



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Thiago Bittencourt Ottoni de Carvalho

**POLIMORFISMOS NO GENE HTR2A
RELACIONADOS À SÍNDROME DA
APNEIA OBSTRUTIVA DO SONO**

São José do Rio Preto

2017

Thiago Bittencourt Ottoni de Carvalho

POLIMORFISMOS NO GENE HTR2A
RELACIONADOS À SÍNDROME DA
APNEIA OBSTRUTIVA DO SONO

São José do Rio Preto

2017

Thiago Bittencourt Ottoni de Carvalho

Polimorfismos no Gene HTR2A relacionados à
Síndrome da Apneia Obstrutiva do Sono

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
São José do Rio Preto para obtenção do Título
de Doutor no Curso de Pós-graduação em
Ciências da Saúde, Eixo Temático: Medicina
Interna.

Orientador: Prof. Dr. José Victor Maniglia

São José do Rio Preto

2017

Carvalho, Thiago Bittencourt Ottoni

Polimorfismos no Gene HTR2A relacionados à síndrome da
apneia obstrutiva do sono / Thiago Bittencourt Ottoni de Carvalho

São José do Rio Preto, 2017

59 p.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio
Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina Interna

Orientador: Prof. Dr. José Victor Maniglia

1. Síndrome da Apneia Obstrutiva do sono; 2. Polimorfismos; 3.
Gene HTR2A; 4. Medicina do Sono.

Thiago Bittencourt Ottoni de Carvalho

Polimorfismos no Gene HTR2A relacionados à
Síndrome da Apneia Obstrutiva do Sono

Banca Examinadora

Tese para Obtenção do Grau de Doutor

Presidente e Orientador: Prof. Dr. José Victor Maniglia

2° Examinador: _____

3° Examinador: _____

4° Examinador: _____

5° Examinador: _____

Suplentes: _____

São José do Rio Preto, __/__/2017.

Sumário

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Dedicatória..... | i |
| Agradecimentos..... | ii |
| Epígrafe..... | iii |
| Lista de Quadros e Tabelas..... | iv |
| Resumo..... | v |
| Abstract..... | vi |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA..... | 9 |
| 3. CASUÍSTICA E MÉTODO..... | 22 |
| 3.1 Investigação molecular..... | 25 |
| 3.1.1 Extração de <i>DNA</i> genômico..... | 25 |
| 3.1.2 Detecção de polimorfismos no gene nuclear <i>HTR2A</i> | 25 |
| 4. RESULTADOS..... | 29 |
| 4.1. Resultados demográficos..... | 30 |
| 4.2. Resultados da Análise Molecular para ambos os Grupos - Casos-índice e Controle..... | 32 |
| 4.2.1 Extração do <i>DNA</i> genômico..... | 32 |
| 4.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (<i>PCR</i>)..... | 33 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.2.3 Técnica da <i>RFLP</i> (Digestão Enzimática) dos fragmentos amplificados para identificação dos polimorfismos..... | 35 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 40 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 46 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 48 |

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Avelino Macedo Ottoni de Carvalho e Heloisa Helena Bittencourt Ottoni de Carvalho e ao meu irmão Felipe Bittencourt Ottoni de Carvalho, que sempre me apoiaram em todos os momentos da minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Victor Maniglia, um verdadeiro pai na Otorrinolaringologia, que me proporcionou a oportunidade de realizar o mestrado e o doutorado na Famerp. Muito obrigado pelos ensinamentos na especialidade médica e na vida.

À Profa Dra Vânia Belintani Piatto que se dedicou muito a este trabalho e desenvolveu toda a parte de biologia molecular. Sem a sua participação não seria possível a realização deste estudo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. José Victor Maniglia, pelo apoio e orientação deste trabalho.

À Profa Dra Vânia Belintani Piatto pela importante participação neste estudo, pelos ensinamentos e apoio incondicional.

Aos meus professores do programa de Residência Médica em Otorrinolaringologia do Hospital de Base da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, pelo ensino e dedicação.

Aos meus professores do programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, pelo ensino e dedicação.

Aos colegas e amigos especiais do programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, pelo apoio e companheirismo.

Aos funcionários da Pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, por ajudarem a encurtar as distâncias.

Aos residentes do Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, pela dedicação dispensada.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

Cora Coralina

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1**- Fotografia do DNA genômico das amostras identificadas de 1 a 5, em gel de agarose 1%. A seta indica as bandas correspondentes ao DNA de cada amostra. M-marcador 100 pb (Ladder®).....32
- Figura 2** - Fotografia do produto da *PCR* - fragmento de 342 pb amplificado do gene *HTR2A*, em gel de agarose 2%. Colunas 1 a 5 - amostras do estudo. M-marcador 100 pb (Ladder®).....33
- Figura 3** - Fotografia do produto da *PCR* - fragmento de 469 pb amplificado do gene *HTR2A*, em gel de agarose 2%. Colunas 1 a 4 - amostras do estudo. M- marcador 100 pb (Ladder®).....34
- Figura 4** - Fotografia do produto da *RFLP* (digestão enzimática) - fragmentos de 342, 217 e 125 pb do gene *HTR2A*, em gel de agarose 2%, das amostras do estudo. Coluna 1: genótipo heterozigoto (TC). Coluna 2: genótipo homozigoto selvagem (TT). Coluna 3: genótipo homozigoto polimórfico (CC). M- marcador 100 pb (Ladder®).....35
- Figura 5** - Fotografia do produto da *RFLP* (digestão enzimática) - fragmentos de 469, 243 e 226 pb do gene *HTR2A*, em gel de agarose 2%, das amostras do estudo. Coluna 1: genótipo homozigoto selvagem (GG). Colunas 2-4: genótipo heterozigoto (GA). Coluna 5: genótipo homozigoto polimórfico (AA). M- marcador 100 pb (Ladder®)...36

LISTA DE QUADROS E TABELAS

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Quadro 1 - Classificação do nível de gravidade da SAOS. | 16 |
| Quadro 2 - Sequência dos <i>primers</i> para PCR do DNA nuclear..... | 26 |
| Quadro 3 - Sequência dos <i>primers</i> para PCR do DNA nuclear..... | 27 |
| Tabela 1 - Distribuição dos dados demográficos dos casos-índice (n=100) em relação ao grupo controle (n=100)..... | 31 |
| Tabela 2 - Parâmetros clínicos e polissonográficos dos casos-índice em relação ao grupo controle..... | 32 |
| Tabela 3 - Distribuição dos alelos encontrados nos casos-índice e controles para os polimorfismos T102C e -1438G/A do gene <i>HTR2A</i> | 36 |
| Tabela 4 - Distribuição dos genótipos encontrados nos casos-índice e controles para os polimorfismos T102C e -1438G/A do gene <i>HTR2A</i> | 37 |
| Tabela 5 - Relação genotípica entre casos-índice e controles para os polimorfismos T102C e -1438G/A do gene <i>HTR2A</i> | 37 |
| Tabela 6 - Distribuição do sexo dos casos-índice e controles em relação aos genótipos encontrados para os polimorfismos T102C e -1438G/A do gene <i>HTR2A</i> | 38 |
| Tabela 7 - Distribuição do IMC (Índice de Massa Corpórea) dos casos-índice e controles em relação aos genótipos para os polimorfismos T102C e -1438G/A do gene <i>HTR2A</i> | 38 |
| Tabela 8 - Distribuição do IAH (Índice de apneia/hipopneia) dos casos-índice em relação aos genótipos para os polimorfismos T102C e -1438G/A do gene <i>HTR2A</i> | 39 |

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- (dNTPs) - desoxinucleotídeos trifosfato
- 5HT – serotonina, 5-hidroxitriptamina
- A – Adenina
- AIO – Aparelhos intra oral de avanço mandibular
- AMM – Avanço Maxilo Mandibular
- BIPAP - Bi-level Positive Airway Pressure)
- C – Citosina
- CPAP (*Contiunous Positive Airway Pressure*)
- DP – Desvio Padrão
- EUA - Estados Unidos da América
- FAMERP - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
- G – Guanina
- IAH - índice de apneia e hipopneia
- IMC – índice de massa corporal
- KCL - cloreto de potássio
- LAEPI - Laboratório de Ensino e Pesquisa em Imunomorfologia
- LAUP - uvulopalatoplastia assistida por laser
- MgCl₂ - cloreto de magnésio
- PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
- REM – rapid eye moviment
- RFLP - análise de restrição
- RFLP - *Restriction Fragment Lenght Polymorphism*
- SAOS - síndrome da apneia obstrutiva do sono
- T – Timina
- UPFP - uvulopalatofaringoplastia
- VAS – vias aéreas superiores

RESUMO

Introdução: A síndrome da apneia obstrutiva do sono (SAOS) é um dos distúrbios mais complexos do sono, envolvendo múltiplos fatores genéticos contribuintes para o fenótipo. A serotonina está envolvida na regulação de uma variedade de funções viscerais e fisiológicas, inclusive o sono. Polimorfismos no gene *5-HTR2A* podem alterar a transcrição afetando o número de receptores do sistema serotoninérgico, contribuindo para a SAOS. **Objetivo:** Investigar a prevalência dos polimorfismos T102C e -1438G/A no gene *HTR2A* em pacientes com e sem SAOS. **Casuística e Método:** Estudo molecular em 100 pacientes como casos-índice e em 100 como grupo controle, de ambos os sexos. O DNA foi extraído de leucócitos de sangue periférico e realizada a amplificação pelas técnicas da PCR-RFLP. **Resultados:** Houve maior prevalência do sexo masculino nos casos-índice quando comparados ao grupo controle ($p < 0,0001$). Não foram encontradas diferenças genótípicas entre os casos e o grupo controle no polimorfismo T102C ($P = 1,000$). Houve diferença estatística dos genótipos do polimorfismo -1438G/A encontrados nos casos-índice em relação ao grupo controle ($p = 0,0177$). Houve diferença significativa entre o genótipo AA do polimorfismo -1438G/A e pacientes com SAOS ($OR: 2,3$; $IC_{95\%}: 1,20-4,38$; $p = 0,01$). **Conclusões:** Os mecanismos serotoninérgicos parecem estar relacionados a SAOS. Não há diferenças na prevalência do polimorfismo T102C entre os pacientes com SAOS e o grupo controle. Há evidências de associação entre o polimorfismo -1438G/A e a SAOS.

Palavras Chave: Síndrome da Apneia Obstrutiva do sono; Polimorfismos; Gene *HTR2A*; Medicina do Sono.

ABSTRACT

Introduction: Obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) is one of the most complex disorders of sleep; it comprises several genetic factors that contribute to the phenotype. Serotonin (5-HT) regulates a variety of visceral and physiological functions, including sleep. Gene 5-HTR2A polymorphisms may change the transcription of several receptors in the serotonergic system, thereby contributing to OSAS. **Objective:** To investigate the prevalence of T102C and -1438G/A polymorphisms in the 5-HTR2A gene of patients with and without OSAS. **Casuistic and Methods:** A cross-sectional case study. A molecular study of 100 patients as index-cases and 100 controls of both genders. DNA was extracted from blood leukocytes samples and the regions that enclose both polymorphisms were amplified by PCR-RFLP techniques. **Results:** There was a significant prevalence of males in index cases compared to controls ($p < 0.0001$). No significant genotypic differences between cases and controls were found in T102C polymorphism ($p = 1.000$). There was a statistical difference of the polymorphism genotypes -1438 G/A found in the index cases compared to the control group. There were significant differences between the AA genotype of -1438G/A polymorphisms and patients with OSAS (OR:2.3; CI95%:1.20-4.38, $p = 0.01$). **Conclusion:** Serotonergic mechanisms may be related to OSAS. There were no differences in the prevalence of T102C polymorphisms in patients with OSAS and the control group. Evidences of an association between the -1438G/A polymorphism and OSAS were observed.

Key words: Obstructive sleep apnea syndrome; polymorphisms; HTR2A gene; Sleep Medicine.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A síndrome da apneia obstrutiva do sono (SAOS) é um distúrbio muito comum, cuja prevalência tem aumentado dramaticamente devido sua associação com a atual pandemia de obesidade. É caracterizada pelo recorrente colapso, sono-induzido, das vias aéreas faríngeas levando a hipoxemia e hipercapnia.⁽¹⁾ Variáveis tendendo a promover o colapso faríngeo incluem a pressão negativa dentro da via aérea (por exemplo, durante a inspiração) e a pressão positiva fora da via (por exemplo, deposição de gordura e retroposicionamento mandibular). A patência das vias aéreas superiores (VAS) é mantida, principalmente, pela contração muscular e estruturas do tecido mole adjacente. A atividade dos músculos responsáveis pela manutenção da patência da VAS está aumentada durante a inspiração, dessa forma tensionando e dilatando as referidas vias para contrapor-se ao colapso decorrente da pressão negativa nas mesmas. Durante o sono há perda da entrada promotora tônica (e compensação neuromuscular) e reflexos ocasionados pela estimulação muscular levando a grande decréscimo no eletromiograma e, finalmente, maior chance de colapso da via aérea.⁽²⁾

A síndrome é mais frequente em homens, encontrada em todas as faixas etárias, tornando-se mais prevalente com o avançar da idade¹. Entre indivíduos acima de 55 anos, 30% a 60% cumprem o critério diagnóstico polissonográfico mínimo para a síndrome.^(3,4)

Na síndrome da apneia obstrutiva, o colapso das VAS repetitivamente durante o sono, resulta em roncos, pausas e diminuição da respiração, hipoxia e hipercapnia transitórias e conseqüente fragmentação do sono. Os sintomas noturnos associados são agitação, salivação excessiva, sudorese, nocturia e relacionados a refluxo

gastroesofágico. Na manhã, é frequente cefaleia, sonolência e boca e orofaringe ressecadas.

A fragmentação noturna do sono resulta em excessiva sonolência diurna. Essa, por sua vez, juntamente com a hipoxia e hipercapnia recorrentes e a estimulação simpática, podem ser responsáveis pelas consequências metabólicas adversas da síndrome. Os indivíduos com apneia obstrutiva têm risco aumentado para hipertensão arterial e distúrbios cardiovasculares.⁽⁵⁻⁷⁾

A síndrome da apneia obstrutiva do sono é diagnosticada por estudos de polissonografia tendo o índice de apneia/hipopneia, obtido pelo exame, como uma simples mensuração, mas altamente reprodutível da síndrome. O índice de apneia/hipopneia ≥ 5 , combinado com os sintomas anteriormente descritos, tem sido usado para o diagnóstico. A apneia durante o sono atualmente é caracterizada como a redução do fluxo de ar maior ou igual a 90% por um período maior ou igual a dez segundos e a hipopneia é definida como redução do fluxo de ar maior ou igual a 30% do fluxo, por mais de dez segundos acompanhada de dessaturação da oxihemoglobina maior ou igual a 3% ou um despertar. A apneia obstrutiva deve estar associada a esforços respiratórios. A hipopneia obstrutiva deve estar associada a roncos, limitação de fluxo ou respiração paradoxal.^(8,9)

Múltiplos fatores genéticos podem, provavelmente, contribuir com a síndrome uma vez que, também, são diversos os fatores componentes para o fenótipo. Os maiores fatores de risco para a síndrome incluem obesidade, anormalidades no controle da ventilação, dismorfismo craniofacial, alterações no ritmo circadiano e nos mecanismos do sono e vigília.⁽¹⁰⁾

A obesidade é o maior fator contribuinte para a síndrome, particularmente, em adultos jovens e, cada vez mais, em crianças. É devida, provavelmente, pelo excesso de depósito de gordura na região orofaríngea e pela reduzida complacência da parede torácica. Estudos em famílias e em gêmeos têm mostrado que 40%-70% da variação em obesidade, dentro da população geral, pode ser atribuída a fatores genéticos.^(11,12) Acredita-se que a obesidade seja o fenótipo final para as anormalidades nas funções autonômicas, endócrinas e hipotalâmicas. Essas funções, por sua vez, estão associadas a fatores genéticos influenciando o índice metabólico, depósito de gordura e o comportamento do apetite. Cerca de 1/4 da variabilidade, entre indivíduos, na distribuição da gordura corporal regional, pode ser influenciada pelos fatores genéticos; isso é importante, uma vez que a massa de gordura corporal superior pode ser um risco relativamente maior para a síndrome do que a obesidade corporal total.⁽⁸⁾

Características craniofaciais e mecanismos do controle ventilatório explicam algumas das associações genéticas da síndrome da apneia. O crescimento craniofacial está sob controle genético, pois várias desordens cromossômicas clássicas estão associadas com característicos dismorfismos craniofaciais. Isto pode explicar algumas das agregações familiares e diferenças interraciais na síndrome. Em relação ao controle ventilatório, há um alto grau de concordância em respostas quimiorreceptoras em gêmeos monozigóticos.⁽¹³⁾ Resposta ventilatória anormal à hipoxia ou à hipercapnia tem sido relatada em várias síndromes de doenças pulmonares. Há também a possibilidade genética sobreposta entre as síndromes da apneia do sono e da morte súbita do lactente.⁽¹⁴⁾

Embora os reais mecanismos da apneia do sono sejam ainda desconhecidos, alterações no controle do sistema nervoso central dos músculos das vias aéreas

superiores são consideradas um importante componente da síndrome.⁽¹⁵⁾ A patogênese da síndrome envolve o colapso da via aérea superior a qual é dependente do músculo dilatador para sua patência e respiração normal. Dentre os músculos das vias aéreas superiores há o genioglosso, o maior músculo extrínseco protusor da língua, innervado por neurônios originados no núcleo do hipoglosso, no tronco encefálico.^(2,16) Contrações do músculo genioglosso, durante a inspiração, contribuem para a efetiva ventilação pulmonar e manutenção da abertura das vias aéreas superiores. A patência das VAS e o padrão regular da respiração são importantes no sono. Uma rede neuronal central regula as funções aéreas desde o nariz até os bronquíolos sendo um componente integral do sistema regulador para o controle cerebral da respiração e patência dessas vias durante a vigília e o sono. Grupos de células serotoninérgicas e noradrenérgicas podem fazer padrões paralelos estimulando, diretamente, as células motoras do nervo hipoglosso que regulam os músculos dilatadores das vias aéreas superiores. Portanto, a ativação desses grupos celulares, aumenta a atividade do músculo genioglosso.⁽¹⁶⁾

É evidente que a serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT), um neurotransmissor no sistema nervoso central, está envolvida na regulação de uma variedade de funções viscerais e fisiológicas, tais como o sono, apetite, termorregulação, percepção da dor, secreção hormonal e comportamento sexual. Anormalidades do sistema serotoninérgico têm sido implicadas em um grande número de doenças humanas como depressão, cefaleia, epilepsia, comportamento obsessivo-compulsivo, disfunção temporomandibular e distúrbios afetivos.^(15,17)

A 5-HT também tem importante papel na patência das vias aéreas superiores, pois excita os neurônios motores dessas vias e, também, promove uma excitação intrínseca nos neurônios motores do tronco encefálico, em animais não anestesiados. A

atividade dos neurônios que suprimem de 5-HT os neurônios motores, declina com o sono, conforme a maioria dos estudos funcionais que mostram que a 5-HT e neurônios serotoninérgicos têm um significativo efeito excitatório nos neurônios motores respiratórios, ambos *in vivo* e *in vitro* e que, os referidos neurônios, apresentam máxima atividade durante a vigília e mínima atividade durante o sono REM (*Rapid Eye Movement*). O comportamento, relacionado ao sono, da 5-HT sobre os neurônios motores contribui para o colapso das vias aéreas superiores e consequente obstrução da respiração.^(18,19)

A 5-HT atua por meio de uma grande família de receptores 5-HT e, dentre essa, há os receptores denominados 5-HT₂ que compreendem três subtipos, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} e 5-HT_{2C}, os quais são semelhantes em termos de sua estrutura molecular, farmacologia e padrões dos sinais de transdução. Os subtipos 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} têm um importante papel na manutenção da estabilidade das vias aéreas superiores e da respiração normal, na obesidade. O subtipo 5-HT_{2A} é predominantemente excitatório aos neurônios motores do hipoglosso e o subtipo 5-HT_{2C} é excitatório para neurônios em várias áreas cerebrais. Embora poucas dessas respostas excitatórias têm sido analisadas usando-se seletivos agentes dos subtipos de receptores, evidências sugerem que, em alguns desses casos, as respostas são mediadas pelos receptores 5-HT_{2A}, enquanto outras envolvem os receptores 5-HT_{2C}.⁽²⁰⁾

A característica de todos os genes da família dos receptores 5-HT₂ (denominados genes *HTR2*) é que eles têm dois introns (no caso dos genes *HTR2A* e *HTR2B*) ou três introns (gene *HTR2C*) na sequência codificante, estando todos acoplados, positivamente, à fosfolipase C além de mobilizar Ca²⁺ intracelular. O gene *HTR2A* está localizado no cromossomo 13 (13q14-q21) (OMIM - 182135) tendo uma

sequência de aminoácidos, relativamente alta, idêntica ao gene *5-HTR2C*, embora seja mais baixa quando comparada ao gene *HTR2B*. O gene *HTR2C* está localizado no cromossomo X (Xq24) (OMIM - 312861).⁽²⁰⁾

Uma variante funcional promotora do gene *HTR2A* pode, diferencialmente, alterar a transcrição afetando, desse modo, o número de receptores. Polimorfismos nos genes *HTR2* estão associados a várias doenças, inclusive à síndrome da apneia obstrutiva do sono, por afetarem o sistema serotoninérgico. Os efeitos excitatórios do receptor 5-HT_{2C} são de baixa magnitude e, embora o polimorfismo do gene *HTR2C* seja funcional, o efeito de um alelo polimórfico ativo pode não ser suficiente para que esse polimorfismo esteja associado com o índice apneia/hipopneia devido a menor dominância desse subtipo de receptores no núcleo do hipoglosso.^(21,22) Em compensação, foi identificado, recentemente, um polimorfismo no gene *HTR2A*, o qual é definido pela substituição T->C (Timina -> Citosina) na posição nucleotídica 102,⁽²⁾ além da identificação da substituição G->A (Guanina -> Adenina), na posição -1438 da região promotora do gene,⁽¹⁷⁾ em pacientes com a síndrome da apneia obstrutiva do sono.

Os objetivos gerais deste estudo foram realizar avaliações geral, otorrinolaringológica, polissonográfica em pacientes encaminhados ao Ambulatório de Otorrinolaringologia da FAMERP (Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto), com e sem queixa de roncos e dificuldade respiratória durante o sono e selecionar os pacientes com e sem diagnóstico de síndrome da apneia obstrutiva do sono documentada pelos exames realizados.

Os objetivo específico foi investigar a prevalência dos polimorfismos 102T/C e -1438G/A no gene *HTR2A*, com o teste da Reação em Cadeia da

Polimerase/Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (*Polimerase Chain Reaction/Restriction Fragment Length Polymorphism - PCR/RFLP*), em amostra de pacientes com e sem a síndrome da apneia obstrutiva do sono.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

Uma das queixas comuns aos profissionais da área da saúde, quando se fala em hábitos do sono, é a presença de roncos. Sabe-se que o ronco traz prejuízos ao convívio social desses indivíduos, porém o paciente que, associado aos roncos, apresenta alterações respiratórias necessita de atendimento médico especializado, pois as complicações inerentes a essas alterações, principalmente as cardiovasculares, são inúmeras e já bem documentadas.⁽²³⁾

A síndrome de apneia obstrutiva do sono é um importante problema de saúde pública associada à sonolência excessiva, acidentes, morbidade cardiovascular, comprometimento cognitivo, ansiedade, depressão e disfunção metabólica.⁽²⁴⁻²⁸⁾

Estudos estimam que 3,7% a 26% da população tem um índice de apneia/hipopneia (IAH) acima 5. A prevalência de SAOS, definido pela frequência IAH e a presença de sonolência excessiva, foi estimada entre 1,2% a 7,5 %, entretanto em 2010, *Tufik et al* relatou em estudo epidemiológico que um em cada três (32,8%) residentes em São Paulo preencheram os critérios para SAOS. A prevalência foi mais elevada entre os homens e aumentou em ambos os sexos com idade. SAOS também foi mais prevalente em indivíduos com sobrepeso e obesos de ambos os sexos. A SAOS tende a ser mais prevalente em mulheres com baixo nível socioeconômico e entre pessoas que não participam da força de trabalho e, essas diferenças, são ainda maiores quando comparadas às mulheres que trabalham com aquelas que não trabalham.^(1, 29-38)

Sher considera na etiologia da síndrome apneia obstrutiva do sono, como componentes fundamentais, as alterações anatômicas e físicas (acúmulo de partes moles ou desproporções esqueléticas) que diminuem o espaço aéreo da faringe e conseqüentemente, levam a um aumento na resistência das vias aéreas superiores.⁽²³⁾

Anormalidades nas estruturas ósseas, em nível de orofaringe, são frequentemente observadas nos pacientes com síndrome da apneia obstrutiva do sono sendo, a mais prevalente, a mandíbula retroposicionada, a qual restringe o espaço da orofaringe. Com relação aos tecidos moles, a redução do diâmetro da via aérea superior, pode ser pelo aumento de volume das paredes da faringe, da língua, das tonsilas, do palato mole, vasos sanguíneos, tecidos linfáticos e gordurosos.⁽³⁹⁾

Alterações estruturais nas fibras dos músculos faríngeos têm sido descritas em pacientes com síndrome da apneia obstrutiva do sono. Estudos histológicos e histoquímicos do músculo constritor médio da faringe demonstram que indivíduos apneicos têm uma distribuição anormal de fibras musculares, com redução nos tipos de fibra I e II-b e aumento e hipertrofia de fibras II-a.⁽⁴⁰⁾

Lindman *et al.*,⁽⁴¹⁾ em estudo do músculo palatofaríngeo de 11 pacientes submetidos a uvulopalatofaringoplastia, em decorrência de apneia do sono, encontraram aumento da proporção de tecido conjuntivo com relação ao grupo controle e alterações que sugerem um processo de desnervação e degeneração nestes pacientes.

Woodson *et al.*,⁽⁴²⁾ em estudo histológico do palato mole de pacientes portadores de apneia obstrutiva do sono, encontraram hipertrofia de glândulas mucosas, edema da lâmina própria, atrofia da musculatura e desmielinização das fibras nervosas periféricas.

Hamans *et al.*,⁽⁴³⁾ relataram significativa redução na proporção de músculo e não significativa diferença em relação a tecido gorduroso entre pacientes roncadores e o grupo controle.

Berger *et al.*,⁽⁴⁴⁾ em estudo histológico da região distal do palato mole e da úvula de 34 pacientes que foram submetidos a uvulopalatofaringoplastia concluem que a proporção de músculo, tecido adiposo, vasos sanguíneos e glândulas são semelhantes

entre o grupo controle e o dos pacientes com apneia. Porém, a proporção de tecido conectivo foi significativamente maior nos pacientes com apneia moderada e grave.

A fisiopatologia da SAOS caracteriza-se pelo colapso repetido dos tecidos moles da via aérea superior, delimitada pela nasofaringe superiormente, pela epiglote inferiormente, pelo complexo maxilomandibular anteriormente e pela coluna vertebral posteriormente. O colapso da via aérea superior diminui seu diâmetro intraluminal e aumenta a resistência das vias aéreas, de acordo com a Lei de Poiseuille. Esse aumento da resistência ao fluxo resulta em reduções de ventilação (hipopneias) ou cessação completa da ventilação (apneias), com as correspondentes alterações metabólicas (acidose respiratória por hipoventilação) e fragmentação do sono. A compensação dos distúrbios metabólicos ocorre principalmente sob a forma de alterações no esforço respiratório, que é o principal determinante do despertar do sono. Breves despertares proporcionam compensação ventilatória para corrigir anomalias de gases sanguíneos, proporcionando ainda mais controle respiratório desestabilizador na interface sono-vigília. A ativação concomitante do sistema nervoso simpático, assim como alguns mecanismos neurais, humorais, trombóticos, metabólicos e de doenças inflamatórias resultam no aumento da pressão arterial, risco de morte súbita, acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio. ⁽⁴⁵⁾

Os despertares produzem fragmentação dos padrões de sono, resultando em sonolência excessiva diurna, diminuição neurocognitiva e aumento do risco de acidentes relacionados à privação do sono. ^(46,47)

A permeabilidade das vias aéreas superiores é mantida por um equilíbrio entre as forças de colapso e forças de dilatação sendo seu calibre determinado pela diferença de pressão entre ambas as forças. As forças de colapso estão relacionadas com as pressões

intra-luminais das vias aéreas superiores durante a inspiração e a composição da parede da faringe e as forças de dilatação são predominantemente relacionadas com o tônus da musculatura dilatadora da faringe, com contribuições de tração das vias aéreas durante a inspiração, além do aumento do volume pulmonar. ^(46,47)

O músculo genioglosso é o principal músculo dilatador da faringe, innervado por neurônios originados no núcleo hipoglosso no tronco encefálico, cujas contrações, durante a inspiração, contribuem para a efetiva ventilação pulmonar e pela manutenção da abertura das vias aéreas superiores durante a vigília e o sono.^(7,8) Grupos de células serotoninérgicas e noradrenérgicas podem fazer padrões paralelos estimulando diretamente as células motoras do nervo hipoglosso que regulam esse músculo dilatador, aumentando, conseqüentemente, sua atividade.^(16, 17, 48)

A 5-HT tem um importante papel na patência das vias aéreas superiores, pois excita os neurônios motores dessas vias e, também, promove uma excitação intrínseca nos neurônios motores do tronco encefálico. O comportamento, relacionado ao sono, da 5-HT sobre os neurônios motores contribui para o colapso das vias aéreas superiores e conseqüentemente da respiração.^(18,19)

Polimorfismos nos genes *HTR2* estão associados a várias doenças, inclusive à síndrome da apneia obstrutiva do sono, por afetarem o sistema serotoninérgico através da redução do número de receptores e da concentração de serotonina nos neurônios pós-sinápticos contribuindo para o colapso das vias aéreas durante o sono.⁽¹⁷⁾

O quadro clínico dos pacientes portadores da síndrome da apneia obstrutiva do sono pode ser dividido em sintomas noturnos e diurnos. Os sintomas noturnos são caracterizados principalmente pelo ronco, que é produto da vibração da úvula, do palato mole, paredes faríngeas, epiglote e língua, pausas respiratórias, em geral, referidas pelo

cônjuge; sono agitado, com múltiplos despertares, nocturia e sudorese. Já os sintomas diurnos são principalmente, sonolência excessiva, déficits neurocognitivos, alterações da personalidade, redução da libido, irritabilidade, sintomas depressivos, ansiedade e cefaleia matinal.⁽⁴⁹⁾

O diagnóstico da doença deve iniciar através de história clínica detalhada, com especial atenção ao ronco e a sonolência diurna, os dois sintomas mais comuns. O exame físico completo deve incluir exames do sistema cardiovascular, endócrino, neurológico, respiratório, das vias aéreas superiores e padrão facial. As variáveis antropométricas (peso e altura), circunferência do pescoço e pressão arterial devem ser mensuradas. Dentro dessas variáveis destacam-se, como de maior valor preditivo, a circunferência do pescoço, o índice de massa corpórea, a história de hipertensão arterial sistêmica, a história de ronco e o relato de apneias durante o sono.^(50,51)

Através da avaliação facial, tem-se uma ideia anatômica da morfologia craniofacial de cada indivíduo, detectando-se alterações do desenvolvimento da maxila (hipoplasia) e da mandíbula (retroposição mandibular). O exame da cavidade oral permite identificar alterações da oclusão dentária (mordida cruzada, mordida aberta, má oclusão de classe II de Angle, presença de palato ogival e estreitamento lateral da maxila) que podem sugerir um crescimento inadequado da maxila e/ou da mandíbula, muitas vezes, corroborando com os achados da inspeção facial, assim como avaliar o tamanho e posição da língua, palato mole, tonsilas palatinas e linguais. A rinoscopia anterior, complementada pela videonasofibrolaringoscopia, visa detectar alterações do septo nasal, dos cornetos nasais, nasofaringe, orofaringe, hipofaringe e laringe.^(50,51)

A polissonografia noturna, em laboratório do sono assistida, é considerada o padrão ouro para diagnóstico da SAOS.^(52,53,54) As monitorizações portáteis do sono

ainda apresentam a limitação de perda de canais de monitorização pela falha ou soltura dos sensores,⁽⁵³⁾ além da necessidade da realização do novo exame em laboratório para descartar falsos negativos em casos de alta probabilidade da doença e monitorizações iniciais normais.^(55,56)

A presença dos critérios A e B ou C, citados a seguir, definem a diagnóstico da apneia obstrutiva do sono:

A. Presença de uma ou mais das seguintes características:

- Sintomas como queixa de sonolência, sono não reparador, fadiga ou insônia; O paciente refere que acorda com pausas respiratórias, ofegante ou asfixia; O parceiro ou outro observador relata ronco habitual, pausas respiratórias, ou ambos durante o sono do paciente; Paciente diagnosticado com hipertensão arterial sistêmica, transtorno de humor, alteração cognitiva, doença coronariana, acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca congestiva, fibrilação atrial, ou diabetes mellitus tipo 2.

B. Polissonografia demonstrando:

1. Cinco ou mais eventos respiratórios predominantemente obstrutivos (apneia obstrutiva e mista, hipopnéias, ou despertares relacionados ao esforço respiratório [RERAs]) por hora de sono.

C. Polissonografia demonstrando:

1. Quinze ou mais eventos respiratórios predominantemente obstrutivos (apneias, hipopnéias ou RERAs) por hora de sono.

A classificação do nível de gravidade da SAOS deve ser feita baseada nos índices polissonográficos, na intensidade dos sintomas, impacto das funções sociais e a presença de manifestações cardiovasculares conforme o quadro 1.⁽⁵⁷⁾

Quadro 1. Classificação do nível de gravidade da SAOS.⁽⁵⁷⁾

| Classificação do nível de gravidade do SAOS | |
|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| SAOS Leve | Baixo índice de apneia-hipopneia (entre 5 e 15,9 eventos por hora) |
| SAOS Moderada | Moderado índice de apneia/hipopneia (entre 16 e 29,9 eventos/hora) |
| SAOS Grave | Índice de apneia/hipopneia maior que 30 |

Segundo a literatura especializada, as crises de apneia, associadas a despertares recorrentes e dessaturação da oxihemoglobina durante o sono dos pacientes portadores da síndrome da apneia do sono, podem acarretar sérias complicações, principalmente relacionadas ao sistema cardiovascular.

Neau *et al.*⁽⁵⁸⁾ referem que a apneia obstrutiva do sono é um fator de risco independente para o acidente vascular cerebral e deve ser tratada em todo paciente vítima desse evento. Referem ainda que, indivíduos com índice de distúrbio respiratório maior que 20, apresentam uma taxa de mortalidade, em decorrência de doenças cerebrovasculares, significativamente maior daqueles que apresentam índice de distúrbio respiratório menor do que 20, fato que se torna mais evidente em uma faixa etária maior que 50 anos.

Mohsenin *et al.*⁽⁵⁹⁾ relatam que o acidente vascular cerebral está entre as principais causas de óbito nos EUA (Estados Unidos da América), tendo fatores de risco bem conhecidos como a hipertensão arterial, o tabagismo, a dislipidemia e o diabetes, porém seus estudos evidenciaram que cerca de 50% desses pacientes eram portadores da síndrome da apneia obstrutiva do sono, sugerindo causa efeito com essa afecção.

Chung *et al.*⁽⁶⁰⁾ descrevem que a hipertensão arterial é observada em 50% dos pacientes portadores da síndrome da apneia obstrutiva do sono e que 35% dos indivíduos portadores de hipertensão arterial essencial, a qual não se encontra causa definida, também são portadores da síndrome da apneia obstrutiva do sono, sugerindo que essa população pudesse apresentar apneia não diagnosticada.

Peppard *et al.*⁽⁶¹⁾ acompanharam 709 pacientes portadores da síndrome da apneia obstrutiva do sono, por um período mínimo de 4 anos e concluíram que a apneia obstrutiva do sono é um fator de risco, independente, para o desenvolvimento da hipertensão arterial. Estudos posteriores revelam que o tratamento da síndrome da apneia obstrutiva do sono se faz essencial nesses pacientes, reduzindo de forma substancial os níveis pressóricos.

Lavie *et al.*⁽⁶²⁾ relatam que cada evento adicional de apneia por hora, aumenta o risco de desenvolvimento de hipertensão arterial em cerca de 1% dos pacientes portadores da síndrome e a cada 10% de decréscimo da saturação sanguínea de oxigênio aumenta o risco de desenvolvimento de hipertensão arterial em cerca de 13% desses indivíduos.

Tryfon *et al.*,⁽⁶³⁾ também descrevem a síndrome da apneia obstrutiva do sono como um fator de risco independente para hipertensão arterial, e acrescentam que a pressão diastólica é a que mais sofre influência das crises de apneia, elevando-se com maior intensidade durante atividade física, nesse grupo de pacientes.

O mecanismo pelo qual as crises repetidas de apneia levam a hipertensão arterial, ainda encontra-se sob investigação, porém sabe-se que está relacionado com um excesso de atividade do sistema nervoso simpático, com lesões funcionais do endotélio vascular e de anormalidades metabólicas que são conhecidas como fatores de risco para

hipertensão arterial, como a intolerância a glicose, resistência a insulina e que, em geral, estão presentes nos pacientes apneicos.⁽⁶⁴⁾

Dimsdale *et al.*⁽⁶⁵⁾ sugerem que o uso do CPAP (*Contiunous Positive Airway Pressure*) reduz os índices pressóricos dos pacientes apneicos durante o sono e que os beta bloqueadores são as drogas mais efetivas no controle da hipertensão arterial nos pacientes portadores de SAOS, sugerindo que a descarga adrenérgica seja a causa da hipertensão.

A arritmia cardíaca, que também é uma importante causa de acidente vascular cerebral, é um distúrbio da condução elétrica do coração e que com frequência está presente nos portadores de SAOS.

Guilleminault *et al.*⁽⁶⁶⁾ em estudo com 400 pacientes portadores de SAOS evidenciaram que 48% desses indivíduos eram portadores de arritmia cardíaca, documentadas, principalmente durante o sono, as quais não se correlacionavam com a gravidade da apneia.

Harbison *et al.*⁽⁶⁷⁾ submeteram 45 pacientes portadores de apneia obstrutiva do sono a monitorização cardíaca, holter por 18 horas, encontrando distúrbios do ritmo cardíaco em 35 pacientes, sendo que oito apresentaram distúrbios que poderiam acarretar um acidente vascular cerebral. Relatam também que o uso do CPAP nasal é capaz de abolir os distúrbios do ritmo cardíaco na maioria dos pacientes portadores de SAOS.

Kanel *et al.*⁽⁶⁸⁾ em estudo de revisão da literatura, sugerem que um dos fatores que contribuem para o aumento da incidência de doenças coronarianas e cerebrovasculares em indivíduos portadores de SAOS é a hipercoagulabilidade. Concluem em seu estudo, que tais indivíduos apresentam elevado nível de fibrinogênio, aumento da capacidade de

agregação plaquetária e redução da capacidade fibrinolítica, alterações essas, reversíveis com o uso do CPAP.

Roman *et al.*⁽⁶⁹⁾ em seus estudos citam que uma das causas de demência vascular é a isquemia subcortical, alteração que pode ter a SAOS como patologia de base, em decorrência de períodos intermitente de hipoxia cerebral presentes nessa síndrome.

Ferini *et al.*⁽⁷⁰⁾ em estudo com 23 pacientes portadores de SAOS, concluem que esses apresentam alterações no sistema cognitivo, como déficit de atenção, redução da capacidade de aprendizado visual e limitação da capacidade de planejamento. Alterações essas, que são parcialmente corrigidas com o uso do CPAP.

A relação entre síndrome da apneia obstrutiva do sono e acidente automobilístico, hoje já é bem clara e segundo dados do ministério da saúde, ocorrem cerca de 300.000 acidentes automobilísticos ao ano no Brasil, com mais de 27.000 mortes ao ano, constituindo a principal causa de morte na faixa etária entre 15 e 44 anos. Segundo dados da literatura, cerca de 60% dos caminhoneiros no Brasil apresentavam algum grau de sonolência diurna enquanto realizavam suas atividades. O risco de acidente automobilístico em indivíduos portadores de apneia obstrutiva do sono, no Brasil, é de quatro a sete vezes maior que do da população geral. Já os estudos norte americanos relatam que cerca de 16 a 20% dos acidentes automobilísticos estão relacionados a sonolência excessiva.⁽⁷¹⁻⁷³⁾

O tratamento da apneia obstrutiva do sono deve ser individualizado, cada paciente é avaliado e tratado de maneira singular. Esse tratamento pode ser clínico ou cirúrgico.

O tratamento clínico é realizado de algumas formas, como a perda de peso, que traz melhoras tanto no ronco como no padrão respiratório do paciente já que a obesidade altera a arquitetura das vias aéreas superiores, reduzindo o diâmetro da coluna aérea.⁽⁷⁴⁾

O uso do CPAP ou BIPAP (Bi-level Positive Airway Pressure), que são dispositivos não invasivos que proporcionam pressão positiva contínua nas vias aéreas superiores, apresentam alta eficácia no controle das apneias, e que podem ter o uso interrompido a qualquer momento, porém alguns pacientes não toleram o uso, em decorrência de sintomas irritativos e a necessidade de ser diário, mesmo em viagens.⁽⁷⁵⁾ Os aparelhos intra-orais têm como objetivo prevenir que a língua entre em colapso com os tecidos moles da orofaringe. Esses dispositivos estão sendo indicados para o tratamento do ronco, apneia leve e casos selecionados de apneia moderada. Tem como vantagem ser um método não invasivo e reversível e como complicações mais expressivas, desajustes oclusais e alterações na articulação temporomandibular.⁽⁷⁴⁾

O tratamento cirúrgico para SAOS abrange cirurgias nasais, faríngeas (palatais e linguais) e cirurgia esquelética. As cirurgias podem ser realizadas isoladas ou combinadas o que denominamos de cirurgias em múltiplos níveis.⁽⁷⁶⁾

As cirurgias nasais realizadas em pacientes com SAOS incluem principalmente a correção dos desvios septais e da hiperplasia das conchas nasais inferiores. O tratamento cirúrgico nasal isolado traz impacto no controle do ronco, na sonolência diurna e na qualidade de vida, mas sem benefício para tratamento da SAOS, principalmente se avaliado diante dos parâmetros objetivos da polissonografia.^(77,78-80)

As principais modalidades cirúrgicas faríngeas para tratamento da SAOS são: uvulopalatofaringoplastia (UPFP), Z-palatoplastia, faringoplastia expansiva e a faringoplastia lateral. Há grande heterogeneidade nos estudos das principais técnicas de cirurgias faríngeas para tratamento da SAOS, o que impossibilita adequada comparação entre as diferentes cirurgias e entre a cirurgia e tratamento com CPAP ou AIO.⁽⁸¹⁾

Os procedimentos sobre a base da língua associada a cirurgias faríngeas podem ser alternativa para os pacientes com SAOS moderada a severa quando não houver tolerância ou houver recusa do CPAP,^(82,83) tendo melhores resultados em pacientes com índice de massa corporal (IMC) inferior a 30kg/m².^(83,84)

O tratamento cirúrgico do esqueleto facial está indicado em pacientes com deformidades dento-esqueléticas e em pacientes com SAOS grave que não tenham adaptado ao CPAP ou não tenham apresentado resposta terapêutica aos aparelhos intraorais de avanço mandibular (AIO), independentemente de apresentarem ou não alteração craniofacial.⁽⁸⁵⁾ O tratamento cirúrgico da SAOS pode ser feito por meio do avanço maxilo mandibular (AMM), com taxa de sucesso de 82% e possibilidade de cura em 43,2% dos casos.⁽⁸⁶⁾ Outra técnica utiliza o avanço do músculo genioglossa associado à uvulopalatofaringoplastia, com taxa de sucesso média de 67%.⁽⁸⁷⁾ Os procedimentos cirúrgicos aumentam a dimensão da faringe e tentam prevenir o colapso faríngeo durante o sono em pacientes com SAOS.⁽⁸⁶⁾

A síndrome da apneia obstrutiva do sono é uma patologia de alta incidência, que atinge a população em sua fase produtiva e que acarreta complicações importantes, muitas vezes irreversíveis ao ser humano. Sua etiologia ainda não está totalmente elucidada, sabe-se que é multifatorial, incluindo a de origem genética, relacionada a ambos os polimorfismos no gene *HTR2A*: a substituição T->C na posição nucleotídica 102² e a substituição G->A, na posição -1438 da região promotora do gene,⁽¹⁷⁾ o que justifica estudos mais detalhados, para que novos tratamentos mais eficazes e menos invasivos possam surgir.

3. CASUÍSTICA E MÉTODO

3. CASUÍSTICA E MÉTODO

De acordo com as Normas Reguladoras de Pesquisa em Seres Humanos, Resolução 196/96 do Ministério da Saúde, o presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição (Parecer nº342/2006).

No período de 01/07/2008 a 30/06/2010 foi realizado um estudo de corte transversal no qual foram estudados 100 casos-índice com síndrome da apneia obstrutiva do sono (73 do sexo masculino e 27 do sexo feminino), com idade entre 23 e 70 anos e 100 pacientes do grupo-controle (40 do sexo masculino e 60 do sexo feminino), com idade entre 17 e 70 anos. Foram submetidos à completa anamnese para investigar presença de roncos, sono agitado, episódios de apneia noturna e sonolência diurna, uso de medicamentos, hipertensão arterial e estados depressivos. Os exames físicos, otorrinolaringológico e sistêmico, foram realizados para avaliar o índice de massa corpórea (IMC), o diâmetro cervical, pesquisar tumores cervicais e afastar malformações craniofaciais, além dos exames das cavidades nasal e oral. Após esta avaliação clínica, os pacientes realizaram exames complementares gerais e específicos da SAOS como a cefalometria, nasofibrolaringoscopia com manobra de Müller e polissonografia basal tipo I.

Para a seleção dos pacientes foram considerados os seguintes critérios⁽⁸⁸⁾:

Critérios de inclusão:

a) preencham os critérios A ou B, mais o C para o diagnóstico da síndrome:

A. sonolência diurna excessiva que não pode ser explicada por outros fatores.

B. dois ou mais dos seguintes critérios que não podem ser explicados por outros fatores:

.respiração ofegante ("gaspings") durante o sono; .despertares recorrentes do sono; .sono não-reparador; fadiga diurna; .falta de concentração.

C. monitoramento durante a noite demonstrando mais de 5 episódios de obstrução da respiração por hora, durante o sono. Esses eventos podem incluir qualquer combinação de apneia obstrutiva/hipopneia ou esforços respiratórios relacionados com despertares.

b) ausência de dismorfismo craniofacial ou alterações temporomandibular, investigados pelo exame físico e complementar específicos.

c) ausência de dependência de drogas, alcoolismo, transtornos depressivos, demência, investigados pela anamnese e avaliações psiquiátricas.

d) ausência de síndromes genéticas aparentes, investigadas pelo exame físico genético-clínico.

e) presença ou não de outros casos na família.

f) idade máxima de 70 anos.

g) $IMC \leq 35$.

Critérios de exclusão:

a) Pacientes acima de 70 anos

b) presença de distúrbios psiquiátricos.

c) alterações nas análises laboratoriais, nos exames físicos geral e específico.

d) não apresentarem os critérios mínimos para diagnóstico da síndrome.

e) $IMC > 35$.

f) Caucasianos de mesma área demográfica

Os pacientes do Grupo Controle foram selecionados com os mesmos critérios de inclusão e exclusão descritos para o Grupo com SAOS, exceto que o IAH (índice de apneia/hipopneia/hora) é de ≤ 5 .

Foram coletados os seguintes dados: idade à época da realização da polissonografia, índice de massa corpórea e índice de apneia/hipopneia, obtido pelos

registros do aparelho de polissonografia (*Stellat System QC, Harmonie TM, Canada*). Os pacientes foram distribuídos nas seguintes faixas etárias: adolescência (11 a 17 anos), adulto jovem (18 a 40 anos), adulto (41 a 65 anos) e idoso (> 65 anos)^(15,16). Em relação ao índice da apneia/hipopneia (IAH) os pacientes foram agrupados na seguinte classificação: SAOS leve (IAH de 5 a 15,9 eventos/hora), SAOS moderada (IAH de 16 a 30 eventos/hora), SAOS grave (IAH > 30 eventos/hora).⁽⁵⁷⁾ Da mesma forma, em relação ao Índice de Massa Corporal (IMC) os pacientes foram agrupados de acordo com a classificação da OMS: peso ideal (18,5-24,9 Kg/m²), sobrepeso (25,0-29,9 Kg/m²), obesidade Grau I (30,0-34,9 Kg/m²) e obesidade Grau II (35,0-39,9 Kg/m²).⁽¹⁸⁾ Foi estipulado o limite do IMC ≤ 35, a fim de que maiores graus de obesidade não influenciassem nos níveis de IAH.

3.1 Investigação molecular:

3.1.1 Extração de DNA genômico:

O DNA genômico foi extraído das amostras de sangue estocadas usando-se o Kit de extração *GE Illustra - Blood Genomicprep Mini Spin Kit™ (GE Healthcare UK Limited)*, de acordo com o protocolo do fabricante, e o procedimento realizado no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Imunomorfologia (LAEPI) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP (FAMERP).

3.1.2 Detecção de polimorfismos no gene nuclear *HTR2A*:

a) Polimorfismo 102T/C:

Para se detectar o polimorfismo 102T/C, fragmentos do DNA nuclear, que abrangem a região do polimorfismo no gene *HTR2A*, foram amplificados pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (*PCR*). Para esta reação, foi utilizado um par de iniciadores ou *primers*, que são oligonucleotídeos sintéticos.⁽²⁾ A partir destes, os

desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs) são incorporados, iniciando a amplificação do DNA, respeitando-se a complementaridade de bases (A-T/C-G) sendo obtida, por fim, a amplificação do gene *HTR2A*. As sequências dos oligonucleotídeos sintetizados e o tamanho (em pares de bases - pb) dos fragmentos amplificados, pelo par de *primers*, são descritos no Quadro 2.

Quadro 2. Sequência dos *primers* para PCR do DNA nuclear.⁽²⁾

| Par | Sequência 5'-> 3' | Tamanho (pb) |
|--------|------------------------------|--------------|
| "1-2A" | 1-2AF - TCTGCTACAAGTTCTGGCTT | } 342 |
| | 1-2AR - CTGCAGCTTTTTCTCTAGGG | |

F ("Forward" - direto); R ("Reverse" - inverso); pb (pares de bases)

Pela PCR foi amplificado, como produto da reação, um fragmento de 342 pb o qual, posteriormente, foi submetido à análise de restrição (RFLP) utilizando-se a enzima *MspI* (New England Biolabs)[®], a 37°C, para detecção do polimorfismo 102T/C.⁽²⁾

A digestão do fragmento de amostras homozigotas polimórficas (CC) para o polimorfismo 102T/C, produz dois fragmentos de 217 pb e 125 pb (alelo polimórfico-C), devido o reconhecimento do sítio de restrição da enzima *MspI*, pela substituição das bases nitrogenadas T->C, na posição 102 do gene *HTR2A*. As amostras heterozigotas para o polimorfismo (TC), após a digestão enzimática, apresentam três fragmentos: de 342 pb (alelo sem o polimorfismo-T), 217 e 125 pb (alelo polimórfico-C). As amostras sem o polimorfismo, portanto homozigotas selvagem (TT), têm apenas o fragmento de 342 pb (alelo selvagem-T), pois não há o reconhecimento do sítio da enzima.

b) Polimorfismo -1438G/A:

Para se detectar o polimorfismo -1438G/A fragmentos do DNA nuclear, que abrangem a região do polimorfismo, na região promotora do gene *HTR2A*, foram amplificados pela técnica da PCR. Para esta reação, foi utilizado um par de iniciadores ou *primers*, que são oligonucleotídeos sintéticos.⁽¹⁷⁾ As sequências dos

oligonucleotídeos sintetizados e o tamanho (em pares de bases - pb) dos fragmentos amplificados, pelo par de *primers*, são descritos no Quadro 3.

Quadro 3. Sequência dos *primers* para PCR do DNA nuclear.⁽¹⁷⁾

| Par | Sequência 5'-> 3' | Tamanho (pb) |
|--------|-------------------------------|--------------|
| "2-2A" | 2-2AF - AAGCTGCAAGGTAGCAACAGC | } 469 |
| | 2-2AR - AACCAACTTATTCCTACCAC | |

F ("Forward" - direto); R ("Reverse" - inverso); pb (pares de bases)

Pela PCR foi amplificado, como produto da reação, um fragmento de 469 pb o qual, posteriormente, foi submetido à análise de restrição (RFLP) utilizando-se a enzima *MspI* (New England Biolabs)[®], a 37°C, para detecção do polimorfismo -1438G/A na região promotora do gene.⁽¹⁷⁾

A digestão do fragmento de amostras selvagem (GG) para o polimorfismo -1438G/A, produz dois fragmentos de 243 pb e 226 pb (alelo selvagem-G), devido o reconhecimento do sítio de restrição da enzima *MspI*. As amostras homozigotas para o polimorfismo (AA) têm apenas o fragmento de 469 pb (alelo polimórfico-A), pois não há reconhecimento do sítio da enzima, pela substituição das bases nitrogenadas G->A na posição -1438 do gene *HTR2A* e as amostras heterozigotas (GA) têm três fragmentos: de 469 pb (alelo polimórfico-A), 243 e 226 pb (alelo selvagem-G).

Cada uma das duas reações da *PCR* foi processada em ciclador de temperatura (*Bioer Technology*[®], Modelo *TC-XPG*), em reações de 25 µL de volume final, contendo:

- 1) *DNA* (200-300 ng),
- 2) *primers* 1 e 2 - 10 pmoles de cada [direto (F) e inverso (R)].
- 3) Conjunto de Reagentes *FideliTaq*[™] *PCR MasterMix* (2X) (*GE HEALTHCARE*[®]) composto por: tampão de *PCR* 1X [Tris-HCl - 30 mM (pH 8.4), cloreto de potássio (KCl) - 50 mM], cloreto de magnésio (MgCl₂) - 1,5 mM, *dNTPs* -

0,2 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (*dATP*, *dTTP*, *dCTP*, *dGTP*) e *Taq DNA* polimerase - 1,25 U. Protocolo utilizado de acordo com as instruções do fabricante.

Foi utilizado o seguinte ciclo padrão para as reações da *PCR*: inicialmente, as amostras foram desnaturadas a 94°C por 3 minutos sendo, posteriormente, submetidas a 35 ciclos repetidos de 60 segundos a 94°C para desnaturação, 60 segundos a 60°C para anelamento de ambos os pares de *primer* e, para a extensão, 2 minutos a 72°C e, após os ciclos, 10 minutos a 72°C para extensão final das cadeias.

Os produtos de cada uma das duas reações da *PCR* e das duas da *RFLP* foram adicionados ao azul de bromofenol e submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% em tampão Tris-Borato-EDTA ou TBE 1X, contendo brometo de etídio, na concentração de 0,5 µg/mL, submetidos à iluminação ultravioleta para confirmar o sucesso das mesmas e o gel, fotodocumentado.

Os resultados foram submetidos previamente à estatística descritiva para determinação da normalidade. Foram utilizados o teste *t* bicaudal de *Student* para amostras independentes com distribuição normal e o teste de *Mann-Whitney* para amostras com distribuição não normal. Quando aplicáveis, foram utilizados o teste *Chi-square* para comparação entre as variáveis e o *odds ratio*, com intervalo de confiança de 95% (IC-95%), para determinar o fator de risco à SAOS pelos polimorfismos analisados. O nível de significância foi estabelecido em 5%. Os testes estatísticos foram realizados usando o programa GraphPad InStat version 3.00, GraphPad Software Inc, San Diego California USA, www.graphpad.com. A coerência da distribuição genotípica com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliada por testes exatos.^(89,90)

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Resultados demográficos

Do total de 100 pacientes com apneia (casos-índice), 73 (73%) são do sexo masculino e 27 (27%) do sexo feminino. Em relação à faixa etária, a idade variou de 23 a 70 anos para o sexo masculino (Média M-50,1 anos; DP±12,5) e para o sexo feminino a idade variou de 43 a 65 anos, (M-52 anos; DP±6,0). O IMC para o sexo masculino variou de 21,2 a 35 Kg/m² (M-29,5 Kg/m²; DP±3,8) e para o sexo feminino variou de 21 a 35 Kg/m² (M-28,6 Kg/m²; DP±3,5). Em relação ao IAH, este variou de 5,8 a 115 (M-37,5; DP±26,3) para o sexo masculino e para o feminino variou de 5,4 a 79 (M-19,6; DP±19,3).

Dos 100 pacientes do grupo controle, 40 (40%) são do sexo masculino e 60 (60%) são do sexo feminino. A faixa etária variou de 17 a 66 anos (M-46,1 anos; DP±12,3) para o sexo masculino e de 21 a 70 anos (M-43,6 anos; DP±11,7) para o feminino. O IMC para o sexo masculino variou de 20 a 34,6 Kg/m² (M-26,8 Kg/m²; DP±3,9) e de 20 a 35 Kg/m² (M-27,1 Kg/m²; DP±4,0) para o feminino. O IAH variou de 0 a 4,9 (M-2,3; DP±1,5) para o sexo masculino e de 0 a 4,9 (M-1,6; DP±1,4) para o sexo feminino.

A Tabela 1 apresenta os dados demográficos dos 100 casos-índice e 100 controles e a Tabela 2 apresenta estes dados em média ± desvio padrão.

Tabela 1. Distribuição dos dados demográficos dos casos-índice (n=100) em relação ao grupo controle (n=100).

| Variáveis | Casos-índice n (%) | Controles n (%) | p* |
|-------------------------------------------------|-----------------------|--------------------|-------------------|
| Sexo | | | |
| Masculino | 73 (73) | 40 (40) | <0,0001 |
| Feminino | 27 (27) | 60 (60) | |
| IMC | | | |
| Peso ideal | 13 (13) | 32 (32) | 0,0081 |
| Sobrepeso | 44 (44) | 41 (41) | |
| Obesidade Grau I | 38 (38) | 24 (24) | |
| Obesidade Grau II | 05 (05) | 03 (03) | |
| Faixa etária | | | |
| Adolescente | 0 (0) | 01 (01) | 0,0007 |
| Adulto jovem | 12 (12) | 35 (35) | |
| Adulto | 80 (80) | 61 (61) | |
| Idoso | 08 (08) | 03 (03) | |
| Dados obtidos pela Polissonografia n (%) | | | |
| IAH | | | |
| Normal | -- | 100 (100) | NA |
| Leve | 40 (40) | -- | |
| Moderada | 15 (15) | -- | |
| Grave | 45 (45) | -- | |

IMC - índice de massa corporal.

IAH - índice de apneia/hipopneia.

NA - Não analisado.

*Teste do *Chi-square*.

Houve maior prevalência do sexo masculino (73%) nos casos-índice e o sexo feminino foi o predominante no grupo controle em 60% dos casos, sendo esta relação significativa ($p < 0,0001$).

Em relação ao IMC, o grupo de pacientes com SAOS teve maior prevalência nas classificações de sobrepeso e obesidade Grau I, perfazendo o total de 82% dos casos, enquanto que o grupo controle teve a maior prevalência nas classificações de peso ideal e obesidade Grau I (73% do total), sendo esta diferença entre os grupos significativa ($p = 0,0081$).

Ambos os grupos, casos-índice e controles, tiveram a maior prevalência da idade nas faixas de adulto jovem e adulto, perfazendo o total de 92% e 96%, respectivamente. Não houve paciente adolescente nos casos-índice. A análise estatística para esta variável mostrou significância entre os casos-índice e controles ($p < 0,0001$).

Tabela 2. Parâmetros clínicos e polissonográficos dos casos-índice em relação ao grupo controle.

| Parâmetros | Casos-índice (n=100) | Controles (n=100) | <i>p</i> |
|---------------------|-------------------------|----------------------|-------------------|
| IMC (grau) | 29,3 ± 3,7 | 27,0 ± 3,9 | <i>p</i> <0,0001* |
| Faixa etária (anos) | 50,6 ± 11,1 | 44,6 ± 12,0 | <i>p</i> =0,0004† |
| IAH | 32,6 ± 25,7 | 1,9 ± 1,5 | <i>p</i> <0,0001† |

Valores apresentados como média ± desvio padrão.

IMC - índice de massa corporal.

IAH - índice de apneia/hipopneia.

*Teste *t* bicaudal de *Student* para amostras independentes.

†Teste de *Mann-Whitney*.

Conforme apresentado na Tabela 2, os casos-índice apresentaram os valores médios do IMC, da faixa etária e do IAH significativamente maiores quando comparados aos valores médios do grupo controle.

4.2. Resultados da Análise Molecular para ambos os Grupos - Casos-índice e Controle

4.2.1 Extração do *DNA* genômico

Foi possível a extração do *DNA* genômico, a partir de leucócitos de sangue periférico, de todas as amostras de ambos os grupos do estudo (n=200 - 100%) (Figura 1).

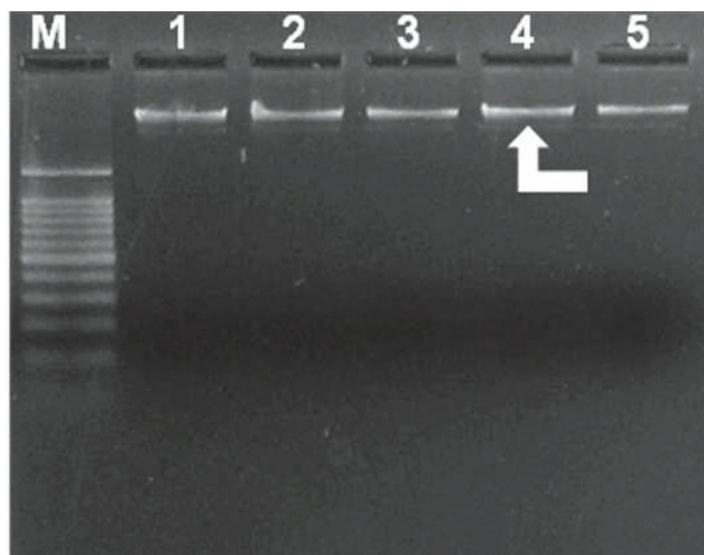


Figura 1. Fotografia do *DNA* genômico das amostras identificadas de 1 a 5, em gel de agarose 1%. A seta indica as bandas correspondentes ao *DNA* de cada amostra. M-marcador 100 pb (Ladder®).

4.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (*PCR*):

a) Amplificação da região do polimorfismo 102T/C no gene *HTR2A*:

A reação da *PCR* permitiu a amplificação do fragmento de 342 pb que abrange a região polimórfica, em todas as amostras analisadas de ambos os Grupos do estudo (n=200 - 100%) (Figura 2).

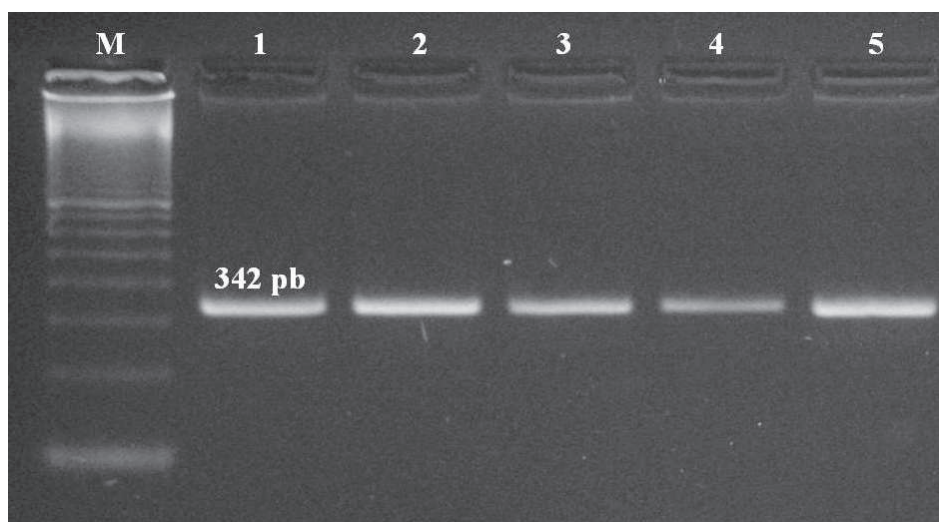


Figura 2. Fotografia do produto da *PCR* - fragmento de 342 pb amplificado do gene *HTR2A*, em gel de agarose 2%. Colunas 1 a 5 - amostras do estudo. M- marcador 100 pb (Ladder[®]).

b) Amplificação da região do polimorfismo -1438G/A na região promotora do gene *HTR2A*:

A reação da *PCR* permitiu a amplificação do fragmento de 469 pb que abrange a região polimórfica, em todas as amostras analisadas de ambos os Grupos do estudo (n=200 - 100%) (Figura 3).

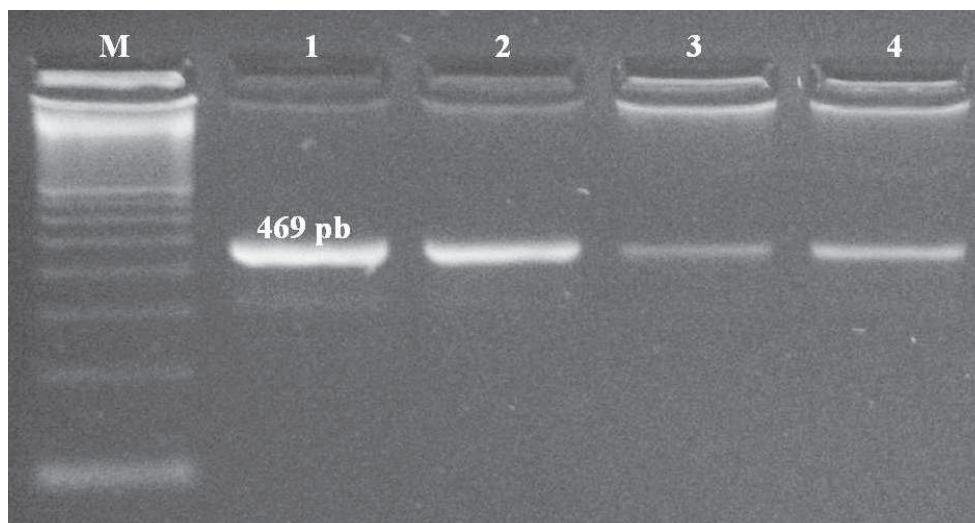


Figura 3. Fotografia do produto da *PCR* - fragmento de 469 pb amplificado do gene *HTR2A*, em gel de agarose 2%. Colunas 1 a 4 - amostras do estudo. M-marcador 100 pb (Ladder[®]).

4.2.3 Técnica da *RFLP* (Digestão Enzimática) dos fragmentos amplificados para identificação dos polimorfismos:

a) 102T/C no gene *HTR2A* (Figura 4):

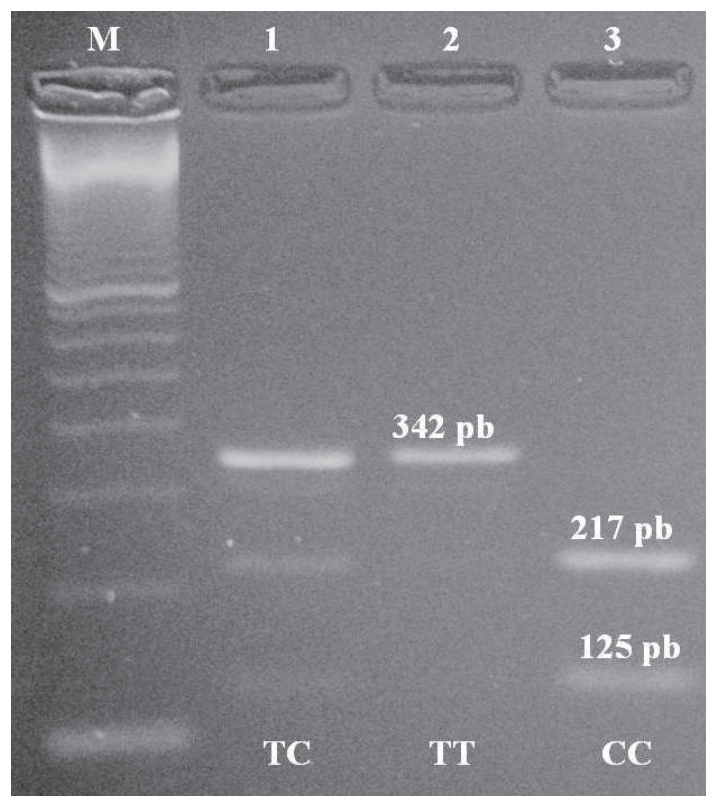


Figura 4. Fotografia do produto da *RFLP* (digestão enzimática) - fragmentos de 342, 217 e 125 pb do gene *HTR2A*, em gel de agarose 2%, das amostras do estudo. Coluna 1: genótipo heterozigoto (TC). Coluna 2: genótipo homozigoto selvagem (TT). Coluna 3: genótipo homozigoto polimórfico (CC). M- marcador 100 pb (Ladder®).

b) -1438G/A na região promotora do gene *HTR2A* (Figura 5):

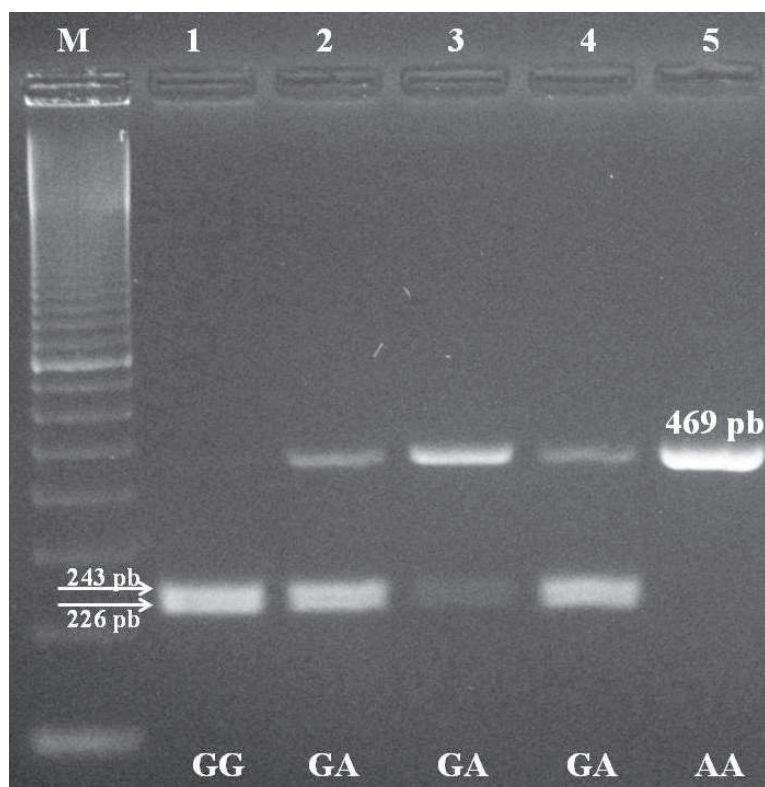


Figura 5. Fotografia do produto da *RFLP* (digestão enzimática) - fragmentos de 469, 243 e 226 pb do gene *HTR2A*, em gel de agarose 2%, das amostras do estudo. Coluna 1: genótipo homocigoto selvagem (GG). Colunas 2-4: genótipo heterocigoto (GA). Coluna 5: genótipo homocigoto polimórfico (AA). M- marcador 100 pb (Ladder[®]).

Os resultados moleculares encontrados e as comparações entre as variáveis obtidas no estudo estão apresentados nas Tabelas 3 a 8:

Tabela 3. Distribuição dos alelos encontrados nos casos-índice e controles para os polimorfismos T102C e -1438G/A do gene *HTR2A*.

| Alelos | Casos-índice n (%) | Controles n (%) | <i>p</i> * |
|--------|-----------------------|--------------------|---------------|
| T | 112 (112) | 109 (109) | 0,8406 |
| C | 88 (88) | 91 (91) | |
| G | 69 (69) | 91 (91) | 0,0321 |
| A | 131 (131) | 109 (109) | |

*Teste do *Chi-square*.

As frequências alélicas T e C para os casos-índice foram T=0,56 e C=0,44 e para os controles foram T=0,545 e C=0,455, não apresentando diferença estatística entre os grupos ($p=0,8406$). As frequências alélicas G e A para os casos-índice foram G=0,345 e A=0,655 e para os controles G=0,455 e A=0,545, mostrando diferença estatística entre os grupos ($p=0,0321$).

Tabela 4. Distribuição dos genótipos encontrados nos casos-índice e controles para os polimorfismos T102C e -1438G/A do gene *HTR2A*.

| Genótipo | Casos-índice n (%) | Controles n (%) | <i>p</i> * |
|----------|-----------------------|--------------------|------------|
| TT | 23 (23) | 20 (20) | 0,8711 |
| TC | 66 (66) | 69 (69) | |
| CC | 11 (11) | 11 (11) | |
| GG | 4 (4) | 10 (10) | 0,0177 |
| GA | 61 (61) | 71 (71) | |
| AA | 35 (35) | 19 (19) | |

*Teste do *Chi-square*.

Houve diferença estatística dos genótipos do polimorfismo -1438G/A encontrados nos casos-índice em relação ao grupo controle ($p=0,0177$).

As frequências genóticas para o polimorfismo T102C não se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg tanto para os casos-índice ($\chi^2=11,511$; $p=0,00069$) como para o grupo controle ($\chi^2=15,309$; $p=0,00009$). As frequências genóticas para o polimorfismo -1438G/A não se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg tanto para os casos-índice ($\chi^2=12,229$; $p=0,00047$) como para o grupo controle ($\chi^2=18,628$; $p=0,00002$).

A Tabela 5 apresenta, em *odds ratio*, a relação dos genótipos encontrados no estudo entre casos-índice e controles.

Tabela 5. Relação genotípica entre casos-índice e controles para os polimorfismos T102C e -1438G/A do gene *HTR2A*.

| Genótipo (Casos x Controles) | Odds ratio (OR) | IC 95% | Chi-square | <i>p</i> |
|---------------------------------|--------------------|-----------|------------|----------|
| TT e TC (89 x 89) | 1,0 | 0,41-2,43 | 0,000 | 1,000 |
| CC (11 x 11) | 1,0 | 0,41-2,43 | | |
| GG e GA (65 x 81) | 0,44 | 0,23-0,83 | 5,71 | 0,0169 |
| AA (35 x 19) | 2,3 | 1,20-4,38 | | |

IC - intervalo de confiança de 95%

Não houve diferença estatística dos genótipos TT e TC entre casos x controles, o mesmo ocorrendo para o genótipo CC, pois para estes genótipos ambos os grupos apresentaram a mesma frequência.

Apesar da alta frequência dos genótipos GG e GA em ambos os grupos, o grupo controle apresentou frequência significativamente maior em relação aos casos-índice, indicando uma razão de chance de 2,3 vezes mais de proteção para o não desenvolvimento da SAOS. Mas, em relação ao genótipo AA, os casos-índice apresentaram frequência significativamente maior do mesmo em relação aos controles estando, portanto, este genótipo associado ao risco de desenvolver SAOS e 2,3 vezes mais chance.

Tabela 6. Distribuição do sexo dos casos-índice e controles em relação aos genótipos encontrados para os polimorfismos T102C e -1438G/A do gene *HTR2A*.

| Genótipo | Casos-índice | | Controles | | <i>p</i> * |
|----------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|------------|
| | Masculino n (%) | Feminino n (%) | Masculino n (%) | Feminino n (%) | |
| TT e TC | 64 | 25 | 33 | 56 | 0,3387 |
| CC | 9 | 2 | 7 | 4 | |
| GG e GA | 40 | 25 | 31 | 50 | <0,0001 |
| AA | 33 | 2 | 9 | 10 | |

*Teste do *Chi-square*.

A relação do sexo com os genótipos do polimorfismo -1438G/A entre casos-índice e controles foi significativa

Tabela 7. Distribuição do IMC dos casos-índice e controles em relação aos genótipos para os polimorfismos T102C e -1438G/A do gene *HTR2A*.

| Genótipo | Casos-índice n (%) | | Controles n (%) | | <i>p</i> * |
|----------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------|
| | 20 ≤ IMC < 25 Kg/m ² | 25 ≤ IMC ≤ 35 Kg/m ² | 20 ≤ IMC < 25 Kg/m ² | 25 ≤ IMC ≤ 35 Kg/m ² | |
| TT e TC | 12 (12) | 77 (77) | 27 (27) | 62 (62) | 0,7542 |
| CC | 1 (1) | 10 (10) | 5 (5) | 6 (6) | |
| GG e GA | 6 (6) | 59 (59) | 24 (24) | 57 (57) | 0,0182 |
| AA | 7 (7) | 28 (28) | 8 (8) | 11 (11) | |

*Teste do *Chi-square*.

Houve associação estatisticamente significativa dos genótipos do polimorfismo -1438G/A com o IMC entre 25 e 35 Kg/m² nos casos-índice em relação aos controles.

Tabela 8. Distribuição do IAH (Índice de apneia/hipopneia) dos casos-índice em relação aos genótipos para os polimorfismos T102C e -1438G/A do gene *HTR2A*.

| Genótipo | Casos-índice n (%) | | <i>p</i> * |
|----------|-----------------------------|-------------------|------------|
| | $5 \leq \text{IAH} \leq 30$ | $\text{IAH} > 30$ | |
| TT e TC | 50 (50) | 39 (39) | 0,7238 |
| CC | 5 (5) | 6 (6) | |
| GG e GA | 38 (38) | 27 (27) | 0,4608 |
| AA | 17 (17) | 18 (18) | |

*Teste do *Chi-square*.

Não houve associação de ambos os polimorfismos estudados e a gravidade da SAOS nos casos-índice.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O sistema serotoninérgico é um importante componente do sono e da abertura das vias aéreas durante o mesmo. Conseqüentemente, fatores que afetam as atividades desse sistema podem levar a distúrbios do sono e respiração. O receptor 5-HT_{2A} é um componente essencial do sistema serotoninérgico estando, sua expressão, sob controle gênico. Assim, polimorfismos de genes que codificam o receptor podem afetar o estado funcional do mesmo e, por sua vez, a atividade serotoninérgica.^(17,20)

Diante disso, o presente estudo teve como objetivos investigar a prevalência dos polimorfismos T102C e -1438G/A do gene *HTR2A* em pacientes com e sem SAOS, pois até o momento não há trabalhos brasileiros sobre este tema, havendo somente dois estudos na literatura que relatam as frequências destes polimorfismos e a associação com a SAOS,^(2,17) o que reforça a importância deste estudo.

Para avaliar os resultados dos estudos de associação genética, os grupos índices e controle devem ter as mesmas origens étnicas e geográficas, porque a base genética de doenças, tais como configurações polimórficas, podem variar entre regiões e populações. A influência da diversidade étnica e geográfica pode ser extensa e deve ser considerada em estudos genéticos.^(91,92) Neste estudo, apesar da miscigenação significativa no Brasil, apenas os pacientes e controles caucasianos foram incluídos, e todos eles eram da mesma área geográfica.

Todos os indivíduos, de ambos os grupos do estudo, realizaram a polissonografia a fim de ser obtido o IAH que, pelo qual, foi possível o diagnóstico da presença ou não da SAOS enquadrando-os, respectivamente, em grupo com SAOS e grupo controle. Este critério foi rigorosamente seguido a fim de não se incluir pacientes, especialmente

do grupo controle, com diagnóstico de exclusão de SAOS apenas por critérios clínicos, como realizado em outros estudos descritos na literatura.^(2,15,17)

A SAOS é mais frequente em homens, encontrada em todas as faixas etárias, tornando-se mais prevalente com o avançar da idade¹. Conforme a literatura, no presente estudo, houve maior prevalência dos casos-índice no sexo masculino e na fase adulta, mas apenas 8% dos casos acima de 65 anos.

Em relação ao polimorfismo T102C, como o grupo controle apresentou a mesma frequência dos casos-índice para os genótipos TT/TC e CC pode-se sugerir que não houve associação do polimorfismo T102C com o desenvolvimento da SAOS, sendo este resultado concordante com os descritos na literatura.^(2,17) Embora o receptor 5-HT_{2A} predominantemente contribui para a excitação da serotonina (5-HT) dentro do representativo núcleo motor das vias aéreas superiores, a falta de polimorfismos comuns ou modificações epigenéticas que alterem os níveis de RNA mensageiro do gene *HTR2A* podem ser a razão para a ausência de associação do polimorfismo T102C com SAOS nesta população, além de ser considerado um polimorfismo silencioso e estar presente na mesma proporção no grupo controle.^(2,17,21,22)

Mas, o genótipo AA foi significativamente maior nos casos-índice, assim como os genótipos GG/GA no grupo controle significando que, em relação ao polimorfismo -1438G/A, o genótipo AA pode estar associado com o desenvolvimento da SAOS na população do presente estudo, resultado este concordante com os da literatura.^(2,17)

Houve diferença significativa entre o sexo dos casos-índice e controles em relação aos genótipos do polimorfismo -1438G/A, o que não ocorreu com os genótipos do polimorfismo T102C. Este resultado, conforme a literatura, pode sugerir predisposição genética da SAOS, especialmente no sexo masculino, resultante de

alterações no sistema serotoninérgico,⁽²⁰⁾ podendo explicar, assim, a diferente incidência da SAOS entre os sexos.^(1,15,17) A comparação dos genótipos com o sexo foi realizada no estudo devido, conforme descrito na literatura, a maior prevalência da SAOS no sexo masculino.^(1,15,17)

Não houve correlação entre o IAH, obtido pela polissonografia, e os genótipos de ambos os polimorfismos dos casos-índice, resultado este concordante com os da literatura^{2,17}. Esta condição pode sugerir que outros mecanismos, além de polimorfismos no gene *HTR2A*, estejam também envolvidos na fisiopatologia da SAOS. É evidente que a SAOS seja o fenótipo de um número de diferentes distúrbios, relacionados ou não, e resulte de uma complexa associação de genes e fatores modificadores e ambientais.⁽¹⁷⁾ Essa pode ser uma explicação para a ausência da associação, estatisticamente significativa, entre ambos os polimorfismos analisados e os achados polissonográficos da amostra do presente estudo.

A variabilidade no tamanho das vias aéreas é provavelmente determinada por influências genéticas na estrutura óssea, tamanho da língua e do tecido tonsilar assim como fatores adquiridos como a obesidade.⁽²⁶⁾ A obesidade pode afetar o tamanho faríngeo pela deposição de gordura ao redor das VAS ou pela alteração da função e orientação muscular.^(8,11,22) O estreitamento da via aérea faríngea, como um resultado de alterações na morfologia craniofacial, também tem sido sugerido na etiologia da SAOS. Um número combinado de fatores para determinar o tamanho da via aérea tem impacto na propensão para o colapso faríngeo e apneia durante o sono. Embora polimorfismos do gene *HTR2A* tenham um importante papel na atividade dos músculos dilatadores da faringe, outros fatores tais como a característica cefalométrica e estruturas de tecidos moles podem ser determinantes na abertura das vias aéreas durante o sono.^(2,13,14)

No presente estudo, foram utilizados como critérios de inclusão a ausência de dismorfismo craniofacial ou alterações temporomandibulares e $IMC \leq 35 \text{ Kg/m}^2$. Estes critérios foram rigorosamente seguidos a fim de se excluir estas variáveis e as anteriormente descritas, que afetariam a patência das vias aéreas superiores. Diante do exposto, quando o IMC foi comparado aos genótipos de ambos os polimorfismos em relação aos casos-índice e controles, a relação do IMC entre 25 e 35 Kg/m^2 foi significativa para os genótipos do polimorfismo -1438G/A nos casos-índice, resultado este concordante com os da literatura.^(2,27)

Em decorrência disto, o polimorfismo T102C parece não estar associado a SAOS nos pacientes do estudo quando comparado ao polimorfismo -1438G/A, o qual pode ser associado com a ocorrência da SAOS, na população estudada, especialmente nos pacientes do sexo masculino e com IMC entre 25 e 35 Kg/m^2 .

Os mais comuns distúrbios do sono resultam da interação de múltiplos genes e fatores ambientais, inclusive a SAOS.⁽²⁸⁾ Estudos genéticos estão sendo realizados para esclarecer algumas das complexidades do sono e levar a novos enfoques para o tratamento de seus distúrbios. Os genes estão, provavelmente, menos envolvidos nas mudanças de estado (*non-REM*->*REM*) observadas eletrofisiologicamente durante o ciclo do sono; eles estão, certamente, relacionados a determinar a ritmicidade circadiana e a homeostase do sono.⁽²⁸⁾

Até a presente data, não há dados na literatura brasileira de uma ligação genética com a SAOS, o que reforça a hipótese da disfunção do sistema serotoninérgico em relação à patogênese da SAOS. Apesar destes resultados positivos, eles devem ser interpretados com cautela e deve ser corroborada por estudos independentes e multicêntricos para determinar a real prevalência do polimorfismo 102T-C e sua

associação com SAOS nesta população brasileira estudada. Embora este estudo tenha sido realizado em uma amostra relativamente pequena de pacientes e controles, o polimorfismo 102T-C não parece estar associada com SAOS em comparação com o -1438G- um polimorfismo, que pode correlacionar-se com a incidência de SAOS na população brasileira.

A compreensão do impacto dos fatores genéticos permitirá a elucidação da fisiopatologia desses distúrbios e fornecerá importantes indícios para possíveis esquemas terapêuticos.⁽⁸⁾ Há a necessidade de futuros estudos, na população brasileira, a fim de que se possa conhecer a real prevalência destes polimorfismos, determinando a associação com a SAOS, para que futuros tratamentos possam talvez, ser instituídos de modo sexo-específico, devido as diferenças geneticamente determinadas entre ambos os sexos.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

As técnicas moleculares PCR/RFLP permitem a identificação dos polimorfismos T102C e -1438G do gene *HTR2A*, colaborando para a investigação molecular da SAOS.

Não há diferenças na prevalência do polimorfismo T102C entre os pacientes com SAOS e o grupo controle.

Há evidências de associação entre o polimorfismo -1438G/A e a SAOS.

Os mecanismos serotoninérgicos podem ser relacionados à SAOS.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. Young T, Peppard P, Gottlieb D. The epidemiology of obstructive sleep apnoea: a population health perspective. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:1217-39.
02. Sakai K, Takada T, Nakayama H, Kubota Y, Nakamata M, Satoh M, et al. Serotonin-2A and 2C receptor gene polymorphisms in Japanese patients with obstructive sleep apnea. *Intern Med* 2005; 44:928-33.
03. Pillar G, Malhotra A, Fogel R, Beauregard J, Schnall R, White DP. Airway mechanics and ventilation in response to resistive loading during NREM sleep: the influence of gender. *Am J Resp Crit Care Med* 2000; 162:1627-32.
04. Palmer LJ, Redline S. Genomics approaches to understanding obstructive sleep apnea. *Respir Physiol* 2003; 135:187-205.
05. Nieto FJ, Young TB, Lind BK, Shahar E, Samet JM, Redline S, et al. Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea, and hypertension in a large community-based study. Sleep Heart Health Study. *JAMA* 2002; 283:1829-36.
06. Shahar E, Whitney CW, Redline S, Lee ET, Newman AB, Nieto FJ, et al. Sleep-disordered breathing and cardiovascular disease: cross-sectional results of the Sleep Heart Health Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:19-25.
07. Fisher D, Pillar G, Malhotra A, Peled N, Lavie P. Long-term follow-up of untreated patients with sleep apnoea syndrome. *Respir Med* 2002; 96:337-43.
08. Taheri S. The genetics of sleep disorders. *Minerva Med* 2004; 95:203-12.
09. Berry RB, Brooks R, Gamaldo CE, Harding SM, Lloyd RM, Marcus CL and Vaughn BV for the American Academy of Sleep Medicine. The AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events: Rules, Terminology and Technical Specifications, Version 2.0.3. www.aasmnet.org. Darien, IL: American Academy of

Sleep Medicine, 2014.

10. Guilleminault C. Clinical features and evaluation of sleep obstructive apnea. In: Kryeger M, Roth T, Dement WC, editors. Principles and practices of sleep medicine, 2^a ed. Philadelphia:WB Saunders Company; 1994 p.869-78.
11. Bouchard C. Genetics determinants of regional fat distribution. Hum Reprod 1997; 12:1-5.
12. Maes HH, Neale MC, Eaves LJ. Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. Behav Genet 1997; 27:325-51.
13. Thomas DA, Swaminathan S, Beardsmore CS, McArdle EK, MacFadyen UM, Goodenough PC, et al. Comparison of peripheral chemoreceptor responses monozygotic and dizygotic twins infants. Am Rev Respir Dis 1993; 148:1605-9.
14. Tishler PV, Redline S, Ferrete V, Hans MG, Altose MD. The association of sudden unexpected infant death with obstructive sleep apnea. Am J Resp Crit Care Med 1996; 153:1857-63.
15. Yilmaz M, Bayazit YA, Ciftci TU, Erdal ME, Urhan M, Kokturk O, et al. Association of serotonin transporter gene polymorphism with obstructive sleep apnea syndrome. Laryngoscope 2005; 115:832-6.
16. Jeleu A, Sood S, Liu H, Nolan P, Horner RL. Microdialysis perfusion of 5-HT into hypoglossal motor nucleus differentially modulates genioglossus activity across natural sleep-wake states in rats. J Physiol 2001; 532:467-81.
17. Bayazit YA, Yilmaz M, Ciftci T, Erdal E, Kokturk O, Gokdogan T, et al. Association of the -1438G/A polymorphism of the 5-HT_{2A} receptor gene with obstructive sleep apnea syndrome. ORL 2006; 68:123-8.

18. Douse MA, White DP. Serotonergic effects on hypoglossal neural activity and reflex responses. *Brain Res* 1996; 726:213-22.
19. Bayliss DA, Viana F, Talley EM, Berger AJ. Neuromodulation of hypoglossal motoneurons: cellular and developmental mechanisms. *Respir Physiol* 1997; 110:139-50.
20. Barnes NM, Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 1999; 38:1083-1152.
21. Fenik P, Veasey SC. Pharmacological characterization of serotonergic receptor activity in the hypoglossal nucleus. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:563-69.
22. Okada M, Northup JK, Ozaki N, Russell JT, Linnoila M, Goldman D. Modification of human 5-HT(2C) receptor function by Cys23Ser, an abundant, naturally occurring amino- acid substitution. *Mol Psychiatry* 1998; 9:55-64.
23. Sher AE. Obstructive sleep apnea syndrome: A complex disorder of the upper airway. *Otolaryngol Clin North Am* 1990; 23(4):593-608
24. Flemons WW. Obstructive sleep apnea. *N Eng J Med* 2002;347:498–504.
25. Hartenbaum N, Collop N, Rosen IM, Phillips B, George CF, Rowley JA et al. American College of Chest Physicians American College of Occupational and Environmental Medicine; National Sleep Foundation Sleep apnea and commercial motor vehicle operators: Statement from the joint task force of the American College of Chest Physicians, the American College of Occupational and Environmental Medicine, and the National Sleep Foundation. *Chest* 2006;130:902–5.
26. Caples SM, Garcia-Touchard A, Somers VK. Sleep-disordered breathing and cardiovascular risk. *Sleep* 2007;30:291–303.
27. Quan SF, Wright R, Baldwin CM, Kaemingk KL, Goodwin JL, Kuo TF, et al.

Obstructive sleep apnea-hypopnea and neurocognitive functioning in the Sleep Heart Health Study. *Sleep Med* 2006;7:498–507.

28. Parish JM, Adam T, Facchiano L. Relationship of metabolic syndrome and obstructive sleep apnea. *J Clin Sleep Med*. 2007;3:467–72.

29. Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Weber S, Badr S. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N Engl J Med* 1993;328:1230–5.

30. Bixler EO, Vgontzas AN, Ten Have T, Tyson K, Kales A. Effects of age on sleep apnea in men: I prevalence and severity. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:144–8.

31. Bixler EO, Vgontzas AN, Lin HM, Ten Have T, Rein J, Vela-Bueno A, et al. Prevalence of sleep-disordered breathing in women: effects of gender. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:608–13.

32. Durán J, Esnaola S, Rubio R, Iztueta A. Obstructive sleep apnea-hypopnea and related clinical features in a population-based sample of subjects aged 30 to 70 Yr. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:685–9.

33. Ip MS, Lam B, Launder IJ, Tsang KW, Chung KF, Mok YW, et al. A community study of sleep-disordered breathing in middle-aged Chinese men in Hong Kong. *Chest* 2001;119:62–9.

34. Ip MS, Lam B, Tang LC, Launder IJ, Ip TY, Lam WK. A community study of sleep-disordered breathing in middle-aged Chinese women in Hong Kong: prevalence and gender differences. *Chest* 2004;125:127–34.

35. Kim J, In K, Kim J, You S, Kang K, Shim J, et al. Prevalence of sleep-disordered breathing in middle-aged Korean men and women. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:1108–13.

36. Bearpark H, Elliott L, Grunstein R, Cullen S, Schneider H, Althaus W, et al.

Snoring and sleep apnea. A population study in Australian men. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:1459–65.

37. Udwadia ZF, Doshi AV, Lonkar SG, Singh CI. Prevalence of sleep-disordered breathing and sleep apnea in middle-aged urban Indian men. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:168–73.

38. Tufik S, Santos-Silva R, Taddei JA, Bittencourt LRA. Obstructive Sleep Apnea Syndrome in the Sao Paulo Epidemiologic Sleep Study. *Sleep Medicine* 2010;11: 441–46.

39. Ryan MC, Bradley TD. Physiology and Pathophysiology of Sleep Apnea. *J Appl Physiol* 2005; 99:2440-2450.

40. Ferini-Strambi LJ, Smirne S, Moz U, Sferrazza B, Iannaccone S. Muscle fibre type and obstructive sleep apnea. *Sleep Res Online*. 1998;1:24-7.

41. Lindman R, Stal PS. Abnormal palatopharyngeal muscle morphology in sleep-disordered breathing. *J Neurolog Sci* 2002; 195:11-23.

42. Woodson BT, Garancis JC, Toohil RJ. Histopathologic changes in snoring and obstructive sleep apnea syndrome. *Laryngoscope* 1991; 102:1318-1322.

43. Hamans EPPM, Van Marck EA, De Backer WA, Creten W, Van de Heyning PH. Morphometric analysis of the uvula in patients with sleep – related breathing disorders. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2000; 257:232-236.

44. Berger G, Gilbey P, Hammel I, Ophir D. Histopathology of the Uvula and the Soft Palate in Patients With Mild, Moderate and severe Obstructive sleep apnea. *Laryngoscope* 2002; 112:357-363.

45. Jean-Louis G, Zizi F, Clark LT, Brown CD, McFarlane SI. Obstructive sleep apnea and cardiovascular disease: role of the metabolic syndrome and its components. *J Clin Sleep Med.* 2008;4: 261–272.
46. Eckert DJ, Malhotra A. Pathophysiology of adult obstructive sleep apnea. *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5: 144 –153.
47. Susarla RM, Thomas RJ, Abramson ZR, Kaban LB. Biomechanics of the upper airway: Changing concepts in the pathogenesis of obstructive sleep apnea *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2010; 39: 1149–1159.
48. Sakai K, Takada T, Nakayama H, Kubota Y, Nakamata M, Satoh M, et al. Serotonin-2A and 2C receptor gene polymorphisms in Japanese patients with obstructive sleep apnea. *Intern Med.* 2005;44:928-33.
49. Mannarino MR, Di Filippo F, Pirro M. Obstructive sleep apnea syndrome. *Eur J Intern Med.* 2012; 23: 586–593.
50. Waite PD, Wooten V, Lachner J. et al maxilomandibular advancement surgery in 23 patients with sleep apnea syndrome. *J. Oral maxillo Surg.* 1989; 47: 1256- 61
51. Friedman M, Tanyeri H, La Rosa M, Landsberg R, Vaidyanathan K, Pieri S, Caldarelli D. Clinical Predictors of obstructive sleep apnea. *Laryngoscope.* 1999; 109 1901-1907.
52. Ross SD, Sheinait MA, Harrison KI, Kvasz M, Connelly JE, Shea AS, et al. Systematic Review and Meta-analysis of the literature Regarding the Diagnosis of Sleep Apnea. *Sleep* 2000;23:1-14.
53. Andreas S, von Breska B, Magnusson K, Kreuzer H. Validation of automated sleep stage and apnoea analysis in suspected obstructive sleep apnea. *Eur Respir J* 1993;6:48-52.

54. Ross SD, Sheinhait IA, Harrison KJ, Kvasz M, Connelly JE, Shea SA, et al. Systematic review and meta-analysis of the literature regarding the diagnosis of sleep apnea. *Sleep* 2000;23:519-32.
55. Collop NA, Anderson WM, Boehlecke B, Claman D, Goldberg R, Gottlieb DJ, et al. Clinical guidelines for the use of unattended portable monitors in the diagnosis of obstructive. *Sleep* 2007;3:737-47.
56. American Academy of Sleep Medicine. International classification of sleep disorders. Diagnostic and coding manual (ICSD-3). 3rd ed. Westchester, IL, 2014
57. American Academy of Sleep Medicine Task Force. Sleep-related breathing disorders in adults: Recommendations for syndrome definition and measurement techniques in clinical research. The Report of an American Academy of Sleep Medicine Task Force. *Sleep*. 1999;22:667–89.
58. Neau JP, Paquereau J, Meurice JC, Chavagnat JJ, Gil R. Stroke and Sleep Apnoea: cause or consequence. *Sleep Med Rev* 2002; 6:457-469.
59. Mohsenin V. Is sleep apnea a risk factor for stroke? A critical analysis. *Minerva Med* 2004; 95:281-90.
60. Chung KF, Chang KN, Lam SP, Lee K. Previously unrecognised obstructive sleep apnea in chinese subjects with essential hypertension. *Thorax* 1999;177:391-400.
61. Peppard PE, Youngt, Palat M, Skatrut J. Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N Eng J Med* 2000; 342:1378-1384.
62. Lavie P, Here P, Hoffstein V. Obstrutive sleep apnoea as a risk factor for hipertension: population study. *Br Med J* 2000; 320:479-482.

63. Tryfon S, Stanopoulos I, Dascalopoulou E, Mavrofridis E. Sleep apnea syndrome and diastolic pressure elevation during exercise. *Respiration* 2004; 71:499-504.
64. Samet JM, Nieto FJ, Punjabi NM. Sleep-disordered breathing and hypertension; more research is still needed. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1409-1411.
65. Dimsdale JE, Loreda JS, Profant J. Effects of continuous positive airway pressure on blood pressure: a placebo trial. *Hypertension* 2000; 35:144-147.
66. Guilleminault C, Connolly SJ, Winckle RA. Cardiac arrhythmia and conduction disturbances during sleep in 400 patients with sleep apnea syndrome. *Am J Cardiol* 1983; 52:490-494.
67. Harbison J, O'Reilly P, Mc Nicholas WT. Cardiac rhythm disturbances in the obstructive sleep apnea syndrome: effects of nasal continuous positive airway pressure therapy. *Chest* 2000; 118:591-595.
68. Kanel V, Dimsdale JE. Hemostatic alteration in patients with obstructive sleep apnea and the implications for the cardiovascular disease. *Chest* 2003; 124:1956-1967.
69. Roman GC, Erkinjuntti T, Wallin A, Pantoni L, Chui HC. Subcortical ischaemic vascular dementia. *Lancet Neurol* 2002; 1:426-436.
70. Ferini SL, Baietto C, Di Gioia MR, Castaldi P, Castronovo C, Zucconi M, Cappa SF. Cognitive dysfunction in patients with obstructive sleep apnea syndrome (OSA): partial reversibility after continuous positive airway positive pressure (CPAP). *Brain Res Bull* 2003;61:87-92.
71. Montovani CJ, Weber ST. Doença do sono associada a acidentes de veículos automotores: revisão das leis e regulamentação para motoristas. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2002; 68:412-415.

72. Sociedade Brasileira de Sono. Apnéia obstrutiva do sono. Disponível em <http://www.sbsono.com.br/index.php?source=noticias/infosono/apneia.php> Acessado em 12/12/2007.
73. Tregear S, Reston J, Schoelles K, Phillips B. Continuous positive airway pressure reduces risk of motor vehicle crash among drivers with obstructive sleep apnea: systematic review and meta-analysis. *Sleep* 2010;33:1373-80.
74. Sociedade Brasileira de Sono. I Consenso Brasileiro em Ronco e Apnéia do Sono. *Hypnos* 2001; 2:1-47.
75. Maniglia AJ. Sleep Apnea. In: Lee KJ, editor. *Essentials Otolaryngology and Head and Neck Surgery*. 7^a ed. New York: Thieme; 2000. p. 825-838.
76. Pang KP, Siow JK, Tseng P. Safety of multilevel surgery in obstructive sleep apnea: a review of 487 cases. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2012; 138:353-7.
77. Li H, Wang PC, Chen YP, Lee LA, Fang TJ, Lin HC. Critical appraisal and meta-analysis of nasal surgery for obstructive sleep apnea. *Am J Rhinol Allergy*. 2011; 25:45-9.
78. Morinaga M, Nakata S, Yasuma F, Noda A, Yagi H, Tagaya M, Sugiura M, Teranishi M, Nakashima T. Pharyngeal morphology: a determinant of successful nasal surgery for sleep apnea. *Laryngoscope* 2009;119:1011-6.
79. Woodson BT, Feroah T, Connolly LA, Toohill RJ. A method to evaluate upper airway mechanics following intervention in snorers. *Am J Otolaryngol* 1997;18:306-14.
80. Li HY, Lin Y, Chen NH, Lee LA, Fang TJ, Wang PC. Improvement in quality of life after nasal surgery alone for patients with obstructive sleep apnea and nasal obstruction. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2008;134:429-433.

81. Carrasco-Llatas M, Marcano-Acuña M, Zerpa-Zerpa V, Dalmau-Galofre J, Surgical results of different palate techniques to treat oropharyngeal collapse. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2015;272:2535-2540.
82. Franklin KA, Anttila H, Axelsson S, Gislason T, Maasilta P, Myhre KI, et al. Effects and side-effects of surgery for snoring and obstructive sleep apnea: a systematic review. *Sleep* 2009;32:27-36.
83. Back LJ, Liukko T, Rantanen I, Peltola JS, Partinen M, Ylikoski J, et al. Radiofrequency surgery of the soft palate in the treatment of mild obstructive sleep apnea is not as effective as a single-stage procedure: A randomized single-blinded placebo-controlled Trial. *Laryngoscope* 2009;119:1621-7.
84. Main C, Liu Z, Welch K, Weiner G, Jones SQ, Stein K. Surgical procedures and non-surgical devices for the management of non-apnoeic snoring: a systematic review of clinical effects and associated treatment costs. *Health Technol Assess* 2009;13:1-208.
85. Aurora RN, Casey KR, Kristo D, Auerbach S, Bista SR, Chowdhuri S, et al. American Academy of Sleep Medicine. Practice parameters for the surgical modifications of the upper airway for obstructive sleep apnea in adults. *Sleep*. 2010;33:1408-13.
86. Holty JE, Guilleminault C. Maxillomandibular advancement for the treatment of obstructive sleep apnea: a systematic review and meta-analysis. *Sleep Med Rev* 2010;14:287-97.
87. Kezirian EJ, Goldberg AN. Hypopharyngeal surgery in obstructive sleep apnea: an evidence-based medicine review. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;132:206-13.

88. American Academy of Sleep Medicine. International classification of sleep disorders. Diagnostic and coding manual (ICSD-2). 2nd ed. Westchester, IL, 2005
89. Rodriguez S, Gaunt TR, Day INM. Hardy-Weinberg Equilibrium Testing of Biological Ascertainment for Mendelian Randomization Studies. *Am J Epidemiol* 2009;169:505-14.
90. Strom TM, Wienker TF. Tests for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. 2014; <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>.
91. Ayub Q, Tyler-Smith C. Genetic variation in South Asia: assessing the influences of geography, language and ethnicity for understanding history and disease risk. *Brief Funct Genomic* 2009;8:395-404.
92. Larkin EK, Patel SR, Goodloe RJ, Li Y, Zhu X, Gray-McGuire C, Adams MD, Redline S. A candidate gene study of obstructive sleep apnea in European Americans and African Americans. *Am J Respir Critic Care Med* 2010;182:947-953.