL. Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) Pathway. *Sci STKE.* 2007;407:cm8.
95. Safran M., Kaelin WG. HIF hydroxylation and the mammalian oxygen-sensing pathway. *J Clin Invest.* 2003;111(6):779–783.
96. He G, Jiang Y, Zhang B, Wu G The effect of HIF-1 α on glucose metabolism, growth and apoptosis of pancreatic cancerous cells. *Asia Pac J Clin Nutr* 2014;23(1):174-80.
97. Wong C.M., Wong K.H., Chen X.D. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial application. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008;78:927-938.
98. Kotyk A, Michaljanicova D, Veres K, Soukupova V. Transport of 4-deoxy- and 6deoxy-D-glucose in baker´s yeast. *Folia Microbiol* 1975;20:496-503.
99. Lavie L. Oxidative stress-a unifying paradigm in obstructive sleep apnea and comorbidities. *Prog Cardiovasc Dis.* 2009;51(4):303-12.
100. Henriksen EJ, Diamond-Stanic MK, Marchionne EM. Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(5):993-9.
101. Hochachka PW. Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science* 1986;23:234-242.
102. Gozal LK, Philby MF, Qiao Z, Khalyfa A, Gozal D. Endothelial Dysfunction in Children With Obstructive Sleep Apnea Is Associated With Elevated Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Plasma Activity Levels. *J Am Heart Assoc* 2017;6(2):e004923.

103. Micova P, Hahnova K, Hlavackova M, *et al.* Chronic intermittent hypoxia affects the cytosolic phospholipase A-2 α /cyclooxygenase 2 pathway via β 2-adrenoceptor-mediated ERK/p38 stimulation. *Mol Cell Biochem*, 2016;423:151-163.
104. Suzuki J, Ogawa M, Watanabe R, *et al.* Roles of prostaglandin E2 in cardiovascular diseases. *Int Heart J*. 2011;52(5):266-9.
105. Weber PC, Siess W, Held E, Witzgall H, Lorenz R. Arachidonic acid metabolites, hypertension and atherosclerosis. *Klin Wochenschr* 1982;60:479-488.
106. Barbour B, Szatkowski M, Ingledew N, Attwell D. Arachidonic acid induces a prolonged inhibition of glutamate uptake into glial cells. *Nature* 1989;342:21-28.
107. Li C, Zhang G, Zhao L, *et al.* Metabolic reprogramming in cancer cells: glycolysis, glutaminolysis, and Bcl-2 proteins as novel therapeutic targets for cancer. *World J of Surgical Oncology* 2016;14:16.
108. Sun RC, Denko NC. Hypoxic Regulation of Glutamine Metabolism through HIF1 and SIAH2 Supports Lipid Synthesis that Is Necessary for Tumor Growth. *Cell Metabolism* 2014;16(2):285-92.
109. Le A, Lane AN, Hamaker M, *et al.* Glucose-Independent Glutamine Metabolism via TCA Cycling for Proliferation and Survival in B Cells. *Cell Metabolism* 2012;15(1):110-21.
110. Hornemann T, Worgall T.S., Sphingolipids and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2013;226:16-28.
111. Casetti A, Bagnacani A, Colimbi A, Ghidoni R, Samaja M. Cross-talk between hypoxia and sphingolipid signaling. *Mol Cell Biochem* 2005;2.
112. Watts JL, Browse J. A palmitoyl-CoA-specific Δ 9 fatty acid desaturase from. *Biochemical and biophysical research communications* 2000;272:263-269.