

Instituto Politécnico de Lisboa  
Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

## **Biomarcadores de Disfunção Tubular em Doenças Cardiometabólicas**

Ana Rita Serafim Sequeira

Prof. Doutora Sofia Pereira – NOVA Medical School|Faculdade de  
Ciências Médicas, NMS|FCM, Universidade Nova de Lisboa;

Doutora Judit Morello – NOVA Medical School|Faculdade de Ciências  
Médicas, NMS|FCM, Universidade Nova de Lisboa;

Prof. Doutora Ana Sofia Tavares - Escola Superior de Tecnologia da  
Saúde de Lisboa

**Mestrado em Tecnologias Clínico – Laboratoriais**

*Lisboa, 2022*

Instituto Politécnico de Lisboa  
Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

## **Biomarcadores de Disfunção Tubular em Doenças Cardiometabólicas**

Ana Rita Serafim Sequeira

Prof. Doutora Sofia Pereira – NOVA Medical School|Faculdade de  
Ciências Médicas, NMS|FCM, Universidade Nova de Lisboa

Doutora Judit Morello – NOVA Medical School|Faculdade de Ciências  
Médicas, NMS|FCM, Universidade Nova de Lisboa

Prof. Doutora Ana Sofia Tavares - Escola Superior de Tecnologia da  
Saúde de Lisboa

Júri:

Prof. Doutora Teresa Maria de Castro Cunha Alves Monteiro – NOVA  
Medical School|Faculdade de Ciências Médicas, NMS|FCM,  
Universidade Nova de Lisboa

Prof. Doutora Edna Soraia Gregório Ribeiro- Escola Superior de  
Tecnologia da Saúde de Lisboa

**Mestrado em Tecnologias Clínico – Laboratoriais**

*Lisboa, 2022*



## Agradecimentos

Gostaria de agradecer à Profª Doutora Sofia Pereira e Doutora Judit Morello por esta oportunidade de me acolher no seu grupo de investigação durante estes meses.

Agradecer a professora Profª Doutora Ana Sofia Tavares, por ter aceite ser minha orientadora.

Gostaria de agradecer sobretudo à Catarina Sequeira, porque sem ela esta tese não poderia ter sido realizada. Muito obrigada por todos os esforços e ajuda disponibilizada para a realização deste projeto. Gostaria de agradecer acima de tudo pela amizade.

Agradecer a Maria João Correia e ao António Pimpão pela disponibilidade e ajuda.

Agradecer ainda a minha família, porque sem vocês não seria possível realizar esta etapa e obrigada por todo o apoio em todos os momentos.

Por fim, agradecer aos meus amigos pelo apoio nestes momentos.



## Resumo

**Introdução:** A apneia obstrutiva do sono (SAOS) é uma doença respiratória relacionada com o sono caracterizada por obstrução parcial (hipoapneia) ou total (apneia) das vias aéreas e a sua principal característica clínica é a hipoxia crónica intermitente (HCI) que é responsável pelo desenvolvimento de hipertensão arterial, particularmente nos homens. Importante, a hipertensão arterial (HTA) é um fator de risco principal e modificável para a mortalidade e morbidade cardiovascular e a SAOS é uma causa principal de hipertensão.

A SAOS é tratada por pressão positiva contínua das vias aéreas (CPAP), mas a aderência é baixa e assim os doentes acabam por desenvolver HTA. Outra preocupação é que a HTA é uma doença silenciosa, geralmente diagnosticada tardiamente e, conseqüentemente, numa fase irreversível. Assim, uma necessidade não satisfeita na gestão da SAOS, é a disponibilidade de biomarcadores de risco para identificar os doentes com maior risco de desenvolver hipertensão.

**Objetivos:** Caracterizar a impressão digital tiolómica da HTA associada à SAOS e produzir evidências sobre a relação entre a função tubular em doentes com doenças cardiometabólicas, nomeadamente Síndrome da Apneia Obstrutiva do Sono (SAOS) e Hipertensão Arterial (HTA).

**Metodologia:** O perfil tiolómico foi determinado pelo método de cromatografia líquida de alto rendimento com detetor de fluorescência (HPLC-FD), em 90 amostras de soro e 149 de urina da coorte de estudo da Kyntosa. O estudo obteve parecer favorável da comissão de ética e foram conduzidas em conformidade com a Declaração de Helsínquia. Além disso, todos os pacientes deram o seu consentimento informado por escrito.

**Resultados:** Tanto o soro como a urina apresentaram uma elevada variabilidade interindividual (a partir de 18% a 74%).

No soro, a idade foi associada a todos os aminotióis e o sexo influenciou HCys e CysGly. A Cys T foi maior em pacientes com SAOS + HTA do que em pacientes com SAOS (217 [199-248]  $\mu$ M vs 202 [185-212]  $\mu$ M,  $p=0,0420$ ). Cys LT foi maior em pacientes com SAOS + HTA em comparação com pacientes com SAOS (71[14-99]  $\mu$ M vs 14[9-82]  $\mu$ M,  $p=0,0467$ ) e pacientes com HTA (71[14-99]  $\mu$ M vs 6 [5-11]  $\mu$ M,  $p <0,0001$ ). A GSSP, por outro lado, mostrou diferenciar SAOS vs SAOS + HTA (4 [3-5]  $\mu$ M vs 3[2-4]  $\mu$ M,  $p = 0,0416$ ) em homens.

Na urina, a idade mostrou influenciar os aminotióis Cys e GSH, ao contrário do sexo, que não influenciou nas concentrações de aminotióis. Os aminotióis urinários não influenciaram a

SAOS e/ou hipertensão. A uNAC foi influenciada pela idade e distinguiu SAOS + HTA vs HTA (22 [14-28]  $\mu$ M vs 13[10-27]  $\mu$ M,  $p= 0,0273$ ), apenas nos homens.

Por fim, a relação uNAC/Cys LT foi maior em pacientes com HTA do que em pacientes com SAOS + HTA (2[1-4]  $\mu$ M vs 0,3[0,1-1]  $\mu$ M,  $p<0,0001$ ).

**Conclusão:** Os resultados apontam marcadores promissores como indicadores de risco de hipertensão em pacientes com SAOS, principalmente a Cys LT e o GSSP no soro. Mais estudos são necessários para incluir outros parâmetros ainda não abordados neste estudo.

**Palavras-Chave:** Hipertensão; Apneia obstrutiva do sono; Disfunção Tubular; Perfil tiolômico; Biomarcadores.



## Abstract

**Introduction:** Obstructive sleep apnea (OSA) is a sleep-related respiratory disorder characterized by partial (hypopnoea) or total (apnoea) airway obstruction and its main clinical feature is chronic intermittent hypoxia (CIH) which is responsible for the development of arterial HTN, particularly in men. Importantly, arterial hypertension (HTN) is a main and modifiable risk factor for cardiovascular mortality and morbidity and OSA is a main cause of drug resistant hypertension.

OSA is treated by continuous positive airway pressure (CPAP), but adherence is low and thus patients end up developing HTN. Another concern is that HTN is a silent disease, usually late diagnosed and consequently at an irreversible stage. Thus, an unmet need in OSA management, is the availability of risk biomarkers to identify patients at higher risk of developing hypertension.

**Objective:** To characterize the thiolomic fingerprint of HTN associated with OSA and to produce evidence on the relationship between renal tubular function in patients with cardiometabolic diseases, namely Obstructive Sleep Apnoea (OSA) and hypertension (HTN).

**Methodology:** The thiolomic profile was determined by high performance liquid chromatography method with fluorescence detector (HPLC-FD), in 90 serum and 149 urine samples of Kytosa study cohort. These samples were in line with the ethics committee and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Also, all patients gave their written informed consent.

**Results:** Both serum and urine showed a high inter-individual variability in all aminothiols (from 18% to 74%).

In the serum, age was associated with all aminothiols and sex influenced HCys and CysGly. Cys T was higher in patients with OSA + HTN than in patients with OSA (217 [199-248]  $\mu\text{M}$  vs 202 [185-212]  $\mu\text{M}$ ,  $p=0,0420$ ). Cys LT was higher in OSA + HTN patients compared to OSA patients (71[14-99]  $\mu\text{M}$  vs 14[9-82]  $\mu\text{M}$ ,  $p=0,0467$ ) and patients with HTN (71[14-99]  $\mu\text{M}$  vs 6 [5-11]  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0,0001$ ). GSSP, on the other hand, was shown to differentiate OSA vs OSA+HTN (4 [3-5]  $\mu\text{M}$  vs 3[2-4]  $\mu\text{M}$ ,  $p = 0,0416$ ) in men.

In urine, age was shown to influence the aminothiols Cys and GSH, in contrast to gender, which did not impact aminothiols concentrations. Urinary aminothiols did not influence OSA and/or HTN. uNAC was influenced by age and distinguished OSA+HTN vs HTA (22 [14-28]  $\mu\text{M}$  vs 13[10-27]  $\mu\text{M}$ ,  $p=0,0273$ ), only in men.

Finally, the uNAC/Cys LT ratio was lower in patients with HTA than in patients with OSA+HTN (2[1-4]  $\mu$ M vs 0,3[0,1-1]  $\mu$ M,  $p < 0,0001$ ).

**Conclusions:** The results point to promising markers as risk indicators of hypertension in patients with OSA, the Cys LT and GSSP in serum. Further studies are needed to include other parameters not yet covered in this study.

**Keywords:** Arterial Hypertension; Obstructive Sleep Apnea; Tubular Dysfunction; Thiolic profile; Biomarkers.



# Índice

Índice de Tabelas.....	xii
Índice de Figuras.....	xiii
Lista de Abreviaturas .....	xiv
1. Introdução.....	1
2. Contextualização Teórica .....	3
2.1. Apneia do Sono e Hipertensão .....	3
2.2. Relação da SAOS, o túbulo renal e a HTA.....	4
2.3. O tioloma e o uNAC como possíveis biomarcadores de HTA na SAOS.....	6
2.4. Diagnóstico de Disfunção renal e a via dos mercapturatos.....	9
3. Objetivos.....	12
4. Metodologia .....	13
4.1. Tipo de Estudo .....	13
4.2. População e Amostra .....	13
4.3. Procedimento .....	15
4.3.1. Quantificação de Aminotióis .....	15
4.3.1.1. Preparação da amostra.....	15
4.3.1.2. Preparação Curvas de Calibração .....	16
4.3.2. Método Cromatográfico .....	18
4.4 Variáveis do estudo .....	20
4.5. Tratamento e Análise Estatística dos dados.....	20
4.6. Considerações Éticas.....	21
5. Resultados.....	23
5.1. Caracterização da população do estudo .....	23
5.2. Perfil tiolômico sérico dos diferentes grupos de estudo .....	23
5.2.1. Variabilidade interindividual no perfil de tióis séricos.....	23
5.2.2. Influência dos fatores demográficos e antropométricos nas concentrações séricas dos aminotióis.....	24
5.2.3. Níveis séricos das diferentes frações dos aminotióis nos grupos de estudo .....	26
5.2.4. Níveis séricos dos aminotióis entre os grupos de estudo por sexo .....	28
5.2.5. Variáveis que se associam com os níveis de Cys LT de forma independente .....	29
5.3. Perfil tiolômico urinário dos diferentes grupos de estudo.....	30
5.3.1. Variabilidade interindividual no perfil de tióis urinários .....	30
5.3.2. Influência dos fatores demográficos e antropométricos nas concentrações urinárias dos aminotióis .....	30

5.3.3. Níveis urinários das diferentes frações dos aminotióis nos grupos de estudo .....	31
5.3.4. Níveis urinários dos aminotióis entre os grupos de estudo por sexo .....	32
5.4. Níveis urinários de mercapturatos de dissulfetos urinários nos diferentes grupos de estudo quantificados .....	33
5.4.1. Variabilidade interindividual nas concentrações uNAC .....	33
5.4.2. Influência dos fatores demográficos e antropométricos no uNAC .....	34
5.4.3. Níveis de uNAC nos diferentes grupos de estudo .....	35
5.4.4. Níveis de uNAC entre os grupos de estudo por sexo .....	35
5.4.5. Impacto do rácio uNAC/CysLT para discriminar os grupos de estudo.....	36
6. Discussão .....	38
7. Conclusões.....	41
8. Referências Bibliográficas.....	42
Anexo I .....	52

## Índice de Tabelas

Tabela 1. Valores de referência em diferentes matrizes biológicas (plasma, urina e soro) em indivíduos saudáveis. ....	8
Tabela 2. Concentrações dos Padrões utilizados para as curvas de calibração .....	18
Tabela 3. Dados demográficos, antropométricos e clínicos dos indivíduos incluídos no estudo (n=149).....	23
Tabela 4. Correlação entre a idade com as concentrações séricas dos aminotióis (n=90) .....	25
Tabela 5. Influência do sexo nas concentrações séricas dos aminotióis (n=90) .....	25
Tabela 6. Frações de Cisteína séricas que mostraram diferenças entre doentes com SAOS e HTA.....	26
Tabela 7. Correlação entre a idade e as concentrações urinárias dos aminotióis (n=149) .....	31

## Índice de Figuras

Figura 1.Mecanismo da Via dos Mercapturatos. (Gonçalves-Dias, C., et al 2019) .....	10
Figura 2.Esquema do método para quantificação de aminotióis. ....	16
Figura 3.Exemplo de Cromatograma de (A) soro e (B) urina.....	20
Figura 4.Variabilidade interindividual das concentrações séricas obtidas para (A) cisteína, (B) $\gamma$ -glutamilcisteína, (C) homocisteína, (D) cisteinilglicina e (E) glutatião....	24
Figura 5.Concentrações séricas obtidas para (A) cisteína, (B) $\gamma$ -glutamilcisteína, (C) homocisteína, (D) cisteinilglicina e (E) glutatião para os quatro grupos de estudo: Controlo, SAOS, SAOS + HTA e HTA .....	27
Figura 6.Concentrações séricas de (A) cisteína livre total, (B) cisteína total, (C) glutatião ligado as proteínas e (D) $\gamma$ -glutamilcisteína ligada as proteínas para os três grupos de estudo: Normotensos, SAOS, SAOS + HTA e HTA comparadas relativamente ao sexo do individuo .....	29
Figura 7.Variabilidade interindividual dos níveis urinários da (A) cisteína, (B) cisteinilglicina, (C) glutatião .....	30
Figura 8.Concentrações urinárias de (A) cisteína, (B) cisteinilglicina, (C) glutatião para os quatro grupos de estudo: Normotensos, SAOS, SAOS + HTA e HTA .....	32
Figura 9.Concentrações urinárias de (A) cisteína, (B) cisteinilglicina, (C) glutatião para os quatro grupos de estudo: Normotensos, SAOS, SAOS + HTA e HTA comparadas relativamente ao sexo do indivíduo .....	33
Figura 10.Variabilidade interindividual da concentração do indicador dos mercapturatos de dissulfetos urinários uNAC .....	34
Figura 11.Associação entre o uNAC e a idade dos indivíduos .....	34
Figura 12.Concentração de uNAC para os quatro grupos de estudo: Normotensos, SAOS, SAOS + HTA e HTA.....	35
Figura 13.Concentração de uNAC para os três grupos de estudo: Normotensos, SAOS, SAOS + HTA e HTA comparadas relativamente ao sexo do indivíduo .....	36
Figura 14. Rácio uNAC/sCysLT para os grupos de estudo: Normotensos, SAOS, SAOS + HTA e HTA comparadas relativamente a doença e ao sexo .....	37

## Lista de Abreviaturas

**AcNa** – Acetato de Sódio

**ATP** - Adenosina Trifosfato

**CO<sub>2</sub>** – Dióxido de Carbono

**CPAP** - Pressão positiva contínua nas vias aéreas

**Cys** – Cisteína

**CysSSP** – Cisteína ligada a proteínas

**CysGly** - Cisteinilglicina

**CysGlySSP** - Cisteinilglicina ligada a proteínas

**CV** – Coeficiente de Variação

**GluCys** –  $\gamma$ -glutamilcisteína

**GluCysSSP** –  $\gamma$ -glutamilcisteína ligada a proteínas

**GSH** – Glutatião

**GSSP** – Glutatião ligado a proteínas

**HCI** - Hipoxia crónica intermitente

**HCys** – Homocisteína

**HCysSP** – Homocisteína ligada a proteínas

**HPLC - FD** – High-Performance liquid chromatography with fluorescence detection

**HTA** – Hipertensão Arterial

**IAH** - Índice de Apneia e Hipopneia

**IMC** – Índice de Massa Corporal

**LT** - Livre Total

**NaCl** – Cloreto de Sódio

**NaOH**- Hidróxido de sódio

**Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>**– Tetraborato de Sódio

**RAAS** – Sistema Renina – Angiotensina - Aldosterona

**SAOS** – Síndrome da Apneia Obstrutiva do Sono

**SBD-F** - Ácido 7-fluorbenzofurazan-4- sulfónico, sal de amónio

**TCA**- Ácido tricloroacético

**TCEP** - Tris(2-carboxietilfosfina)

**uNAC** - Indicador dos mercapturatos de dissulfetos de cisteína

# 1. Introdução

---

A Síndrome da Apneia Obstrutiva do Sono (SAOS) é um distúrbio do sono, caracterizado por uma obstrução parcial (hipoapneia) ou total (apneia) das vias respiratórias onde ocorrem 5 ou mais episódios de apneia ou hipoapneia por hora de sono. Esta síndrome apresenta quatro características clínicas principais: a hipoxia crónica intermitente (HCl), a hipercapnia (aumento de dióxido de carbono no sangue), o aumento da pressão intratorácica e a fragmentação do sono. Destas quatro, a HCl encontra-se descrita como a característica mais preponderante no desenvolvimento da hipertensão (HTA) em pessoas com SAOS. (Dewan, Nieto & Somers, 2015; Floras, 2015)

A HTA é caracterizada por um aumento da pressão arterial, que pode ser dividida em 2 tipos: hipertensão essencial e hipertensão secundária. A primeira, de causa desconhecida, representa cerca de 90-95% dos casos. Já a hipertensão secundária, de causa conhecida, corresponde a 5-10% dos casos (Ibekwe, 2015; Azeez & Yusuf, 2018).

A relação entre estas duas patologias está associada para além dos ciclos de dessaturação/reoxigenação presentes na HCl associada à SAOS, à sobreativação do sistema nervoso simpático e do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), estes responsáveis pelo aumento do stress oxidativo e da inflamação, levando em última instância ao desenvolvimento da HTA. O rim é um órgão com um papel fundamental no controlo da pressão arterial e sabe-se que é afetado pela SAOS (Abuyassin, Sharma, Ayas & Laher, 2015). Concretamente, a nível do túbulo renal proximal, a ausência de oxigénio (O<sub>2</sub>) causada pela HCl provoca uma diminuição na produção de energia (ATP), levando assim a que os transportadores ativos, como os canais de bomba sódio-potássio, deixem de funcionar (Bouhamida *et al.*, 2022). Consequentemente, o sódio e as espécies reativas de oxigénio acumulam no meio intracelular das células proximais tubulares, tornando o túbulo proximal vulnerável à lesão, uma vez que para além de ser um local de reabsorção também é dependente de fosforilação oxidativa. (Gai, Gui, Kullak-Ublick, Li & Visentin, 2020).

A HTA é uma doença com alta taxa de morbilidade e mortalidade. As doenças cardiovasculares atingiram uma percentagem de óbitos de 29,7%, em que 32% dos óbitos correspondem à HTA (Portugal, MS, DGS, 2013; Pinto, Ribeiro, Cavallini, Duarte & Freitas 2016; Portugal, MS, DGS, 2017). Sendo por isso imperativo um marcador do risco de HTA nos doentes com SAOS, representando uma ferramenta de medicina de precisão.

Em condições de stress oxidativo (ex. Hipertensão), o nosso organismo apresenta mecanismos de defesa antioxidantes que podem ser enzimáticos, como acontece com as

enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), entre outras, ou não enzimáticos, como é o caso do papel dos aminotióis (Birben, Sahiner, Sackesen, Erzurum & Kalayci, 2012). Estes são compostos orgânicos de baixo peso molecular que contém um grupo tiol (-SH) na sua estrutura, como é o caso da cisteína (Cys), homocisteína (HCys), cisteinilglicina (CysGly) e o glutatião (GSH). Estes encontram-se todos relacionados na via dos mercapturatos, que é uma via de desintoxicação metabólica para espécies eletrofílicas geradas em condições inflamatórias e oxidativas localizada fundamentalmente no túbulo proximal renal. Nesta via os dissulfetos de cisteína (CysSSX) são acetilados pela N-acetiltransferase 8 (NAT8) (expressa nas células tubulares renais proximais) formando o, uNAC (substituto da N-acetil-CysSSX). Este é um possível biomarcador de disfunção tubular, visto ser possível avaliar, pela sua determinação analítica, a capacidade de o rim destoxificar (Gonçalves-Dias *et al*, 2019; Gonçalves-Dias *et al*, 2021).

Na prática clínica o tratamento dos doentes com apneia do sono carece de ferramentas que permitam informar os clínicos do risco de HTA nos indivíduos com apneia do sono. Neste sentido, a tese tem como objetivo investigar o perfil tiolómico da HTA associada à SAOS, através da quantificação do tioloma da urina, soro e uNAC.

Esta dissertação, redigida segundo as normas de orientação da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL), encontra-se separada por capítulos, correspondendo estes a diferentes fases do processo de investigação. Neste capítulo “Introdução” encontra-se uma breve apresentação da temática em estudo, bem como a questão de investigação e os objetivos definidos para o estudo. No capítulo “Contextualização Literária” situa-se o enquadramento teórico na base da investigação. De seguida, no capítulo “Metodologia” está descrita toda a fase metodológica: descrição do estudo clínico do qual procedem as amostras usadas nesta tese (critérios de inclusão e exclusão, desenho do estudo, tipo de amostras biológicas recolhidas, dados demográficos, clínicos e antropométricos recolhidos, centros clínicos envolvidos), as variáveis de investigação, metodologia analítica para quantificação dos aminotióis, análise estatística e o seu tratamento e ainda outras considerações. Os resultados obtidos estão apresentados no capítulo “Resultados” e a interpretação dos mesmos é feita no capítulo seguinte “Discussão”. O capítulo “Conclusão” compreende as considerações finais do estudo.

## **2.Contextualização Teórica**

### **2.1. Apneia do Sono e Hipertensão**

A síndrome da apneia obstrutiva do sono (SAOS) é um distúrbio do sono, caracterizada por uma obstrução parcial (hipoapneia) ou total (apneia) das vias respiratórias, ocorrendo 5 ou mais episódios de apneia ou hipoapneia por hora de sono, sendo por isso a hipoxia crônica intermitente uma característica clínica *core* da SAOS. A SAOS apresenta uma prevalência mundial de 4-15% em adultos tendo uma maior prevalência em homens e correlaciona-se com o envelhecimento e com a obesidade (Young, Palta, Dempsey, Skatrud, Weber, & Badr, 1993; Durán, Esnaola, Rubio & Iztueta, 2001; Punjabi, 2008; Jennum & Riha, 2009; Jennum & Kjellberg, 2011; Peppard, Young, Barnett, Palta, Hagen, & Hla, 2013; Ekiz, Kara, Ricci & Özçakar, 2021).

A SAOS é diagnosticada com recurso à polissonografia, em que são avaliados os índices de apneia e hipoapneia (IAH), com base nos quais é classificada a severidade da SAOS: ligeira (IAH = 5-14 /hora), moderada (IAH = 15-30/hora) e severa (IAH > 30/hora) (American Academy of Sleep Medicine Task, 1999; Mannarino, Di Filippo, & Pirro, 2012; Dewan *et al* ,2015).

As causas da SAOS são multifatoriais, podendo ter uma origem anatómica ou outra. Como possíveis causas anatómicas temos como exemplos, o aumento do comprimento das vias aéreas (importante em homens), da espessura da parede lateral e aumento do tecido mole (presente na obesidade), língua grande e alterações de volume e estrutura músculo-esquelética (redução do maxilar e/ou tamanho mandibular) (Kapur, 2010). Como outras causas está documentada a capacidade de resposta inadequada dos músculos dilatadores enquanto a pessoa dorme (em particular o músculo genioglosso), levando à interrupção do sono prematuramente e ao estreitamento das vias aéreas (também chamado limiar de excitação respiratória baixa) (Kapur, 2010; Eckert, White, Jordan, Malhotra & Wellman, 2013).

A SAOS está associada a múltiplas morbidades cardiometabólicas, fatores de risco para a morte por acidente vascular cerebral e enfarte do miocárdio. Sendo as comorbidades mais estudadas a hipertensão arterial (HTA), a diabetes mellitus tipo 2 e a obesidade. Para além da pressão arterial elevada, também a resistência à insulina, a intolerância à glucose e a dislipidemia estão fortemente associadas à SAOS. Já a obesidade é um dos maiores fatores de risco para a SAOS. A obesidade, promove esta doença visto que a deposição de gordura nos tecidos ao redor das vias aéreas superiores leva ao colapso das mesmas e predispõe apneia (Romero-Corral, Caples, Lopez-Jimenez & Somers, 2010; Jehan *et al.*, 2017; Anitua, Durán-Cantolla, Almeida & Alkhraisat, 2020).

A SAOS apresenta quatro características clínicas principais: a hipoxia crónica intermitente (HCI), a hipercapnia (aumento dos níveis arteriais de CO<sub>2</sub> originado por um fluxo de ar obstruído), o aumento da pressão intratorácica e a fragmentação do sono, sendo a HCI a mais preponderante no desenvolvimento da HTA (Dewan et al.,2015; Floras,2015).

A HTA é caracterizada por um aumento da pressão arterial, sendo caracterizada como normal alta, segundo a Sociedade Portuguesa de Hipertensão para valores entre 130-139 mmHg e 85-89 para a pressão sistólica e diastólica respetivamente (Sociedade Portuguesa de Hipertensão, 2022).

Estima-se que a nível mundial, 1,28 bilhões de pessoas (30-79 anos) tenham hipertensão (World Health Organization, 2021)

A HTA pode ser classificada em 2 tipos: hipertensão essencial e hipertensão secundária. A primeira, de causa desconhecida, representa cerca de 90-95% dos casos. Já a secundária, de causa conhecida, corresponde a 5-10% dos casos e resulta da pré-existência de outras doenças (doença renal, diabetes, obesidade, SAOS) (Ibekwe,2015; Azeez & Yusuf ,2018). A SAOS é uma causa secundária de HTA e convém salientar que é a principal causa associada à hipertensão resistente à medicação anti-hipertensores (Calhoun *et al.*, 2008; Faselis, Dumas & Papademetriou, 2011; Parati *et al.*, 2014).

Até ao momento não se conhece a causa específica da SAOS, o que tem condicionado o desenvolvimento de estratégias terapêuticas. De fato, o atual tratamento de referência é o uso do dispositivo de pressão positiva contínua nas vias aéreas (CPAP), para evitar o colapso das mesmas, mas o uso de uma máscara durante o sono, não é fácil para o doente o que explica uma baixa taxa de adesão pelos doentes (30 a 50%) e, além disso, o seu efeito sob o controlo da pressão arterial é controverso (Rotenberg, Murariu & Pang, 2016).

## **2.2. Relação da SAOS, o túbulo renal e a HTA**

Os ciclos de dessaturação/reoxigenação que se associam com HCI característica da SAOS são responsáveis pelos mecanismos que levam ao aumento da pressão arterial e que incluem a sobreativação do sistema nervoso simpático e do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), aumento do stress oxidativo e da inflamação ao desenvolvimento da HTA (Giestas, Palma & Ramos,2010; Zhang & LY ,2012; Passali *et al* 2015).

Além da eliminação de compostos tóxicos, o túbulo renal tem um papel fundamental no controlo da pressão arterial através do SRAA e dos transportadores de sódio distribuídos que

se encontram ao longo do túbulo renal. O rim tem a capacidade de regular o volume do fluido corporal e a resistência vascular.

Embora a relação da doença renal induzida pela SAOS não seja das mais estudadas, vários trabalhos têm sugerido uma relação entre a SAOS e a doença renal (Pochetti *et al*, 2020). O túbulo proximal, ao ser um local de reabsorção dependente da fosforilação oxidativa (mitocondrial), torna-se vulnerável a condições de stress oxidativo, hipoxia, toxinas e distúrbios metabólicos. A falta de oxigênio ( $O_2$ ) e aumento de espécies reativas de oxigênio provocada pela HCl perturbam a capacidade das mitocôndrias para a produção de energia necessária para o transporte tubular de sódio (bomba de sódio-potássio) tornando o túbulo proximal vulnerável a lesão (Gai *et al.*, 2020; Tian & Liang, 2021; Bouhamida *et al.*, 2022),

De fato, o subdiagnóstico da SAOS é consensualmente aceite pela comunidade médica e científica e têm sido procurados possíveis marcadores associados à inflamação, alterações metabólicas e contexto stress oxidativo associado à SAOS. (Carpagnano, Kharitonov, Resta, Foschino-Barbaro, Gramiccioni & Barnes, 2002; Carpagnano, Kharitonov, Resta, Foschino-Barbaro, Gramiccioni & Barnes, 2003; Alonso-Fernández *et al.*, 2009; Montesi, Bajwa & Malhotra, 2012).

Um destes possíveis marcadores é a cisteína estudada pelo grupo da Cintra *et al* (Cintra *et al*, 2011), que concluiu, comparando um grupo de indivíduos com e sem SAOS, que os níveis de cisteína poderão ser mais elevados no grupo com SAOS.

A cisteína é precursora da síntese do glutatião, e ambos são importantes controladores da homeostase redox. Além disso, a cisteína também é uma fonte de metabolitos intracelulares relevantes e moléculas sinalizadoras, incluindo taurina, coenzima A (CoA), sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ) e persulfeto de cisteína (CysSSH), sendo todos essenciais na função renal: bioenergética, função e regulação da pressão arterial. A cisteína existe em 3 frações (livre reduzida (CysSH), livre oxidada (CysSSX) e ligada a proteínas (CysSSP), sendo que a ligada a proteína é a mais abundante em circulação no sangue. A CysSSP é uma forma de as proteínas de cisteína evitarem a oxidação irreversível, sendo também uma fonte de cisteína visto serem absorvidas pelos lisossomas das células tubulares (Sumayao, Newsholme, & McMorrow, 2018; Correia *et al*, 2022).

Várias particularidades das células tubulares renais destacam a relevância de cisteína para o rim. Uma das particularidades mais relevantes é que a via dos mercapturatos é exclusiva das células tubulares. Apresenta um papel importante como fornecedor de cisteína devido à alta capacidade de catabolizar o glutatião e os seus conjugados. Confere ainda proteção à célula tubular renal contra a toxicidade da cisteína, pois em excesso no organismo é tóxica (Correia *et al*, 2022).

### 2.3. O tioloma e o uNAC como possíveis biomarcadores de HTA na SAOS

Em condições de stress oxidativo, o nosso organismo apresenta mecanismos de defesa antioxidantes que podem ser enzimáticos (catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), entre outros) ou não enzimáticos, como o caso dos aminotióis (Birben *et al.*, 2012). Os aminotióis são aminoácidos contendo um grupo tiol (-SH), de baixo peso molecular, que desempenham funções importantes na sinalização celular, no metabolismo e na desintoxicação. O interesse crescente sobre o estudo destas moléculas, vem do seu envolvimento na patogénese de diversas doenças humanas como demonstrado já na comunidade científica, estando descritas associações das suas concentrações com o stress emocional e doenças cardiovasculares (Hackam, & Anand, 2003; Madamanchi, Vendrov & Runge, 2005).

Os aminotióis cisteína (Cys),  $\gamma$ -glutamilcisteína (GluCys), homocisteína (HCys), cisteínilglicina (CysGly), e o glutatião (GSH) encontram-se em três frações distintas: livre reduzida (CysSH), livre oxidada (CysSSX) e ligada a proteínas (CysSSP) considerando-se a fração total a soma das respetivas frações acima referidas (Fu *et al.*, 2019; Gonçalves-Dias *et al.*, 2019). O grupo de Farmacologia Cardiovascular e Metabólica definiu o conjunto destes aminotióis como o tioloma (Gonçalves-Dias *et al.*, 2019; Gonçalves-Dias *et al.*, 2021).

Estes aminotióis encontram-se todos correlacionados entre eles, visto que os percursores da síntese do glutatião são a cisteína, homocisteína e a  $\gamma$ -glutamilcisteína; a cisteínilglicina e a cisteína são produtos de degradação do glutatião (Paolicchi, Dominici, Pieri, Maellaro, & Pompella 2002; Correia *et al.*, 2022).

No nosso organismo a cisteína é um aminoácido bastante relevante no túbulo renal, pois é essencial para a síntese e estabilização proteica e é uma fonte de metabolitos intracelulares e moléculas de sinalização que desempenham um papel importante, na bioenergética do rim e regulação da pressão arterial (Hirakawa & Baker, 1985; Finkelstein, Martin & Harris, 1986; Serpa, 2020; Van Goor, Van Den Born, Hillebrands, & Joles, 2016; Correia *et al.*, 2022). É um aminoácido obtido através da dieta ou através da síntese da metionina, sendo bastante abundante nos fluidos extracelulares (Oliveira & Laurindo, 2018; Correia *et al.*, 2022). A cisteína armazenada na forma do GSH constitui um mecanismo de proteção contra os efeitos tóxicos da cisteína em excesso. Este excesso pode originar uma diminuição dos níveis de glutatião contraria a presunção de que a dependência renal da cisteína está apenas relacionada com a sua canalização para síntese de glutatião (Correia *et al.*, 2022).

Nos diversos fluidos extracelulares, como o plasma, o aminotiól que se encontra em maiores concentrações é a cisteína, em que 65% está ligada a proteínas e 35% livre, seguida da

cisteinilglicina, com 60% ligada a proteínas e 40% livre, e da homocisteína, que na sua maioria se encontra ligada a proteína (70-80%). Contrariamente a estes aminoácidos, o glutationa encontra-se em baixa concentração devido ao plasma ser um meio oxidativo (Tabela 1) (Oliveira & Laurindo, 2018).

**Tabela 1.** Valores de referência em diferentes matrizes biológicas (plasma, urina e soro) em indivíduos saudáveis.

Aminotióis	Frações	Plasma * ( $\mu\text{M}$ )	Soro * ( $\mu\text{M}$ )	Urina ( $\mu\text{M}$ )
<b>Cisteína</b>	Total	202-281	145-213	130.4 $\pm$ 58.8 <sup>##</sup>
	Livre Total	66,7-93,7	-	-
	Ligada a Proteína	131,3- 182,6	-	-
<b>Homocisteína</b>	Total	5 -15	5,9-11,1	-
	Livre Total	1 – 3	-	-
	Ligada a Proteína	4 - 12	-	-
<b>Cisteinilglicina</b>	Total	18,6 – 35,8	20,8-33,8	2,5-25 <sup>a</sup>
	Livre Total	7,4 – 14,3	-	-
	Ligada a Proteína	11,2-21,5	-	-
<b>Glutationa</b>	Total	4,9 – 7,3	2,4-6,8	1,43 – 12,1 <sup>*b</sup>
	Livre Total	2,0 - 5,1	-	-
	Ligada a Proteína	0,7 – 1,9	-	-
<b>uNAC, substituto urinário dos mercapturatos de dissulfetos de cisteína</b>	Total	NA	NA	58 [44–69] <sup>#</sup>
<b>Referências</b>		(Oliveira & Laurindo, 2018)	(Caussé <i>et al</i> , 2017)	(Gonçalves-Dias <i>et al</i> , 2021) <sup>#</sup> (Edward Bald, <i>et al</i> . 2001) <sup>##</sup> (Kuśmierek <i>et al.</i> , 2008) <sup>a</sup> (Zhang <i>et al.</i> ,2014) <sup>b</sup>

\*Representado em intervalo de mínimo e máximo

# Representado em mediana [IQR];

## Representado em média  $\pm$  desvio-padrão;

NA-Não aplicável

Na urina, para além dos aminotióis referidos anteriormente, existe o indicador dos mercapturatos de dissulfetos de cisteína (uNAC). Este indicador corresponde ao produto da acetilação da N-acetiltransferase 8 (NAT8) com os dissulfetos de cisteína e tem sido associada com a função renal e com a regulação da PA (Juhanson *et al*, 2008).

Como já mencionado acima, existe relação do túbulo renal na SAOS e na HTA. Estas são duas doenças com altas taxas de morbilidade e mortalidade. Sendo por isso imperativo um marcador do risco de HTA nos doentes com SAOS, representando uma ferramenta de medicina de precisão.

O grupo Farmacologia Cardiovascular e Metabólica desenvolveu um marcador relacionado com a oxidação da cisteína no túbulo renal, o indicador dos mercapturatos de dissulfetos de cisteína (uNAC).

## **2.4. Diagnóstico de Disfunção renal e a via dos mercapturatos**

Segundo o *National Institutes of Health* (NIH) um biomarcador é definido como “uma característica que é objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patogénicos ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica” (Strimbu & Tavel, 2010).

Atualmente, os biomarcadores de lesão renal conhecidos e mais utilizados são os biomarcadores de disfunção glomerular: a creatinina e a taxa de filtração glomerular. No entanto, estes biomarcadores não são os mais indicados visto apresentarem uma baixa sensibilidade e especificidade. Como tal, acabam por ser biomarcadores tardios no diagnóstico, pois quando a doença renal é diagnosticada já se encontra num estadió avançado (Dusse, Rios, Sousa, Moraes, Domingueti & Gomes, 2017). Assim, é necessário o desenvolvimento de biomarcadores específicos de disfunção tubular para diagnosticar de forma precoce a doença renal.

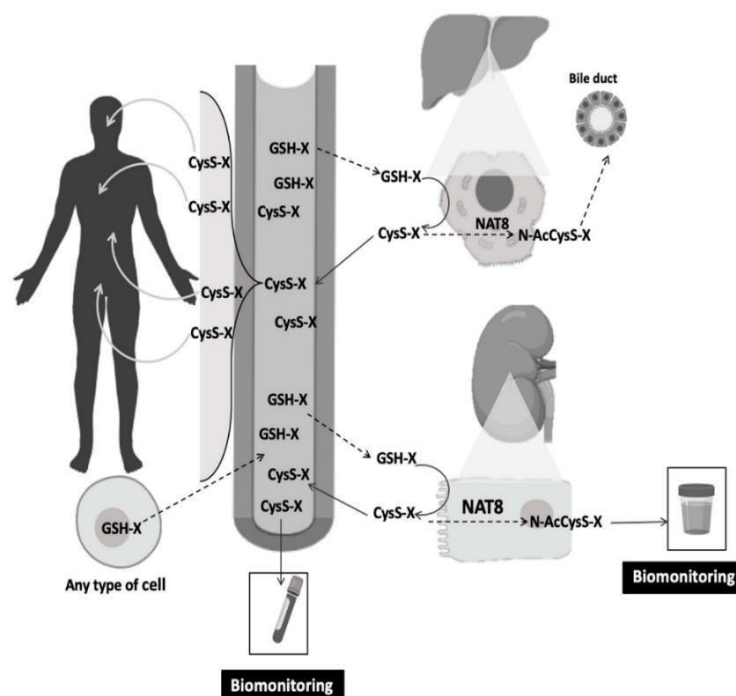
Como foi previamente mencionado, o túbulo renal, concretamente o túbulo proximal, é altamente suscetível a dano oxidativo sendo por isso os marcadores de disfunção tubular ótimos para um diagnóstico de dano renal precoce.

Até à data, encontram-se referenciados possíveis biomarcadores de disfunção tubular tais como: a lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (Ngal), a cistatina C, a molécula-1 de lesão renal (KIM-1) e a interleucina-18 (IL-18) e o indicador dos mercapturatos de dissulfetos

de cisteína (uNAC), estudado pelo grupo de Farmacologia Cardiovascular e Metabólica (Dusse *et al.*, 2017; Gonçalves-Dias *et al.*, 2019).

O uNAC não existe em circulação no nosso organismo sendo por vezes administrado como tratamento, visto apresentar efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios levando assim à manutenção do desequilíbrio redox na célula. Esta molécula é o acetil derivado da L-Cisteína que ao entrar dentro das células, será o fornecedor de Cisteína, que irá ser usada para formar GSH e assim aumentar a capacidade de defesa antioxidante (Lushchak., 2012).

O uNAC é obtido através da via dos mercapturatos. Esta via tem sido associada à função renal, visto que a sua última enzima N- acetiltransferase 8 (NAT8) se expressa nas células tubulares renais proximais (Chambers *et al.*, 2010; Datta *et al.*, 2010; De Carvalho *et al.*, 2011). A via dos mercapturatos é caracterizada como um circuito de desintoxicação metabólica para espécies eletrofílicas geradas em condições inflamatórias e oxidativas (Habig, Pabst & Jakoby, 1974).



**Figura 1. Mecanismo da Via dos Mercapturatos.** (Gonçalves-Dias *et al.*, 2019).

As células em condições inflamatórias e oxidativas, acabam por produzir conjugados de GSH, no entanto, este tripéptido é excretado e degradado levando à formação da cisteinilglicina (CysGly-X), que por ação da enzima gama-glutamilttransferase (GGT) obtêm-se o conjugado de cisteína (Cys-X) (Gonçalves-Dias *et al.*, 2019).

Os Cys-X que podem ser dissulfetos de cisteína (CysSSX) entram nas células tubulares renais através de transportadores de aniões orgânicos e transportadores membranares de

cistina/cisteína. Em condições consideradas normais a CysSSX seria a única a sofrer uma redução, formando assim cisteína livre (Cys) capaz então de executar as suas diversas ações fisiológicas (estabilização de proteínas, síntese de proteínas). Por outro lado, em condições inflamatórias ou oxidativas os Cys-X são destoxificados pela acetilação da enzima NAT8, formando assim um mercapturato, ao adicionar um grupo acetil à Cys-X, formando o uNAC, substituto da N-acetil-CysSSX, que é eliminado pela urina (Gonçalves-Dias *et al.*, 2019; Gonçalves-Dias *et al.*, 2021).

O uNAC foi estudado inicialmente em ratos e de seguida investigado em amostras biológicas humanas pelo grupo de Farmacologia Cardiovascular e Metabólica concluindo-se que o uNAC permite avaliar a capacidade do rim de destoxificar (Gonçalves-Dias *et al.*, 2021). Após um episódio de doença renal aguda, os valores de uNAC são mais baixos (Gonçalves-Dias *et al.*, 2021).

### 3. Objetivos

Uma das questões por resolver na prática clínica no tratamento dos doentes com apneia do sono é a falta de ferramentas que permitam informar os clínicos do risco de HTA nos indivíduos com apneia do sono.

Neste trabalho inspirámo-nos na relação entre a SAOS e a disfunção tubular, nomeadamente na relevância da cisteína para a manutenção da homeostasia do túbulo renal e da relação entre a cisteína e os aminotióis que lhe são relacionados (tioloma) com a doença cardiovascular para identificar perfis metabólicos que permitam identificar precocemente os doentes com maior risco de HTA.

O objetivo geral deste trabalho é avaliar o impacto da HTA associada à SAOS no perfil tiolómico e produzir evidências sobre a relação entre a função tubular em doentes com doenças cardiometabólicas.

Colocámos a hipótese que a HCl promove a disfunção tubular que se traduz no aumento da pressão arterial condicionando assim a dinâmica dos aminotióis no indivíduo.

Para estudar esta hipótese usaram-se amostras de soro e urina de indivíduos de 4 subgrupos:

- 1) Indivíduos sem SAOS e sem doença cardiometabólica conhecida (normotensos);
- 2) Indivíduos com hipertensão arterial essencial;
- 3) Indivíduos com apneia obstrutiva do sono normotensos;
- 4) Indivíduos com SAOS e hipertensos.

Assim, os objetivos específicos do presente trabalho incluem:

- a) Quantificação do tioloma na urina (frações totais dos aminotióis Cys, CysGly, GSH e uNAC);
- b) Quantificação do tioloma no soro (frações total, livre e ligada a proteínas dos aminotióis Cys, GluCys, HCys, CysGly, GSH);
- c) Quantificação do marcador de disfunção tubular uNAC na urina
- d) Estudar a variabilidade do tioloma sérico e urinário entre indivíduos;
- e) Comparação do tioloma entre os 4 grupos de estudo;
- f) Relacionar os resultados obtidos com características clínicas, antropométricas (ex: IMC) e demográficas (ex. sexo, idade) dos participantes.

### 4.1. Tipo de Estudo

Estudo observacional, transversal de uma coorte de indivíduos pertencente ao estudo clínico “Relevance of the ratio kynurenine/tryptophan to characterize hypertension associated to Obstructive Sleep Apnea” (Kyntosa) (Clinical trials NCT04646902).

O estudo Kyntosa tem por objetivo avaliar o impacto de metabolitos (entre eles a kinurenina e o triptofano) na HTA associada à SAOS. O estudo foi desenhado como um estudo de casos controlos, onde há casos controlo de indivíduos com HTA (com e sem SAOS) e controlos de indivíduos sem HTA (com e sem SAOS). A população de estudo, por tanto, inclui 4 grupos de indivíduos: indivíduos com SAOS e com HTA, indivíduos com SAOS, mas sem HTA, indivíduos sem SAOS, mas com HTA e indivíduos sem SAOS e sem HTA. O recrutamento dos indivíduos tem vindo a ser feito de forma consecutiva em cinco hospitais de Lisboa: Centro Hospitalar Lisboa Occidental, Centro Hospitalar Universitário Lisboa Central, Hospital da Luz, Hospital Beatriz Ângelo e Hospital Fernando Fonseca. Neste estudo incluiu-se 149 indivíduos: 51 normotensos, 8 com apneia obstrutiva do sono, 45 com apneia obstrutiva do sono hipertensos e 45 hipertensos.

### 4.2. População e Amostra

Este estudo incluiu os 4 quatro grupos de indivíduos:

- 1) Indivíduos sem SAOS e sem doença cardiometabólica conhecida (normotensos);
- 2) Indivíduos com hipertensão arterial essencial;
- 3) Indivíduos com apneia obstrutiva do sono normotensos;
- 4) Indivíduos com SAOS e hipertensos.

Os critérios de inclusão foram os seguintes:

a) adultos com idade superior ou igual a 30 anos a frequentar consultas (medicina interna, pneumologia, nefrologia, cardiologia) dos locais clínicos envolvidos no estudo Kyntosa com capacidade de compreender e comunicar eficazmente com o pessoal do estudo e dar consentimento informado por escrito para participar.

b) Só no caso dos indivíduos com HTA, o diagnóstico de hipertensão foi definido como:

- Utilização de medicamento(s) anti-hipertensivo(s) e dose estável durante pelo menos 2 semanas antes da inclusão.
- Em doentes não tratados: valores de tensão arterial sistólica de consultório  $\geq 140$  mmHg e/ou diastólica com valores de pressão arterial  $\geq 90$  mmHg.

Os principais critérios de exclusão foram os seguintes:

- a) gravidez ou aleitamento materno autodeclarado;
- b) pacientes em hemodiálise ou diálise peritoneal; doença hepática crónica com Child-Pugh score B ou superior;
- c) hipertensão atribuída à estenose da artéria renal, hiperaldosteronismo primário, feocromocitoma, síndrome de Cushing, coarctação da aorta; histórico de qualquer tratamento cirúrgico da Síndrome da Apneia Obstrutiva do Sono (SAOS) para as regiões do palato e hiofaringeas, nomeadamente uvulopalatofaringoplastia (UPPP), ablação do palato por radiofrequência, amigdalectomia, amigdalectomia linguística, glossectomia parcial, ablação por radiofrequência na base da língua, avanço do genioglosso, suspensão hióide, cirurgia de avanço maxilo-mandibular (MMA) e uso ativo de estimulador nervoso do hipoglosso;
- d) pacientes com uma boa adesão ao CPAP, assim como a utilização de CPAP durante pelo menos 4 horas/noite em 70% das noites durante os últimos 3 meses;
- e) hipertensão pulmonar;
- f) doença oncológica diagnosticada atualmente;
- g) pacientes com doenças infecciosas crónicas ou agudas conhecidas.
- h) Outra doença à data considerada grave, progressiva ou descontrolada, que, a juízo do clínico tornasse o doente impróprio para o estudo.

Este estudo incluiu as amostras biológicas de soro e urina que foram colhidas no estudo Kyntosa até a data de dezembro de 2021. A hora da colheita e a hora da última refeição foram anotadas para cada amostra. As amostras foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até à determinação quantitativa dos aminotióis.

## 4.3. Procedimento

### 4.3.1. Quantificação de Aminotióis

De forma a se quantificar o perfil tiolómico nas amostras de soro e urina, recorreu-se a um método analítico já estabelecido no laboratório do grupo de Farmacologia Cardiovascular e Metabólica (Grilo *et al.*, 2017; Gonçalves-Dias *et al.*, 2021).

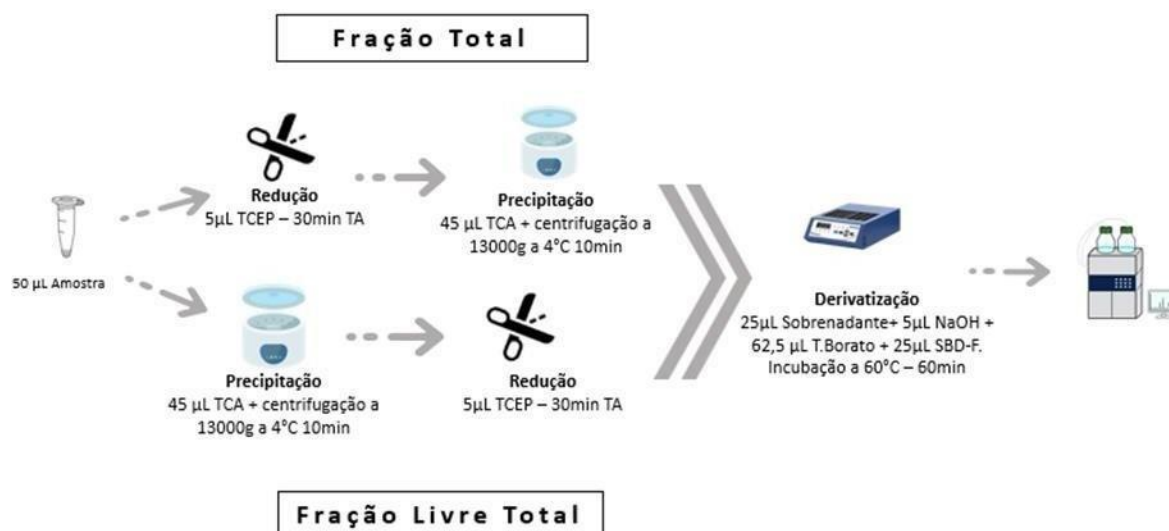
A determinação do perfil tiolómico nas amostras de soro incluiu as frações livre total, total e ligada a proteínas, sendo esta última resultante da subtração da fração total pela livre, dos aminotióis cisteína (Cys),  $\gamma$ -glutamilcisteína (GluCys), homocisteína (HCys), cisteínilglicina (CysGly) e glutatião (GSH).

No que diz respeito à análise deste perfil em amostras urinárias, determinou-se a fração total dos aminotióis cisteína (Cys), cisteínilglicina (CysGly) e glutatião (GSH) e também do indicador dos mercapturatos de dissulfetos de cisteína (uNAC). Quantificando-se só a fração total, pois a urina não deve conter proteína.

#### 4.3.1.1. Preparação da amostra

O protocolo inicia-se com um volume inicial de 50  $\mu$ L de amostra (soro ou urina ou padrão) (Figura 2.)

Para a determinação da fração total, adiciona-se 5  $\mu$ L de Tris(2-carboxietilfosfina) (TCEP) (100g / L; 75259, Sigma - Aldrich) para a redução dos grupos dissulfeto (30 minutos à temperatura ambiente); de seguida as proteínas são removidas por precipitação com 45  $\mu$ L de (TCA) (100 g/L; 8789.1, Roth) com (EDTA) (1mM; E9884, Sigma - Aldrich) seguindo-se a centrifugação (13000 g, 10 minutos, 4 ° C). Posteriormente, 25  $\mu$ L do sobrenadante são retirados para um novo *microcentrifuge tube* contendo 5  $\mu$ L de NaOH (1,55M; 30620, Sigma – Aldrich) e 62,5  $\mu$ L de tampão tetraborato de sódio (125 mM, pH 9,5; 27727.231, VWR Chemicals), com 4 mM EDTA. Neste adiciona-se 25  $\mu$ L (SBD-F) (1 g/L; 46640, Sigma - Aldrich), que por fim agitado no vórtex e incubado ao abrigo da luz, a 60 °C por 1 h, para ocorrer derivatização dos grupos tiol (-SH) livres. No caso da fração livre total, o protocolo inicia-se com a remoção das proteínas com o TCA como descrito anteriormente. Posteriormente, efetua-se a redução das ligações dissulfeto com a adição do TCEP e, finalmente a derivatização, como acima mencionado (Grilo *et al.*, 2017; Gonçalves-Dias *et al.*, 2021).



**Figura 2. Esquema do método para quantificação de aminotióis.** TA: Temperatura ambiente; TCA: ácido tricloroacético; TCEP: tris(2-carboxietilfosfina); SBD-F: Ácido 7-fluorbenzofurazan-4- sulfônico, sal de amônio; NaOH: Hidróxido de sódio; T. Borato: Tampão Borato; min: minutos.

No caso da obtenção do indicador dos mercapturatos de dissulfetos de cisteína (uNAC), esta é resultante da redução de N-acetil-CysSSX urinário com o TCEP e é usada como substituto do N-acetil-CysSSX. Desta forma, usando uma sonda fluorescente seletiva para grupos tiol, o SBD-F o uNAC pode ser monitorado através da detecção de fluorescência (FD), proporcionando alta sensibilidade ao método (Gonçalves-Dias *et al.*,2021).

#### 4.3.1.2. Preparação Curvas de Calibração

Para obtenção de curvas de calibração necessárias à extrapolação das concentrações dos aminotióis quantificados, recorreu-se à utilização de padrões de concentrações seriadas conhecidas, já preparados pelo laboratório, cuja constituição abrangeu os seguintes compostos:

- a) L-Cysteinyglycine (CysGly) (C0166, Sigma-Aldrich);
- b) Gamma-L-Glutamyl-L-cysteine (GluCys) (G0903, Sigma-Aldrich);
- c) L-Homocysteine (HCys) (69453, Sigma-Aldrich);
- d) L-Glutathione (GSH) (G6529, Sigma-Aldrich);
- e) L-Cysteine (Cys) (7352, Sigma-Aldrich)
- f) N-Acetyl-L-cysteineA (NAC) (7250, Sigma-Aldrich)

Os padrões de concentração conhecida utilizados para as curvas de calibração (Tabela 2), foram feitos com os reagentes acima referidos.

**Tabela 2.**Concentrações dos Padrões utilizados para as curvas de calibração.

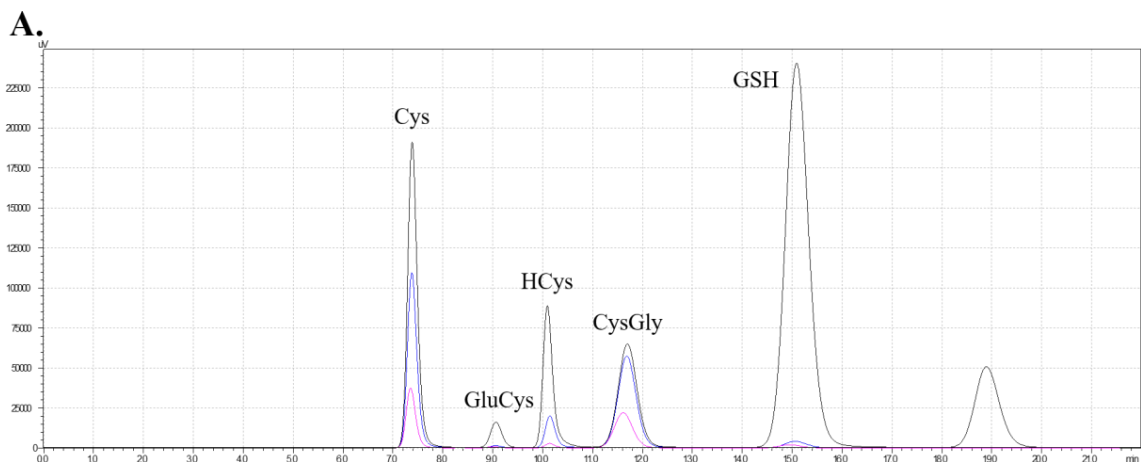
Padrões	Concentração (µM)					
	Cys	GluCys	HCys	CysGly	GSH	NAC
PT1	800	100	100	75	800	600
PT2	600	75	37,5	50	600	400
PT3	400	50	50	37,5	400	300
PT4	300	37,5	18,75	25	300	200
PTA	400	50	50	100	25	25
PTB	300	37,5	37,5	75	18,75	18,75
PTC	200	25	25	50	12,5	12,5
PTD	150	18,75	18,75	37,5	9,375	9,375
PTE	100	12,5	12,5	25	6,25	6,25
PTF	50	6,25	6,25	12,5	3,125	3,125
PTG	35	4,375	4,375	8,75	2,1875	2,1875
PTH	20	2,5	2,5	5	1,25	1,25
PTI	10	1,25	1,25	2,5	0,625	0,625
PTJ	5	0,625	0,625	1,25	0,3125	0,3125
PT9	2,5	0,313	0,313	0,625	0,156	0,156
F11	0,625	-	0,078	0,156	2,5	0,039
F13	0,240	-	0,030	0,060	0,960	0,015

### 4.3.2. Método Cromatográfico

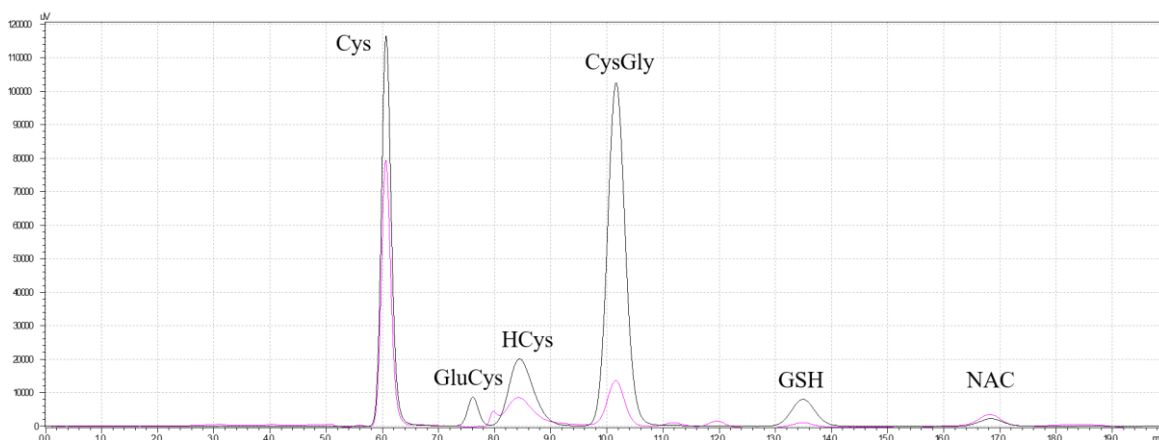
Após o procedimento efetuado no 4.4.2.1., as amostras derivatizadas são separadas e detetadas pelo método cromatográfico, HPLC – FD (*High Performance (pressure) Liquid Chromatography with Fluorescence Detection* - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Fluorescência). A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica amplamente utilizada para a separação, identificação e quantificação de diversas moléculas como aminoácidos, carboidratos, lípidos, proteínas, esteroides e outras moléculas biologicamente ativas e em diferentes tipos de matriz (Coskun, 2016).

No método cromatográfico aqui utilizado recorreremos a um sistema de HPLC da Shimadzu (Shimadzu Scientific Instruments Inc), usando uma bomba Shimadzu LC-10 AD VP e uma coluna de fase reversa C18 LiChroCART 250 × 4 column (LiChrospher 100 RP-18, 5 µm, VWR, USA). A separação dos aductos fluorescentes dos aminotióis, ocorreu a 29°C com recurso a uma eluição isocrática durante 20 minutos a um fluxo de 0,8mL/min sobre a influência de uma fase móvel constituída por Acetato de Sódio (AcNa) a 100mM com Metanol (MeOH) [99:1 (v/v)]. A deteção da fluorescência foi realizada com o detetor de fluorescência RF 10AXL, nos comprimentos de onda excitação e de emissão de 385 e 515 nm, respetivamente (Grilo *et al.*, 2017; Gonçalves-Dias *et al.*, 2021).

De forma a obter uma melhor separação dos aminotióis GluCys e a HCys, modificou-se percentagem da fase móvel de AcNa a 100mM com MeOH para a constituição de [98:2 (v/v)] e o fluxo de eluição para 0,6mL/min durante 22min. De referir que este método apenas foi aplicado e otimizado para amostras de soro, não tendo sido possível otimizar para a matriz urina, daí a inexistência destes dois aminotióis nos resultados aqui apresentados.



## B.



**Figura 3. Exemplo de Cromatograma de (A) soro e (B) urina.** O eixo do x representa o tempo (min) e o eixo do y a quantificação da fluorescência (uV). A linha a preto representa um padrão em ambos os cromatogramas. No cromatograma A (método 0,6 ml/min), a linha azul representa a fração total de uma amostra de soro e a linha rosa a fração livre total da mesma amostra. No cromatograma B (método 0,8 ml/min), a linha rosa corresponde à fração total de uma amostra de urina. Em (A) aos 7,4 min a Cys, 9,0 min o GluCys, 10,1 min a HCys, 11,6 min o CysGly e aos 14,9 min o GSH. Em (B) aos 6 min a Cys, 7,6 min o Glu-Cys, 8,4 min a HCys, 10,1 min o CysGly, aos 13,5 min o GSH e 16,9 min uNAC. Cys: cisteína; GluCys:  $\gamma$ -glutamilcisteína; HCys: homocisteína; CysGly: cisteínilglicina; GSH: Glutatião.

## 4.4 Variáveis do estudo

O estudo Kyntosa recolhe vários dados pessoais como: dados demográficos e antropométricos, doenças atuais, fármacos atuais, parâmetros bioquímicos e parâmetros clínicos relacionados com o SAOS e a HTN.

Esta tese usou os seguintes dados do estudo Kyntosa: idade, etnia, sexo, índice de massa corporal, diagnóstico de HTA e diagnóstico de SAOS.

## 4.5. Tratamento e Análise Estatística dos dados

Os dados obtidos foram tratados com recurso ao *GraphPad Prism* versão 8.0.2 e *IBM SPSS Statistics* for Windows, Versão 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.

Para a caracterização da população em estudo, recorreu-se à estatística descritiva, mais especificamente ao cálculo do mínimo, máximo, mediana, interquartil e o coeficiente de variação (CV) para os dados quantitativos. Foi efetuada uma análise dos fatores antropométricos e clínicos em estudo: a idade, o género, a raça, o índice de massa corporal

(IMC) e a doença metabólica (hipertensão (HTA)), síndrome da apneia obstrutiva do sono (SAOS) e dos aminotióis obtidos.

De forma a avaliar as diferenças nas concentrações dos aminotióis entre os indivíduos (variabilidade interindividual) recorreu-se à análise do coeficiente de variação (CV%) das concentrações dos aminotióis.

De forma a avaliar normalidade das variáveis (quantitativas) utilizou-se o teste **Shapiro-Wilk**. De forma a estudar a distribuição das variáveis qualitativas recorreu-se ao teste **Qui-Quadrado**. A comparação das variáveis quantitativas entre dois grupos realizou-se com o teste **T-Student** em caso de normalidade, e o teste **Mann-Whitney** em caso de não normalidade.

De forma a avaliar as diferenças das variáveis quantitativas em mais de dois grupos utilizou-se o teste **ANOVA** quando confirmada a normalidade, caso contrário efetuou-se o teste **Kruskal-Wallis**.

Quando efetuadas correlações entre as variáveis antropométricas e as variáveis experimentais, foi utilizado o **Teste de Person** em caso de normalidade ou o **Teste Spearman rank** em caso de não normalidade.

Por último, foram realizadas **regressões lineares** para associações entre variáveis quantitativas (concentrações de aminotióis) e outras variáveis (idade, sexo, IMC e patologia). Quando a variável quantitativa a analisar não seguia distribuição normal esta era transformada em logaritmo.

Todos os resultados foram considerados significativos ao nível de significância de 5%.

## 4.6. Considerações Éticas

Atendendo ao cariz deste estudo, onde está implicada a utilização de amostras biológicas e de dados pessoais de utentes, é importante garantir princípios de ética bem definidos. De acordo com o tratado de Helsínquia, devem ser tomadas todas as precauções para proteger a privacidade de cada sujeito de investigação e a confidencialidade dos seus dados pessoais. Os dados pessoais foram pseudo-anonimizados, o que garante a privacidade dos participantes.

Este estudo foi conduzido de acordo com os princípios éticos nacionais e internacionais, nomeadamente a “Declaração de Genebra” (2002), a “Declaração de Helsínquia” e emendas (2008) e a “Convenção de Oviedo” (1997). O estudo obteve parecer positivo por parte do Conselho de Ética da ESTeSL (Anexo I).

## 5. Resultados

### 5.1. Caracterização da população do estudo

Foram incluídos 149 indivíduos, 51 normotensos, 8 com apneia obstrutiva do sono, 45 com apneia obstrutiva do sono hipertensos e 45 hipertensos. A comparação entre grupos permite salientar que o grupo de estudo dos normotensos se revelou mais novo que os grupos com doença, mas as idades não diferiram entre grupos com patologia. Para além disso, o grupo com SAOS+HTA apresentou um índice de massa corporal superior ao grupo com SAOS. Não houve diferenças para o sexo e etnia (Tabela 3).

**Tabela 3.** Dados demográficos, antropométricos e clínicos dos indivíduos incluídos no estudo (n=149).

Parâmetros	Normotensos (n=51)	SAOS (n=8)	SAOS + HTA (n=45)	HTA (n=45)
Idade (anos) <sup>a</sup>	36 [30-43]	52 [45-62] **	60 [51-68] ***	61[51-72] ***
Homens (%)	55	75	73	49
Caucasiano (%)	NA	88	93	98
IMC (Kg/m <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	NA	29 [25-40]	32 [29-35] ##	28 [25-34]
Nº de amostras de urina disponíveis	51	8	45	45
Nº de amostras de soro disponíveis	26	8	40	16

<sup>a</sup> Mediana [IQR]; \* vs. normotenso # vs. SAOS (# ou \* p<0,05; ## ou \*\* p<0,01; ### ou \*\*\* p<0,001)

**IMC:** Índice de Massa Corporal; **NA:** Não há informação; **ns:** não significativo;

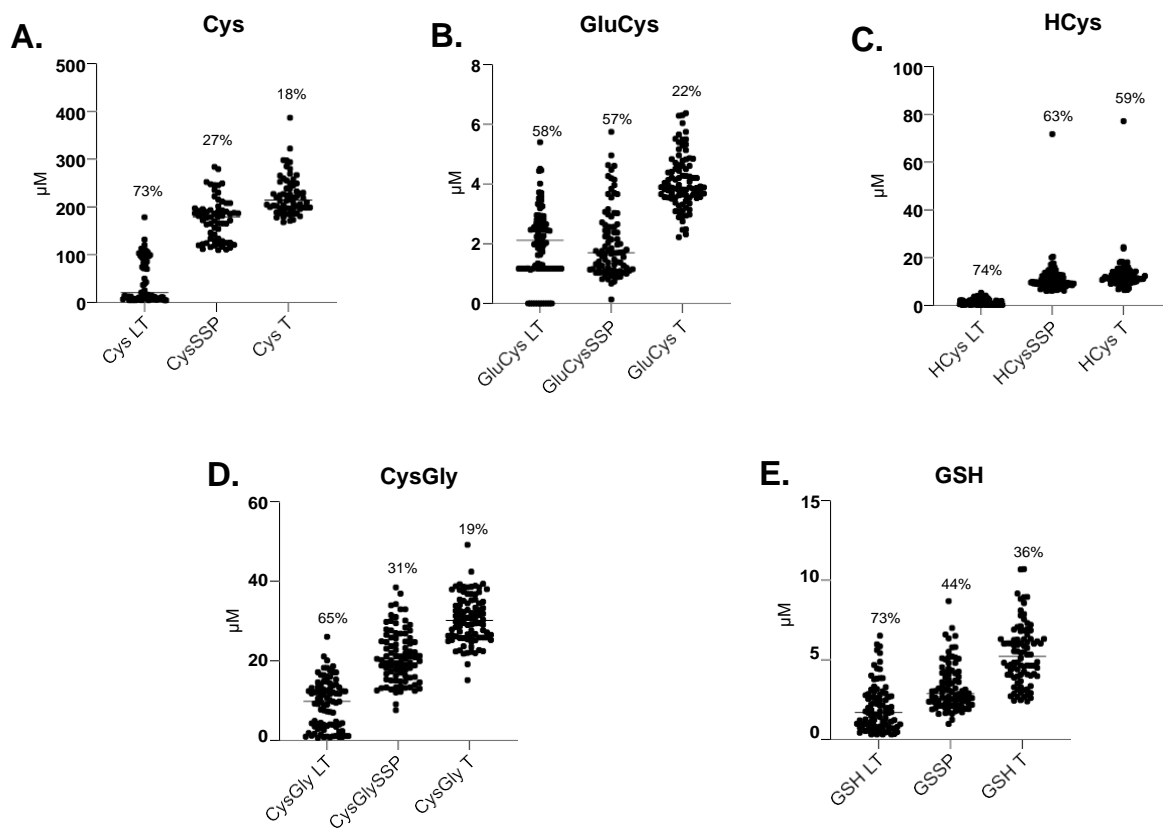
Idade e IMC analisados ANOVA, Sexo e etnia por Teste Qui-Quadrado;

### 5.2. Perfil tiolómico sérico dos diferentes grupos de estudo

#### 5.2.1. Variabilidade interindividual no perfil de tióis séricos

Foram analisadas um total de 90 amostras de soro (normotensos n=26, SAOS n=8, SAOS+HTA n=40, HTA n=16), uma por cada indivíduo. Estudou-se a variabilidade interindividual das frações (livre total, ligada a proteína e total) (Figura 4) dos aminotióis Cys (Figura 4A), GluCys (Figura 4B), HCys (Figura 4C), CysGly (Figura 4D) e GSH (Figura 4E). Esta variabilidade foi expressa através do cálculo coeficiente de variação (CV). Entre o total de 15 frações estudadas, oito apresentaram CV superiores a 50%, sendo que as frações livres

totais foram as mais variáveis entre indivíduos. No geral, os resultados indicam uma elevada variabilidade nas frações de tióis entre os indivíduos incluídos no estudo.



**Figura 4. Variabilidade interindividual das concentrações séricas obtidas para (A) cisteína, (B)  $\gamma$ -glutamilcisteína, (C) homocisteína, (D) cisteínilglicina e (E) glutatião.** LT: fração livre total; SSP: fração ligada a proteínas T: Fração Total; Cys: cisteína; GluCys:  $\gamma$ -glutamilcisteína; HCys: homocisteína; CysGly: cisteínilglicina; GSH: glutatião

### 5.2.2. Influência dos fatores demográficos e antropométricos nas concentrações séricas dos aminorídeos

Seguidamente investigou-se o efeito da idade, IMC e sexo no perfil de tióis séricos. Na Tabela 4 apresentam-se as 8 frações para as quais se encontrou relação com a idade. As frações da Cys (ligada às proteínas e total), GluCys (ligada às proteínas), e HCys (ligada às proteínas e total), precursores do glutatião associaram-se positivamente à idade. Contrariamente às frações do glutatião (livre total e total) e do seu produto de degradação (livre total) associaram-se a um decréscimo com a idade. É interessante observar que entre as 8 frações com maior variabilidade interindividual (superior a 50%, Figura 4), a variabilidade das frações Cys LT, GluCys LT e a Hcys LT não parecem ser justificadas pela idade.

**Tabela 4.**Correlação entre a idade com as concentrações séricas dos aminotióis (n=90).

Parâmetros séricos	Coefficiente de correlação (rho)	p
<b>Cys T</b>	0,2677	0,0017
<b>CysSSP</b>	0,3380	0,0011
<b>GluCysSSP</b>	0,2128	0,0440
<b>HCys T</b>	0,2380	0,0239
<b>HCysSSP</b>	0,3144	0,0025
<b>CysGly LT</b>	-0,2136	0,0432
<b>GSH T</b>	-0,3940	0,0001
<b>GSH LT</b>	-0,3777	0,0002

Foi utilizado o teste de correlação *Spearman*. **Cys**: cisteína; **GluCys**  $\gamma$ -glutamilcisteína; **HCys**: homocisteína; **CysGly**: cisteinilglicina; **GSH**: glutatião; LT: Livre total; SP: fração ligada a proteína; T: Total

O IMC também variou entre os indivíduos, sendo superior nos indivíduos com SAOS e HTA, de forma similar ao descrito na tabela 4. No entanto não foi observada qualquer associação entre os níveis das concentrações das diferentes frações e o IMC dos indivíduos com patologia.

Analisou-se a influência do sexo e obteve-se diferenças estatisticamente significativas nos tióis HCys e CysGly (Tabela 5). Obtendo-se valores superiores no sexo masculino quando comparado com o sexo feminino.

**Tabela 5.**Influência do sexo nas concentrações séricas dos aminotióis (n=90).

Parâmetros séricos	Concentrações homens vs mulheres	Valor de t	p
<b>HCys T</b>	11,98 vs 10,65	-	0,011
<b>HCysSSP</b>	10,73 vs 9,15	-	0,013
<b>CysGly T</b>	31,44 vs 28,36	2,35	0,021

Foi utilizado o teste t-student e Mann-Whitney, incluídos todos os indivíduos (n=90). **HCys**: homocisteína; **CysGly**: cisteinilglicina; **LT**: Livre total; **SP**: fração ligada a proteína; **T**: Total.

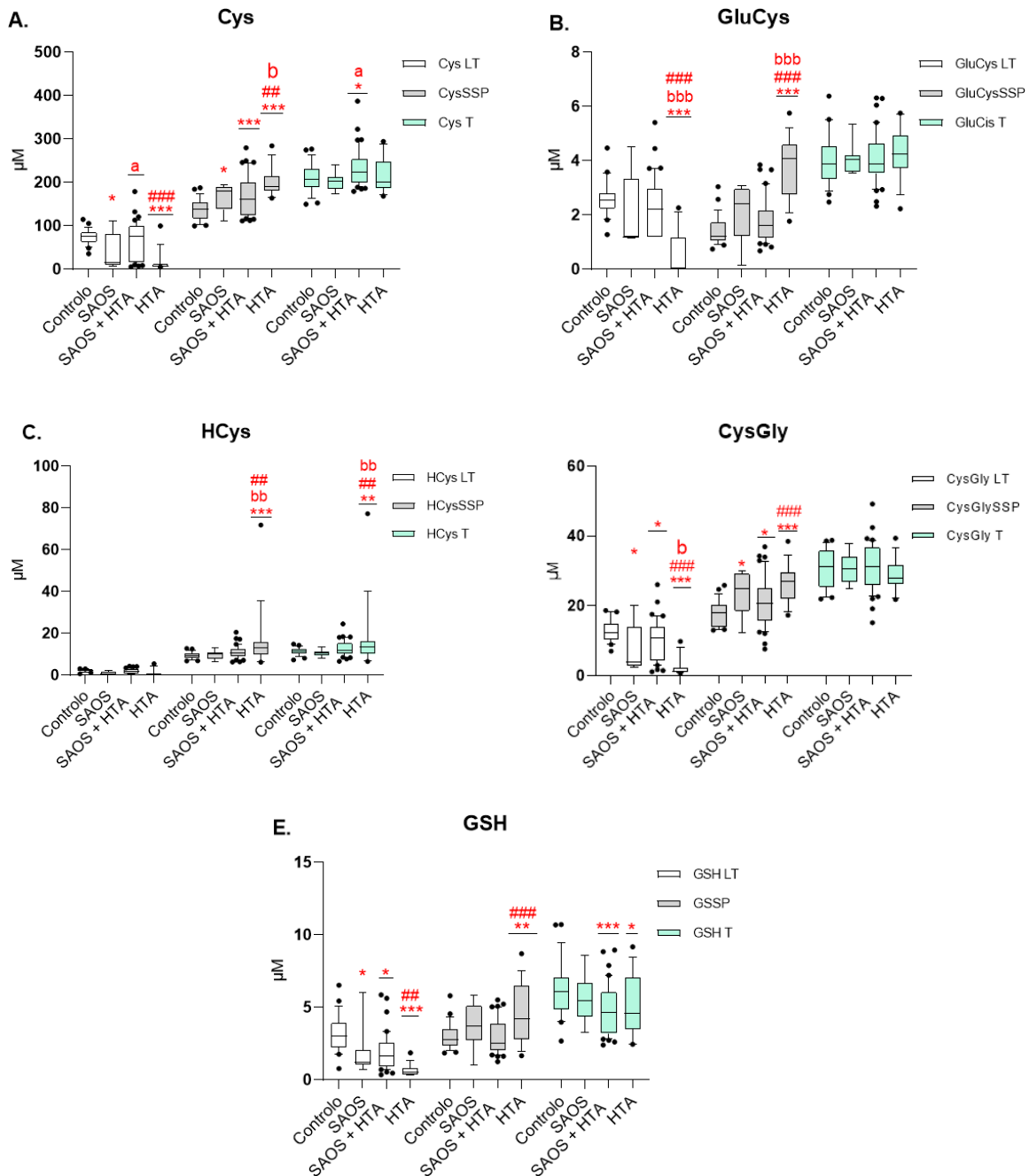
### 5.2.3. Níveis séricos das diferentes frações dos aminotióis nos grupos de estudo

As concentrações de cada fração dos diferentes aminotióis (Figura 5) foram comparadas entre os 4 grupos de estudo (normotensos n=26, SAOS n=8, SAOS+HTA n=40, HTA n=16). Adicionalmente, a fração Cys LT permitiu distinguir hipertensão essencial de hipertensão secundária associada à SAOS (Figura 5 e Tabela 6).

**Tabela 6.** Frações de Cisteína séricas que mostraram diferenças entre doentes com SAOS e HTA.

Parâmetros séricos (n=90)	SAOS+HTA (n=40) vs SAOS (n=8)	SAOS+HTA (n=40) vs HTA (n=16)
Cys T (213 $\mu\text{M}$ ) *	↑ (+15 $\mu\text{M}$ ) (p<0,05)	nd
Cys LT (66 $\mu\text{M}$ ) *	↑ (+57 $\mu\text{M}$ ) (p<0,05)	↑ (+64 $\mu\text{M}$ ) (p<0,001)

**HTA:** hipertensão arterial; **SAOS:** síndrome da apneia obstrutiva do sono; **SAOS+HTA:** síndrome de apneia obstrutiva do sono com hipertensão arterial; **Frações da Cisteína (Cys) T:** fração total; **LT:** fração livre total; **nd:** não diferem. \* valor mediano da concentração obtida nos 90 indivíduos incluídos.



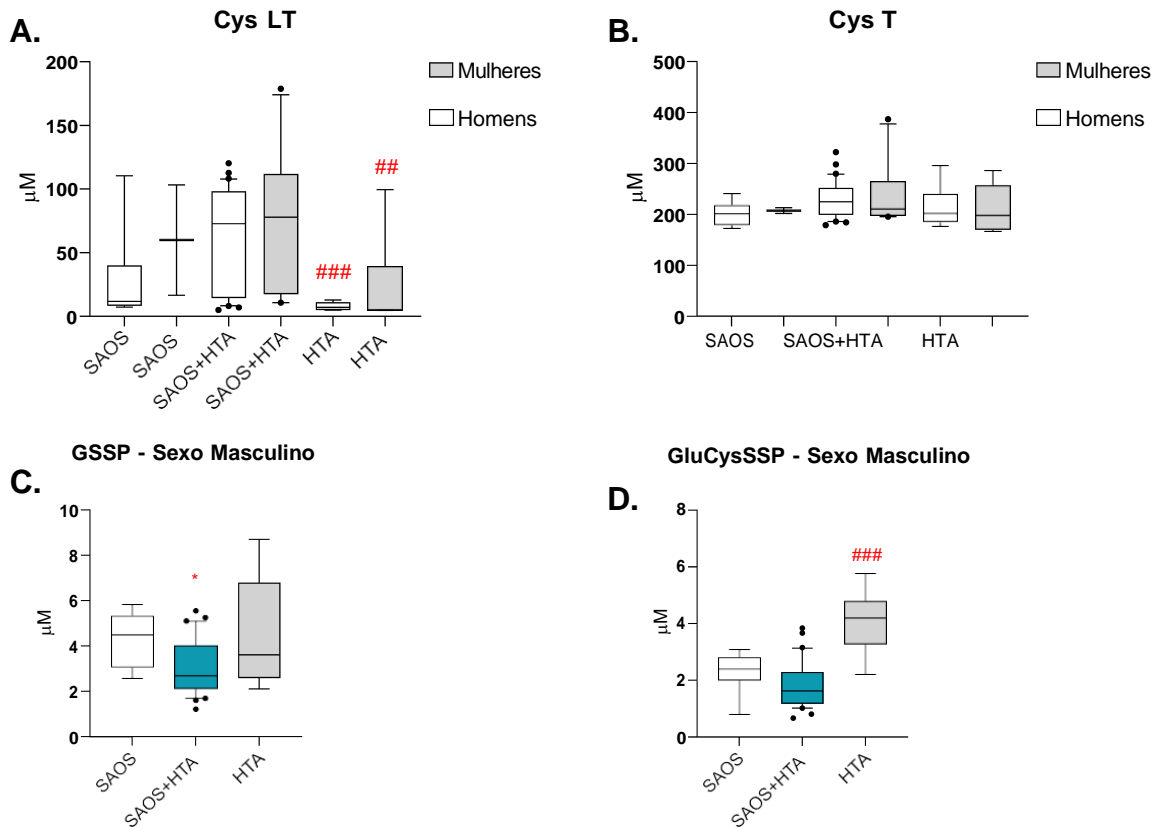
**Figura 5. Concentrações séricas obtidas para (A) cisteína, (B)  $\gamma$ -glutamilcisteína, (C) homocisteína, (D) cisteinilglicina e (E) glutatião para os quatro grupos de estudo: Controlo, SAOS, SAOS + HTA e HTA. Análise efetuada por 2-way ANOVA com teste Fisher's LSD para múltiplas comparações. a: SAOS vs SAOS+HTA; #: SAOS+HTA vs HTA; \*: grupo de doença vs. normotensos (a ou # ou \* $p < 0,05$ ; bb ou ## ou \*\*  $p < 0,01$ ; aaa ou bbb ou ### ou \*\*\*  $p < 0,001$ ). HTA: hipertensão arterial; SAOS: síndrome da apneia obstrutiva do sono; SAOS+HTA: síndrome de apneia obstrutiva do sono com hipertensão arterial; LT: fração livre total; SSP: fração ligada a proteína T; Fração Total; Cys: cisteína; GluCys:  $\gamma$ -glutamilcisteína; HCys: homocisteína; CysGly: cisteinilglicina; GSH: glutatião.**

#### **5.2.4. Níveis séricos dos aminotióis entre os grupos de estudo por sexo**

Realizou-se uma análise entre grupos (SAOS, SAOS+HTA, HTA) no sexo masculino e feminino, visto que a prevalência na HTA na SAOS é maior nos homens do que nas mulheres (Hedner *et al*, 2006) e visto que foram identificadas diferenças entre homens e mulheres para alguns tióis (Tabela 5).

Observou-se que, as diferenças previamente encontradas para a fração Cys LT entre SAOS+HTA vs HTA (Tabela 6) mantêm-se em ambos os sexos (Figura 6A). Não houve diferenças entre SAOS+HTA vs SAOS em homens ou mulheres. Por tanto, as diferenças entre grupos encontradas para a Cys LT parecem não depender do sexo (Figura 6) e nem da idade (Tabela 4). No caso da Cys T, não houve diferenças entre grupos (Figura 6B).

Não se observaram diferenças entre grupos nas mulheres para as restantes frações de tióis analisadas. Para o sexo masculino, foi possível ainda observar que os níveis de GSSP (Figura 6C) e de GluCysSSP (Figura 6D) diferenciam SAOS vs SAOS+HTA e SAOS+HTA vs HTA, respetivamente.



**Figura 6. Concentrações séricas de (A) cisteína livre total, (B) cisteína total, (C) glutatião ligado as proteínas e (D)  $\gamma$ -glutamilcisteína ligada as proteínas para os três grupos de estudo: Normotensos, SAOS, SAOS + HTA e HTA comparadas relativamente ao sexo do indivíduo. Foram analisadas 90 amostras de soro. Análise efetuada por 2-way ANOVA com teste Fisher's LSD para múltiplas comparações \*: SAOS vs SAOS+HTA; #: SAOS+HTA vs HTA; (a ou # ou \* $p < 0,05$ ; ## ou \*\*  $p < 0,01$ ; aaa ou ### ou \*\*\*  $p < 0,001$ ). HTA: hipertensão arterial; SAOS: síndrome da apneia obstrutiva do sono; SAOS + HTA: síndrome da apneia obstrutiva do sono com hipertensão; Cys: cisteína; LT: Livre total; T: Total; SSP: Ligado as proteínas;**

### 5.2.5. Variáveis que se associam com os níveis de Cys LT de forma independente

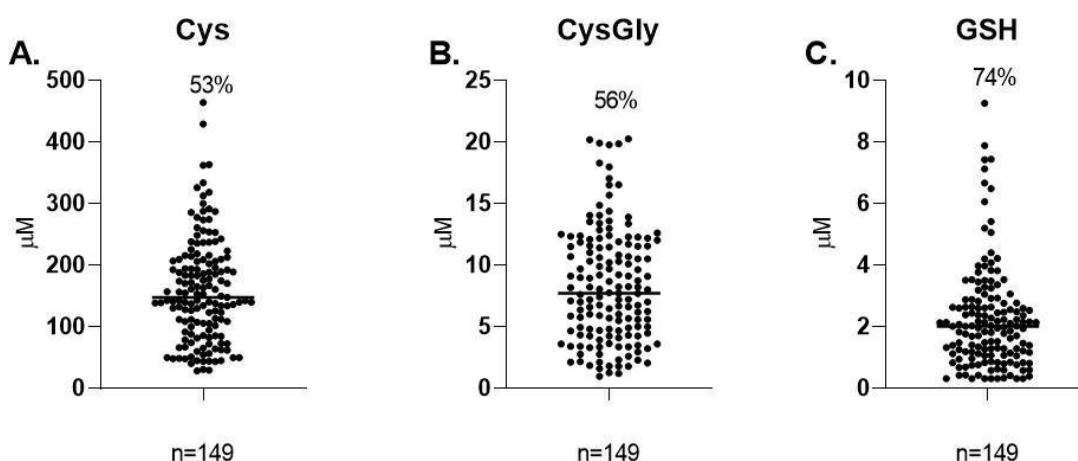
Visto que os resultados mais interessantes foram observados para a fração Cys LT construímos um modelo de regressão linear para identificar as variáveis do estudo (sexo, idade, IMC, patologia) associadas de forma independente com as concentrações de Cys LT.

Primeiramente foram realizadas análises univariadas, entre o log da Cys LT e as variáveis: idade, IMC e uma variável que combina SAOS com HTA (SAOS, HTA ou HTA+SAOS). Só a variável SAOS+HTA associou-se de forma estatisticamente significativa com o log Cys LT (Coeficiente de regressão ou Beta (CI95%) 0,588 (0,231-0,479),  $p < 0,001$ ).

### 5.3. Perfil tiolómico urinário dos diferentes grupos de estudo

#### 5.3.1. Variabilidade interindividual no perfil de tióis urinários

Foram analisadas um total de 149 amostras de urina (normotensos n=51, SAOS n= 8, SAOS+HTA n= 45, HTA n=45), uma por cada indivíduo (Figura 7) sendo possível observar que a Cys foi o tiol mais abundante na urina com valor mediano de 148 (93-208)  $\mu\text{M}$ , seguindo-se por ordem decrescente o CysGly 8 (5-12)  $\mu\text{M}$  e o GSH 2 (1-3)  $\mu\text{M}$ . Estudou-se a variabilidade interindividual das frações totais, expressa através do cálculo coeficiente de variação. Observou-se ainda uma elevada variabilidade nos valores dos tióis urinários entre indivíduos na população em estudo, sendo o valor mais elevado o do GSH (74%) e o menor para a cisteína (53%).



**Figura 7. Variabilidade interindividual dos níveis urinários da (A) cisteína, (B) cisteinilglicina, (C) glutatião.** A variabilidade interindividual foi obtida incluindo 149 indivíduos através do coeficiente de variação expresso em percentagem. Cys: cisteína; CysGly: cisteinilglicina; GSH: glutatião.

#### 5.3.2. Influência dos fatores demográficos e antropométricos nas concentrações urinárias dos aminotióis

Seguidamente fomos investigar o efeito da idade no perfil de tióis urinários.

Na Tabela 7 apresentam-se as duas frações para as quais se encontrou uma associação com a idade, em ambas esta associação foi negativa.

**Tabela 7.**Correlação entre a idade e as concentrações urinárias dos aminotióis (n=149).

<b>Parâmetros urinários</b>	<b>Coefficiente de correlação (rho)</b>	<b>p</b>
<b>Cys T</b>	-0,2074	0,0112
<b>GSH T</b>	-0,2068	0,0114

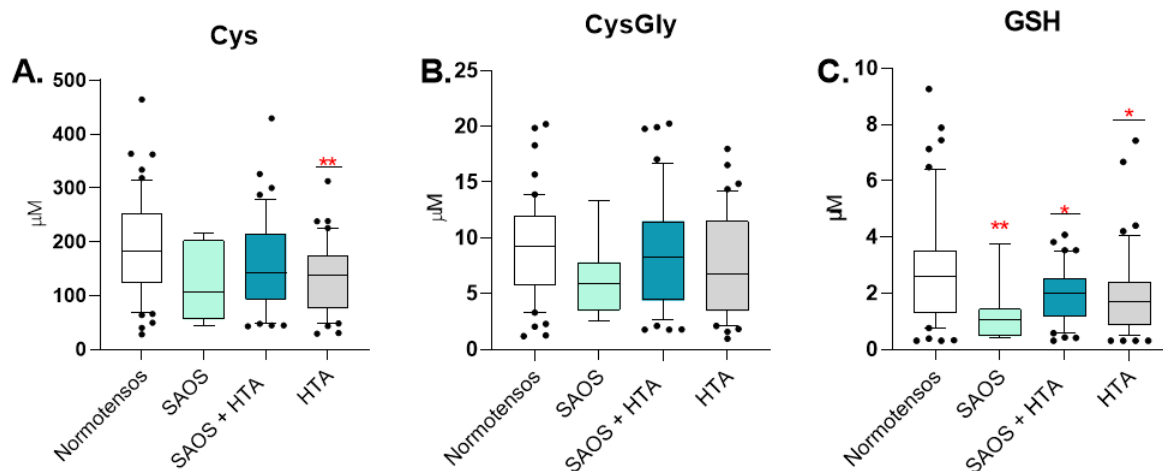
Foi utilizado o teste de correlação *Spearman* e incluídos todos os indivíduos (n=149). **Cys**: cisteína; **GSH**: glutatião; T: Total

Não foi encontrada nenhuma correlação estatisticamente significativa entre o IMC e as concentrações urinárias dos tióis.

Ao comparar as concentrações dos aminotióis entre homens e mulheres não se encontrou nenhuma diferença estatisticamente significativa.

### **5.3.3. Níveis urinários das diferentes frações dos aminotióis nos grupos de estudo**

As concentrações da fração total dos diferentes aminotióis (Figura 8) foram comparadas entre os 4 grupos de estudo, caracterizados na Tabela 3 (seção 5.1). Observamos que nenhum dos tióis urinários diferenciou indivíduos SAOS dos SAOS+HTA, tendo sido apenas observados valores medianos de GSH inferiores nos grupos com patologia quando comparados com normotensos. Sendo as únicas diferenças observadas na Cys entre os normotensos e os HTA (Figura 8.A).

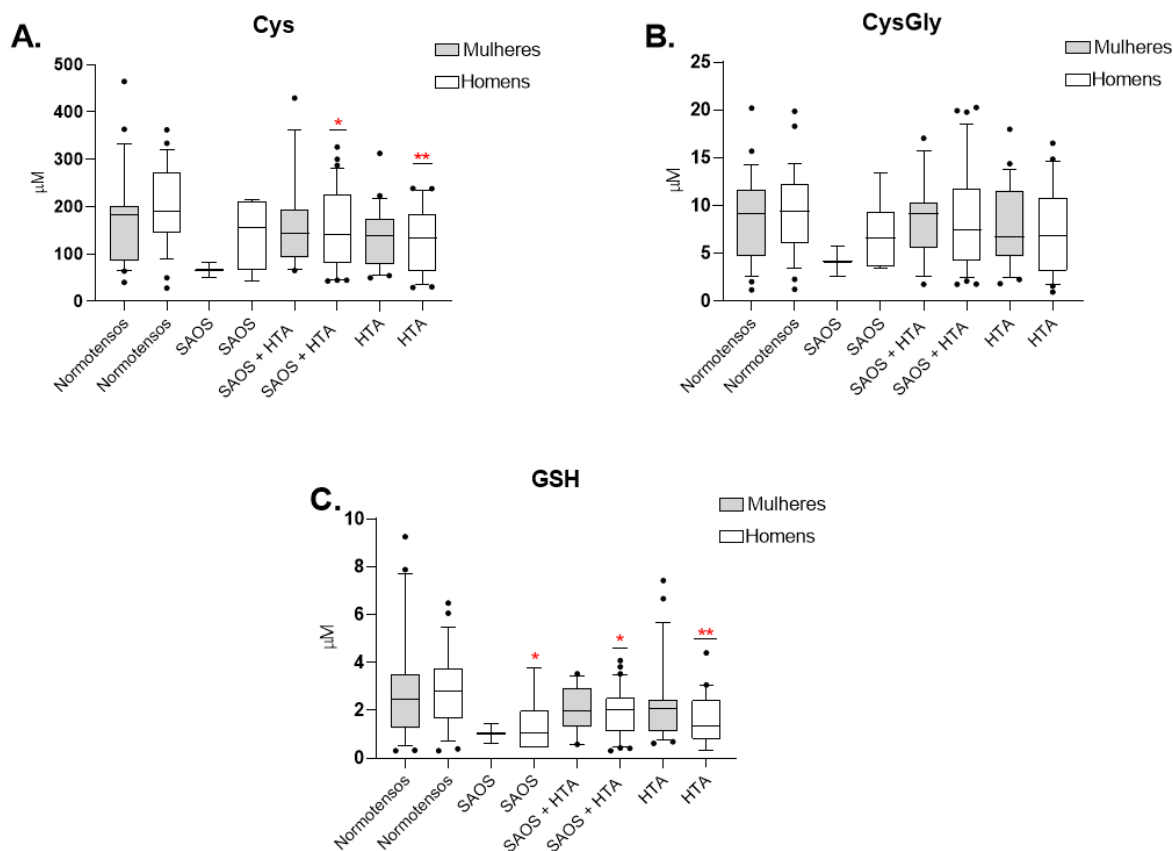


**Figura 8. Concentrações urinárias de (A) cisteína, (B) cisteinilglicina, (C) glutatião para os quatro grupos de estudo: Normotensos, SAOS, SAOS + HTA e HTA.** One-way ANOVA, teste Kruskal-Wallis de comparações múltiplas (\* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ;) para a análise entre os grupos normotensos ( $n=51$ ), SAOS ( $n=8$ ), SAOS + HTA ( $n=45$ ) e HTA ( $n=45$ ). \* vs. grupo normotenso. HTA: hipertensão arterial; SAOS: síndrome da apneia obstrutiva do sono; SAOS + HTA: síndrome de apneia obstrutiva do sono com hipertensão arterial; Cys: cisteína; CysGly: cisteinilglicina; GSH: glutatião.

#### 5.3.4. Níveis urinários dos aminotióis entre os grupos de estudo por sexo

Tal como fizemos com as amostras de soro, procedemos à avaliação das diferenças dos aminotióis entre os grupos (normotensos, SAOS, SAOS+HTA, HTA), dividindo os dados por sexo (Figura 9.).

Os níveis de Cys foram menores nos grupos SAOS+HTA e HTA comparativamente aos normotensos nos homens (Figura 9A). Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre patologias nas mulheres. Os níveis de CysGly não demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre patologias em homens ou mulheres (Figura 9B). Os níveis inferiores de GSH encontrados nos grupos com patologia comparativamente aos normotensos na população total, mantém-se para os indivíduos do sexo masculino, mas não para os do sexo feminino (Figura 9C).

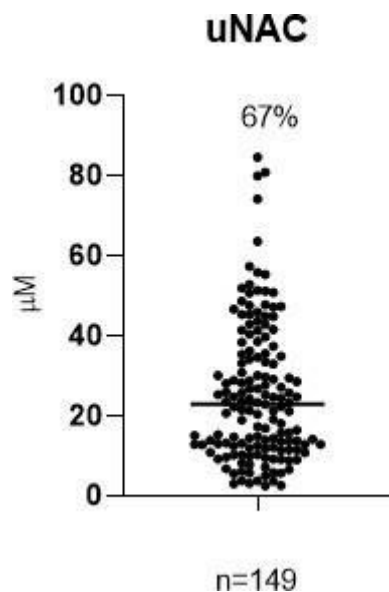


**Figura 9. Concentrações urinárias de (A) cisteína, (B) cisteinilglicina, (C) glutatião para os quatro grupos de estudo: Normotensos, SAOS, SAOS + HTA e HTA comparadas relativamente ao sexo do indivíduo.** Two way ANOVA de comparações múltiplas (\* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ;) \* vs. grupo normotenso. HTA: hipertensão arterial; SAOS: síndrome da apneia obstrutiva do sono; SAOS + HTA: síndrome de apneia obstrutiva do sono com hipertensão arterial; Cys: cisteína; CysGly: cisteinilglicina; GSH: glutatião.

## 5.4. Níveis urinários de mercapturatos de dissulfetos urinários nos diferentes grupos de estudo quantificados

### 5.4.1. Variabilidade interindividual nas concentrações uNAC

No que diz respeito ao indicador dos mercapturatos de dissulfetos de cisteína, uNAC, o valor mediano obtido foi de 23 (12-36)  $\mu\text{M}$ , tendo apresentado um elevado coeficiente de variação (67%), ou seja, uma elevada variabilidade interindividual entre pessoas (Figura 10).

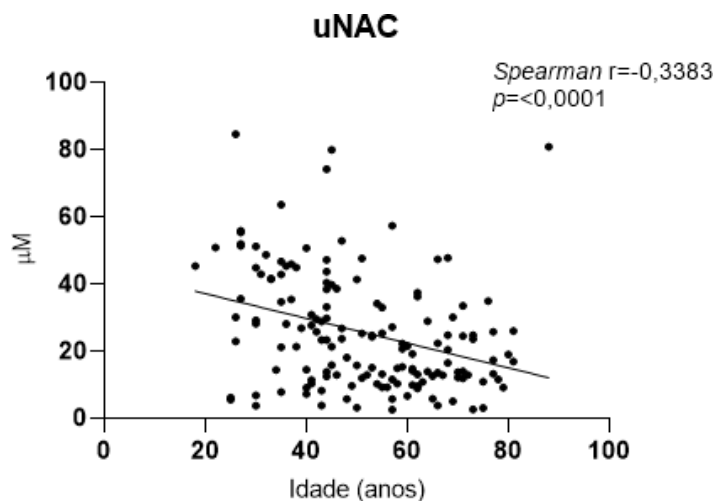


**Figura 10. Variabilidade interindividual da concentração do indicador dos mercapturatos de dissulfetos urinários uNAC.** A variabilidade interindividual foi obtida incluindo 149 indivíduos através do coeficiente de variação expresso em percentagem uNAC: indicador dos mercapturatos de dissulfetos urinários.

#### 5.4.2. Influência dos fatores demográficos e antropométricos no uNAC

Na Figura 11 observa-se a associação negativa entre o uNAC e a idade dos indivíduos independentemente do grupo de estudo. No entanto, a variação entre indivíduos no uNAC não parece estar dependente do IMC.

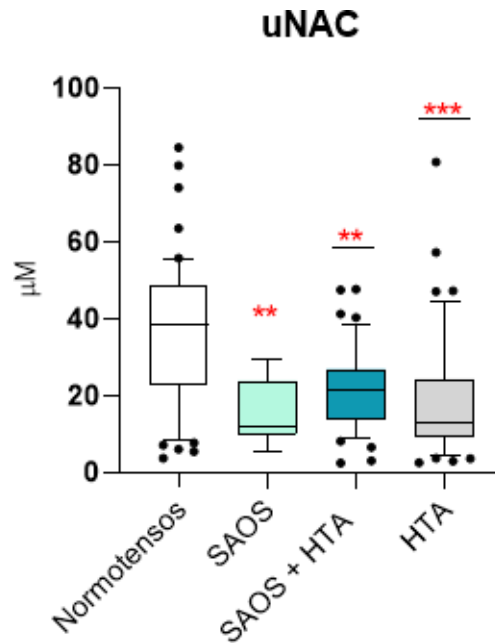
Os níveis de uNac não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre sexos masculino e feminino.



**Figura 11. Associação entre o uNAC e a idade dos indivíduos.** Teste de *Spearman*

### 5.4.3. Níveis de uNAC nos diferentes grupos de estudo

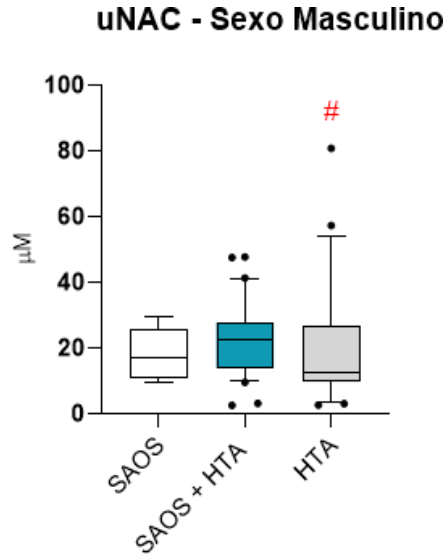
As concentrações do uNAC foram comparadas entre os grupos de estudo (normotensos n=51, SAOS n= 8, SAOS+HTA n= 45, HTA n=45) tendo-se verificado que não foi possível diferenciar o grupo de indivíduos SAOS do grupo de indivíduos SAOS+HTA (Figura 12.). No entanto, os níveis dos indivíduos com patologia são inferiores aos normotensos.



**Figura 12. Concentração de uNAC para os quatro grupos de estudo: Normotensos, SAOS, SAOS + HTA e HTA.** One-way ANOVA, teste Kruskal-Wallis de comparações múltiplas (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ) para a análise entre os grupos normotensos ( $n=51$ ), SAOS ( $n=8$ ), SAOS + HTA ( $n=45$ ) e HTA ( $n=45$ ). \* vs. grupo normotenso. HTA: hipertensão arterial; SAOS: síndrome da apneia obstrutiva do sono; SAOS + HTA: síndrome de apneia obstrutiva do sono com hipertensão arterial; uNAC: indicador dos mercapturatos de dissulfetos urinários.

### 5.4.4. Níveis de uNAC entre os grupos de estudo por sexo

A Figura 13 mostra que os níveis de uNAC no sexo masculino permitem discriminar os dois grupos com indivíduos hipertensos. Não foram identificadas diferenças para o sexo feminino.



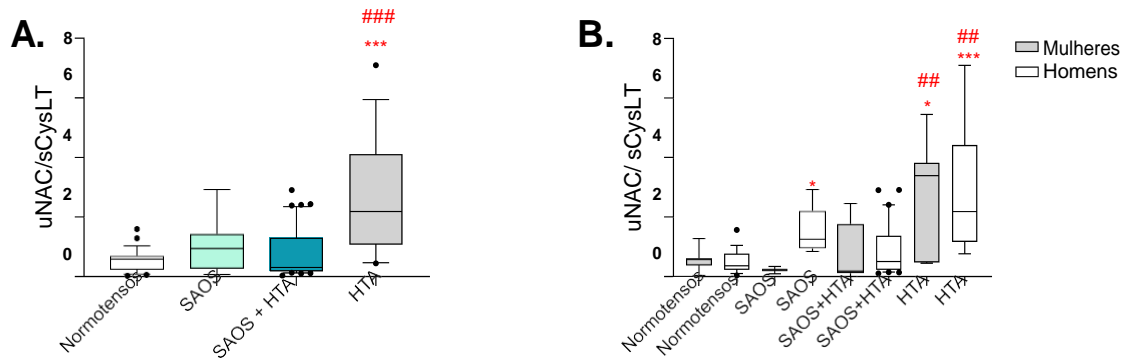
**Figura 13. Concentração de uNAC para os três grupos de estudo: Normotensos, SAOS, SAOS + HTA e HTA comparadas relativamente ao sexo do indivíduo.** Two-way ANOVA, teste Kruskal-Wallis de comparações múltiplas (#  $p < 0,05$ ) para a análise entre os grupos SAOS ( $n=8$ ), SAOS + HTA ( $n=45$ ) e HTA ( $n=45$ ). #: SAOS+HTA vs HTA; HTA: hipertensão arterial; SAOS: síndrome da apneia obstrutiva do sono; SAOS + HTA: síndrome de apneia obstrutiva do sono com hipertensão arterial; uNAC: indicador dos mercapturatos de dissulfetos urinários.

#### 5.4.5. Impacto do rácio uNAC/CysLT para discriminar os grupos de estudo

Com base nos resultados obtidos para os tióis urinários e séricos, o parâmetro mais promissor foi a Cys LT sérica. Sendo a CysLT substrato da enzima NAT8, foi calculado o rácio uNAC/CysLT como indicador da via dos mercapturatos.

Analisamos a influência deste rácio nos quatro grupos de estudo. O rácio apresentou diferenças tanto dos normotensos como SAOS+HTA no grupo dos HTA (Figura 14A.).

Analisamos também a influência do rácio nos quatro grupos de estudo dividindo os dados por sexo, onde se observou diferenças entre os normotensos vs HTA e SAOS. No entanto, ainda foi possível diferenciar SAOS+HTA vs HTA em homens e mulheres (Figura 14 B).



**Figura 14. Rácio uNAC/sCysLT para os grupos de estudo: Normotensos, SAOS, SAOS + HTA e HTA comparadas relativamente a doença e ao sexo.** Two-way ANOVA, teste Kruskal-Wallis de comparações múltiplas (# ou \*  $p < 0,05$ , ## ou \*\*  $p < 0,01$ ; ### ou \*\*\*  $p < 0,001$ ) para a análise entre os grupos SAOS (n=8), SAOS + HTA (n=45) e HTA (n=45). #: SAOS+HTA vs HTA; HTA: hipertensão arterial; SAOS: síndrome da apneia obstrutiva do sono; SAOS + HTA: síndrome de apneia obstrutiva do sono com hipertensão arterial; uNAC: indicador dos mercapturatos de dissulfetos urinários.

## 6. Discussão

Este estudo teve como objetivo avaliar o perfil tiolómico em amostras clínicas em doenças metabólicas como HTA e SAOS.

Foi encontrada uma alta variabilidade das concentrações dos aminotióis no soro e na urina. Observou-se uma influência de variáveis demográficas no tioloma como a idade e o sexo. Por último, algumas frações do tioloma conseguiram discriminar os indivíduos com SAOS dos indivíduos com SAOS e HTA, resultado muito promissor para diagnosticar de forma precoce o risco de desenvolver HTA na população com SAOS.

Os valores de aminotióis nas amostras séricas deste estudo vão ao encontro aos descritos na literatura, apesar de quando comparamos as frações totais no soro, os nossos valores estão ligeiramente aumentados. Este aumento pode dever-se ao facto de as amostras não terem sido obtidas de indivíduos sujeitos a jejum. Este é importante, uma vez que o tipo de dieta influencia por exemplo as quantidades de cisteína em circulação, uma vez que uma das vias de obtenção deste aminotiol é pela via da metionina que vem da existência da HCys da dieta. (Pennington, 1994; Vasdev, Singal, & Gill, 2009).

Através da comparação dos valores dos aminotióis urinários obtidos com os apresentados na Tabela 1 pode observar-se que os valores medianos dos tióis urinários são semelhantes aos descritos para a população saudável. No entanto, os valores de uNAC observados são inferiores aos documentados na população saudável, o que pode juntamente com a elevada variabilidade interindividual verificada indicar-nos que grande parte dos indivíduos incluídos na análise têm valores abaixo do esperado para este marcador (30%).

A variabilidade das concentrações dos aminotióis foi mais elevada na urina em comparação com o soro, em que o aminotiol mais elevado na urina foi o glutatião (74%) e no soro a homocisteína (fração livre total 74%, ligada as proteínas 58% e fração total 57%), demonstrando assim uma elevada variabilidade entre doentes.

No soro, as frações livres foram as que apresentaram maior variação. A fração de cisteína livre total e a ligada a proteínas foram as mais abundantes nos soros analisados. Os dissulfetos de cisteína assim como a sua ligação a proteínas têm sido apontadas como biomarcadores sensíveis de stress oxidativo, tendo sido demonstrada que a sua concentração elevada em pacientes sob stress oxidativo decrescia pelo tratamento com o antioxidante NAC. (Fu *et al*, 2019).

Na urina o aminotiol com maior variação foi o GSH enquanto que a Cys foi a mais abundante, sendo esta essencial para a via dos mercapturatos podendo indicar assim a sua utilização na via dos mercapturatos.

De acordo com a literatura a HTA e a SAOS encontram-se associadas à idade, obesidade, género e índice de apneia e hipoapneia (IAH) (Ekiz et al. ,2021). Podemos observar na urina que dos fatores analisados somente a idade se mostrou inversamente proporcional à concentração dos aminotióis a nível urinário (Cys e GSH). Já nas amostras séricas vemos influência da idade: em que as frações Cys T, CysSSP, GluCysSSP, HCys T, HCysSSP são proporcionais enquanto que as frações CysGly LT, GSH T e GSH LT são inversamente proporcionais e a influência do sexo nos aminotióis HCys T, HCysSSP e CysGly T, em que o sexo masculino apresenta valores elevados em comparação com o sexo feminino.

Os níveis de Cys LT aumentaram na SAOS + HTA em comparação com SAOS e em SAOS+HTA de HTA nos homens e mulheres; Cys T diferenciou SAOS+HTA de SAOS e o GSSP diferenciou SAOS+HTA de SAOS no sexo masculino; o uNAC diferenciou SAOS+HTA de HTA, mas somente no sexo masculino; sendo o interesse fundamental desta tese encontrar marcadores de risco de HTA na população com SAOS, tem particular relevância a CysLT e o GSSP.

A SAOS é uma doença multifatorial e associada a muitas comorbilidades. Desta forma torna-se importante encontrar biomarcadores específicos e sensíveis para detetar de forma precoce estas comorbilidades, nomeadamente HTA, na população com SAOS. Com os resultados obtidos, conseguimos ver a importância de termos um perfil metabólico que consiga distinguir estágios da doença e possíveis comorbilidades. Os aminotióis como a cisteína já foram estudados em pacientes com SAOS, mostrando-se promissores na identificação da efetividade do tratamento, mas o estudo ocorreu em pacientes com SAOS e saudáveis com sexo e idade emparelhadas. No nosso estudo, é possível observar que a Cys LT apresenta potencial para avaliar o risco de HTA na população com SAOS, tal como o GSSP sendo este só para o sexo masculino.

No estudo aqui apresentado, verificamos que os dissulfetos de cisteína estão diminuídos no soro e o rácio uNAC/sCys LT aumentado nos indivíduos hipertensos em comparação com os indivíduos com apneia do sono hipertensos, o que poderia sugerir que os dissulfetos de cisteína séricos poderiam estar a ser canalizados para o rim, de modo a aumentar a destoxificação de espécies eletrofílicas, pela via dos mercapturatos. No entanto, uma vez que os valores urinários de cisteína e NAC estão diminuídos neste grupo, leva-nos a crer que a via dos mercapturatos está diminuída e que ao invés, estes dissulfetos de cisteína, estejam a ser clivados, de modo a libertar a cisteína para se ligar a proteínas em circulação e assim

evitar a oxidação irreversível com outros compostos em circulação. O presente estudo mostra que os aminotióis analisados na urina (Cys, CysGly e GSH), diminuem quando comparados o grupo dos normotensos com os grupos de estudo.

A Cys LT é o marcador de HTA na SAOS mais promissor neste estudo. A cisteína já foi referenciada como um possível marcador da SAOS (Cintra *et al*, 2011). A Cys é uma fonte de metabólitos intracelulares relevantes e moléculas sinalizadoras, sendo essencial para a função renal, pois regula a pressão arterial. Sendo a cisteína essencial para a via dos mercapturatos pois são “criados” aductos que são eliminados pela via. Esta via confere proteção a células tubulares, visto que Cys em excesso é tóxica.

O presente estudo, apesar de adicionar conhecimento acerca desta temática no que se refere ao perfil tiolómico da HTA associada à SAOS, revelou algumas limitações, nomeadamente, a reduzida dimensão da amostra e o limitado número de parâmetros clínicos avaliados.

Seria importante em estudos futuros, aumentar o número de indivíduos no grupo da apneia obstrutiva do sono e o fornecimento de outros parâmetros clínicos, como a creatinina e taxa de filtração glomerular por forma a avaliar a influência da filtração renal nos aminotióis em circulação e os que são excretados. Parâmetros como o IAH também deveriam ser analisados, de modo a relacionar a severidade da SAOS.

Em suma, um desequilíbrio nos níveis dos aminotióis, traduz-se numa diminuição da capacidade antioxidante do organismo. O aumento do stress oxidativo leva a uma redução da capacidade antioxidante no organismo. No conjunto dos resultados obtidos, podemos sugerir a Cys LT como potencial marcador de risco de HTA na população com SAOS.

## 7. Conclusões

---

O objetivo deste estudo foi caracterizar a impressão digital tiolômica da hipertensão associada à síndrome da apneia obstrutiva do sono e produzir evidências sobre a relação entre a função tubular em doentes com doenças cardiometabólicas, nomeadamente Síndrome da Apneia Obstrutiva do Sono (SAOS) e Hipertensão Arterial (HTA).

Como biomarcadores da função tubular e diferenciadores das duas doenças cardiometabólicas aqui estudadas, os aminotióis, entre eles a CysLT, demonstraram ser bons candidatos de biomarcadores de risco de HTA na SAOS. Mais estudos são necessários como o estudo de outros aminotióis e confirmar se a Cys LT poderia vir a ser uma ferramenta de medicina de precisão e que esta não seja influenciada por outros fatores. Esta abordagem seria uma forma de diagnóstico não invasiva e muito mais rápida e eficiente podendo assim evitar alta prevalência de hipertensão.

## 8.Referências Bibliográficas

- Alonso-Fernández A, García-Río F, Arias MA, Hernanz A, de la Peña M, Piérola J, Barceló A, López-Collazo E, Agustí A. Effects of CPAP on oxidative stress and nitrate efficiency in sleep apnoea: a randomised trial. *Thorax*. 2009 Jul;64(7):581-6. doi: 10.1136/thx.2008.100537. Epub 2008 Dec 15. PMID: 19074930.
- Abuyassin B, Sharma K, Ayas NT, Laher I. Obstructive Sleep Apnea and Kidney Disease: A Potential Bidirectional Relationship? *J Clin Sleep Med*. 2015 Aug 15;11(8):915-24. doi: 10.5664/jcsm.4946. PMID: 25845900; PMCID: PMC4513269.
- Anitua, E., Durán-Cantolla, J., Almeida, G. Z., & Alkhraisat, M. H. (2020). Association between obstructive sleep apnea and enamel cracks. *American Journal of Dentistry*, 33(1), 29–32.
- Azeez, I. A., & Yusuf, B. O. (2018). Case finding of hypertension at a secondary health care facility in south-west nigeria. *Annals of Ibadan postgraduate medicine*, 16(1), 44–51.
- Bald, E., Glowacki, R., & Drzewoski, J. (2001). Determination by liquid chromatography of free and total cysteine in human urine in the form of its S-quinolinium derivative. *Journal of chromatography. A*, 913(1-2), 319–329. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)01202-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)01202-4)
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization journal*, 5(1), 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Bouhamida, E., Morciano, G., Perrone, M., Kahsay, A. E., Sala, M. Della, Wieckowski, M. R., Fiorica, F., Pinton, P., Giorgi, C., & Patergnani, S. (2022). The Interplay of Hypoxia Signaling on Mitochondrial Dysfunction and Inflammation in Cardiovascular Diseases and Cancer: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Approaches. *Biology*, 11(2), 1–32. <https://doi.org/10.3390/biology11020300>
- Calhoun DA, Jones D, Textor S, Goff DC, Murphy TP, Toto RD, White A, Cushman WC, White W, Sica D, Ferdinand K, Giles TD, Falkner B, Carey RM; American Heart Association Professional Education Committee. Resistant hypertension: diagnosis,

evaluation, and treatment: a scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Circulation*. 2008 Jun 24;117(25): e510-26. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.189141. PMID: 18574054.

Carpagnano GE, Kharitonov SA, Resta O, Foschino-Barbaro MP, Gramiccioni E, Barnes PJ. Increased 8-isoprostane and interleukin-6 in breath condensate of obstructive sleep apnea patients. *Chest*. 2002 Oct;122(4):1162-7. doi: 10.1378/chest.122.4.1162. PMID: 12377837.

Carpagnano, G. E., Kharitonov, S. A., Resta, O., Foschino-Barbaro, M. P., Gramiccioni, E., & Barnes, P. J. (2003). 8-Isoprostane, a marker of oxidative stress, is increased in exhaled breath condensate of patients with obstructive sleep apnea after night and is reduced by continuous positive airway pressure therapy. *Chest*, 124(4), 1386–1392. <https://doi.org/10.1378/chest.124.4.1386>

Caussé, E., Fournier, P., Roncalli, J., Salvayre, R., & Galinier, M. (2017). Serum allantoin and aminothiols as biomarkers of chronic heart failure. *Acta cardiologica*, 72(4), 397–403. <https://doi.org/10.1080/00015385.2017.1335104>

Chambers, J. C., Zhang, W., Lord, G. M., van der Harst, P., Lawlor, D. A., Sehmi, J. S., Gale, D. P., Wass, M. N., Ahmadi, K. R., Bakker, S. J., Beckmann, J., Bilo, H. J., Bochud, M., Brown, M. J., Caulfield, M. J., Connell, J. M., Cook, H. T., Cotlarciuc, I., Davey Smith, G., de Silva, R., ... Kooner, J. S. (2010). Genetic loci influencing kidney function and chronic kidney disease. *Nature genetics*, 42(5), 373–375. <https://doi.org/10.1038/ng.566>

Cintra, F., Tufik, S., D'Almeida, V., Calegare, B., de Paola, A., Oliveira, W., Rizzi, C., Roizenblatt, S., & Poyares, D. (2011). Cysteine: a potential biomarker for obstructive sleep apnea. *Chest*, 139(2), 246–252. <https://doi.org/10.1378/chest.10-0667>

Coelho, N. R., Dias, C. G., João Correia, M., Grácio, P., Serpa, J., Monteiro, E. C., Diogo, L. N., & Pereira, S. A. (2018). Cysteine Oxidative Dynamics Underlies Hypertension and Kidney Dysfunction Induced by Chronic Intermittent Hypoxia. *Advances in experimental medicine and biology*, 1071, 83–88. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-91137-3\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-91137-3_10)

- Correia, M. J., Pimpão, A. B., Fernandes, D. G. F., Morello, J., Sequeira, C. O., Calado, J., Antunes, A. M. M., Almeida, M. S., Branco, P., Monteiro, E. C., Vicente, J. B., Serpa, J., & Pereira, S. A. (2022). Cysteine as a Multifaceted Player in Kidney, the Cysteine-Related Thiols and Its Implications for Precision Medicine. *Molecules*, 27(4). <https://doi.org/10.3390/molecules27041416>
- Coskun O. (2016). Separation techniques: Chromatography. *Northern clinics of Istanbul*, 3(2), 156–160. <https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757>
- Datta, S. K., Kumar, V., Pathak, R., Tripathi, A. K., Ahmed, R. S., Kalra, O. P., & Banerjee, B. D. (2010). Association of glutathione S-transferase M1 and T1 gene polymorphism with oxidative stress in diabetic and nondiabetic chronic kidney disease. *Renal failure*, 32(10), 1189–1195. <https://doi.org/10.3109/0886022X.2010.517348>
- De Carvalho, J. A., Piva, S. J., Hausen, B. S., Bochi, G. V., Kaefer, M., Coelho, A. C., Duarte, M. M., & Moresco, R. N. (2011). Assessment of urinary  $\gamma$ -glutamyltransferase and alkaline phosphatase for diagnosis of diabetic nephropathy. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 412(15-16), 1407–1411. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.04.015>
- Dewan, NA, Nieto, FJ, & Somers, VK (2015). Intermittent Hypoxemia and OSA Implications for Comorbidities. *Chest*, 2015 January, 147(1):266-274. <https://doi.org/10.1378/chest.14-0500>
- Durán, J., Esnaola, S., Rubio, R., & Iztueta, A. (2001). Obstructive sleep apnea-hypopnea and related clinical features in a population-based sample of subjects aged 30 to 70 yr. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 163(3 Pt 1), 685–689.
- Dusse, L. M. S., Rios, D. R. A., Sousa, L. P. N., Moraes, R. M. M. e S., Domingueti, C. P., & Gomes, K. B. (2017). Biomarkers of Renal Function: What Is Currently Available? *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 49(1), 41–51. <https://doi.org/10.21877/2448-3877.201600427>
- Eckert, D. J., White, D. P., Jordan, A. S., Malhotra, A., & Wellman, A. (2013). Defining phenotypic causes of obstructive sleep apnea. Identification of novel therapeutic targets. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 188(8), 996–1004. <https://doi.org/10.1164/rccm.201303-0448OC>

- Ekiz, T., Kara, M., Ricci, V., & Özçakar, L. (2021). Obstructive sleep apnea syndrome–related hypertension and sarcopenia: a brief glance on the renin-angiotensin-aldosterone system. *Sleep and Breathing*, 25(2), 1159–1161. <https://doi.org/10.1007/s11325-020-02119-9>
- Faselis, C., Doumas, M., & Papademetriou, V. (2011). Common secondary causes of resistant hypertension and rational for treatment. *International journal of hypertension*, 2011, 236239. <https://doi.org/10.4061/2011/236239>
- Finkelstein, J. D., Martin, J. J., & Harris, B. J. (1986). Effect of dietary cystine on methionine metabolism in rat liver. *The Journal of nutrition*, 116(6), 985–990. <https://doi.org/10.1093/jn/116.6.985>
- Floras, J. S. (2015). Hypertension and Sleep Apnea. *Canadian Journal of Cardiology*, 31(7), 889–897. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2015.05.003>
- Fu, X., Cate, S. A., Dominguez, M., Osborn, W., Özpolat, T., Konkle, B. A., Chen, J., & López, J. A. (2019). Cysteine Disulfides (Cys-ss-X) as Sensitive Plasma Biomarkers of Oxidative Stress. *Scientific reports*, 9(1), 115. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35566-2>
- Gai, Z., Gui, T., Kullak-Ublick, G. A., Li, Y., & Visentin, M. (2020). The Role of Mitochondria in Drug-Induced Kidney Injury. *Frontiers in Physiology*, 11(September). <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.01079>
- Giestas, A., Palma, I., & Ramos, M. H. (2010). Sistema renina-angiotensina-aldosterona: E sua modulação farmacológica. *Acta Medica Portuguesa*, 23(4), 677–688.
- modulação farmacológica. *Acta Medica Portuguesa*, 23(4), 677–688.
- Goncalves-Dias, C., Morello, J., Correia, M. J., Coelho, N. R., Antunes, A. M. M., MacEdo, M. P., Monteiro, E. C., Soto, K., & Pereira, S. A. (2019). Mercapturate pathway in the tubulocentric perspective of diabetic kidney disease. *Nephron*, 143(1), 17–23. <https://doi.org/10.1159/000494390>

- Gonçalves-Dias, C., Morello, J., Semedo, V., Correia, M. J., Coelho, N. R., Monteiro, E. C., Antunes, A. M. M., & Pereira, S. A. (2019). The mercapturomic profile of health and non-communicable diseases. *High-Throughput*, 8(2), 1–24. <https://doi.org/10.3390/ht8020010>
- Gonçalves-Dias, C., Sequeira, C. O., Vicente, J. B., Correia, M. J., Coelho, N. R., Morello, J., Antunes, A. M. M., Soto, K., Monteiro, E. C., & Pereira, S. A. (2021). A Mechanistic-Based and Non-invasive Approach to Quantify the Capability of Kidney to Detoxify Cysteine-Disulfides. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1306, 109–120. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-63908-2\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-030-63908-2_8)
- Grilo, N. M., João Correia, M., Miranda, J. P., Cipriano, M., Serpa, J., Matilde Marques, M., Monteiro, E. C., Antunes, A., Diogo, L. N., & Pereira, S. A. (2017). Unmasking efavirenz neurotoxicity: Time matters to the underlying mechanisms. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 105, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.05.010>
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of biological chemistry*, 249(22), 7130–7139.
- Hacman, D. G., & Anand, S. S. (2003). Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review. *Clinical Cardiology*, 29(7), 932–940.
- Hedner, J., Bengtsson-Boström, K., Peker, Y., Grote, L., Råstam, L., & Lindblad, U. (2006). Hypertension prevalence in obstructive sleep apnoea and sex: a population-based case-control study. *The European respiratory journal*, 27(3), 564–570. <https://doi.org/10.1183/09031936.06.00042105>
- Hirakawa, D. A., & Baker, D. H. (1985). Sulfur amino acid nutrition of the growing puppy: Determination of dietary requirements for methionine and cystine. *Nutrition Research*, 5(6), 631–642. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(85\)80244-X](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(85)80244-X)
- Ibekwe R. (2015). Modifiable Risk factors of Hypertension and Socio-demographic Profile in Oghara, Delta State; Prevalence and Correlates. *Annals of medical and health sciences research*, 5(1), 71–77. <https://doi.org/10.4103/2141-9248.149793>

- Jehan, S., Zizi, F., Pandi-Perumal, S. R., Wall, S., Auguste, E., Myers, A. K., Jean-Louis, G., & McFarlane, S. I. (2017). Obstructive Sleep Apnea and Obesity: Implications for Public Health. *Sleep medicine and disorders: international journal*, 1(4), 00019.
- Jennum, P., & Riha, R. L. (2009). Epidemiology of sleep apnoea/hypopnoea syndrome and sleep-disordered breathing. *The European respiratory journal*, 33(4), 907–914. <https://doi.org/10.1183/09031936.00180108>
- Jennum, P., & Kjellberg, J. (2011). Health, social and economical consequences of sleep-disordered breathing: a controlled national study. *Thorax*, 66(7), 560–566. <https://doi.org/10.1136/thx.2010.143958>
- Ji, Y., Wu, Z., Dai, Z., Sun, K., Zhang, Q., & Wu, G. (2016). Excessive L-cysteine induces vacuole-like cell death by activating endoplasmic reticulum stress and mitogen-activated protein kinase signaling in intestinal porcine epithelial cells. *Amino acids*, 48(1), 149–156. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2071-5>
- Juhanson, P., Kepp, K., Org, E., Veldre, G., Kelgo, P., Rosenberg, M., Viigimaa, M., & Laan, M. (2008). N-acetyltransferase 8, a positional candidate for blood pressure and renal regulation: Resequencing, association and in silico study. *BMC Medical Genetics*, 9, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-9-25>
- Kapur, V. K. (2010). Obstructive sleep apnea: Diagnosis, epidemiology, and economics. *Respiratory Care*, 55(9), 1155–1167.
- Kuśmierek, K., & Bald, E. (2008). Determination of N-acetylcysteine and thioglycolic acid in human urine. *Chromatographia*, 67(1–2), 23–29. <https://doi.org/10.1365/s10337-007-0447-8>
- Lushchak V. I. (2012). Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *Journal of amino acids*, 2012, 736837. <https://doi.org/10.1155/2012/736837>
- Madamanchi, N. R., Vendrov, A., & Runge, M. S. (2005). Oxidative stress and vascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 25(1), 29–38. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000150649.39934.13>

- Mannarino, M. R., Di Filippo, F., & Pirro, M. (2012). Obstructive sleep apnea syndrome. *European Journal of Internal Medicine*, 23(7), 586–593. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2012.05.013>
- Montesi, S. B., Bajwa, E. K., & Malhotra, A. (2012). Biomarkers of sleep apnea. *Chest*, 142(1), 239–245. <https://doi.org/10.1378/chest.11-2322>
- Oliveira, P. V. S., & Laurindo, F. R. M. (2018). Implications of plasma thiol redox in disease. *Clinical Science*, 132(12), 1257–1280. <https://doi.org/10.1042/CS20180157>
- Paolicchi, A., Dominici, S., Pieri, L., Maellaro, E., & Pompella, A. (2002). Glutathione catabolism as a signaling mechanism. *Biochemical Pharmacology*, 64(5–6), 1027–1035. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)01173-5](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01173-5)
- Pankow, W., Nabe, B., Lies, A., Becker, H., Köhler, U., Kohl, F. V., & Lohmann, F. W. (1997). Influence of sleep apnea on 24-hour blood pressure. *Chest*, 112(5), 1253–1258. <https://doi.org/10.1378/chest.112.5.1253>
- Parati, G., Ochoa, J. E., Bilo, G., Mattaliano, P., Salvi, P., Kario, K., & Lombardi, C. (2014). Obstructive sleep apnea syndrome as a cause of resistant hypertension. *Hypertension research: official journal of the Japanese Society of Hypertension*, 37(7), 601–613. <https://doi.org/10.1038/hr.2014.80>
- Passali, D., Corallo, G., Yaremchuk, S., Longini, M., Proietti, F., Passali, G. C., & Bellussi, L. (2015). Oxidative stress in patients with obstructive sleep apnoea syndrome. *Acta otorhinolaryngologica Italica: organo ufficiale della Societa italiana di otorinolaringologia e chirurgia cervico-facciale*, 35(6), 420–425. <https://doi.org/10.14639/0392-100X-895>
- Pennington JA. Supplementary tables – amino acids. In: Allen A, editor. *Bowes & Church's Food Values of Portions Commonly Used*. 16th edn. Philadelphia: JB Lippincott Company; 1994. pp. A325–77
- Peppard, P. E., Young, T., Barnet, J. H., Palta, M., Hagen, E. W., & Hla, K. M. (2013). Increased prevalence of sleep-disordered breathing in adults. *American journal of epidemiology*, 177(9), 1006–1014. <https://doi.org/10.1093/aje/kws342>

- Pinto, J. A., Ribeiro, D. K., Cavallini, A. F., Duarte, C., & Freitas, G. S. (2016). Comorbidities Associated with Obstructive Sleep Apnea: a Retrospective Study. *International archives of otorhinolaryngology*, 20(2), 145–150. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1579546>
- Pochetti, P., Azzolina, D., Ragnoli, B., Tillio, P. A., Cantaluppi, V., & Malerba, M. (2020). Interrelationship among Obstructive Sleep Apnea, Renal Function and Survival: A Cohort Study. *International journal of environmental research and public health*, 17(14), 4922. <https://doi.org/10.3390/ijerph17144922>
- Portugal, Ministério da Saúde, Direção Geral de Saúde. (2013). Norma nº020/2011: Hipertensão arterial: Definição e classificação. DGS. <http://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0202011-de28092011-atualizada-a-19032013.aspx>
- Portugal, Ministério da Saúde, Direção-Geral da Saúde (2017). Programa nacional para as doenças cerebrovasculares 2017. DGS.
- Punjabi, N. M. (2008). The epidemiology of adult obstructive sleep apnea. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 5(2), 136–143. <https://doi.org/10.1513/pats.200709-155MG>
- Romero-Corral, A., Caples, S. M., Lopez-Jimenez, F., & Somers, V. K. (2010). Interactions between obesity and obstructive sleep apnea: implications for treatment. *Chest*, 137(3), 711–719. <https://doi.org/10.1378/chest.09-0360>
- Rotenberg, B. W., Murariu, D., & Pang, K. P. (2016). Trends in CPAP adherence over twenty years of data collection: a flattened curve. *Journal of otolaryngology - head & neck surgery = Le Journal d'oto-rhino-laryngologie et de chirurgie cervico-faciale*, 45(1), 43. <https://doi.org/10.1186/s40463-016-0156-0>
- Serpa J. (2020). Cysteine as a Carbon Source, a Hot Spot in Cancer Cells Survival. *Frontiers in oncology*, 10, 947. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00947>
- Shibui, Y., Sakai, R., Manabe, Y., & Masuyama, T. (2017). Comparisons of l-cysteine and d-cysteine toxicity in 4-week repeated-dose toxicity studies of rats receiving daily oral administration. *Journal of toxicologic pathology*, 30(3), 217–229. <https://doi.org/10.1293/tox.2017-0002>

Singh, V. K., Rahman, M. N., Munro, K., Uversky, V. N., Smith, S. P., & Jia, Z. (2012). Free cysteine modulates the conformation of human c/ebp homologous protein. *PLoS ONE*, 7(4), 22–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034680>

Sleep-related breathing disorders in adults: recommendations for syndrome definition and measurement techniques in clinical research. The Report of an American Academy of Sleep Medicine Task Force. (1999). *Sleep*, 22(5), 667–689.

- Sociedade Portuguesa de Hipertensão, (2022), Hipertensão Arterial (HTA): O que é? Postado em [https://www.sphta.org.pt/pt/base8\\_detail/24/89](https://www.sphta.org.pt/pt/base8_detail/24/89)
- Strimbu, K., & Tavel, J. A. (2010). What are biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS*, 5(6), 463–466. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32833ed177>
- Sumayao, R., Newsholme, P., & McMorrow, T. (2018). The role of cystinosin in the intermediary thiol metabolism and redox homeostasis in kidney proximal tubular cells. *Antioxidants*, 7(12). <https://doi.org/10.3390/antiox7120179>
- Tian, Z., & Liang, M. (2021). Renal metabolism and hypertension. *Nature communications*, 12(1), 963. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21301-5>
- van Goor, H., van den Born, J. C., Hillebrands, J. L., & Joles, J. A. (2016). Hydrogen sulfide in hypertension. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 25(2), 107–113. <https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000000206>
- World Health Organization, (2021) Hypertension. Postado em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hypertension>
- Young, T., Palta, M., Dempsey, J., Skatrud, J., Weber, S., & Badr, S. (1993). The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *The New England journal of medicine*, 328(17), 1230–1235. <https://doi.org/10.1056/NEJM199304293281704>
- Zhang, W., Li, P., Geng, Q., Duan, Y., Guo, M., & Cao, Y. (2014). Simultaneous determination of glutathione, cysteine, homocysteine, and cysteinylglycine in biological fluids by ion-pairing high-performance liquid chromatography coupled with precolumn derivatization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(25), 5845–5852. <https://doi.org/10.1021/jf5014007>
- Zhang, W., & Si, L. Y. (2012). Obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) and hypertension: pathogenic mechanisms and possible therapeutic approaches. *Upsala journal of medical sciences*, 117(4), 370–382. <https://doi.org/10.3109/03009734.2012.707253>

# Anexo I

## CE-ESTeSL-Nº.31-2022 – Ana Rita Serafim Sequeira



**De** Comissão Ética <comissaoetica@estel.ipl.pt>  
**Para** Ana Sequeira <2000219@alunos.estel.ipl.pt>, Ana Sofia Rodrigues Tavares <ana.tavares@estel.ipl.pt> <sofia.pereira@rma.unl.pt>  
**Cc** Mestrados <mestrados@estel.ipl.pt>, Edna Ribeiro <edna.ribeiro@estel.ipl.pt>  
**Data** 2022-06-17 15:23

### REFERÊNCIA INTERNA DO PROJETO: CE-ESTeSL-Nº.31-2022 – Ana Rita Serafim Sequeira

**TÍTULO DO PROJETO:** Biotransformação de Difenilacetato em Doença Cardiovascular

**Tipo de Projeto/Estudo:** Investigação 2º ciclo

**INVESTIGADORA RESPONSÁVEL:** Ana Rita Serafim Sequeira

**Equipa:** Ana Sofia Tavares, Sofia Pereira

**INSTITUIÇÃO PROMOTORA:** Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa

**Instituição(s) envolvida(s):** ESTeSL-IP, NOVA Medical School - Faculdade de Ciências Médicas

Exma. Senhora Profª. Sofia Pereira

Exma. Senhora Profª. Ana Sofia Tavares

Exma. Senhora Dra. Ana Rita Sequeira, Estudante de Mestrado

Após os esclarecimentos de 29 de maio, o Comité de Ética de Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (CE-ESTeSL) decidiu por unanimidade a seguinte deliberação:

O presente parecer tem em consideração a correta submissão do projeto e demais documentação enviada. Exceções atenuantes estão devidamente documentadas e justificadas de acordo com o presente parecer.

Tratamos aqui todos os aspetos que se referem à submissão dos participantes e à recolha de amostras e dados anonimizados e em conformidade com o Regulamento Geral sobre a Proteção de Dados de 17 de maio de 2018.

Por último, salientamos que, ao abrigo do nº 19 da Lei 21/2014 de 16 de abril e do disposto no nº 23 do atual texto da Declaração de Helsínquia, seja dado conhecimento à CE-ESTeSL de qualquer incidência com os resultados do estudo, bem como de qualquer alteração ao protocolo de investigação e demais informações sobre os intervenientes.

Agradecemos desde já a sua atenção e muito obrigado ao desenvolvimento deste trabalho.

Com os melhores cumprimentos,

Rita Barroga

Rita Barroga | Professora Adjunta  
Presidente do Comité de Ética

Avenida João de Deus 400-015, Parque das Nações  
1649-016 Lisboa | Portugal  
[comissaoetica@estel.ipl.pt](mailto:comissaoetica@estel.ipl.pt)  
+351 218886407

