

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Ciências**  
**ULisboa**

**Validação de Potenciais Biomarcadores Proteómicos na  
Síndrome da Apneia Obstrutiva do Sono**

**Mestrado em Biologia Humana e Ambiente**

Cristina Valentim Coelho

Dissertação orientada por:  
Doutora Deborah Penque  
Doutora Maria Teresa Rebelo

2015

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Validação de Potenciais Biomarcadores Proteómicos na  
Síndrome da Apneia Obstrutiva do Sono**

**Mestrado em Biologia Humana e Ambiente**

Cristina Valentim Coelho

Dissertação orientada por:  
Doutora Deborah Penque  
Doutora Maria Teresa Rebelo

2015

*As referências desta dissertação cumprem os critérios da Revista Sleep Medicine.*

## **AGRADECIMENTOS**

As minhas primeiras palavras de agradecimento vão para os meus pais. Possivelmente não teria conseguido sem o amor, carinho, dedicação e todo o apoio que sempre me concederam ao longo dos anos. Um enorme obrigado pela força que me deram até ao final, por acreditarem em mim e me proporcionarem um futuro.

Um agradecimento especial à minha orientadora, Doutora Deborah Penque, por me receber no seu grupo e no Laboratório de Proteómica. Por ter concedido os seus conhecimentos e pela forma como me orientou, mostrando a sua confiança nas minhas capacidades e apoiando em todos os aspectos na realização deste trabalho.

Agradeço em especial à Doutora Fátima Vaz, pela sua prontidão e paciência em orientar-me neste trabalho, pela sua forma entusiasta e jovial com que sempre se disponibilizou em ajudar, transmitindo conhecimentos científicos e sugerindo novas ideias. Obrigada por todos os momentos risonhos.

De igual modo, agradeço à minha orientadora, Professora Doutora M<sup>a</sup> Teresa Rebelo pela orientação e pelos ensinamentos ao longo do mestrado. A toda a sua disponibilidade em qualquer momento, pelo seu incentivo e apoio.

À minha amiga Rita Silva, pela amizade, carinho, apoio, paciência e boa disposição. Obrigada pela ajuda incondicional neste trabalho, e por todos os momentos divertidos que passamos no laboratório.

À Doutora Vukosava Torres por todo o apoio e ensinamentos que transmitiu, foram essenciais para a realização deste trabalho. Obrigada por me ter incutido mais garra, dedicação e um forte sentido de responsabilidade na vida científica.

À Doutora Solange Pacheco, pelo apoio e simpatia prestado ao longo deste ano.

À minha família e amigos pelo carinho, apoio e incentivo demonstrado em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, muito comuns para quem tenta alcançar novos caminhos.

# ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	I
ABREVIATURAS .....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS .....	VI
ÍNDICE DE TABELAS .....	VIII
ÍNDICE DE EQUAÇÕES.....	IX
RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	XII
<b>I. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>- 1 -</b>
1. Síndrome da Apneia Obstrutiva do Sono.....	- 2 -
1.1. Contexto histórico.....	- 2 -
1.2. Definição .....	- 2 -
1.3. Epidemiologia.....	- 3 -
1.4. Factores de Risco.....	- 4 -
1.5. Diagnóstico.....	- 6 -
1.6. Manifestações Clínicas .....	- 7 -
1.7. Repercussões da SAOS .....	- 9 -
1.8. Tratamento.....	- 9 -
1.9. SAOS e o Stresse Oxidativo .....	- 11 -
2. Estudo em Glóbulos Vermelhos (GVs) .....	- 12 -
2.1. Potenciais Biomarcadores.....	- 13 -
2.1.2. Catalase (CAT) .....	- 13 -
2.1.3. Peroxiredoxina 2 (Prx 2).....	- 14 -
<b>II. OBJECTIVOS .....</b>	<b>- 19 -</b>
<b>III. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>- 21 -</b>
1. Pacientes & Amostras .....	- 22 -
2. Fase de Descoberta .....	- 22 -
2.1. Análise pelo <i>Software SameSpots</i> .....	- 23 -
2.2. Identificação das Proteínas .....	- 23 -
2.3. <i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i> (DAVID).....	- 23 -
3. Fase de Validação .....	- 24 -
3.1. Determinação da Actividade Enzimática da Catalase (CAT) .....	- 24 -
3.2. <i>Western Blotting</i> .....	- 25 -
3.2.1. Preparação da Amostra.....	- 25 -
3.2.2. Quantificação da Proteína Total.....	- 26 -
3.2.3. Electroforese Unidimensional (1DE) SDS-PAGE .....	- 26 -

3.2.4. Corrida Electroforética .....	- 26 -
3.2.5. Transferência.....	- 27 -
3.2.6. Bloqueio da Membrana.....	- 28 -
3.2.7. Incubação da Membrana com o Anticorpo Primário.....	- 28 -
3.2.8. Incubação da membrana com o anticorpo secundário.....	- 28 -
3.2.9. Revelação .....	- 29 -
3.2.10. Quantificação das bandas de proteínas .....	- 29 -
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>- 31 -</b>
1. Identificação das proteínas presentes nos GVs de indivíduos com/sem SAOS .....	- 32 -
1.1. Análise de mapas 2D-DIGE pelo <i>Software SameSpots</i> .....	- 32 -
1.2. Identificação das proteínas diferencialmente expressas .....	- 33 -
1.3. Anotação e classificação das proteínas identificadas com expressão diferencial .....	- 33 -
2. Validação da Catalase e da Peroxiredoxina 2.....	- 35 -
2.1. Catalase (CAT) .....	- 36 -
2.2. Peroxiredoxina 2 (Prx2).....	- 38 -
<b>V. DISCUSSÃO .....</b>	<b>- 42 -</b>
<b>VI. CONCLUSÃO .....</b>	<b>- 46 -</b>
<b>VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>- 48 -</b>
<b>VIII. ANEXOS .....</b>	<b>- 55 -</b>

## ABREVIATURAS

<b>ΔAbsorvância</b>	Variância da Absorvância
<b>CAT</b>	Catalase
<b>c.d.o</b>	Comprimento de Onda
<b>CHCM</b>	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
<b>CPAP</b>	<i>Continuous Positive Airway Pressure</i>
<b>Cpr</b>	Concentração de Proteína
<b>1DE</b>	Electroforese Unidimensional
<b>2D-DIGE</b>	Electroforese Bidimensional Diferencial
<b>2DE</b>	Electroforese Bidimensional
<b>DAVID</b>	<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>
<b>DGH-INSARJ</b>	Departamento de Genética Humana do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
<b>DVE</b>	Distribuição do Volume dos Eritrócitos
<b>EPW</b>	Escala de Sonolência de <i>Epworth</i>
<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>HCM</b>	Hemoglobina Corpuscular Média
<b>HMW</b>	<i>Higher Molecular Weight</i>
<b>IAH</b>	Índice Apneia-Hipopneia
<b>IDO</b>	Índice de Dessaturação de Oxigénio
<b>IDR</b>	Índice de Distúrbio Respiratório
<b>IMC</b>	Índice de Massa Corporal
<b>INSARJ</b>	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
<b>KDa</b>	<i>KiloDalton</i>
<b>LMW</b>	<i>Lower Molecular Weight</i>
<b>MRHO-RI</b>	Modelo de Resistência Homeostático – Resistência à Insulina
<b>NA</b>	Não Aplicável
<b>NS</b>	Sem Significado Estatístico
<b>Prx2</b>	Peroxiredoxina 2

<b>PrxSO<sub>2/3</sub></b>	Peroxiredoxina 2 Hiperoxidada
<b>PTMs</b>	Modificações Pós – Traducionais
<b>SAOS</b>	Síndrome da Apneia Obstrutiva do Sono
<b>T90</b>	Percentagem de tempo durante o qual a saturação arterial de O <sub>2</sub> foi menos de 90%
<b>TAD</b>	Tensão Arterial Diastólica
<b>TAS</b>	Tensão Arterial Sistólica
<b>Vamostra</b>	Volume da Amostra
<b>VAS</b>	Vias Aéreas Superiores
<b>VCM</b>	Volume Corpuscular Médio
<b>Vrmáx</b>	Volume da Reacção Máximo

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo catalítico da peroxiredoxina. Formação de dímeros oxidados (Dissulfito e Sulfénico) e hiperoxidados (Sulfínico e Sulfónico) .....	- 16 -
<b>Figura 2.</b> Processo de oligomerização da peroxiredoxina em relação ao estado <i>redox</i> activo, sinalização celular e função <i>chaperone</i> .....	- 16 -
<b>Figura 3.</b> Estrutura da peroxiredoxina nos diferentes estados: reduzido, oxidado e hiperoxidado .....	- 17 -
<b>Figura 4.</b> Esquema da avaliação do estado <i>redox</i> na proteína Prx sob acção do alquilante, NEM. Visualização dos quatro estados <i>redox</i> da Prx, nos GVs, por separação SDS-PAGE em condições não reduzidas .....	- 18 -
<b>Figura 5.</b> Esquema de montagem efectuado para a transferência no <i>western blotting</i> .....	- 27 -
<b>Figura 6.</b> Gel 2D-DIGE com os 76 <i>spots</i> diferencialmente expressos analisados pelo <i>SameSpots v4.5</i> .....	- 32 -
<b>Figura 7.</b> Principais características das proteínas identificadas e com expressão diferencial, pela Componente Celular a partir da análise DAVID .....	- 34 -
<b>Figura 8.</b> Principais características das proteínas identificadas e com expressão diferencial, pela Função Molecular a partir da análise DAVID. ....	- 34 -
<b>Figura 9.</b> Principais características das proteínas identificadas e com expressão diferencial, pelo Processo Biológico a partir da análise DAVID .....	- 34 -
<b>Figura 10.</b> Gel 2D-DIGE com os <i>spots</i> assinalados das proteínas diferencialmente expressas, catalase e peroxiredoxina 2 .....	- 35 -
<b>Figura 11.</b> Representação gráfica da actividade enzimática da CAT nas amostras recolhidas “Noite” e “Manhã” em indivíduos Roncadores, com SAOS e CPAP (pools em duplicado).....	- 36 -
<b>Figura 12.</b> Validação da proteína CAT por WB. Esta figura mostra a reacção do anticorpo específico para a catalase, na fracção citosólica GVs (70 µg) de cada indivíduo (R: roncador, S: SAOS e S-CPAP: SAOS-CPAP; N: noite e M: manhã) .....	- 37 -
<b>Figura 13.</b> Representação gráfica da abundância relativa da CAT nas amostras recolhidas “Noite” e “Manhã” em Roncadores, SAOS e CPAP (n=50), normalizada pela Hb, através da análise pelo Image J.....	- 37 -
<b>Figura 14.</b> Validação por WB da proteína Prx2, da fracção citosólica GVs (70 µg) de cada indivíduo (R: roncador, S: SAOS e S-CPAP: SAOS-CPAP; N: noite e M: manhã). Observam-se as formas monoméricas e diméricas da Prx2 .....	- 38 -
<b>Figura 15.</b> Representação gráfica da abundância relativa da Prx2 monomérica nas diferentes amostras “Noite” e “Manhã” de Roncadores, SAOS e SAOS-CPAP (n=50) .....	- 39 -

<b>Figura 16.</b> Representação gráfica da abundância relativa da Prx2 dimérica nas formas hiperoxidada e oxidada, nos diferentes grupos em estudo.....	- 39 -
<b>Figura 17.</b> Validação por WB da proteína PrxSO <sub>2/3</sub> (hiperoxidada), na fracção citosólica GV <sub>s</sub> (70 µg) de cada indivíduo (R: roncadador, S: SAOS e S-CPAP: SAOS-CPAP; N: noite e M: manhã). Observam-se as formas monoméricas, diméricas e multiméricas da PrxSO <sub>2/3</sub> .....	- 40 -
<b>Figura 18.</b> Representação gráfica da abundância relativa da PrxSO <sub>2/3</sub> (hiperoxidada) para as formas monoméricas, diméricas e multiméricas nas diferentes amostras de Roncadores, SAOS e SAOS-CPAP (n=50).....	- 41 -
<b>Figura 19.</b> Representação gráfica da abundância relativa da PrxSO <sub>2/3</sub> (hiperoxidada) com a junção das formas monoméricas e diméricas nos diferentes grupos de estudo.....	- 41 -

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Sintomatologia da SAOS .....	- 8 -
<b>Tabela 2.</b> Gravidade dos eventos respiratórios da SAOS .....	- 8 -
<b>Tabela 3.</b> Complicações da SAOS .....	- 9 -
<b>Tabela 4.</b> Diluição dos anticorpos primários e secundários utilizados neste estudo.....	- 29 -
<b>Tabela 5.</b> Proteínas identificadas com expressão diferencial, na fracção citosólica dos GVs depletados da Hb nos indivíduos Roncadores e com SAOS, em amostras “Noite” e “Manhã” .....	- 33 -

## ÍNDICE DE EQUAÇÕES

**Equação 1.** Equação utilizada para calcular a actividade catalítica, definida em  $\text{nmolCT}^{-1}\text{min}^{-1}\text{mg}$  de proteína ..... - 25 -

## RESUMO

A Síndrome da Apneia Obstrutiva do Sono (SAOS) é um distúrbio respiratório muito prevalente na população em geral, com graves repercussões na saúde e na qualidade de vida dos doentes. A Proteómica tem vindo a ser aplicada no estudo da SAOS na pesquisa de novos biomarcadores de diagnóstico, prognóstico, monitorização e/ou alvo terapêutico para esta doença. Estudos preliminares realizados no Laboratório de Proteómica do INSARJ revelaram a existência de proteínas diferencialmente moduladas em glóbulos vermelhos (GVs) de doentes com SAOS comparados com roncadores simples. Algumas destas proteínas, como a catalase (CAT) e a peroxiredoxina 2 (Prx2), estão envolvidas em processos antioxidantes, e este mecanismo parece estar significativamente comprometido nos doentes com SAOS.

O principal objectivo deste trabalho foi a validação da CAT e da Prx2 por técnicas ortogonais à Proteómica, como o *western blotting* (WB) e/ou por estudos de cinética enzimática em amostras de GVs de doentes com SAOS, antes e após seis meses de tratamento CPAP (*Continuous Positive Airway Pressure*), e em indivíduos roncadores simples como controlos. Dois tipos de amostras de GVs foram avaliadas por doente, amostra recolhida no final da tarde antes do exame de polissonografia – PSG (denominadas de “Noite”) e amostra recolhida na manhã seguinte ao exame (denominadas de “Manhã”). Após tratamento CPAP, apenas as amostras de GVs “Manhã” foram preparadas e, portanto, consideradas no estudo.

O estudo da CAT, por cinética enzimática, revelou que a actividade da CAT é significativamente menor nos GVs “Manhã” em comparação com as amostras “Noite”, sejam de doentes SAOS ou de controlos (*Anova*  $p < 0,05$ ). Contudo, esta diminuição da actividade da CAT durante a manhã em relação à noite estava significativamente (*T Student*,  $p < 0,05$ ) mais acentuada nos doentes com SAOS do que nos controlos. Após seis meses de tratamento com CPAP, observou-se um aumento muito significativo da actividade da CAT nos GVs “Manhã”. Surpreendentemente, constatou-se por WB, não haver diferenças quantitativas e significativas dos níveis de expressão da CAT entre os grupos de doentes/condições analisados, e tão pouco havia, nos doentes SAOS, antes e após o tratamento CPAP. Estes resultados sugerem que a modulação da actividade da CAT nos GVs está essencialmente associada a modificações pós-traducionais da

proteína, o que corrobora com os resultados obtidos pela Proteómica, que identificou oito proteoformas para a CAT nestas células.

A avaliação do estado *redox*/oligomérico da Prx2 nos GVs por WB em SDS-PAGE não reduzido, utilizando anticorpos específicos para a Prx2 e para formas hiperoxidadas da Prx (PrxSO<sub>2/3</sub>), revelou que as formas monoméricas e diméricas da Prx2 estavam significativamente hiperoxidadas nos GVs “Manhã” ou “Noite” de doentes com SAOS. O tratamento CPAP diminui esta hiperoxidação nos monómeros e dímeros da Prx2. Contudo, as formas multiméricas da Prx2 hiperoxidadas, descritas com actividade *chaperone*/transdução de sinal associadas à protecção celular, surgiram quase que exclusivamente nos doentes SAOS após CPAP.

A forma dissulfídica oxidada/hiperoxidada da Prx2 está associada a inativação da sua actividade peroxidática, e por conseguinte, a estado de stresse oxidativo. A conversão entre as diferentes funções da Prx2, ou seja, entre a actividade peroxidática antioxidante e a actividade *chaperone*/transdução de sinal, é regulada pelo seu estado *redox*/oligomérico na célula.

Em resumo, os resultados deste trabalho validaram os resultados anteriormente obtidos por Proteómica, indicando nos GVs de doentes com SAOS, existência de desregulação no seu sistema *redox*-homeostase envolvendo a CAT e a Prx2. Este trabalho propõe ainda, a CAT e a Prx2, como fortes candidatos a biomarcadores de gravidade e/ou de monitorização do tratamento CPAP. Contudo, serão necessários mais estudos para consolidar este resultados e contribuir para uma melhor compreensão acerca do diagnóstico, monitorização e tratamento para a SAOS.

**Palavras-chave:** Síndrome da Apneia Obstrutiva do Sono (SAOS); CPAP (*Continuous Positive Airway Pressure*); Proteómica; Biomarcadores, Catalase; Peroxiredoxina 2.

## **ABSTRACT**

The Obstructive Sleep Apnea (OSA) is a breathing disorder very prevalent in the general population, with serious effects on health and quality of life of the patients. The Proteomics has been applied to the study of the OSA, in order to identify new biomarkers of diagnosis, prognosis, monitoring and/or as therapeutic target for this disease. Preliminary studies at Proteomics Laboratory of INSARJ revealed the existence of proteins differentially modulated in red blood cells (RBCs) of OSA patients compared with simple snorers (controls). Some of these proteins such as catalase (CAT) and peroxiredoxin 2 (Prx2), are involved in antioxidants processes, which seem to be significantly compromised in OSA patients.

The main objective of this work was the validation of these proteins by orthogonal technologies to Proteomics, such as western blotting (WB) and/or kinetic enzyme assay on RBCs samples from OSA patients, before and after six months of treatment CPAP (Continuous Positive Airway Pressure), and from simple snorers as controls. Two types of RBCs samples were evaluated per patient, sample taken late in the afternoon and before polysomnography (PSG) (denominated here "Night") and sample collected in the morning after the examination ("Morning"). After CPAP treatment, only "Morning" RBC samples were prepared and therefore considered in this study.

The kinetic enzyme assay showed that CAT activity is significantly higher in RBC "Morning" compared to the "Night" samples, whatever were OSA or control (Anova  $p < 0.05$ ). However, this decrease in "Morning" CAT activity compared to "Night" was even greater in OSA RBC samples than in controls ones (Student's T  $p < 0.05$ ). After six months of CPAP treatment, there was a very significant increase in CAT activity in this "Morning" RBC OSA samples. Surprisingly, no significant differences were observed in the CAT expression level among the patient's group/condition analysed. These results suggest that the modulation of CAT activity in RBCs is mainly associated with post-translational modifications, which supports the previous proteomics data identifying eight proteoforms for CAT in these cells.

The evaluation of redox/oligomeric study of the Prx2 in RBCs by WB in SDS-PAGE, non-reduced, using antibodies specific for Prx2 and hyperoxidized forms of Prx (PrxSO<sub>2/3</sub>) demonstrated that the monomeric and dimeric form of Prx2 were significantly hyperoxidized in "Morning" or "Night" OSA RBCs. The CPAP treatment reduced this

hyperoxidation observed on monomers and dimers of Prx2. However, hyperoxidized multimeric forms of Prx2, described with chaperone activity, appeared almost exclusively in OSA patients after CPAP.

The disulfide oxidized/hyperoxidized forms of Prx2 are associated with the inactivation of its peroxidatic activity and therefore with the state of stress-oxidative. The conversion between the different functions of Prx2, i.e. between antioxidant peroxidatic activity and chaperone activity or transduction signaling, is regulated by its redox/oligomeric state in the cell.

In summary, the results of this study validated the results previously obtained by proteomics, indicating that in OSA RBCs the redox- homeostasis system involving the CAT and Prx2 is dysregulated. This work also proposes CAT and Prx2 as a promising candidates biomarkers of severity and/or to monitor CPAP treatment. However, more studies will be needed to consolidate this results and contribute to a better understanding of OSA diagnosis and therapy monitoring.

**Keywords:** Obstructive Apnea Syndrome (OSA); CPAP (Continuous Positive Airway Pressure); Proteomics; Biomarkers; Catalase; Peroxiredoxin 2.

# **I. INTRODUÇÃO**

## Introdução

### 1. Síndrome da Apneia Obstrutiva do Sono

#### 1.1. Contexto histórico

O termo *apneia* provém do grego e significa negação de respiração. Em 1837, no livro de Charles Dickens, "*The posthumous paper of the Pickwick Club*", está presente a primeira descrição que se conhece do quadro clínico típico da Síndrome da Apneia Obstrutiva do Sono (SAOS). Neste livro uma das suas personagens, Joe, era descrita do seguinte modo:

*"E no caixote de madeira sentava-se um rapaz gordo, num estado de sonolência... o rapaz gordo e rosado abriu os seus olhos, engoliu uma enorme fatia de tarte e ainda estava no acto de mastigar quando adormeceu... Joe, bolas para o rapaz que adormeceu outra vez"* (Kryger, 2012).

No ano 1956, um grupo de médicos pneumologistas americanos começaram a notar que os doentes extremamente obesos estavam muito sonolentos durante o dia. A partir desta situação chamaram a *Síndrome de Pickwick*, porque os seus doentes faziam recordar a personagem, Joe, do livro de Dickens.

Em 1965, dois grupos de investigação na Europa, relataram que os doentes com síndrome de *Pickwick*, periodicamente, suspendiam a respiração durante o sono, e notaram que essa seria a razão plausível para excessiva sonolência durante o dia. Durante os anos 70 a síndrome de *Pickwick* admitiu um novo nome, passando a ser Síndrome da Apneia Obstrutiva do Sono (SAOS) (Martinho, 2010).

#### 1.2. Definição

A SAOS é definida como um distúrbio respiratório do sono caracterizado por paragens respiratórias (apneias), ou seja, é a ocorrência periódica do fecho parcial (hipopneia) ou completo (apneia) da via aérea superior, que ocorre durante o sono (Lopes, 2012 e Feliciano *et al.*, 2015). A interrupção do fluxo oro-nasal pode suceder por um período igual ou superior a 10 segundos. A ausência de fluxo aéreo deve-se à oclusão total da

faringe durante o sono, apesar do impulso respiratório contínuo que mantém os movimentos respiratórios torácico-abdominal. (Carvalho, 2008).

Estes episódios respiratórios obstrutivos resultam da interrupção do sono com despertares frequentes (fragmentação do sono), perda de sono por REM - *Rapid Eye Movement*; períodos de hipoxia transitórios mas repetidos, habitualmente traduzidos por quedas da saturação de oxigénio com uma rápida reoxigenação causando uma desoxigenação/reoxigenação cíclica, e também devido a repetidas alterações na pressão intratorácica com episódios de hipercapnia (Lopes, 2012 e Feliciano *et al.*, 2015).

### **1.3. Epidemiologia**

Actualmente, a SAOS é considerada uma doença crónica e um problema de saúde pública, com uma prevalência cada vez maior (WHO, 2007). Esta patologia é potencialmente tratável e, em virtude de suas consequências, vem adquirindo uma crescente atenção da comunidade médica. A SAOS é um distúrbio do sono altamente prevalente na população ocidental afectando 2-26% da população em geral, mas a maioria ainda é subdiagnosticada (Pereira *et al.*, 2013).

Na análise por género os estudos demonstram maior frequência de SAOS nos homens do que nas mulheres. Vários estudos revelam que 9% da população feminina e 24% da população masculina apresentam a doença (Silva *et al.*, 2009 e Gottlieb *et al.*, 2010).

A SAOS pode ocorrer em qualquer grupo etário, no entanto, estudos revelam que as mulheres apresentam maior incidência na faixa etária acima dos 65 anos, aumentando a prevalência após a menopausa, enquanto nos homens ocorre entre os 45 e os 64 anos de idade (Carvalho, 2008 e Silva *et al.*, 2009).

A prevalência de SAOS é diferente entre os diversos grupos étnicos. Um estudo demonstrou que os jovens afro-americanos apresentam maior probabilidade de possuir SAOS quando comparados com caucasianos (Silva *et al.*, 2009).

Em Portugal, Joana Teixeira, no âmbito da sua tese de mestrado em Saúde Pública, estimou uma prevalência para a SAOS de 2,2 a 7,9%, estando estes resultados consistentes com os apresentados na literatura internacional (Teixeira, 2007 in Martinho, 2010).

## **1.4. Factores de Risco**

Os factores de risco descritos como responsáveis pelo aparecimento de SAOS, correspondem a género; idade (entre 40 a 60 anos); obesidade; alterações craniofaciais; factores genéticos e a presença de hábitos alcoólicos e tabágicos (Punjabi, 2008).

### **○ Género**

Como foi referido anteriormente, os homens têm uma maior probabilidade de desenvolver a doença do que as mulheres (Punjabi, 2008). Esta disparidade de prevalência entre géneros pode resultar de diferenças anatómicas, como a relação perímetro da cintura/perímetro da anca tende a ser superior nos homens, o que é indicativo de obesidade central, muito associada à SAOS (Eckert e Malhotra, 2008). Além disso, também existem diferenças evidentes na forma das VAS (vias aéreas superiores), na actividade do músculo genioglossos durante o estado de vigília, na morfologia craniofacial, tendo sido propostos como factores de risco mais elevado nos homens (Young *et al.*, 2002).

As diferenças hormonais entre homens e mulheres podem ser determinantes para explicar a elevada prevalência em homens e a propensão para as mulheres na fase de menopausa desenvolverem SAOS (Punjabi, 2008).

### **○ Idade**

Com o avançar da idade, as dificuldades relacionadas com o sono tornam-se mais frequentes e muitas vezes manifestam-se através de queixas subjectivas, como a dificuldade em adormecer, o aumento do número e a duração de despertares durante a noite, e a quantidade de sono adquirido. Além disso, estudos epidemiológicos revelam uma elevada prevalência da SAOS em indivíduos mais idosos. São necessários mais estudos epidemiológicos que relacionem a morbilidade e mortalidade com a SAOS em indivíduos de idade mais avançada (Punjabi, 2008).

### **○ Obesidade**

A obesidade é um factor de risco de alta prevalência na população em geral, e por isso apresenta um papel importante no desenvolvimento da SAOS. O excesso de peso está presente em mais de 60% dos pacientes com IMC maior ou igual a 25 Kg/m<sup>2</sup> (Punjabi, 2008).

Alguns investigadores demonstraram que existe uma correlação entre a circunferência abdominal e a circunferência do pescoço, apoiando a ideia de que a apneia está estreitamente relacionada com a obesidade central (Ip *et al.*, 2000).

A circunferência do pescoço é um factor predisponente para a SAOS (Martins *et al.*, 2007). Presume-se que a elevada deposição de gordura ou de tecido mole na região do pescoço, é provavelmente o principal factor para a colapso da via aérea em obesos (Eckert e Malhotra, 2008).

Para além disso, a obesidade é considerada a causadora de alterações na *drive* ventilatória, na exacerbação dos eventos respiratórios nocturnos devido a limitação da capacidade residual funcional e aumento das exigências de oxigénio por parte do organismo (Young *et al.*, 2002).

A estratégia eficaz para alcançar uma melhoria da gravidade da doença é a redução de peso, mas os mecanismos fisiopatológicos permanecem incertos (Punjabi, 2008).

#### ○ **Alterações Craniofaciais**

As alterações na anatomia externa da cabeça e pescoço podem ser factores de risco para desenvolvimento da SAOS, independentemente da obesidade (Martins *et al.*, 2007).

O dismorfismo craniofacial pode envolver um atraso no desenvolvimento da mandíbula, produzindo o retrognatismo. Esta micrognatia ou hipoplasia mandibular é associada com o posicionamento posterior da base da língua, levando ao estreitamento das VAS (Martins *et al.*, 2007).

As diferenças na morfologia craniofacial também podem explicar algumas das alterações no risco da apneia obstrutiva do sono em diferentes grupos étnicos (Punjabi, 2008).

#### ○ **Factores Genéticos**

Já se conhece de longa data a influência genética, como factor predisponente para a SAOS. Existem estudos que demonstraram relações entre áreas específicas do genoma humano e a SAOS (Young *et al.*, 2002).

Alguns factores de risco podem ser herdados, como a estrutura craniofacial, a distribuição de gordura corporal, o controlo neural das VAS e o comando central da respiração que interagem para produzir o fenótipo da síndrome (Martins *et al.*, 2007).

Daí que, membros da mesma família que partilham essas características genéticas podem apresentar o distúrbio respiratório. Porém, estudos futuros são necessários para identificar os genes específicos que são responsáveis pelo desenvolvimento da SAOS.

Além disso, outras patologias podem causar a SAOS, como as doenças endócrinas (acromegalia e hipotireoidismo), e ainda outras doenças genéticas, como a síndrome de Down, que pode promover o estreitamento da VAS, predispondo à SAOS (Martins *et al.*, 2007).

- **Tabagismo e Consumo de Álcool**

O tabagismo e o consumo de álcool têm sido sugeridos como possíveis determinantes de risco para a SAOS.

Existem mecanismos em que o fumo de tabaco tem influência na SAOS, incluindo o aumento da instabilidade do sono e a inflamação das vias aéreas superiores. A instabilidade do sono, que foi relacionada com a SAOS, pode ser elevada devido à redução dos níveis de nicotina no sangue durante a noite. Na inflamação das VAS, relacionada com o fumo do tabaco, pode aumentar a vulnerabilidade para o aparecimento da SAOS (Young *et al.*, 2002 e Lam *et al.*, 2010).

A ingestão de álcool aumenta drasticamente a resistência nasal e faríngea em indivíduos durante a vigília, e provavelmente este efeito poderá comprometer a respiração durante o sono (Young *et al.*, 2002 e Lam *et al.*, 2010).

O consumo de álcool pode induzir actividade apneica em indivíduos normais ou assintomáticos. Muitos estudos demonstraram que o álcool também possui uma acção antimicrodespertar, prolongando a duração das apneias. Esta acção relaciona-se com a diminuição da actividade dos músculos intrínsecos da faringe (genioglosso e cricoaritenóideu), e assim facilitando a colapsibilidade da via aérea superior, com agravamento do ressonar e dos episódios de apneias (Young *et al.*, 2002 e Punjabi, 2008).

## **1.5. Diagnóstico**

A maioria dos pacientes com SAOS só chega a saber que possui a patologia quando se informam com um médico, apresentando alguns dos sintomas descritos anteriormente.

O diagnóstico desta síndrome pode ser feito através da história clínica e respectivo exame clínico, polissonografia (PSG), oximetria, entre outros. O melhor método de diagnóstico é a PSG, a qual apresenta informação detalhada do estado do sono, da respiração e anomalias na troca de gases e outras informações, como posição corporal, batimento e ritmo cardíaco, tonicidade e contração muscular. Porém, este exame possui desvantagens: é prolongado (durante todo o período de sono), complexo, dispendioso (necessita de constante supervisão por técnicos especializados) e é mal tolerado pela maior parte dos pacientes, pois provoca um enorme desconforto (Lam *et al.*, 2010).

No entanto, existe um outro método, denominado por poligrafia cardiorrespiratória nocturna, que pode ser feito em casa, este não requer supervisão e tem sido aceite por alguns pacientes (McNicholas, 2008).

Embora exista um progresso significativo nos últimos tempos, a SAOS ainda continua a ser uma doença subdiagnosticada causando efeitos prejudiciais na saúde humana. É, importante por isso desenvolver mais estudos que ajudem na identificação precoce de pacientes com SAOS, através de um teste mais simples e económico, facilitando o rastreio atempadamente, assim como ao nível do prognóstico e monitorização terapêutica, contribuindo para uma melhor compreensão e prevenção da SAOS, e as consequências a ela associada (Feliciano *et al.*, 2015).

## **1.6. Manifestações Clínicas**

O quadro clínico dos doentes com SAOS sugere facilmente o diagnóstico, caracterizando-se pela presença de sintomas que ocorrem durante o sono, habitualmente apontados pelo(a) companheiro(a), e outros que surgem durante o dia que são referidos pelo paciente. Na tabela 1, verificamos os possíveis sintomas que podem ocorrer nos pacientes com SAOS (Galal, 2012 e Feliciano *et al.*, 2015).

**Tabela 1.** Sintomatologia da SAOS.

<b>Sintomas Diurnos</b>	<b>Sintomas Nocturnos</b>
- Hipersonolência diurna - Cansaço ao despertar - Cefaleias matinais - Secura da boca - Alterações da personalidade e/ou humor (ansiedade, depressão, irritabilidade) - Perturbações da memória/concentração/ desempenho - Disfunção sexual/diminuição da libido	- Roncopatia intensa habitual - Paragens respiratórias - Salivação excessiva - Sono agitado com despertares frequentes - Nictúria/Enurese - Hipersudorese - Sensação de asfixia/engasgamento - Refluxo gastro-esofágico

Na avaliação da gravidade da SAOS, devemos ter em conta, essencialmente, a gravidade da hipersonolência diurna e dos eventos respiratórios (Fleetham *et al.*, 2006). Na tabela 2 verificamos a gravidade dos eventos respiratórios por hora nos diferentes estados da SAOS.

- **Ligeira:** Durante actividades que requerem pouca atenção (como ver televisão, ler, ou viajar como passageiro), com impacto social e laboral menor.
- **Moderada:** Durante actividades que requerem alguma atenção (como assistir a concertos, reuniões, ou conferências), com impacto social e laboral moderado.
- **Grave:** Durante actividades que requerem maior atenção (como andar, comer, conversar, ou conduzir), com impacto social e laboral marcado. (Fleetham *et al.*, 2006)

**Tabela 2.** Gravidade dos eventos respiratórios da SAOS (Lee *et al.*, 2008).

<b>Gravidade dos Eventos Respiratórios</b>	
<b>Ligeira</b>	5 a 15 eventos/hora
<b>Moderada</b>	15 a 30 eventos/hora
<b>Grave</b>	mais de 30 eventos/hora

## 1.7. Repercussões da SAOS

A SAOS não tratada pode originar complicações graves, de natureza neuropsicológica e cardiovascular (Tabela 3). As alterações respiratórias durante o sono estão associadas a excesso de morbidade e mortalidade (Boléo-Tomé *et al.*, 2008 e Teixeira, 2006).

Tabela 3. Complicações da SAOS.

Neuropsicológicas	Cardiovasculares
- Acidentes de viação - Acidentes de trabalho - Perturbações cognitivas - Dificuldades de relacionamento social/familiar	- HTA (Hipertensão arterial) - Hipertensão pulmonar - Arritmias cardíacas - Insuficiência respiratória - DCI (Doença cardíaca isquémica) - AVC (Acidente vascular cerebral)

## 1.8. Tratamento

A abordagem terapêutica ideal e a elaboração de um plano terapêutico adequado a cada paciente, passam pela investigação da etiologia da SAOS, a determinação da gravidade clínica, sintomas, existência de comorbidades pertinentes, expectativas do paciente e hipótese de melhorar a sua qualidade de vida. Existem várias medidas terapêuticas que podem ser medidas gerais, medidas farmacológicas, CPAP nasal, medidas cirúrgicas e próteses bucais.

As **medidas gerais** são abordagens comportamentais, principalmente de carácter higiénico-dietético. Incluem evitar o álcool, o tabaco e os sedativos, que são agentes que tendem a agravar a SAOS. Evitar a posição de decúbito dorsal, pode resultar para doentes com SAOS posicional. A perda de peso também ajuda a melhorar ou até mesmo eliminar a SAOS visualmente em todos os doentes em que a obesidade é o principal factor de risco presente. (McNicholas, 2008).

As **medidas farmacológicas** são discutíveis e possuem poucas evidências a seu favor. A utilização de medicamentos que estimulem a vigília pode servir de auxílio no tratamento de doentes que mantêm sonolência diurna, apesar de terem adoptado as regras de higiene do sono e cumprirem a terapêutica com CPAP (Fleetham *et al.*, 2006).

O recurso à **cirurgia** deve ser ponderado e aplicado apenas em casos específicos. O sucesso da cirurgia depende de várias condições, em especial da adesão do doente às medidas gerais.

O principal objectivo da cirurgia é aumentar o diâmetro da orofaringe. Existem várias técnicas que podem ser utilizadas, mas a mais comum é a uvulopalatofaringoplastia (UVPF), obtendo um sucesso de 40-50% e, melhora a SAOS ligeira a moderada. No entanto, a eficácia da cirurgia tende a diminuir com o passar do tempo (Won *et al.*, 2008).

A **prótese bucal** é um dispositivo que se coloca na boca com o objectivo de aumentar as vias aéreas superiores. Este tratamento é indicado para doentes com alterações anatómicas do maxilar inferior, micro e retrognatia. Mas também não deixa de ser recomendado para os doentes com apneia do sono que não toleram o CPAP, que não melhoram com o CPAP e para aqueles que apresentam preferência por este processo. No caso dos doentes com SAOS grave, o CPAP deve ser a terapêutica de primeira linha (Chan *et al.*, 2008).

O **CPAP**, sigla do inglês *Continuous Positive Airway Pressure*, é actualmente a forma de tratamento dominante e de maior eficácia comprovada na SAOS. Neste método é gerada uma pressão positiva contínua por um ventilador e, transmitida ao paciente através de uma máscara (normalmente nasal), mantendo a via aérea permeável, (Teixeira, 2006; Boléo-Tomé *et al.*, 2008 e Zancanella *et al.*, 2014).

Cada paciente necessita de uma determinada pressão de ventilação, pelo que a sua avaliação deve ser feita individualmente tendo, para isso, vários métodos para se encontrar a pressão óptima. Recentemente surgiram novos equipamentos, capazes de fazer o ajuste de pressão automaticamente, com o objectivo de alterar a pressão consoante a necessidade. Os auto-CPAP's têm-se mostrado bastante eficazes e mais confortáveis para o doente (Martinho, 2010).

No tratamento com CPAP o paciente tem que cumprir mais de 4h/noite com pressão eficaz, em pelo menos três quartos da noite, estimando-se que cerca de 25 a 50% dos pacientes recusem ou não tolerem esta terapêutica (Lohse *et al.*, 2009 e Zancanella *et al.*, 2014).

Os benefícios do CPAP estão bem documentados, pois possibilitam uma melhoria clínica imediata, quando usado regularmente, como a normalização do padrão

respiratório com ausência dos eventos respiratórios e fenómenos/sintomas a eles associados, melhorando assim a qualidade de vida dos pacientes (Teixeira, 2006 e Weaver, 2008).

No entanto, a sonolência residual pode continuar em alguns pacientes e as consequências crónicas derivadas da SAOS podem não ser totalmente revertidas pelo tratamento com CPAP, e por isso é importante compreender os mecanismos moleculares básicos da SAOS, assim como os efeitos benéficos do CPAP, que podem contribuir para o desenvolvimento de novas terapias alternativas ou coadjuvantes para esta doença (Feliciano *et al.*, 2015).

### **1.9. SAOS e o Stresse Oxidativo**

O stresse oxidativo surge quando existe um desequilíbrio entre os mecanismos de defesa antioxidantes e a produção de oxidantes, isto é, quando ocorre uma diminuição da capacidade antioxidante, e um excesso de produção de espécies reactivas de oxigénio e de nitrogénio (ROS/RNS) levando a um estado de stresse oxidativo (Badran *et al.*, 2014).

Os radicais livres de oxigénio são átomos ou moléculas que possuem um ou mais electrões desemparelhados numa órbita externa, o que os torna susceptíveis a reacções químicas. Apesar dos radicais livres possuírem um papel importante na regulação da transdução de sinal e na função celular, quando há excesso de produção estes podem causar danos em lípidos, proteínas, carboidratos e ADN, afectando muitos mecanismos celulares e fisiológicos (Murri *et al.*, 2009 e Badran *et al.*, 2014).

A SAOS surge como um importante factor de risco para doenças cardiovasculares. Mas a patogénese subjacente a esta relação ainda é desconhecida, embora o stresse oxidativo tenha sido apontado como uma possível via (Ntalapascha *et al.*, 2013).

Actualmente existem alguns estudos que mostram que os sintomas de hipoxia descontínua e episódios de hipoxia/reoxigenação em pacientes com SAOS podem levar a um aumento de radicais livres. O stresse oxidativo pode ser, portanto, um processo patofisiológico que contribui para a associação da doença cardiovascular em pacientes com SAOS (Murri *et al.*, 2009, Ntalapascha *et al.*, 2013 e Badran *et al.*, 2014).

## 2. Estudo em Glóbulos Vermelhos (GVs)

Este trabalho consiste na validação de potenciais biomarcadores proteômicos nos glóbulos vermelhos, de doentes com SAOS. Os biomarcadores candidatos poderão constituir uma forma de diagnóstico, prognóstico e monitorização, o que torna a sua pesquisa essencial para melhorar o tratamento, impedindo a evolução desta doença. Desta forma, foram considerados alguns factores que levaram à escolha da utilização da Proteómica e do fluído biológico, neste caso de glóbulos vermelhos, para o desenvolvimento deste estudo.

A Proteómica é uma área de estudo de larga escala, caracterizada por um conjunto de tecnologias aplicadas para investigar o proteoma, permitindo a avaliação de milhares de proteínas em determinadas circunstâncias e em diversas condições. Com a utilização de metodologia por Proteómica obtêm-se informações acerca das alterações na abundância de proteínas, como também modificações pós-traducionais (PTMs) e interacções entre proteína-proteína, que podem ser importantes para a compreensão do fenótipo molecular de uma doença, para além da descoberta de biomarcadores e o desenvolvimento de novas terapias (Feliciano *et al.*, 2015).

Os glóbulos vermelhos (GVs), também designados por eritrócitos ou hemácias, em inglês *red blood cells* (RBCs), representam 45% dos elementos constituintes do sangue; são cerca de 700 vezes mais numerosos que os leucócitos, e 17 vezes mais do que as plaquetas. São desprovidos de núcleo e organelos, e apresentam uma forma de disco bicôncavo (Klinken, 2002, Lima *et al.*, 2012 e Curralo, 2013).

A hemoglobina é a principal componente dos glóbulos vermelhos e ocupa cerca de um terço do volume total da célula, sendo por isso a responsável pela cor vermelha do sangue (Quintas *et al.*, 2008).

A principal função dos glóbulos vermelhos é a de realizar o transporte de oxigénio, dos pulmões para os tecidos, e dióxido de carbono dos tecidos para os pulmões (Gordon-Smith, 2009).

Zappulla define o glóbulo vermelho como uma fonte de inflamação sistémica que conduz a doenças metabólicas, tais como obesidade, resistência à insulina e hipertensão, patologias reconhecidas como consequências da SAOS, e por estas razões optou-se pela utilização de GVs neste estudo (Zapulla, 2008).

Feliciano e colaboradores realizaram no laboratório estudos preliminares incidindo na identificação de proteínas significativamente alteradas em amostras de eritrócitos de pacientes com SAOS. De entre estas, as mais significativas envolvidas no equilíbrio tais como a catalase e a peroxiredoxina 2, poderão fornecer novos conhecimentos sobre os mecanismos patológicos subjacentes e, eventuais candidatos a biomarcadores na SAOS (Feliciano *et al.*, 2014).

## **2.1. Potenciais Biomarcadores**

No ser humano, em condições fisiológicas normais, as células são protegidas contra o stresse oxidativo através de enzimas antioxidantes, como a catalase e as peroxiredoxinas. O stresse oxidativo, na origem do desequilíbrio entre os processos oxidativos e redutores, é considerado um factor de risco para o desenvolvimento de algumas doenças e, por isso, o estudo destas enzimas antioxidantes, que desempenham papéis fundamentais na eliminação de superóxidos, é relevante na compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento de doenças (Yan *et al.*, 2012).

No entanto, para uma molécula ser considerada um biomarcador de uma determinada doença, deve apresentar:

- > Sensibilidade e especificidade, permitindo o diagnóstico da patologia em causa;
- > Correlação com a severidade da doença, possibilitando o prognóstico;
- > Resposta a um determinado tratamento, prevendo a eficácia no mesmo;
- > Correlação com mecanismos patológicos que, uma vez alvo de terapias podem alterar os seus níveis de expressão, que se traduzem em modificações com o objectivo na recuperação fisiológica deste mesmo mecanismo (Penque, 2009, Shih e Malhotra, 2011).

### **2.1.2. Catalase (CAT)**

A catalase é uma proteína tetramérica de 244 KDa, que compreende quatro subunidades idênticas de 59,7 KDa, e está fortemente ligada ao NADPH (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate* reduzido) (Kodydková *et al.*, 2014).

A catalase é uma das principais enzimas que catalisa a decomposição de espécies reactivas de oxigénio (ROS), como o peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), um radical livre muito relacionado com diversas patologias. A actividade catalítica desta enzima consiste

na degradação de duas moléculas de peróxido de hidrogénio ( $2\text{H}_2\text{O}_2$ ) para uma molécula de oxigénio ( $\text{O}_2$ ) e duas moléculas de água ( $2\text{H}_2\text{O}$ ) (Mueller *et al.*, 1997 e Huang *et al.*, 2015).

É considerada uma proteína promissora para o desenvolvimento terapêutico (Huang *et al.*, 2015), que pode estar envolvida com várias patologias como a diabetes *mellitus*, alterações metabólicas e doenças oncológicas (Kodydková *et al.*, 2014), consequências muito associadas à SAOS. Por esta razão, a catalase é considerada uma proteína importante, sendo responsável pela protecção das células contra os hidroperóxidos (Poynton e Hampton, 2014 e Huang *et al.*, 2015).

No laboratório, Feliciano *et al.*, identificaram seis proteoformas da catalase, significativamente alteradas em amostras de GVs de pacientes com SAOS (noite e manhã). Este estudo preliminar mostra como a catalase pode ser considerada um possível candidato a biomarcador da SAOS (Feliciano *et al.*, 2014).

### **2.1.3. Peroxiredoxina 2 (Prx 2)**

As células humanas possuem várias peroxiredoxinas (Prxs ou PRDX) que pertencem à classe tiol peroxidases, e existem seis Prxs diferentes: Prx1, 2 e 6 estão localizadas no citosol, Prx3 na matriz mitocondrial, Prx4 no retículo endoplasmático e Prx5 na mitocôndria, peroxissomas e no citosol (Poynton e Hampton, 2014).

As Prxs possuem funções importantes na célula como, na degradação de peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a água, na redução de hidroperóxidos orgânicos e de peroxinitrito, e na protecção dos glóbulos vermelhos do stresse oxidativo (Yan *et al.*, 2012 e Hoyle e O'Neill, 2015). Estas proteínas também estão associadas à defesa antioxidante, podendo ser facilmente inactivadas pelo peróxido de hidrogénio, que consequentemente desactiva a actividade peroxidática, diminuindo a capacidade de acção como antioxidantes (Poynton e Hampton, 2014).

A Prx2 é a terceira proteína mais abundante nos GVs (depois da hemoglobina e da anidrase carbónica) (Yan *et al.*, 2012 e Bayer *et al.*, 2015), e por isso é fundamental para a sobrevivência dos eritrócitos (Bayer *et al.*, 2013).

A Prx2 tem sido muito estudada pois pode constituir um marcador de diagnóstico e de tratamento em diversas doenças (Bayer *et al.*, 2013, Cheah *et al.*, 2014 e Cho *et al.*, 2014). A Proteómica e a Biologia Molecular são áreas que desenvolveram

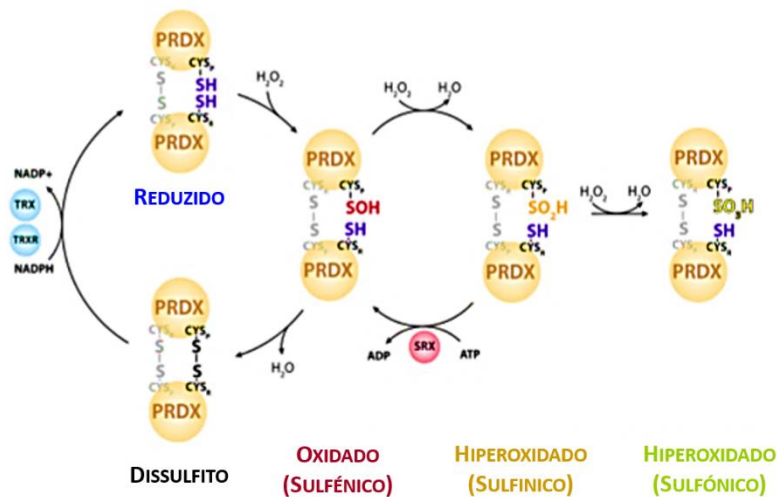
conhecimentos acerca desta proteína, e que apresentam a Prx2 como possível biomarcador em várias doenças (Yan *et al.*, 2012). Um dos principais objectivos deste trabalho é mostrar a Prx2 como um potencial biomarcador para o diagnóstico, prognóstico e tratamento da SAOS.

### **2.1.3.1. Ciclo Catalítico da Peroxiredoxina 2 (Prx 2)**

A Prx2 é uma proteína da família das Prx com 2-cisteínas (Prx2 – Cys) de massa molecular por volta de 22 KDa. Na célula, encontra-se preferencialmente associada em homodímeros não-covalentes (~40 kDa) (Bayer *et al.*, 2013 e Cho *et al.*, 2014).

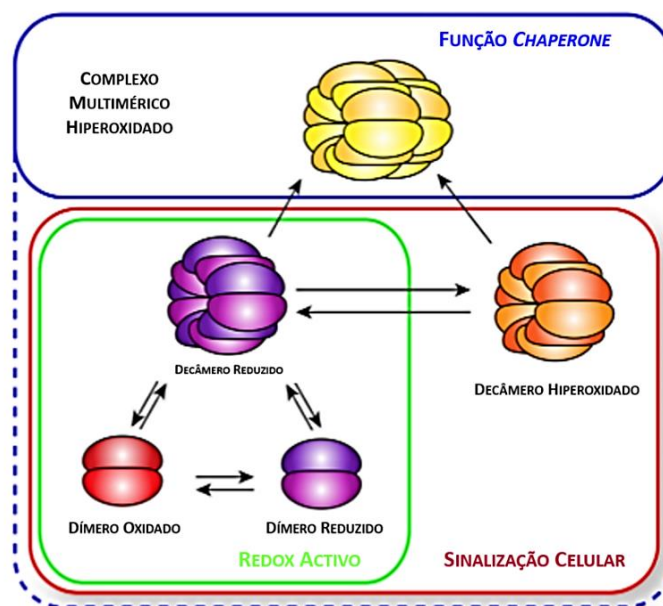
A actividade destas proteínas é desencadeada a partir da cisteína peroxidática – CysP do monómero, que executa um ciclo catalítico na presença de peróxidos orgânicos, como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o que leva à sua oxidação a ácido sulfénico (-SOH). Esta oxidação implica que a CysP de um monómero liga-se ao resíduo de cisteína “*resolving*” – CysR do monómero adjacente, dando origem a um dímero oxidado ligado por pontes dissulfídicas (-S-S), que pode voltar à forma reduzida pelo sistema Tioeredoxina (TRX)/Tioeredoxina redutase (TRXR), através do NADPH como dador de electrões. Este sistema de redução é muito lento, pois o GV possui uma baixa concentração de TRX o que pode levar acumulação de dímeros oxidados (Bayer *et al.*, 2013, Poynton e Hampton, 2014, Hoyle e O’Neill, 2015).

No entanto, o ácido sulfénico (-SOH) ao reagir com outra molécula de peróxido de hidrogénio origina a forma sulfínica hiperoxidada (-SO<sub>2</sub>H). A proteína hiperoxidada -SO<sub>2</sub>H pode ser reciclada, isto é, pode voltar à forma reduzida pela sulfiredoxina (SRX), mas também pode voltar a reagir com outra molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, originando a forma sulfónica hiperoxidada (-SO<sub>3</sub>H). Esta hiperoxidação inactiva a função peroxidática da proteína, como se verifica no esquema da figura 1 (Hoyle e O’Neill, 2015 e Milev *et al.*, 2015).



**Figura 1.** Ciclo catalítico da peroxidase redutiva. Formação de dímeros oxidados (Dissulfito e Sulfênico) e hiperoxidados (Sulfínico e Sulfônico) (Adaptado de Hoyle e O'Neill, 2015).

Na célula humana, a Prx existe em forma de dímero reduzido e oxidado, podendo trocar subunidades entre si para formar decâmeros ou dodecâmeros, neste caso a Prx2 apresenta-se na forma decaimérica. A hiperoxidação da Prx interfere com esta troca provocando a formação de moléculas decaiméricas hiperoxidadas. Esta estrutura hiperoxidada promove a conversão de espécies de elevada massa molecular (multímeros ou oligómeros) que estão associadas com aumento da atividade *chaperone* (figura 2) (Hoyle e O'Neill, 2015).



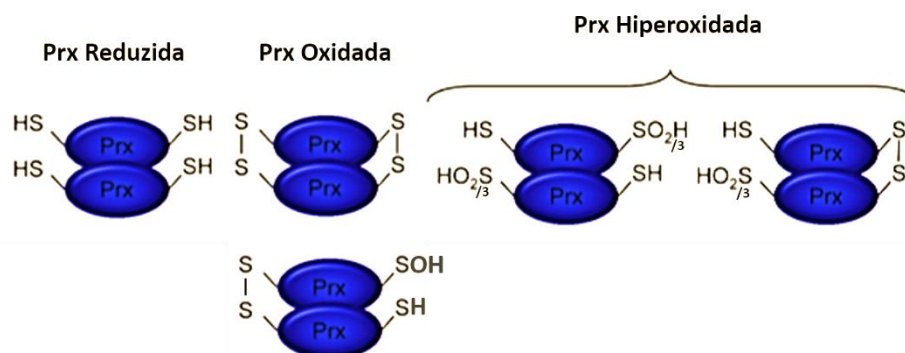
**Figura 2.** Processo de oligomerização da peroxidase redutiva em relação ao estado *redox* ativo, sinalização celular e função *chaperone* (Adaptado de Hoyle e O'Neill, 2015).

Estudos recentes mostram que as formas hiperoxidadas (-SO<sub>2</sub>H e -SO<sub>3</sub>H) desta proteína apresentam oscilação circadiana durante um período de 24 horas em eritrócitos humanos, ou seja, na ausência de mecanismos de transcrição-redução (O'Neill *et al.*, 2011, Cho *et al.*, 2014, Hoyle e O'Neill, 2015).

### 2.1.3.2. Estudo do estado *redox* – oligomérico da Peroxiredoxina

O estado *redox*-oligomérico da Prx2 está associado à sua função antioxidante, transdução de sinal e atividade *chaperone*. A desregulação do estado *redox*-oligomérico da Prx2 pode comprometer a homeostasia celular/tecidual, levando ao aparecimento ou agravamento de doenças (Kang *et al.*, 2005).

O estado *redox*-oligomérico da Prx2 pode ser estudado por SDS-PAGE não-reduzido seguido de *western blotting* (WB) com anticorpos específicos para a Prx2 e PrxSO<sub>2/3</sub>, para se avaliar a quantidade de formas oligoméricas nos diferentes estados reduzido, oxidado e hiperoxidado, como se verifica na figura 3.

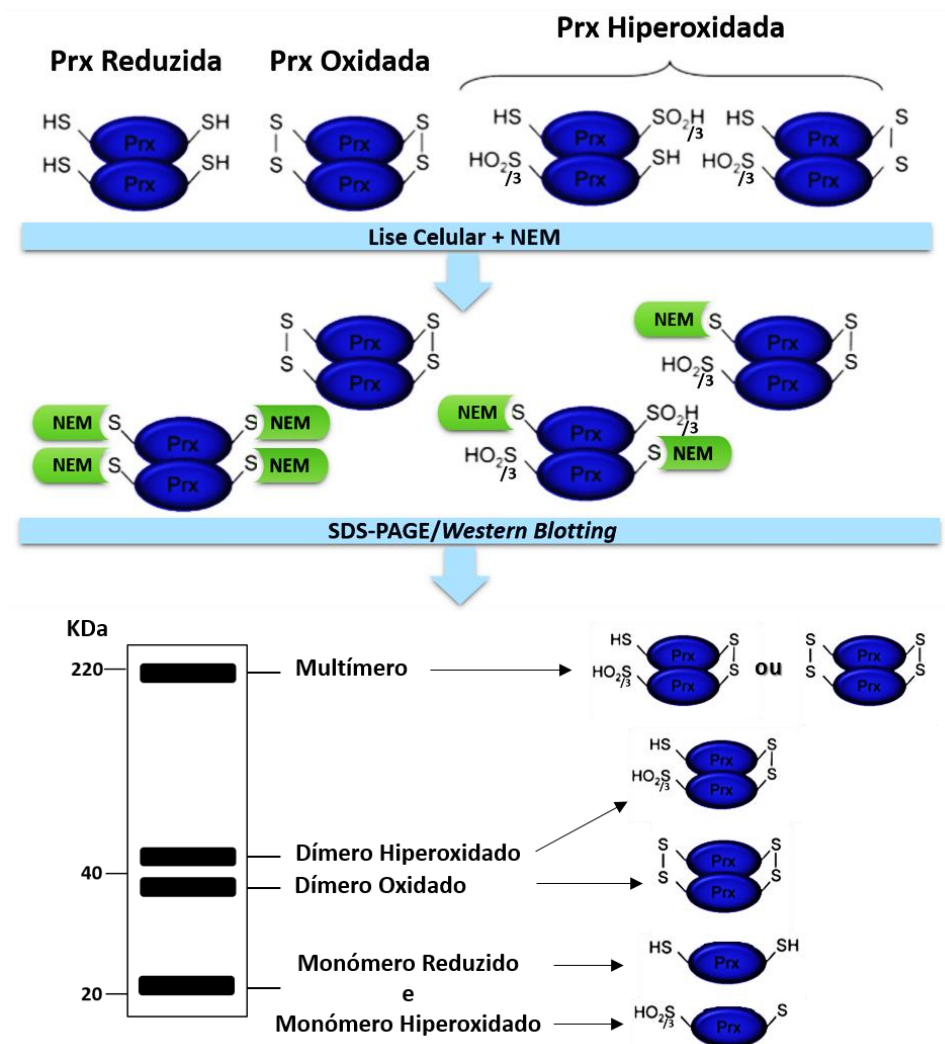


**Figura 3.** Estrutura da peroxiredoxina nos diferentes estados: reduzido, oxidado e hiperoxidado (Adaptado de Poynton e Hampton, 2014).

Para a preparação da amostra podem ser adicionadas substâncias que permitam a quebra de ligações dissulfídicas na proteína, como os agentes redutores (exemplo: β-mercaptoetanol) ou prevenção contra oxidações externas ou reoxidações, como os agentes alquilantes (exemplo: N-etilmaleimida – NEM).

Neste trabalho, foi possível observar e quantificar as formas oligoméricas da Prx2 e PrxSO<sub>2/3</sub>, em cada grupo de pacientes, e por isso adicionou-se às amostras o agente alquilante, NEM (figura 4). Este composto liga-se às cisteínas reduzidas do dímero

impedindo que ocorram oxidações externas na proteína, durante todo o processo de estudo (Poynton e Hampton, 2014).



**Figura 4.** Esquema da avaliação do estado *redox* na proteína Prx sob acção do alquilante, NEM. Visualização dos quatro estados *redox* da Prx, nos GV, por separação SDS-PAGE em condições não reduzidas (Adaptado de Poynton e Hampton, 2014).

## **II. OBJETIVOS**

## **OBJECTIVOS**

Considerando que a SAOS é actualmente reconhecida como um problema de saúde pública em muitos países, incluindo Portugal, sendo responsável por alterações metabólicas e cardiovasculares graves, uma compreensão mais clara dos mecanismos subjacentes às complicações da SAOS, através da identificação de proteínas envolvidas nestes processos, irá contribuir certamente para melhorar o reconhecimento e o tratamento desta doença e de seus efeitos.

Este trabalho teve como objectivo principal reavaliar/confirmar os dados proteómicos obtidos na sua fase de descoberta, no que respeita a existência de proteínas diferencialmente expressas nos eritrócitos de doentes com SAOS (como, a catalase e a peroxiredoxina 2) e, subsequentemente, valida-los por técnicas ortogonais (fase de validação). Estas proteínas, possivelmente, estão relacionadas com os diferentes níveis de gravidade da SAOS e com a resposta terapêutica nestes doentes.

Os resultados deste estudo contribuirão para uma melhor compreensão da SAOS, e assim proporcionar um melhor diagnóstico e tratamento para esta patologia.

# **III. MATERIAL E MÉTODOS**

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **1. Pacientes & Amostras**

A partir do Hospital Pulido Valente, (Centro Hospitalar Lisboa Norte), no Departamento de Pneumologia, foram clinicamente avaliados cento e quatro pacientes com suspeita de SAOS, com o fim de se criar um conjunto de registos clínicos com dados demográficos, estado nutricional, índice de massa corporal, pressão arterial, frequência cardíaca, estilo de vida, parâmetros de polissonografia (PSG) para o diagnóstico da SAOS e perfil metabólico de cada paciente.

Antes de realizarem o exame polissonográfico os pacientes foram sujeitos a uma dieta restrita durante três dias. Este exame foi realizado durante a noite no laboratório do sono.

Todos estes dados se encontram arquivados numa Base de Dados associada a um Biobanco (plasma e eritrócitos) sob consentimento informado, aprovado pela protecção nacional de dados e Comissão de Ética do Centro Hospitalar Lisboa Norte e do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Nesta Base de Dados/Biobanco incluem-se apenas pacientes do sexo masculino com idade entre os 25 e 55 anos.

Para este trabalho foram seleccionados, a partir deste Biobanco, grupos de 10 indivíduos com ausência de SAOS (manhã/noite), designado por Roncadores (controlos), com presença de SAOS (manhã/noite) e com seis meses de tratamento CPAP (manhã), como se pode verificar nas tabelas B1.2 (*Cohort II*) e B1.3 em anexo.

### **2. Fase de Descoberta**

Nesta etapa foi efectuada uma nova análise dos mapas 2D-DIGE anteriormente obtidos no laboratório, de amostras de indivíduos Roncadores simples e SAOS, usando o *software SameSpots* versão 4.5. A partir desta reavaliação foram seleccionados *spots* proteicos com expressão diferencial importantes para este estudo, que foram posteriormente identificados por espectrometria de massa. As amostras de indivíduos Roncadores e SAOS utilizadas nesta fase estão caracterizadas na tabela B1.1 (*Cohort I*) presente em anexo.

### **2.1. Análise pelo Software SameSpots**

Iniciou-se esta fase com uma nova análise para confirmação das proteínas diferencialmente expressas que foram anteriormente determinadas

Os mapas 2D-DIGE obtidos na primeira fase deste estudo foram reavaliados e comparados em relação à intensidade e abundância de *spots* proteicos no gel pelo software *Progenesis SameSpots* versão 4.5 (*Nonlinear Dynamics, UK*). Nesta análise, a abundância relativa dos *spots* correspondentes a todas as imagens dos géis foram expressos por um volume normalizado, e foram comparados entre os grupos de estudo, de modo que cada *spot* tenha um valor com diferença significativa, em termos de valor de  $p$  ( $<0,05$ ). Com esta análise obteve-se um total de 76 *spots* diferencialmente expressos.

### **2.2. Identificação das Proteínas**

Para identificação das proteínas diferencialmente expressas e, após excisão dos *spots* de interesse a partir do gel preparativo com 650  $\mu\text{g}$  de proteína total, prepararam-se 42 *spots* por digestão com tripsina que foram analisados pelo *Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyser com TOF/TOF (time-of-flight/time-of-flight)*, no Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB), em Oeiras.

Identificaram-se um total de 30 proteínas, tais como a catalase (seis proteoformas) e a peroxiredoxina 2.

Em anexo encontra-se a tabela E com as proteínas identificadas e diferencialmente expressas ( $p < 0,05$ ) nas diversas condições de estudo.

### **2.3. Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)**

O DAVID (versão 6.7) é uma base de dados de livre acesso para anotação, visualização e descoberta integrada (Huang *et al.*, 2009). Este *software* foi utilizado para estudar as 30 proteínas identificadas na etapa anterior, permitindo conhecer as suas principais funções moleculares, processos biológicos e componentes celulares.

### 3. Fase de Validação

Neste trabalho foi realizada a fase de validação de potenciais candidatos biomarcadores para a SAOS identificados no laboratório em estudos preliminares anteriores.

#### 3.1. Determinação da Actividade Enzimática da Catalase (CAT)

A quantidade de enzima numa amostra é estimada pela sua actividade enzimática (ou actividade catalítica), isto é, pela quantidade de produto formado por unidade de tempo, em condições bem definidas (Quintas *et al.*, 2008).

A determinação da actividade enzimática da catalase (CAT) foi realizada no espectrofotómetro UV-Visível (*Evolution 300, UV-Visible Spectrophotometer, Thermo Scientific*), sendo utilizado um método contínuo que permite medir a velocidade da reacção em função do tempo, definido pela unidade *nmol CAT/minuto/mg proteína*.

Este estudo foi realizado em 4 *pools* de indivíduos Roncadores (manhã/noite), 3 *pools* de pacientes com SAOS (manhã/noite) – IAH  $\geq 15$  eventos/h, e 4 *pools* de pacientes com tratamento CPAP 6 meses (manhã) – IAH  $\geq 15$  eventos/h, em duplicado.

O método realizado para actividade da catalase baseia-se na determinação da velocidade inicial da reacção, efectuada a partir da taxa de diminuição de absorvância devido à decomposição do  $H_2O_2$ , sendo a diminuição de absorvância proporcional à quantidade de enzima presente.

A técnica da actividade enzimática foi optimizada a partir de uma solução de tampão fosfato a 91 mM [concentração final] a pH 7 (4,98 g  $NaH_2PO_4$  + 7,1 g  $Na_2HPO_4$ , para um volume final de 1 L) com 260  $\mu$ L de  $H_2O_2$  a 30%. Posteriormente, foi adicionado numa cuvete 3 mL de tampão fosfato com  $H_2O_2$  e 8  $\mu$ L de amostra/*pool* 1:400 de cada grupo de Roncadores, SAOS e CPAP.

A leitura, no espectrofotómetro, foi efectuada a 240 nm utilizando a lâmpada de ultravioleta (UV), à temperatura ambiente, durante 3 minutos (equivalente a 18 ciclos, sendo 1 ciclo igual a 10 segundos), a partir da qual se determinam as velocidades iniciais.

A unidade da actividade enzimática é definida por *mUI* (submúltiplo de Unidade Internacional), como *nmolCAT<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup>mg de proteína*, isto é, a quantidade de enzima necessária para converter 1 nmol de substrato em produto por minuto, por mg de

proteína, nas condições de ensaio. A actividade catalítica foi determinada pela seguinte equação, utilizando um coeficiente de absorção molar do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\epsilon$ ): 43,6 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

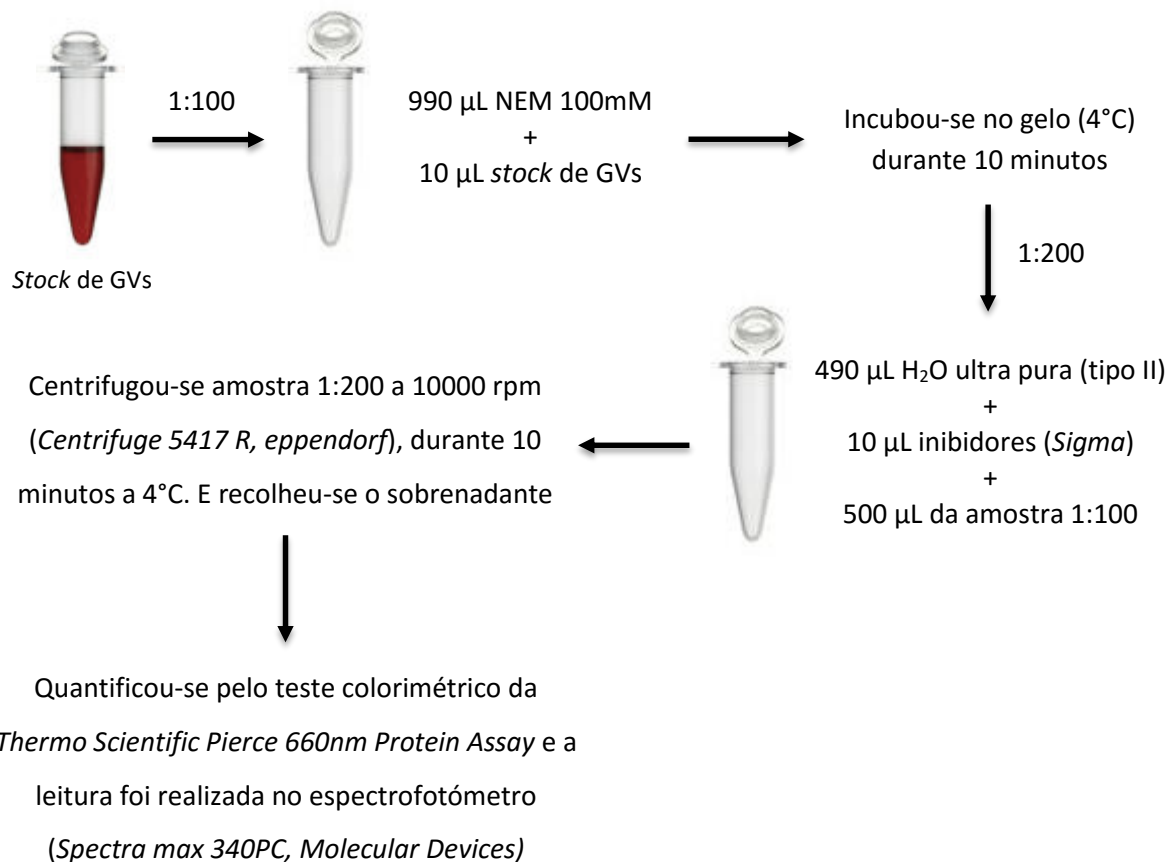
$$\text{Actividade Catalítica} = \frac{(\Delta A_{\text{amostra}} - \Delta A_{\text{branco}}) \times V_{\text{rmax}} \times 1000}{43,6 \times C_{\text{pr}} \times V_{\text{amostra}}}$$

**Equação 1.** Equação utilizada para calcular a actividade catalítica, definida em nmolCT<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup>mg de proteína.

## 3.2. Western Blotting

### 3.2.1. Preparação da Amostra

As amostras (Roncadores; SAOS e CPAP) antes de serem aplicadas no gel foram previamente preparadas com N-etilmaleimida (NEM), esta solução serve para evitar a oxidação induzida pela lise. Preparou-se o NEM em etanol (96%), para uma concentração final 2M, e a partir desta preparou-se uma solução de NEM a 100mM em soro fisiológico (NaCl a 0,9%). As amostras foram preparadas, segundo o esquema:



### 3.2.2. Quantificação da Proteína Total

As amostras 1:200 preparadas na etapa anterior foram quantificadas por um método colorimétrico da *Thermo Scientific Pierce 660nm Protein Assay*, que inclui um reagente e diferentes *standards* pré-diluídos (albumina de soro de bovino – BSA). É um teste reprodutível e rápido para a quantificação de proteínas totais, realizado em microplaca e a leitura das absorvâncias efectuada no espectrofotómetro (*Spectra max 340PC, Molecular Devices*) com um c.d.o. de 660 nm.

A partir da absorvância obtida dos standards elaborou-se uma recta de calibração (Absorvância/[Proteína]) e, através desta, obtemos a concentração de proteína das amostras em estudo (Roncadores, SAOS e CPAP). Para aplicação no gel cada amostra foi ajustada a um volume correspondente a 70 µg de proteína. Os resultados da quantificação da proteína total das amostras em estudo encontram-se no anexo C.

### 3.2.3. Electroforese Unidimensional (1DE) SDS-PAGE

A electroforese é uma técnica que utiliza um campo eléctrico para fazer migrar moléculas carregadas através de uma solução.

De forma a separar as proteínas dos glóbulos vermelhos por massa molecular, recorreu-se à *sodium dodecyl-sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE).

O SDS é um detergente aniónico que possui moléculas com uma carga líquida negativa dentro de uma larga gama de pH, quando dissolvida. Este detergente liga-se a uma cadeia de polipéptidos, atribuindo lhes carga negativa e destruindo a estrutura complexa das proteínas (desnaturação). A proteína carregada negativamente, apenas depende da sua massa molecular para se mover ao longo do gel.

Neste estudo, todos os géis utilizados são *NuPAGE 4-12% Bis-Tris Mini Gels (1.0mm x 15 well) – NOVEX by life Technologies*. A concentração de 4% situa-se por cima do gel de resolução e serve para homogeneizar a frente electroforética, de forma que as proteínas com maior/menor massa molecular migrem ao mesmo tempo, enquanto a concentração 12% faz a separação efectiva das proteínas da amostra.

### 3.2.4. Corrida Electroforética

Nesta etapa, as amostras 1:200, na tabela em anexo C, foram liofilizadas para homogeneização de volumes (10 µL/*lane*), e de seguida foi preparada uma solução de

2,5 µL de LDS (*Lithium Dodecyl Sulfate*) da *NuPAGE LDS Sample Buffer 4X, NOVEX by life Technologies*, e 7,5 µL de água pura (tipo II), seguidas de agitação, a 70°C, durante 10 minutos, para desnaturar as proteínas da amostra. Aplicou-se no gel 3 µL de marcador (*MagicMark XP, Western Protein Standard, NOVEX by life Technologies*).

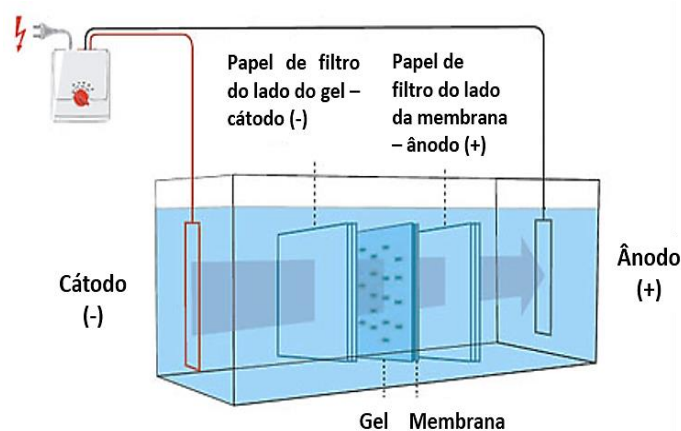
A corrida electroforética foi realizada sob um potencial de 150 V, com um tampão de corrida desnaturante da *NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20X)*, 30 mL deste tampão concentrado com 570 mL de água tipo II, para um volume final de 600mL.

### 3.2.5. Transferência

Após a separação das proteínas por SDS-PAGE, realizou-se o processo de transferência através das membranas de fluoreto de polivinilideno – PVDF (*Immobilon-P Membrane, PVDF, 0,45 µm, 26,5 cm x 3,75 m roll, para Western Blotting – Millipore, Fisher Scientific*). As membranas foram previamente activadas com metanol 100% (v/v) (*Merk*) durante 15 minutos com agitação e, de seguida, foram lavadas com água tipo II antes de serem incubadas com tampão de transferência completo (composição em anexo A1.2) durante 10 minutos com agitação. Os papéis (3MM) e as esponjas utilizados para fazer pressão e aumentar o contacto entre o gel e a membrana também foram equilibrados no tampão de transferência completo.

Realizou-se a montagem/*sandwich* e foram colocadas numa tina com tampão de transferência, como mostra a figura 5.

A transferência decorreu à temperatura de 10°C durante 1 hora e 30 minutos a 400 mA.



**Figura 5.** Esquema de montagem efectuada para a transferência no *western blotting* (Adaptado de <http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSciences-pt/applications/blotting/>).

Após a transferência, as membranas foram coradas com *Ponceau S* a 0,1% em 5% de ácido acético (composição em anexo A1.3), incubadas durante 5 minutos com agitação, para visualizar as bandas transferidas. Após digitalização das membranas coradas para uma posterior análise, removeu-se esta coloração através de várias lavagens consecutivas utilizando o tampão fosfato salino com *Tween 20*, definido por PBS-T (composição em anexo A1.5), com agitação forte até desaparecer por completo o corante das membranas. As membranas podem ser secas entre papel 3MM e guardadas a 4°C até utilização.

### **3.2.6. Bloqueio da Membrana**

As membranas foram bloqueadas com uma solução de 5% de leite em pó magro (*Nestlé*) em tampão PBS-T durante 1 hora com agitação, para evitar ligações inespecíficas do anticorpo em estudo.

### **3.2.7. Incubação da Membrana com o Anticorpo Primário**

Depois do bloqueio a membrana foi incubada com o anticorpo primário desejado, e na concentração escolhida, durante a noite, a 4°C e com agitação lenta. Os anticorpos utilizados neste estudo foram: anti-catalase (*Abcam*); anti-peroxiredoxina 2 e anti-peroxiredoxina SO<sub>2/3</sub> (*Abcam*). Estes anticorpos foram todos diluídos numa solução de 5% de leite em pó em PBS-T de acordo com a tabela 4.

### **3.2.8. Incubação da membrana com o anticorpo secundário**

Após o bloqueio com o anticorpo primário, iniciou-se um ciclo de lavagens com duas lavagens breves, uma lavagem de 15 minutos e três lavagens de 5 minutos em agitação, com tampão PBS-T, para retirar o excesso de anticorpo primário que não se ligou a nenhuma proteína.

Os anticorpos secundários utilizados foram *IgG anti-rabbit* (*GE Healthcare, UK*) e *IgG anti-mouse* (*GE Healthcare, UK*), que foram diluídos com uma solução de 5% de leite em pó em PBS-T, como se verifica na tabela 4. A incubação destes anticorpos foi realizada durante 1 hora com agitação lenta, à temperatura ambiente. Início de um novo ciclo de lavagens de igual duração que o anterior e, por último uma lavagem de 5 minutos com solução PBS 1x (tampão de fosfato salino – composição em anexo A1.4).

**Tabela 4.** Diluição dos anticorpos primários e secundários utilizados neste estudo.

<b>Anticorpo Primário</b>	<b>Diluição</b>	<b>Anticorpo Secundário</b>	<b>Diluição</b>
Anti-Catalase	1/7500	Anti-Mouse	1/5000
Anti-Peroxiredoxina 2	1/20000	Anti-Rabbit	1/10000
Anti-Peroxiredoxina SO <sub>2/3</sub>	1/3000	Anti-Rabbit	1/7500

### 3.2.9. Revelação

Esta fase foi realizada na câmara escura, onde a membrana de PVDF foi envolvida numa solução de detecção por quimioluminescência, da *Amersham ECL Western blotting detection reagentes, GE Healthcare*. A membrana é colocada na *cassette* e depois coberta com a solução de detecção (cerca de 1mL por membrana), durante 2 minutos. De seguida colocou-se um filme de revelação raio-x (*AGFA*) sobre a membrana e fechou-se a *cassette* para impressionar a chapa e, assim permaneceu durante algum tempo, consoante a intensidade luminosa das bandas de cada proteína em estudo. Depois da incubação o filme de raio-x foi revelado num processador (*Medical X-Ray Processor – Kodak*).

### 3.2.10. Quantificação das bandas de proteínas

Após obtermos os resultados da revelação de cada proteína (catalase, peroxiredoxina 2 e SO<sub>2/3</sub>) foi feito o *scanner* em cada filme de raio-x (chapa), passando a ter as imagens em formato *TIFF (16bits)*.

Posteriormente analisaram-se as bandas das proteínas por densitometria utilizando o *ImageJ*. Este *software* avalia a quantidade de proteína através da densidade óptica, permitindo seleccionar uma área na proteína/banda.

A partir das imagens obtidas das membranas coradas com *Ponceau S* referidas anteriormente, quantificou-se a banda da hemoglobina, sendo esta, a proteína normalizadora deste estudo. No anexo D está um exemplo de uma membrana com a banda de hemoglobina.

Com a área seleccionada na banda pretendida obteve-se um gráfico com picos e áreas diferentes em relação à densidade em pixéis de cada banda, correspondente à proteína em estudo.

Os dados adquiridos a partir do *ImageJ* foram tratados em *Excel (Microsoft Office, versão 2013)*. Nesta etapa foi calculado o valor da área da banda em estudo em relação

à área da banda normalizadora correspondente à mesma amostra, ou seja, este cálculo serve para obter os valores normalizados em cada amostra das diferentes proteínas em estudo. Também foi calculada a média e o desvio padrão de todas amostras – Roncadores (noite e manhã); SAOS (noite e manhã) e CPAP (manhã). Estes resultados foram utilizados para elaboração de gráficos e para análise estatística (*Anova e T-student*).

# **IV. RESULTADOS**

## RESULTADOS

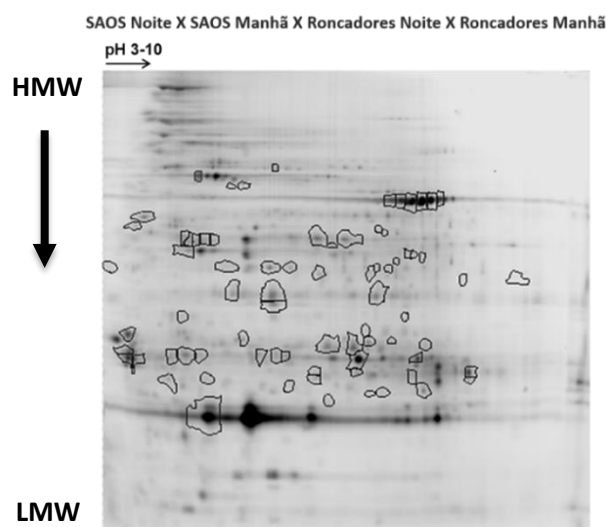
### 1. Identificação das proteínas presentes nos GVs de indivíduos com/sem SAOS

Anteriormente a este trabalho aqui apresentado foram realizados géis 2D-DIGE (electroforese bidimensional diferencial) para a descoberta de proteínas diferencialmente expressas na fracção citosólica dos glóbulos vermelhos depletados da hemoglobina (Hb), preparados a partir de amostras de sangue de doentes com SAOS e de Roncadores simples, colhidas ao final da tarde antes do exame PSG (denominadas de “Noite”) e na manhã do dia seguinte ao exame (denominadas de “Manhã”).

#### 1.1. Análise de mapas 2D-DIGE pelo *Software SameSpots*

Neste trabalho, foi realizada uma nova análise das imagens dos géis 2D-DIGE através do *software Progenesis SameSpots* versão 4.5, que possibilita identificar os *spots* proteicos que estão significativamente diferencialmente expressos nos GVs dos doentes em estudo. Para tal foi necessária a realização de 2 replicados de 6 *pools* com SAOS (noite e manhã), e 2 replicados de 6 *pools* de roncadores (noite e manhã), ou seja, um total de 24 géis 2D (bidimensional).

Esta análise permitiu encontrar cerca de 950 *spots* de proteínas, mas só 76 *spots* é que mostraram ter diferentes expressões quantitativas entre as amostras SAOS e roncadores (noite e manhã), como se pode observar na figura 6.



**Figura 6.** Gel 2D-DIGE com os 76 *spots* diferencialmente expressos analisados pelo *SameSpots* v4.5.

## 1.2. Identificação das proteínas diferencialmente expressas

Nesta etapa, 42 *spots* diferencialmente expressos dos 76 *spots* anteriormente referidos, foram submetidos a análise por *MALDI TOF/TOF da Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyser* no Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB), em Oeiras.

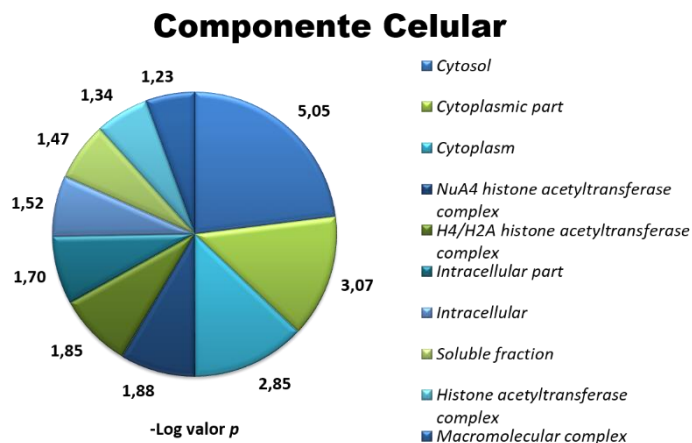
Através desta metodologia foi possível a identificação de um total de 30 proteínas correspondendo a 21 proteínas únicas (tabela 5 e anexo E).

**Tabela 5.** Proteínas identificadas com expressão diferencial, na fracção citosólica dos GV's depletados da Hb nos indivíduos roncoadores e com SAOS, em amostras "Noite" e "Manhã" (tabela completa em anexo E).

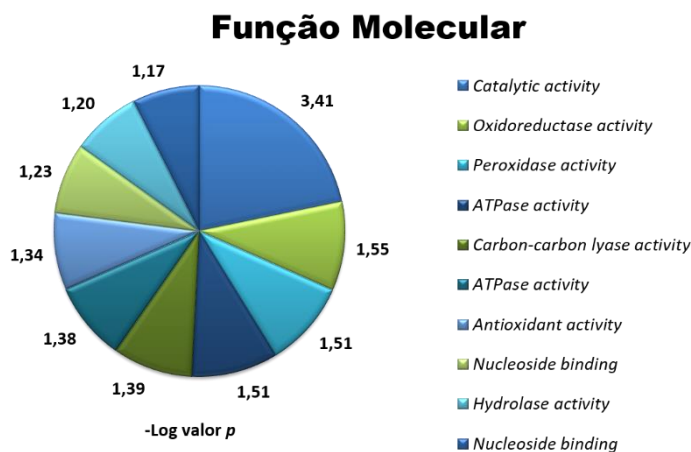
<i>Spot</i>	Proteínas Identificadas	<i>Spot</i>	Proteínas Identificadas
1366	<i>Actin</i>	1374	<i>Hemoglobin subunit beta</i>
882	<i>Actin</i>	1007	<i>L-lactate dehydrogenase B chain</i>
1055	<i>Arginine and glutamate-rich protein 1</i>	1705	<i>Peroxiredoxin-2</i>
1328	<i>Catalase</i>	1238	<i>Probable global transcription activator SNF2L2</i>
1330	<i>Catalase</i>	827	<i>26S protease regulatory subunit 6A</i>
716	<i>Catalase</i>	1099	<i>Proteasome subunit alpha type-1</i>
1332	<i>Catalase</i>	1347	<i>14-3-3 protein epsilon</i>
1669	<i>Catalase</i>	1120	<i>Purine nucleoside phosphorylase</i>
1335	<i>Catalase</i>	1232	<i>Putative inactive group IIC secretory phospholipase A2</i>
981	<i>Fructose-bisphosphate aldolase A</i>	1118	<i>Putative uncharacterized protein FLJ45999</i>
1137	<i>Glutamate--cysteine ligase regulatory subunit</i>	1149	<i>Putative zinc finger protein 861</i>
617	<i>Heat shock 70 kDa protein 1A/1B</i>	808	<i>RuvB-like 1</i>
570	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>	1409	<i>Serine/threonine-protein phosphatase 2A activator</i>
619	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>	938	<i>Uroporphyrinogen decarboxylase</i>
1443	<i>Hemoglobin subunit beta</i>	944	<i>Uroporphyrinogen decarboxylase</i>

## 1.3. Anotação e classificação das proteínas identificadas com expressão diferencial

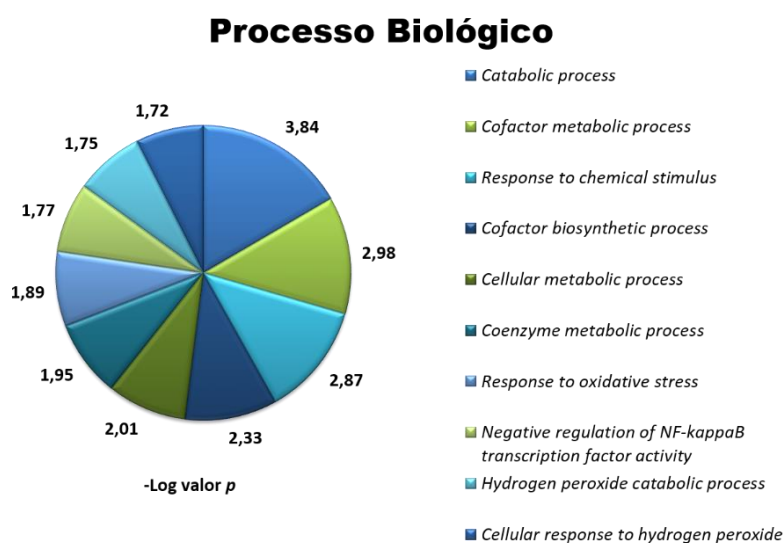
As 30 proteínas identificadas anteriormente (tabela 5) foram submetidas à base de dados DAVID – *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*, obtendo informação biológica e funcional, tais como *Gene Ontology (GO)* terms, localização subcelular, função molecular e associação de processos biológicos e/ou doenças, determinados pelos valores  $p \leq 0,05$ , como se pode verificar nos gráficos da figura 7, 8 e 9.



**Figura 7.** Principais características das proteínas identificadas e com expressão diferencial, pela Componente Celular a partir da análise DAVID.



**Figura 8.** Principais características das proteínas identificadas e com expressão diferencial, pela Função Molecular a partir da análise DAVID.



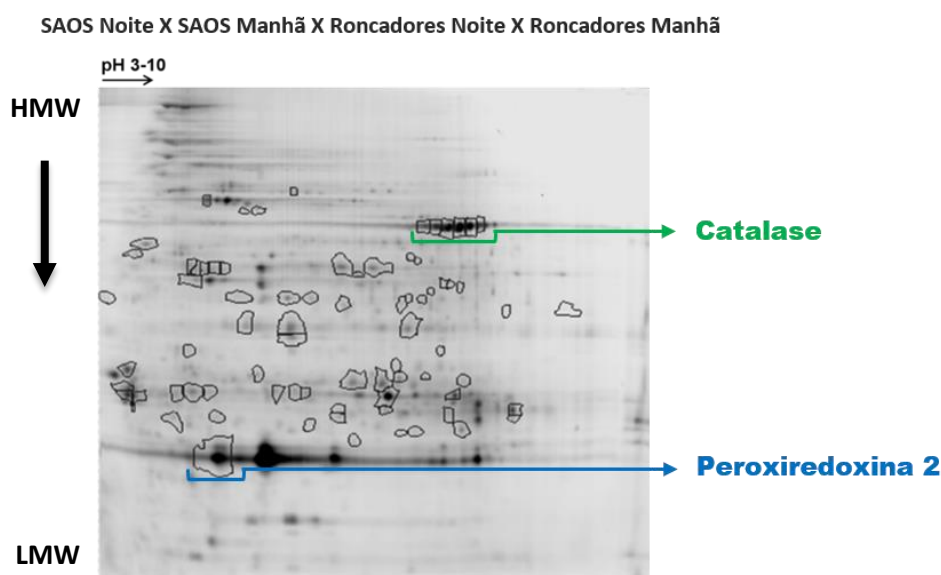
**Figura 9.** Principais características das proteínas identificadas e com expressão diferencial, pelo Processo Biológico a partir da análise DAVID.

Os resultados mostrados nas figuras 7, 8 e 9 indicam que as proteínas identificadas estão localizadas maioritariamente no citoplasma, associadas a actividade antioxidante, e também em resposta ao stresse celular.

## 2. Validação da Catalase e da Peroxiredoxina 2

A partir das proteínas identificadas e diferencialmente expressas foram selecionadas duas proteínas importantes para subsequente validação ortogonal, a catalase (CAT) e a peroxiredoxina 2 (Prx2) (figura 10).

Pelo menos oito *spots* no gel 2D foram identificados como sendo a CAT e 2 *spots* como sendo a Prx2, sugerindo a existência de modificações pós-traducionais (PTMs) ou proteoformas para estas proteínas (figura 10).



**Figura 10.** Gel 2D-DIGE com os *spots* assinalados das proteínas diferencialmente expressas, catalase e peroxiredoxina 2.

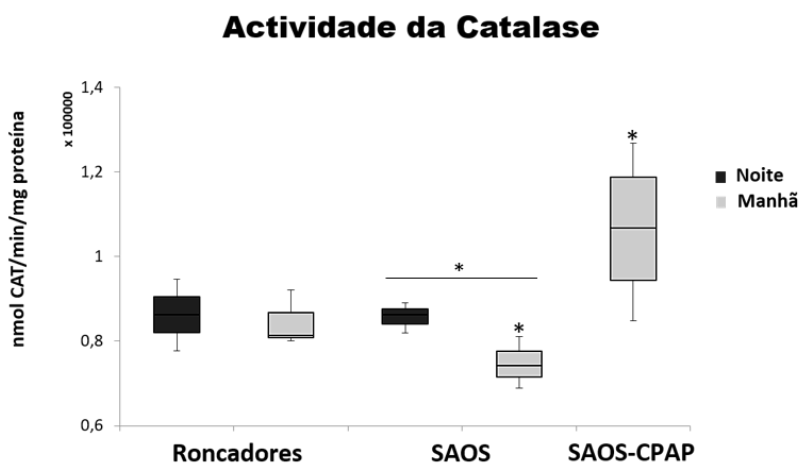
As proteoformas mais ácidas da CAT estavam significativamente menos abundantes em amostras “Manhã” quando comparadas com as amostras “Noite”, quer seja de doentes SAOS ou controlos. Contudo, nas amostras “Manhã” de doentes SAOS, as proteoformas da CAT estavam significativamente ainda mais baixas em comparação com “Noite”. Quanto à Prx2, as formas ácidas estavam aumentadas nas amostras “Manhã” de doentes com SAOS. Não tendo sido observadas diferenças significativas quando comparados “Manhã” versus “Noite”.

## 2.1. Catalase (CAT)

Para a validação da CAT foi determinada a actividade enzimática cujos resultados mostrados na figura 11 apresentam uma diminuição nas amostras de manhã nos pacientes com SAOS em relação às amostras recolhidas de noite, isto significa, que nos doentes a CAT está mais activa durante a noite em relação de manhã, o mesmo não se verifica nos roncadores.

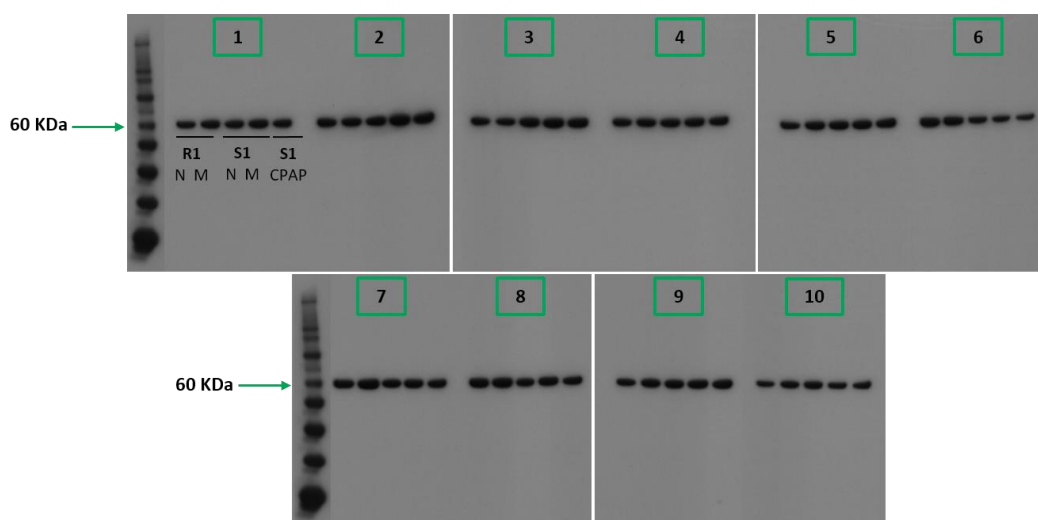
Os pacientes com SAOS de manhã também apresentam uma diminuição significativa em relação aos roncadores, isto significa que a actividade da CAT está mais baixa nos doentes com SAOS.

Em relação ao tratamento com CPAP verifica-se um aumento significativo da actividade da CAT em comparação com os doentes que ainda não iniciaram o tratamento.



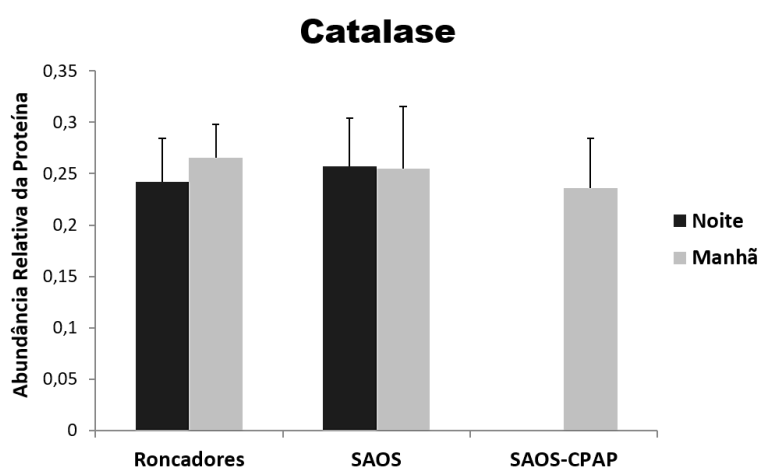
**Figura 11.** Representação gráfica da actividade enzimática da CAT nas amostras recolhidas “Noite” e “Manhã” em indivíduos Roncadores, com SAOS e CPAP (*pools* em duplicado).

Para além deste teste também foi feita a validação pelo método *western blotting* (WB) (figura 12) permitindo a quantificação das bandas de proteínas separadas por gel 1DE SDS-PAGE e transferidas para membranas posteriormente bloqueadas e incubadas com anticorpos específicos.



**Figura 12.** Validação da proteína CAT por WB. Esta figura mostra a reacção do anticorpo específico para a catalase, na fracção citosólica GV's (70  $\mu$ g) de cada indivíduo (R: roncadador, S: SAOS e S-CPAP: SAOS-CPAP; N: noite e M: manhã).

Nos resultados obtidos a partir da técnica *western blotting* não se observaram diferenças significativas entre os grupos em estudo, provavelmente porque todas as proteoformas da catalase foram separadas numa única banda pelo gel 1DE, o que dificultou a quantificação de eventuais diferenças que possam existir em alguma proteoforma da catalase entre os pacientes (figura 12). A figura 13 mostra através da representação gráfica que não existem alterações significativas na abundância relativa da catalase entre as diferentes condições em estudo.



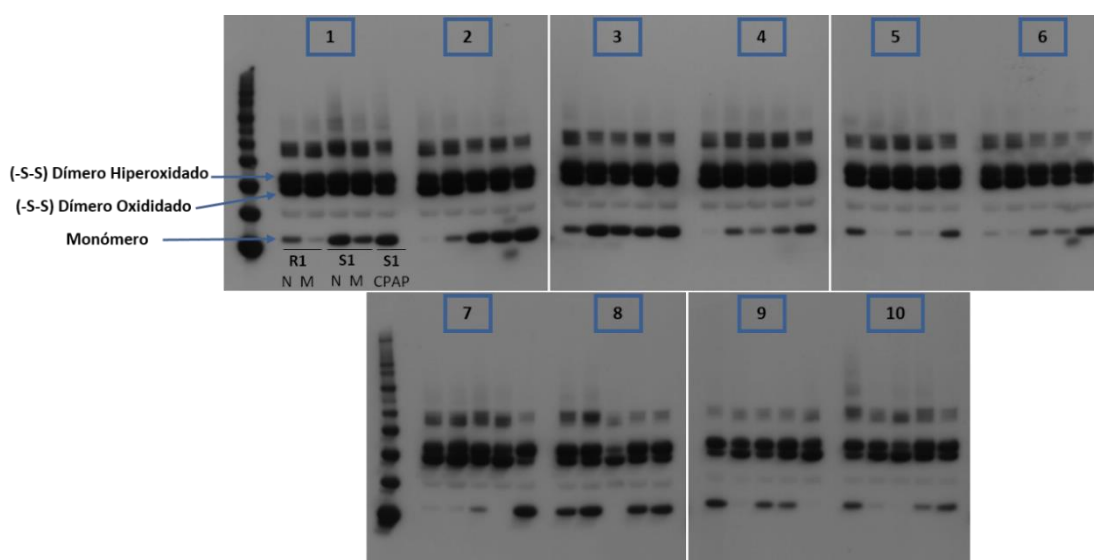
**Figura 13.** Representação gráfica da abundância relativa da CAT nas amostras recolhidas “Noite” e “Manhã” em Roncadores, SAOS e CPAP (n=50), normalizada pela Hb, através da análise pelo *Image J*.

## 2.2. Peroxiredoxina 2 (Prx2)

A peroxiredoxina 2 identificada no gel 2D-DIGE (figura 10) é a isoforma mais ácida e mais abundante nas amostras com SAOS de manhã (Anova,  $p < 0,05$ ).

Para validar a Prx2 nas diferentes formas reduzida, oxidada e hiperoxidada foi realizado o método WB em condições não reduzidas, utilizando um anticorpo contra a Prx2 e contra a forma hiperoxidada, PrxSO<sub>2/3</sub>, como se verifica nas figuras 14 e 17.

A figura 14 mostra diferentes formas oligoméricas de Prx2 com massas moleculares diferentes que migraram ao longo do gel. Estas formas oligoméricas correspondem, principalmente, a formas monoméricas e diméricas (-S-S).

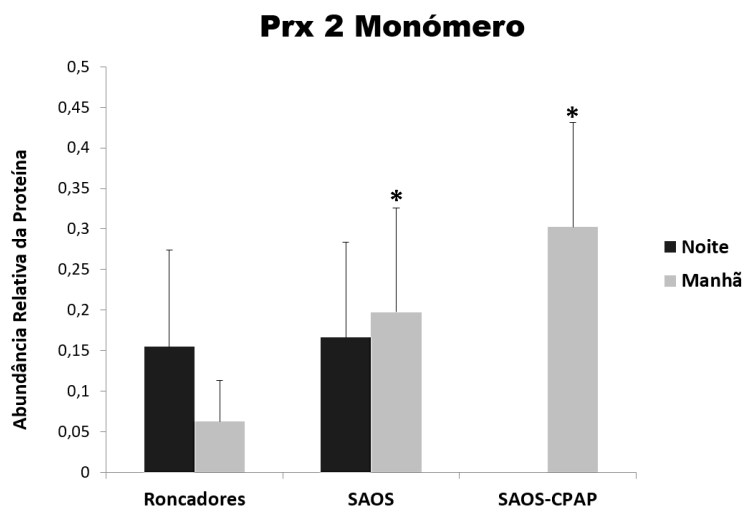


**Figura 14.** Validação da proteína Prx2 por WB. Esta figura mostra a reacção do anticorpo para a Prx2, na fracção citosólica GV (70 µg) de cada indivíduo (R: roncadador, S: SAOS e S-CPAP: SAOS-CPAP; N: noite e M: manhã). Observam-se as formas monoméricas e diméricas da Prx2.

Os resultados da quantificação das bandas da Prx2 (figura 15) apresentam alterações significativas a nível de abundância monomérica, sendo mais elevado nos pacientes com SAOS do que nos roncadores nas amostras de manhã. Após o tratamento com CPAP (6 meses), os níveis destas formas monoméricas ainda estão mais aumentados, quando comparado com os doentes antes de iniciarem o tratamento.

No entanto, não se verificam diferenças significativas na abundância de Prx2 monomérica entre as amostras SAOS “Manhã” e as amostras SAOS “Noite”. Os

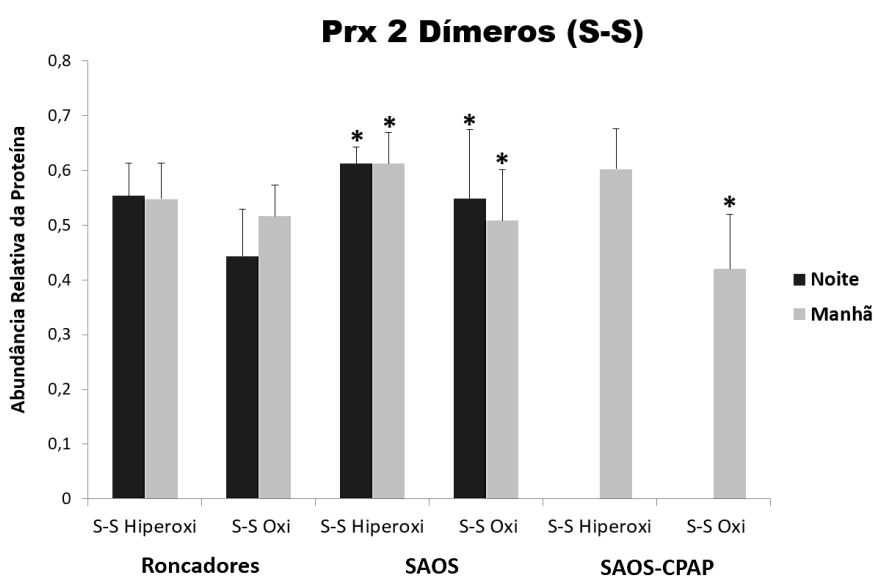
roncadores mostram ter menos Prx2 monomérica nas amostras de manhã comparado com as da noite.



**Figura 15.** Representação gráfica da abundância relativa da Prx2 monomérica nas diferentes amostras “Noite” e “Manhã” de Roncadores, SAOS e SAOS-CPAP (n=50).

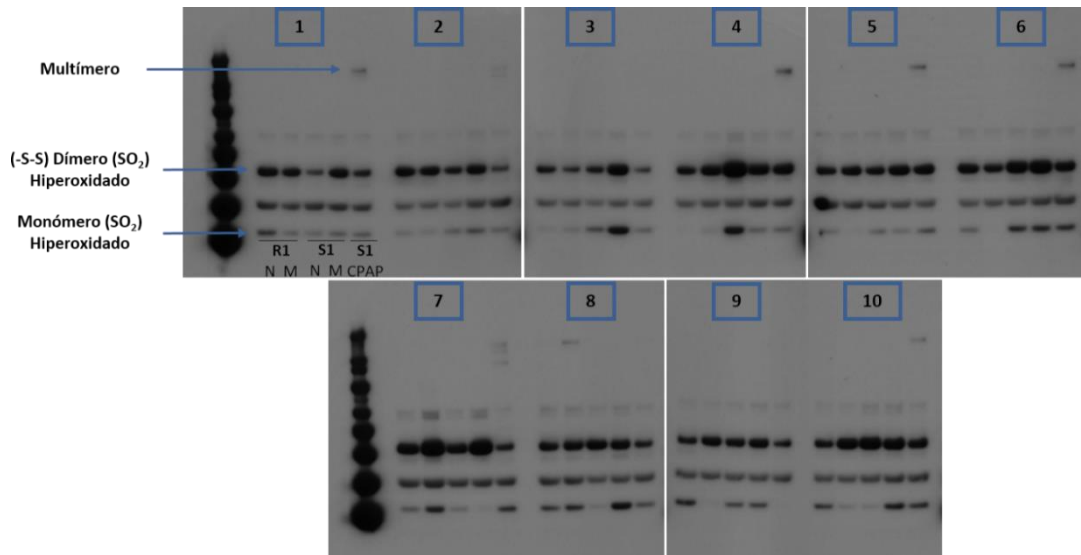
Em relação aos resultados da quantidade de Prx2 na forma dimérica hiperoxidada (figura 16) observa-se um aumento significativo nas amostras SAOS “Manhã” comparado com os roncadores “Manhã”.

As formas diméricas oxidadas da Prx2 também estão aumentadas nos pacientes com SAOS de manhã em relação aos roncadores, mas diminuíram significativamente depois de realizarem o tratamento com CPAP.



**Figura 16.** Representação gráfica da abundância relativa da Prx2 dimérica nas formas hiperoxidada e oxidada, nos diferentes grupos em estudo.

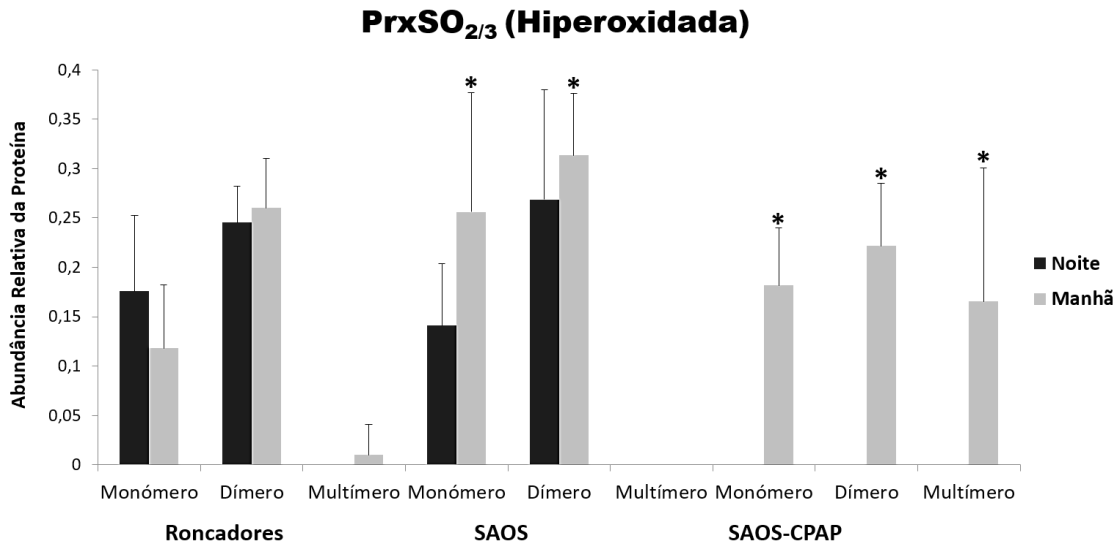
Para compreender melhor o funcionamento desta proteína nos doentes com SAOS e após tratamento com CPAP, fomos estudar a Prx2 hiperoxidada (PrxSO<sub>2/3</sub>) através da técnica WB, os resultados são mostrados na figura 17.



**Figura 17.** Validação por WB da proteína PrxSO<sub>2/3</sub> (hiperoxidada), na fracção citosólica GVs (70 µg) de cada indivíduo (R: roncador, S: SAOS e S-CPAP: SAOS-CPAP; N: noite e M: manhã). Observam-se as formas monoméricas, diméricas e multiméricas da PrxSO<sub>2/3</sub>.

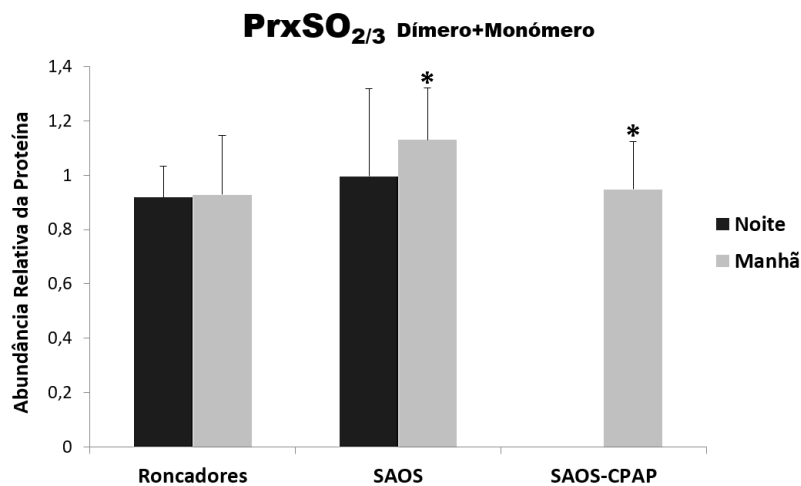
Em relação à quantificação obtida a partir da normalização das bandas monoméricas e diméricas hiperoxidadas da Prx2 (figura 18) estão aumentadas nos pacientes com SAOS de manhã comparado com os roncoadores. Após o tratamento com CPAP estes níveis diminuem significativamente.

Neste estudo foram detectadas formas multiméricas hiperoxidadas muito interessantes, porque estão presentes, principalmente, em pacientes com SAOS após realizar seis meses de tratamento com CPAP (figura 18).



**Figura 18.** Representação gráfica da abundância relativa da PrxSO<sub>2/3</sub> (hiperoxidada) para as formas monoméricas, diméricas e multiméricas nas diferentes amostras de Roncadores, SAOS e SAOS-CPAP (n=50).

Em relação à figura 19 mostra a junção das formas diméricas com as monoméricas hiperoxidadas (PrxSO<sub>2/3</sub>), e verifica-se que há um aumento nos pacientes com SAOS “Manhã” comparado com os roncadores, e posteriormente, uma diminuição significativa após o tratamento com CPAP.



**Figura 19.** Representação gráfica da abundância relativa da PrxSO<sub>2/3</sub> (hiperoxidada) com a junção das formas monoméricas e diméricas nos diferentes grupos de estudo.

# **V. DISCUSSÃO**

## Discussão

Considerando que a SAOS é actualmente reconhecida como um problema de saúde pública em muitos países, incluindo Portugal, sendo responsável por alterações metabólicas e cardiovasculares graves, uma melhor compreensão dos mecanismos subjacentes às complicações da SAOS, através da identificação de proteínas associadas, irá contribuir, certamente, para melhorar o reconhecimento e o tratamento desta doença.

O estudo teve como principal objectivo reavaliar e validar os dados proteómicos obtidos pelo Laboratório de Proteómica do DGH-INSARJ, que apontavam para a existência de um grupo de proteínas diferencialmente abundantes em GVs de doentes com SAOS, como potenciais biomarcadores para esta doença.

Este trabalho iniciou-se com a reavaliação dos mapas 2D-DIGE, do proteoma dos GVs de doentes com SAOS em comparação com doentes controlos, o que permitiu a selecção de *spots* proteicos de interesse para identificação por espectrometria de massa e posterior validação das proteínas mais relevantes.

A reavaliação destes mapas, pelo *software SameSpots vs. 4.5*, confirmou haver diferenças significativas na SAOS, em relação à abundância em determinadas proteínas, maioritariamente envolvidas em processos antioxidantes, ou seja, na protecção da célula contra o stresse oxidativo, tais como a CAT e a Prx2.

A CAT é uma das principais enzimas antioxidantes envolvida na degradação do peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) em água e oxigénio (actividade catalítica) e/ou na oxidação de outras moléculas como o formaldeído, o ácido fórmico e alguns álcoois (função peroxidática), tendo por isso um papel fundamental na defesa do organismo. Os níveis de expressão e função da CAT é regulada ao nível da transcrição, pós-transcrição e pós-translação (Kodydková *et al.*, 2014).

As variações polimórficas no gene da CAT podem ser um factor de risco para doenças metabólicas. Muitos estudos sugerem que o aumento da actividade da CAT pode ser benéfico em patologias associadas ao stresse oxidativo como a, aterosclerose e doenças metabólicas, pois a sua actividade tem sido observada diminuída nestas patologias (Kodydková *et al.*, 2014). Contudo, estes dados são ainda controversos, pois alguns estudos não evidenciaram diferenças ou, pelo contrário, a actividade da CAT estava aumentada em algumas destas patologias. Esta polémica pode estar associada às

diferentes metodologias utilizadas, ou nas possíveis diferenças polimórficas no gene da CAT entre as populações de doentes estudados (Kodydková *et al.*, 2014).

No que respeita à SAOS, também uma doença associada ao stresse oxidativo (Badran *et al.*, 2014) há ainda poucos estudos sobre o papel da CAT nesta doença. Os resultados obtidos nesta investigação mostraram que, pelo menos oito proteoformas da CAT, estão presentes nos GVs, provavelmente resultantes de modificações pós-traducionais. Contudo, as proteoformas mais ácidas da CAT estavam diminuídas nas amostras de GVs “Manhã” em relação às amostras GVs “Noite” e, esta diminuição estava significativamente mais acentuada nas amostras “Manhã” de doentes com SAOS. Os ensaios de cinética enzimática confirmaram que a actividade da CAT estava significativamente diminuída nas amostras “Manhã” em comparação com as amostras “Noite” e, que esta diminuição estava mais evidente nos doentes com SAOS. Ainda, após seis meses de tratamento com CPAP, a actividade da CAT mostrou-se consideravelmente muito aumentada nas amostras “Manhã”.

Uma vez que a quantificação relativa por WB não mostrou diferenças significativas entre os grupos/condições analisadas, estes resultados sugerem que a actividade da CAT nos GVs é principalmente regulada por processos de modificações pós-traducionais, como por exemplo a fosforilação (Cabigas *et al.*, 2015).

Ntalapascha *et al.* 2013 observaram uma tendência para a diminuição da actividade da CAT em doentes SAOS, o que corrobora com os nossos resultados. Contudo, outros investigadores, Sales *et al.* 2013, mostraram não haver diferenças na actividade desta enzima nos doentes SAOS quando comparados com controlos. Esta diferença nos resultados pode estar relacionada com o facto de estes autores terem medido a actividade da CAT no soro e não nos GVs, onde a sua actividade é mais específica.

O aumento da actividade da CAT após CPAP, como observada neste estudo, poderá estar relacionado com os efeitos benéficos do CPAP na diminuição dos níveis de inflamação e stresse oxidativo induzidos pela SAOS (Oyma *et al.*, 2012e Celec *et al.*, 2012). Contudo, um estudo comparativo entre um mês de tratamento com CPAP e um mês com um aparelho bucal para o avanço mandibular (MAD – do inglês *Mandibular Advancement Device*) mostrou que a atividade da CAT nos GVs dos doentes com SAOS não se alterava com CPAP mas diminuía com MAD (Dal-Fabbro *et al.*, 2014). A utilização do CPAP apenas por período de um mês, ou seja, por um período muito mais curto do

que os seis meses utilizados no presente estudo pode explicar as diferenças entre os nossos resultados e destes autores. No entanto, pensamos ser ainda necessário mais investigação e, se possível num maior número de doentes, para compreender melhor o papel da CAT na SAOS e a sua relevância como um possível biomarcador de monitorização da eficácia do tratamento CPAP.

Tal como a CAT, a Prx2 desempenha um papel chave na defesa antioxidante (Bayer *et al.*, 2015). Para além disso, possui ainda função *chaperone* e de transdução de sinal reguladas pelo seu estado *redox*-oligomérico. Alterações no seu estado *redox* ou na sua estrutura oligomérica, ou ainda, na sua interação com outras proteínas, podem ter um impacto significativo na sua função e, portanto, nas cascatas de eventos de sinalização em que participa (Hoyle e O'Neill, 2015).

Na comparação dos mapas 2D-DIGE do proteoma dos GVs, observámos formas acídicas da Prx2, descritas como formas hiperoxidadas (Poynton e Hampton, 2014), que estavam aumentadas nas amostras “Manhã” e “Noite” de doentes com SAOS em comparação com os controlos. Por WB em géis SDS-PAGE não reduzido, confirmámos que de facto formas monoméricas e diméricas da Prx2 estavam significativamente hiperoxidadas na SAOS, naquelas amostras. Formas diméricas oxidadas dissulfídicas (-S-S-) da Prx2, incluindo as parcialmente hiperoxidadas, estão relacionadas com a inativação da sua função peroxidática, e consequentemente, com o estado de stresse oxidativo (Poynton e Hampton, 2014). Estes dados estão de acordo com muitos autores que descrevem a SAOS como uma doença ligada ao stresse oxidativo (Murri *et al.*, 2011 e Badran *et al.*, 2014)

Surpreendentemente, verificamos também que a hiperoxidação dos monómeros e dímeros da Prx2 na SAOS diminuiu significativamente após seis meses de tratamento CPAP. Ainda, as formas multiméricas hiperoxidadas da Prx2 foram identificadas quase exclusivamente na maioria dos doentes SAOS após tratamento CPAP. Estas formas estão associadas com a função de *chaperone*/transdução de sinal, com um papel importante na sobrevivência celular (Hoyle e O'Neill, 2015), o que suporta os efeitos benéficos do tratamento CPAP.

# **VI. CONCLUSÃO**

## Conclusão

Em síntese, os resultados obtidos neste trabalho validaram os resultados anteriormente analisados por Proteómica (2D-DIGE), indicando nos GVs de doentes com SAOS a presença de desregulação no seu sistema *redox*-homeostase que envolvem proteínas como a CAT e a Prx2. Estes resultados confirmam que SAOS é uma doença associada ao stresse oxidativo.

Este trabalho sugere ainda, a CAT e a Prx2, como potenciais candidatos a biomarcadores de gravidade e/ou de monitorização do tratamento CPAP.

Contudo, são ainda necessários mais estudos para uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à patogénese da SAOS e dos efeitos do tratamento CPAP, na procura de biomarcadores de diagnóstico, prognóstico e de monitorização terapêutica.

# **VII. REFERÊNCIAS**

## **BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Badran M, Ayas N, Laher I. Insights into obstructive sleep apnea research. *Sleep Med.* 2014;15(5):485-495
- Bayer SB, Hampton MB, Winterbourn CC. Accumulation of oxidized peroxiredoxin 2 in red blood cells and its prevention. *Transfusion.* 2015;55(8):1909-1918
- Bayer SB, Maghzal G, Stocker R, Hampton MB, Winterbourn CC. Neutrophil-mediated oxidation of erythrocyte peroxiredoxin 2 as a potential marker of oxidative stress in inflammation. *FASEB J.* 2013;27(8):3315-3322
- Boléo-Tomé JP, Salgado S, Oliveira AS, Pinto P, Bugalho A, Feliciano A, et al. Prevalência de doença cardiovascular numa população de doentes com síndrome de apneia obstrutiva do sono. *Revista Portuguesa de Clínica Geral.* 2008;24:355-61
- Cabigas EB, Liu J, Boopathy AV, Che PL, Crawford BH, Baroi G, et al. Dysregulation of catalase activity in newborn myocytes during hypoxia is mediated by c-Abl tyrosine kinase. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2015;20(1):93-103
- Carvalho VMA. Síndrome de apneia/hipopneia obstrutiva do sono. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior. 2008
- Celec P, Hodossy J, Behliak M, Pálffy R, Gardlík R, Halcák L, Mucska I. Oxidative and carbonyl stress in patients with obstructive sleep apnea treated with continuous positive airway pressure. *Sleep breath.* 2012;16(2):393-398
- Chan ASL, Lee RWW, Cistulli PA. Non-positive airway pressure modalities: mandibular advancement devices/positional therapy. *Proc Am Thorac Soc.* 2008;5(2):179-184
- Cheah FC, Peskin AV, Wong FL, Ithnin AO, Winterbourn CC. Increased basal oxidation of peroxiredoxin 2 and limited peroxiredoxin recycling in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient erythrocytes from newborn infants. *FASEB J.* 2014;28(7):3205-3210
- Cho CS, Yoon HJ, Kim JY, Woo HA, Rhee SG. Circadian rhythm of hyperoxidized peroxiredoxin II is determined by hemoglobin autoxidation and the 20S proteasome in red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(33):12043-12048

- Christou K, Kostikas K, Pastaka C, Tanou K, Antoniadou I, Gourgoulialis KI. Nasal continuous positive stress in patients with severe obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep Med.* 2009;10(1):87-94
- Curralo ARA, Desenvolvimento de um método semi-automático em MatLab para calcular o coeficiente de dispersão de eritrócitos em microcanais. Instituto Politécnico de Bragança. Dissertação de Mestrado. 2013
- Dal-Fabbro C, Garbuio S, D'Almeida V, Cintra FD, Tufik S, Bittencourt L. Mandibular advancement device and CPAP upon cardiovascular parameters in OSA. *Sleep Breath.* 2014;18(4):749-759
- Eckert DJ, Malhotra A. Pathophysiology of adult obstructive sleep apnea. *The Proc Am Thorac Soc.* 2008;5(2):144-153
- Feliciano A, Bozanic V, Torres VM, Matthiesen R, Carvalho AS, Almeida A, Alexandre B, Vaz F, Malhotra A, Pinto P, Bárbara C, Penque D. Proteomics of red blood cell from patients with obstructive sleep apnea. HUPO Madrid and European Respiratory Society Annual Congress, Munich. 2014
- Feliciano A, Torres VM, Matthiesen R, Pinto P, Malhotra A, Bárbara C, et al. Overview of proteomics studies in obstructive sleep apnea. *Sleep Med.* 2015;16(4):437-445
- Fleetham J, Ayas N, Bradley D, Ferguson K, Fitzpatrick M, George C, et al. Canadian thoracic society guidelines: Diagnosis and treatment of sleep disordered breathing in adults. *Can Respir J.* 2006;13(7):387-392
- Galal I. Nocturnal heart rate variability analysis as a screening tool for obstructive sleep apnea syndrome. *Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis.* 2012;61(3):187-195
- Gordon-Smith T. Structure and function of red and white blood cells. *Medicine.* 2009;37(3):119-124.
- Gottlieb DJ, Yenokyan G, Newman AB, O'Connor GT, Punjabi NM, Quan SF, et al. A prospective study of obstructive sleep apnea and incident coronary heart disease and heart failure: the sleep heart health study. *Circulation.* 2010;122(4):352-360
- Hoyle NP, O' Neill JS. Oxidation-reduction cycles of peroxiredoxin proteins and nontranscriptional aspects of timekeeping. *Biochemistry.* 2015;54(2):184-193

<http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeScience-s-pt/applications/blotting/>. Protein Transfer. GE Healthcare Life Sciences. Acesso: Agosto de 2015

Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2009;4:44-57

Huang XN, Du XY, Xing JF, Ge ZQ. Catalase-only nanoparticles prepared by shear alone: Characteristics, activity and stability evaluation. *Int J Biol Macromol.* 2015

Ip MSM, Lam KSL, Ho C., Tsang KWT, Lam W. Serum leptin and vascular risk factors in obstructive sleep apnea. *Chest.* 2000;118(3):580-586

Kang SW, Rhee SG, Chang TS, Jeong W, Choi MH. 2-Cys peroxiredoxin function in intracellular signal transduction: therapeutic implications. *Trends Mol Med.* 2005;11(12):571-578

Klingelhoefter C, Kammerer U, Koospal M, Muhling B, Schneider M, Kapp M, et al. Natural resistance to ascorbic acid induced oxidative stress is mainly mediated by catalase activity in human cancer cells and catalase-silencing sensitizes to oxidative stress. *BMC Complement Altern Med.* 2012;12:61

Klinken SP. Red blood cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002;34(12):1513–1518

Kodydková J, Vávrová L, Kocík M, Zák A. Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases. *Folia Biol (Praha).* 2014;60(4):153-167

Kryger M. Charles Dickens: impact on medicine and society. *J Clin Sleep Med.* 2012;8(3):333-338

Lam JCM, Sharma SK, Lam B. Obstructive sleep apnoea: definitions, epidemiology & natural history. *Indian J Med Res.* 2010;131:165-170

Lee W, Nagubadi S, Kryger MH, Mokhlesi B. Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population-based perspective. *Expert Rev Respir Med.* 2008;2(3):349-364

Lima R, Ishikawa T, Imai Y, Yamaguchi T. Blood flow behavior in microchannels: past, current and future trends. In *Single and two-Phase Flows on Chemical and Biomedical Engineering.* 2012;513-547

Lohse AK, Scarfe WC, Shaid F, Farman AG. Obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome: Clinical applications of cone beam CT. *Australasian Dental Practice.* 2009;28:499-521

- Lopes MGA. Análise dos factores da não adesão ao tratamento nos doentes com síndrome de apneia obstrutiva do sono (SAOS). Dissertação de Mestrado. Faculdade de Economia da Universidade de Coimbra. 2012
- Martinho CMSC. Educação do doente com síndrome de apneia obstrutiva do sono. Dissertação de Mestrado. Instituto de Educação da Universidade de Lisboa. 2010
- Martins AB, Tufik S, Moura SMGPT. Síndrome de apneia-hipopneia obstrutiva do sono. Fisiopatologia. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2007;33(1):36-43
- McNicholas WT. Diagnosis of obstructive sleep apnea in adults. *Proc Am Thorac Soc*. 2008;5(2):154–160
- Milev NB, Rey G, Valekunja UK, Edgar RS, O’Neill JS, Reddy AB. Analysis of the redox oscillations in the circadian clockwork. *Methods Enzymol*. 2015;552:185-210
- Mueller S, Riedel HD, Stremmel W. Direct evidence for catalase as the predominant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – removing enzyme in human erythrocytes. *Blood*. 1997;90(12):4973-4978
- Murri M, Alcázar-Ramírez J, Garrido-Sánchez L, Linde F, Alcaide J, Cardona F, et al. Oxidative stress and metabolic changes after continuous positive airway pressure treatment according to previous metabolic disorders in sleep apnea-hypopnea syndrome patients. *Transl Res*. 2009;154(3):111-121
- Murri M, García-Delgado R, Alcázar-Ramírez J, Fernández-Ramos A, Alcaide J, Cardona F, et al. Effect of CPAP on oxidative stress and circulating progenitor cell levels in sleep patients with apnea-hypopnea syndrome. *Respir Care*. 2011;56(11):1830-1836
- Ntalapascha M, Makris D, Kyparo A, Tsilioni I, Kostikas K, Gourgoulianis K, et al. Oxidative stress in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep Breath*. 2013;17(2):549-555
- O’Neill JS, Reddy AB. Circadian clocks in human red blood cells. *Nature*. 2011;469(7331):498-503
- Oyama J, Yamamoto H, Maeda T, Ito A, Node K, Makino N. Continuous positive airway pressure therapy improves vascular dysfunction and decreases oxidative stress in patients with the metabolic syndrome and obstructive sleep apnea syndrome. *Clin Cardiol*. 2012;35(4):231-236
- Penque D. Two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry for biomarker discovery. *Proteomics Clin App*. 2009;3(2):155-172

- Pereira H, Xará D, Mendonça J, Santos A, Abelha FJ. Patients with a high risk for obstructive sleep apnea syndrome: Postoperative respiratory complications. *Rev Port de Pneumol.* 2013;19(4):144-151
- Poynton RA, Hampton MB. Peroxiredoxins as biomarkers of oxidative stress. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840(2):906-912
- Punjabi NM. The Epidemiology of adult obstructive sleep apnea. *Proc Am Thorac Soc.* 2008;5(2):136-143
- Quintas A, Freire AP, Halpern MJ. *Bioquímica – Organização Molecular da Vida.* Lidel. 2008.
- Sales LV, Bruin VM, D’Almeida V, Pompéia S, Bueno OF, Tufik S, et al. Cognition and biomarkers of oxidative stress in obstructive sleep apnea. *Clinics (São Paulo).* 2013;68(4):449-455
- Shih JL, Malhotra A. Could vitamins be helpful to patients with sleep apnea?. *chest.* 2011;139(2):237-238
- Silva GA, Sander HH, Eckeli AL, Fernandes RMF, Coelho EB, Nobre F. Conceitos básicos sobre síndrome da apneia obstrutiva do sono. *Revista Brasileira da Hipertensão.* 2009;16(3):150-157
- Teixeira F. Distúrbios respiratórios obstrutivos do sono: síndrome de apneia-hipopneia obstrutiva do sono e síndrome de resistência das vias aéreas superiores. *Revista Portuguesa de medicina geral e familiar.* 2006;22:613-623
- Teixeira J. SAHOS um problema de saúde pública – Pertinência da gestão integrada da doença para a sua abordagem na comunidade. Dissertação de Mestrado. Escola Nacional de Saúde Pública de Lisboa, Universidade Nova de Lisboa. 2007 in Martinho CMSC. Educação do doente com síndrome de apneia obstrutiva do sono. Dissertação de Mestrado. Instituto de Educação da Universidade de Lisboa. 2010
- Weaver TE, Grunstein RR. Adherence to continuous positive airway pressure therapy. *Proc Am Thorac Soc.* 2008;5(2):173-178
- WHO. Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases: A comprehensive approach. World Health Organization. 2007. Acesso: Junho de 2015  
(<http://www.who.int/gard/publications/GARD%20Book%202007.pdf?ua=1>)

- Won CHJ, Lin KK, Guilleminault C. Surgical treatment of obstructive sleep apnea: upper airway and maxillomandibular surgery. *Proc Am Thorac Soc.* 2008;5(2):193-199
- Yan S, Chen S, Li Z, Wang H, Huang T, Wang X, et al. Biochemical characterization of human peroxiredoxin 2, an antioxidative protein. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2012;44(9):759-764
- Young T, Peppard PE, Gottlieb DJ. Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population health perspective. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165(9):1217-1239
- Zancanella E, Haddad FM, Oliveira LAMP, Nakasato A, Duarte BB, Soares CFP, et al. Obstructive sleep apnea and primary snoring: treatment. *Braz J of Otorhinolaryngol.* 2014;80:17-28
- Zappulla D. Environmental stress, erythrocyte dysfunctions, inflammation, and the metabolic syndrome: adaptations to CO<sub>2</sub> increases?. *J Cardiometab Syndr.* 2008;3(1):30-34

# **VIII. ANEXOS**

## **A. Composição de Soluções**

### **A1.1 Tampão de Transferência Incompleto (10x)**

30,2g Tris-HCL 0,025 M;  
144g Glicina 0,192 M;  
Perfazer com água tipo II para um volume final de 1L.

### **A1.2 Tampão de Transferência Completo**

100 mL Tampão de transferência incompleto;  
200 mL Metanol;  
Perfazer com água tipo II para um volume final de 1L.

### **A1.3 Ponceau S a 0,1% em 5% de Ácido Acético**

50 mL *Ponceau S* a 0,1%;  
450 mL ácido acético a 5%.

### **A1.4 PBS 1x (Tampão de Fosfato Salino)**

100 mL meio mineral 10x;  
900 mL água tipo II.

### **A1.5 PBS-T (Tampão de Fosfato Salino com *Tween 20* a 0,1%)**

100 mL PBS 1x;  
900 mL água tipo II;  
1 mL *Tween 20* a 0,1%.

## B. Tabelas

### B1.1 Cohort I – Caracterização Demográfica, Polissonográfica e Analítica dos indivíduos Roncadores e com SAOS.

Caracterização Demográfica, Polissonográfica e Analítica					
Parâmetros Demográficos e Polissonográficos	Parâmetros Seleccionados				p value Roncadores vs SAOS
	Roncadores (n=12)		SAOS (n=12)		
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	
Idade (anos)	46,8	10,0	45,8	7,2	NS
<b>Hábitos</b>					
Hábitos tabágicos (n)	6,0	-	4,0	-	NS
Hábitos alcoólicos (n)	7,0	-	6,0	-	NS
Pontuação EPW	9,1	4,3	11,7	6,5	NS
<b>Características Observacionais</b>					
Pressão arterial matinal	141,3	23,1	129,8	13,1	NS
TAS/TAD (mmHg)	88,8	14,6	78,9	8,3	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	26,9	2,7	30,8	1,9	<b>0,0002</b>
Perímetro abdominal (cm)	97,5	6,9	107,4	8,6	<b>0,005</b>
<b>Comorbidades</b>					
Hipertensão (n)	6,0	-	4,0	-	NS
Doenças respiratórias (n)	3,0	-	1,0	-	NS
Dislipidemia (n)	8,0	-	10,0	-	NS
<b>Parâmetros Polissonográficos</b>					
IDR (eventos/h)	2,7	1,5	41,9	20,5	<b>5,96E-07</b>
Índice de despertar (eventos/h)	12,6	4,8	34,6	18,4	<b>0,0003</b>
Saturação arterial mínima (%)	87,4	4,1	80,5	7,6	<b>0,006</b>
T90 (%)	0,1	0,2	19,4	24,6	<b>0,006</b>
IDO (eventos/h)	3,0	4,4	41,2	27,0	<b>3,79E-05</b>
Eficiência do sono (%)	76,7	14,1	82,1	6,8	NS
<b>Parâmetros Analíticos</b>					
<b>Perfil Glicémico</b>					
Glucose (70-110 mg/dl)	95,2	8,5	96,7	12,0	NS
Hb A1C (4-6%)	5,7	0,4	5,8	0,4	NS
Insulina (3-25 mU/L)	11,0	6,2	20,6	12,5	<b>0,013</b>
MRHO-RI (≥ 3,8)	2,6	1,6	5,0	3,0	<b>0,012</b>
<b>Perfil Lipídico</b>					
Colesterol (< 190 mg/dl)	206,2	44,3	193,0	30,8	NS
Triglicéridos (< 150 mg/dl)	127,3	69,7	217,1	127,7	<b>0,022</b>
<b>Marcador Cardiovascular</b>					
Homocisteína (3,7-13,9 µmol/L)	15,6	4,3	15,1	2,9	NS
<b>Catecolaminas Urinárias</b>					
Adrenalina (1,7-22,4 µg/24h)	15,0	15,5	10,8	9,3	NS
Nor-adrenalina (12,1-85,5 µg/24h)	73,5	34,0	75,0	37,4	NS
Dopamina (0-498 µg/24h)	389,4	218,4	367,3	169,5	NS
<b>Hemograma Completo</b>					
Eritrócitos (4,5-5,9x10 <sup>12</sup> /L)	5,0	0,4	5,1	0,5	NS
Hemoglobina (13-17,5 g/dl)	15,4	0,8	15,2	1,6	NS
Hematócrito (40-50%)	45,9	2,1	45,1	4,1	NS
VCM (80-97 fl)	91,9	6,4	88,9	4,1	NS
HCM (27-33 pg)	30,9	1,8	30	1,6	NS
CHCM (31,5-35,5 g/dl)	33,6	1,0	33,7	1,1	NS
DVE (11,5-14,5)	13,4	0,7	13,5	0,9	NS
Leucócitos (4,0-11x10 <sup>9</sup> /L)	6,7	1,2	7,8	2,3	NS
Plaquetas (150-450 10 <sup>3</sup> µL)	237,8	40,1	261,7	77,2	NS

**B1.2 Cohort II – Caracterização Demográfica, Polissonográfica e Analítica dos indivíduos Roncadores, com SAOS e com tratamento CPAP (6 meses).**

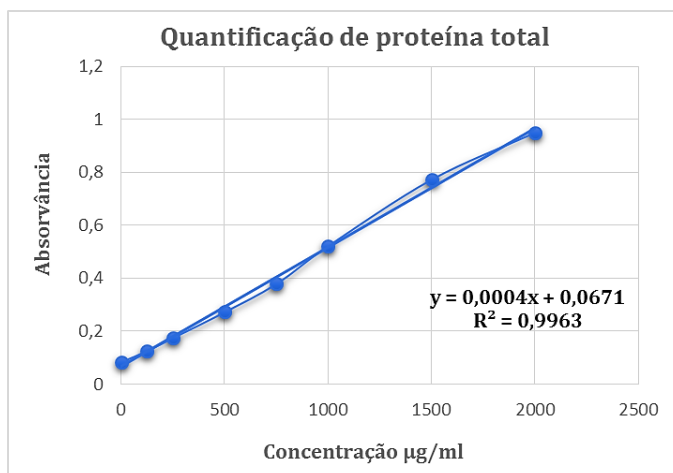
Caracterização Demográfica, Polissonográfica e Analítica								
Parâmetros Demográficos e Polissonográficos	Parâmetros Seleccionados						p value Roncadores vs SAOS	p value SAOS vs CPAP
	Roncadores (n=10)		SAOS (n=10)		CPAP (n=10)			
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão		
Idade (anos)	43,6	11,9	43	7,1	-	-	NS	NS
<b>Hábitos</b>								
Hábitos tabágicos (n)	4,0	-	2,0	-	-	-	NS	NA
Hábitos alcoólicos (n)	5,0	-	6,0	-	-	-	NS	NA
Pontuação EPW	11,7	4,8	11,5	4,5	6,6	4,7	NS	<b>0,0003</b>
<b>Características Observacionais</b>								
Pressão arterial matinal	138,6	21,7	124,2	18,3	-	-	NS	NA
TAS/TAD (mmHg)	85,1	13,5	77,8	12,3	-	-	NS	NA
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27,5	3,9	29,6	2,3	-	-	NS	NA
Perímetro abdominal (cm)	98	9,3	105	8,8	-	-	NS	NA
<b>Comorbidades</b>								
Hipertensão (n)	5,0	-	5,0	-	-	-	NS	NA
Doenças respiratórias (n)	0,0	-	0,0	-	-	-	NS	NA
Dislipidemia (n)	7,0	-	7,0	-	-	-	NS	NA
<b>Parâmetros Polissonográficos</b>								
IDR (eventos/h)	3,3	1,2	34,8	26,5	-	-	<b>0,001</b>	NA
Índice de despertar (eventos/h)	12,8	4,8	34,7	19,8	-	-	<b>0,002</b>	NA
Saturação arterial mínima (%)	87,4	3,4	81,0	7,4	-	-	<b>0,012</b>	NA
T90 (%)	0,1	0,1	12,6	19,5	-	-	<b>0,028</b>	NA
IDO (eventos/h)	5,2	5,9	28,8	27,4	-	-	<b>0,008</b>	NA
Eficiência do sono (%)	79,8	14,3	80,4	12,7	-	-	NS	NA
<b>Registo CPAP</b>								
Nº de dias sem uso	-	-	-	-	54,4	63,7	-	NA
Total de dias de uso	-	-	-	-	200,0	21,5	-	NA
Uso por noite (minutos)	-	-	-	-	269,7	123,4	-	NA
IAH residual (eventos/hora)	-	-	-	-	1,6	1,1	-	NA
<b>Parâmetros Analíticos</b>								
<b>Perfil Glicémico</b>								
Glucose (70-110 mg/dl)	96,1	8,1	95,1	11,9	95,3	11,2	NS	NS
Hb A1C (4-6%)	5,6	0,4	5,7	0,4	5,7	0,3	NS	NS
Insulina (3-25 mU/L)	11,5	6,9	20,7	13,5	28,9	40,9	<b>0,036</b>	NS
MRHO-RI (≥ 3,8)	2,8	1,8	5,0	3,2	7,2	10,8	<b>0,036</b>	NS
<b>Perfil Lipídico</b>								
Colesterol (< 190 mg/dl)	200,9	39,8	181,1	23,6	178,9	28,1	NS	NS
Triglicéridos (< 150 mg/dl)	128,5	70,7	169,6	90,7	153,4	69,9	NS	NS
<b>Marcador Cardiovascular</b>								
Homocisteína (3,7-13,9 µmol/L)	14,7	4,3	14,1	2,8	15,4	2,0	NS	NS
<b>Catecolaminas Urinárias</b>								
Adrenalina (1,7-22,4 µg/24h)	17,3	15,3	9,9	9,1	20	7,7	NS	<b>0,0103</b>
Nor-adrenalina (12,1-85,5 µg/24h)	56,9	15,9	64,1	36,9	54,3	25,6	NS	NS
Dopamine (0-498 µg/24h)	301,7	117,7	244,8	105,5	258,8	123,3	NS	NS
<b>Hemograma Completo</b>								
Eritrócitos (4,5-5,9x10 <sup>12</sup> /L)	5,0	0,5	5,1	0,4	4,9	0,3	NS	<b>0,018</b>
Hemoglobina (13-17,5 g/dl)	15,4	0,9	15,5	1,2	15,1	1,0	NS	<b>0,041</b>
Hematócrito (40-50%)	45,7	2,4	45,7	3,3	44,1	3,1	NS	<b>0,008</b>
VCM (80-97 fl)	91,5	5,3	89,5	3,3	89,7	3,4	NS	NS
HCM (27-33 pg)	30,7	1,2	30,2	1,3	30,7	1,2	NS	NS
CHCM (31,5-35,5 g/dl)	33,6	1,1	33,8	0,9	34,3	0,8	NS	<b>0,051</b>
DVE (11,5-14,5)	13,3	0,5	13,2	0,9	13,8	0,6	NS	<b>0,030</b>
Leucócitos (4,0-11x10 <sup>9</sup> /L)	7,1	1,0	7,6	1,8	7,2	1,8	NS	NS
Plaquetas (150-450 10 <sup>3</sup> µL)	241,5	31,1	238,5	46,2	203,4	47,8	NS	<b>0,012</b>

**B1.3** Tabela com a designação dos indivíduos Roncadores, com SAOS e CPAP 6 meses (n=50), utilizados na validação por *western blotting*, nas proteínas Catalase (CAT), Peroxiredoxina 2 (Prx2) e Peroxiredoxina 2 hiperoxidada (PrxSO<sub>2/3</sub>).

<b>Indivíduos</b>						
<b>Nº</b>	<b>Roncadores</b>		<b>Nº</b>	<b>SAOS</b>		<b>CPAP</b>
	<b>Noite</b>	<b>Manhã</b>		<b>Noite</b>	<b>Manhã</b>	
<b>1</b>	RE1	RM1	<b>1</b>	SE1	SM1	S1-CPAP
<b>2</b>	RE2	RM2	<b>2</b>	SE2	SM2	S2-CPAP
<b>3</b>	RE3	RM3	<b>3</b>	SE3	SM3	S3-CPAP
<b>4</b>	RE4	RM4	<b>4</b>	SE4	SM4	S4-CPAP
<b>5</b>	RE5	RM5	<b>5</b>	SE5	SM5	S5-CPAP
<b>6</b>	RE6	RM6	<b>6</b>	SE6	SM6	S6-CPAP
<b>7</b>	RE7	RM7	<b>7</b>	SE7	SM7	S7-CPAP
<b>8</b>	RE8	RM8	<b>8</b>	SE8	SM8	S8-CPAP
<b>9</b>	RE9	RM9	<b>9</b>	SE9	SM9	S9-CPAP
<b>10</b>	RE10	RM10	<b>10</b>	SE10	SM10	S10-CPAP

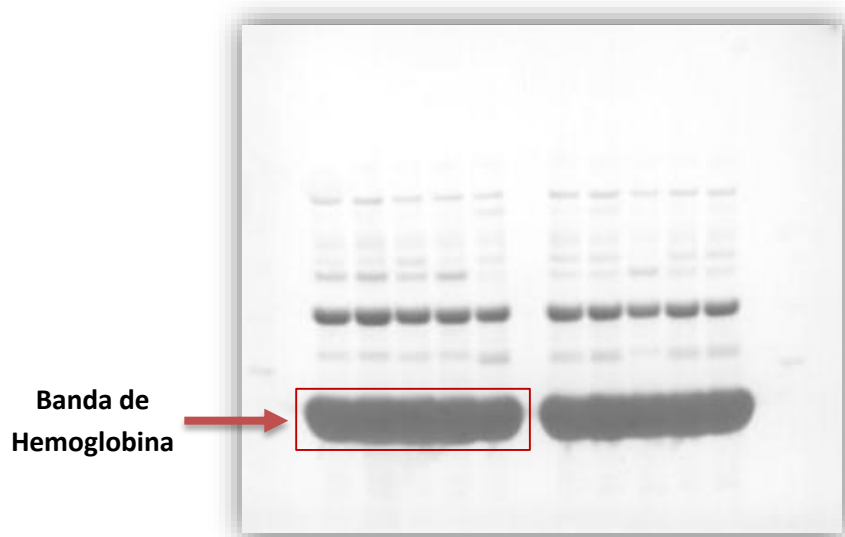
**C. Quantificação de proteína total nas amostras preparadas de GVs (1:200) de indivíduos Roncadores, com SAOS e CPAP 6 meses (n=50).**

[Standards]	Absorvância ( $\lambda = 660 \text{ nm}$ )		Média
0	0,091	0,077	<b>0,084</b>
125	0,139	0,114	<b>0,127</b>
250	0,164	0,187	<b>0,175</b>
500	0,283	0,263	<b>0,273</b>
750	0,350	0,409	<b>0,380</b>
1000	0,523	0,521	<b>0,522</b>
1500	0,783	0,763	<b>0,773</b>
2000	0,943	0,956	<b>0,950</b>



Amostras 1:200	Quantidade para 70 $\mu\text{g}$ de proteína ( $\mu\text{L}$ )	Amostras 1:200	Quantidade para 70 $\mu\text{g}$ de proteína ( $\mu\text{L}$ )
CE1	68,9	CE6	56,1
CM1	64,7	CM6	49,4
SE1	59,5	SE6	58,0
SM1	55,8	SM6	52,2
CPAP1	74,5	CPAP6	52,6
CE2	68,9	CE7	54,9
CM2	72,2	CM7	57,7
SE2	50,5	SE7	49,6
SM2	48,9	SM7	52,0
CPAP2	46,7	CPAP7	53,6
CE3	43,0	CE8	56,5
CM3	59,0	CM8	50,1
SE3	33,9	SE8	49,3
SM3	48,2	SM8	47,0
CPAP3	63,8	CPAP8	51,2
CE4	60,8	CE9	59,0
CM4	62,1	CM9	56,3
SE4	59,1	SE9	56,8
SM4	55,0	SM9	58,1
CPAP4	63,4	CPAP9	57,9
CE5	58,1	CE10	51,8
CM5	50,8	CM10	54,5
SE5	43,2	SE10	59,0
SM5	50,6	SM10	62,8
CPAP5	55,5	CPAP10	60,0

D. Exemplo de uma membrana com a banda de hemoglobina. Banda normalizadora deste estudo, utilizada no *software Image J*.



## E. Tabela das proteínas identificadas e diferencialmente expressas nos grupos em estudo.

Spot	Nome da Proteína	Accession ID	MW/pI	Mascot Score	Sequense Coverage (%)	Anova (p)	Fold (Anova p<0.05)	Roncadores N vs Roncadores M		SAOS N vs SAOS M		Roncadores M vs SAOS M		Roncadores N vs SAOS N		All Roncadores vs All SAOS		All N vs All M	
								Anova (p)	Fold (Anova p<0.05)	Anova (p)	Fold (Anova p<0.05)	Anova (p)	Fold (Anova p<0.05)	Anova (p)	Fold (Anova p<0.05)	Anova (p)	Fold (Anova p<0.05)	Anova (p)	Fold (Anova p<0.05)
1366	Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1	ACTB_HUMAN	42052/5,29	73	20	0,0155	1,4	0,104	-	0,149	-	0,076	-	0,072	-	0,016	1,2	0,055	1,2
882	Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1	ACTB_HUMAN	42052/5,29	26	2	0,0420	1,2	0,167	-	0,255	-	0,002	1,1	0,275	-	0,020	1,1	0,131	-
1055	Arginine and glutamate-rich protein 1 OS=Homo sapiens GN=ARGLU1 PE=1 SV=1	ARGL1_HUMAN	33197/10,35	60	11	0,0363	1,5	0,173	-	0,068	-	0,876	-	0,015	1,3	0,170	-	0,029	1,3
1328	Catalase OS=Homo sapiens GN=CAT PE=1 SV=3	CATA_HUMAN	59719/6,90	896	34	3,80E-06	1,4	0,002	1,3	7,61E-05	1,4	0,364	-	0,268	-	0,866	-	2,02E-07	1,3
1330	Catalase OS=Homo sapiens GN=CAT PE=1 SV=3	CATA_HUMAN	59719/6,90	730	31	0,0005	1,3	0,004	1,1	0,005	1,3	0,005	1,2	0,898	-	0,298	-	2,39E-04	1,2
716	Catalase OS=Homo sapiens GN=CAT PE=1 SV=3	CATA_HUMAN	59719/6,90	797	29	0,0009	1,3	0,028	1,1	0,004	1,3	0,058	-	0,451	-	0,661	-	2,43E-04	1,2
1332	Catalase OS=Homo sapiens GN=CAT PE=1 SV=3	CATA_HUMAN	59719/6,90	253	7	0,0020	1,3	0,063	-	0,003	1,3	0,589	-	0,178	-	0,644	-	2,96E-04	1,2
1669	Catalase OS=Homo sapiens GN=CAT PE=1 SV=3	CATA_HUMAN	59719/6,90	663	25	0,0095	1,3	0,156	-	0,004	1,3	0,560	-	0,242	-	0,697	-	0,002	1,2
1335	Catalase OS=Homo sapiens GN=CAT PE=1 SV=3	CATA_HUMAN	59719/6,90	397	21	0,0120	1,4	0,016	1,1	0,026	1,4	0,248	-	0,324	-	0,823	-	0,003	1,2
981	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Homo sapiens GN=ALDOA PE=1 SV=2	ALDOA_HUMAN	39851/8,30	76	24	0,0335	1,8	0,111	-	0,110	-	0,858	-	0,015	1,8	0,066	-	0,510	-
1137	Glutamate--cysteine ligase regulatory subunit OS=Homo sapiens GN=GCLM PE=1 SV=1	GSHO_HUMAN	30708/5,69	235	26	0,0195	1,2	0,923	-	0,037	1,2	0,729	-	0,043	1,2	0,149	-	0,060	-
617	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B OS=Homo sapiens GN=HSPA1A PE=1 SV=5	HSP71_HUMAN	70294/5,48	201	29	0,0069	1,8	0,009	1,3	0,073	-	0,289	-	0,015	1,4	0,044	1,4	0,010	1,4
570	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens GN=HSPA8 PE=1 SV=1	HSP7C_HUMAN	70854/5,37	52	2	0,0187	1,2	0,674	-	0,243	-	0,001	1,2	0,154	-	0,003	1,1	0,346	-
619	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens GN=HSPA8 PE=1 SV=1	HSP7C_HUMAN	70854/5,37	380	23	0,0004	2,1	0,001	1,4	0,010	1,7	0,498	-	0,006	1,5	0,076	-	0,001	1,6
1443	Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens GN=HBB PE=1 SV=2	HBB_HUMAN	16102/6,75	142	63	0,0046	1,3	0,557	-	0,022	1,2	0,645	-	0,001	1,3	0,011	1,2	0,239	-
1374	Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens GN=HBB PE=1 SV=2	HBB_HUMAN	16102/6,75	61	8	0,0241	1,4	0,026	1,2	0,078	-	0,239	-	0,381	-	0,229	-	0,005	1,2
1007	L-lactate dehydrogenase B chain OS=Homo sapiens GN=LDHB PE=1 SV=2	LDHB_HUMAN	36615/5,72	412	32	0,0033	1,3	0,101	-	0,012	1,2	0,129	-	0,071	-	0,045	1,1	0,006	1,2
1705	Peroxiredoxin-2 OS=Homo sapiens GN=PRDX2 PE=1 SV=5	PRDX2_HUMAN	22049/5,66	857	64	0,0313	1,2	0,888	-	0,007	1,2	0,005	1,2	0,397	-	0,516	-	0,061	-
1238	Probable global transcription activator SNF2L2 OS=Homo sapiens GN=SMARCA2 PE=1 SV=2	SMCA2_HUMAN	181166/6,76	34	4	0,0186	1,3	0,313	-	0,125	-	0,024	1,2	0,152	-	0,011	1,2	0,100	-
827	26S protease regulatory subunit 6A OS=Homo sapiens GN=PSMC3 PE=1 SV=3	PRS6A_HUMAN	49458/5,13	117	30	0,0063	1,4	0,077	-	0,131	-	0,021	1,2	0,097	-	0,009	1,2	0,039	1,2
1099	Proteasome subunit alpha type-1 OS=Homo sapiens GN=PSMA1 PE=1 SV=1	PSA1_HUMAN	29822/6,15	166	39	0,0011	1,2	0,866	-	0,036	1,2	0,153	-	0,003	1,2	0,002	1,2	0,194	-
1347	14-3-3 protein epsilon OS=Homo sapiens GN=YWHAE PE=1 SV=1	1433E_HUMAN	29155/4,63	96	4	0,0071	1,4	0,012	1,3	0,141	-	0,034	1,2	0,759	-	0,159	-	0,005	1,2
1120	Purine nucleoside phosphorylase OS=Homo sapiens GN=PNP PE=1 SV=2	PNPH_HUMAN	32097/6,45	542	40	0,0192	1,2	0,076	-	0,025	1,2	0,173	-	0,708	-	0,662	-	0,003	1,1
1232	Putative inactive group IIC secretory phospholipase A2 OS=Homo sapiens GN=PLA2G2C PE=3 SV=3	PA2GC_HUMAN	16833/8,84	13	14	0,0164	1,2	0,970	-	0,540	-	0,021	1,1	0,036	1,2	0,001	1,2	0,661	-
1118	Putative uncharacterized protein FLJ45399 OS=Homo sapiens PE=5 SV=1	YL004_HUMAN	18957/10,14	32	10	0,0123	1,2	0,209	-	0,009	1,2	0,127	-	0,434	-	0,779	-	0,003	1,1
1149	Putative zinc finger protein 861 OS=Homo sapiens GN=ZNF861P PE=5 SV=1	ZN861_HUMAN	11989/8,91	30	17	0,0367	1,2	0,064	-	0,168	-	0,013	1,1	0,349	-	0,077	-	0,027	1,1
808	RuvB-like 1 OS=Homo sapiens GN=RUVBL1 PE=1 SV=1	RUVB1_HUMAN	50538/6,02	64	19	0,0005	1,3	0,151	-	0,001	1,3	0,682	-	0,005	1,2	0,069	-	0,002	1,2
1409	Serine/threonine-protein phosphatase 2A activator OS=Homo sapiens GN=PPP2R4 PE=1 SV=3	PTPA_HUMAN	40641/5,63	246	17	0,0001	1,3	0,048	1,1	0,001	1,3	0,862	-	0,012	1,2	0,131	-	2,77E-04	1,2
938	Uroporphyrinogen decarboxylase OS=Homo sapiens GN=UROD PE=1 SV=2	DCUP_HUMAN	40761/5,77	32	2	0,0066	1,3	0,303	-	0,157	-	0,031	1,1	0,029	1,2	0,003	1,2	0,141	-
944	Uroporphyrinogen decarboxylase OS=Homo sapiens GN=UROD PE=1 SV=2	DCUP_HUMAN	40761/5,77	134	8	0,0095	1,2	0,180	-	0,127	-	0,077	-	0,027	1,1	0,007	1,1	0,074	-

