

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

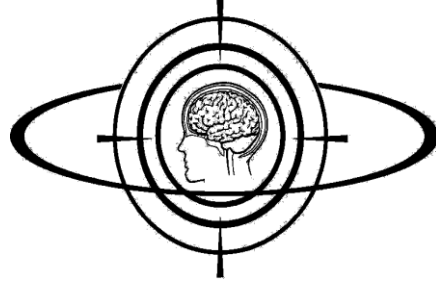


**PAPEL DAS MUTAÇÕES DO GENE DA AQUAPORINA 4
NO EDEMA CEREBRAL DE ETIOLOGIA TRAUMÁTICA**

RICARDO RIBEIRO ROMEIRO

**BELO HORIZONTE, MG
2010**

RICARDO RIBEIRO ROMEIRO



**PAPEL DAS MUTAÇÕES DO GENE DA AQUAPORINA 4
NO EDEMA CEREBRAL DE ETIOLOGIA TRAUMÁTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Neurociências da Universidade
Federal de Minas Gerais como requisito parcial
para obtenção de grau de Doutor

Área de concentração: Neurobiologia
Orientador: Prof. Humberto Correa da Silva Filho

**Belo Horizonte
2010**

Folha de Aprovação

A comissão organizadora, abaixo assinada, aprova a tese intitulada: PAPEL DAS MUTAÇÕES DO GENE DA AQUAPORINA 4 NO EDEMA CEREBRAL DE ETIOLOGIA TRAUMÁTICA, apresentada em sessão pública por Ricardo Ribeiro Romeiro, aluno do Programa de Pós Graduação em Neurociências. Área de concentração: Neurobiologia, da Universidade Federal de Minas Gerais, para obtenção de grau de DOUTOR em Neurociências, realizada em 11 / 03 /2010.

Prof. Humberto Corrêa da Silva Filho– **Orientador**

Prof. Jair Leopoldo Raso

Prof. Fernando Silva Neves

Prof. João Batista Macedo Vianna

Prof. Rodrigo Nicolato

Belo Horizonte, 11 de março de 2010.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor

Prof. Ronaldo Tadeu Pena

Vice Reitora

Prof. Heloisa Maria Murcel Starling

Pró-Reitora de Pós-Graduação

Prof. Elizabeth Ribeiro da Silva

**Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em
Neurociências**

Ângela Maria Ribeiro

A meus familiares

A meus mestres

Aos pacientes

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Humberto Corrêa da Silva Filho, pela confiança, por todo auxílio e orientação e pela amizade.

Aos professores Luiz Armando de Marco e Marco Aurélio Romano Silva, exemplos de dedicação às Ciências.

À Professora Wolfanga Lentz Monteiro Bosom, Mestra querida.

Aos professores dos Cursos de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, pelo saber que tão bem e despojadamente transferem.

Aos acadêmicos da iniciação científica Pedro Henrique Cardieri Romeiro, Rebeca Mascarenhas Lima, Gabriel de Campos Silva, Gabriela Cordeiro Tavares, Vinícius Coralino, Daniel M. Vilela e Laura Miranda Kilimnik, pelo auxílio prestado na realização dos ensaios biomoleculares e coleta de amostras.

À colega Luciana Rodrigues e outros amigos do Laboratório de Neurociências.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular.

À Iraídes Silva de Jesus, secretária da Pós-Graduação.

Ao Sérgio Naves Cardieri e à Marília Inês Naves Cardieri, pelo apoio de informática.

Ao Corpo de Enfermagem do Hospital João XXIII, pela ajuda na coleta de amostras e cuidados aos pacientes.

Ao Corpo Clínico do Hospital João XXIII.

Ao Professor Marcos Mesquita Filho, pela ajuda no estudo estatístico.

RESUMO

Os traumas tornaram-se um importante problema social e de saúde pública, e são a segunda principal causa de morte nos grandes centros urbanos no Brasil e de alguns outros países do mundo. Edema cerebral e hemorragia são fatores envolvidos na determinação do quadro clínico e prognóstico da lesão cerebral traumática. O edema cerebral contribui significativamente para a morbidade e mortalidade após o trauma crânioencefálico. A descoberta dos canais de água, aquaporinas, forneceu novos e importantes conhecimentos sobre os mecanismos de permeabilidade da membrana, e alterou o entendimento da fisiologia do edema. A aquaporina-4 (AQP4) é uma proteína de canal de água fortemente expressa no cérebro, e agora temos provas abundantes de que esta proteína pode estar envolvida no desenvolvimento do edema cerebral. Variantes genéticas em outros membros da família das aquaporinas têm sido associadas a doenças do desequilíbrio da água. O objetivo deste estudo foi avaliar a frequência de três variantes do gene que codifica a proteína aquaporina-4, e associá-las com o desfecho clínico de pacientes que sofreram traumatismos crânioencefálicos. Cento e oitenta e quatro pacientes, que sofreram traumatismos crânioencefálicos, foram avaliados em suas estadias no hospital, com relação às suas condições clínicas. O DNA extraído do sangue de veia periférica de cada paciente foi submetido a estudos de técnicas biológicas moleculares, sequenciamento e PCR em tempo real. Os resultados mostram que duas variantes da aquaporina 4 são raras e têm pouca relevância clínica. Outra variante que ocorre em região 3' não traduzida, de alta frequência entre diferentes populações, provavelmente tem um grande potencial para alterar o prognóstico de pacientes com edema cerebral.

Palavras-chave: Aquaporina 4; Edema cerebral; Traumatismo crânioencefálico.

ABSTRACT

Traumas have become a pressing social and public health problem, and they are the second leading cause of death in major urban centers in Brazil and some other countries in the world. Cerebral edema and bleeding are factors involved in determining the clinical presentation and prognosis of traumatic brain injury. Cerebral edema contributes significantly to morbidity and mortality after brain injury. The discovery of water channels, Aquaporins, has provided important new insights into mechanisms of membrane permeability, and altered the understanding of the physiology of the edema. Aquaporin-4 (AQP4) is a water-channel protein expressed strongly in the brain, and now there are abundant evidences that this protein might be implicated in the development of cerebral edema. Genetic variants in other Aquaporin family members have been associated with diseases of the water imbalance. The purpose of this study was to evaluate the frequency of three variants in the gene encoding aquaporin-4 protein and associate them with the clinical outcome of patients who suffered head trauma. The one hundred eighty-four patients who suffered traumatic brain injury were evaluated in their hospital stay, with respect their clinical conditions. DNA extracted from blood of peripheral vein of each patient was submitted to molecular biological techniques studies, sequencing and real-time PCR. The results show that two variants of Aquaporin 4 are uncommon and probably have little clinical relevance. Another variant that occurs in 3'UTR of high frequency among ethnically diverse populations probably has great potential to alter the prognosis of patients with cerebral edema.

Key Words: Aquaporin 4; Brain Oedema; Head trauma.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

QUADRO 1	Volumes aproximados dos compartimentos intracranianos	61
QUADRO 2	Classificações do edema cerebral segundo Klatzo, lencean e Marmarou	66
GRÁFICO 1	Glasgow de 946 pacientes, com traumatismos craniencefálicos, internados no Hospital João XXIII, no período da pesquisa	57
FIGURA 1	Bom resultado de uma amplificação	29
FIGURA 2	A parte do eletroferograma com a sequência de interesse, da amostra 19, analisada pelo <i>Chromas Pro</i> .	37
FIGURA 3	Amostras 22, 40, 32, 39, 53, 32, analisadas pelo <i>Codoncode Aligner</i> amostras não alinhadas.	38
FIGURA 4	Amostras 21, 17, 7, 13 e 35, analisadas pelo <i>Sequenceviewer 4</i> .	39
FIGURA 5	Parte do eletroferograma com a sequência de interesse da amostra 7 analisada pelo <i>Chromas Pro</i> , onde a seta identifica um polimorfismo rs35248760 heterozigoto	40
FIGURA 6	Parte do eletroferograma com a sequência de interesse da amostra 17 analisada pelo <i>Chromas Pro</i> , onde a seta identifica um polimorfismo rs35248760 homozigoto	40
FIGURA 7	Placa de <i>PCR Real Time</i> com resultados parciais da amostra de 58 pacientes.	41
FIGURA 8	Placa de <i>PCR Real Time</i> com resultados parciais da amostra de 87 controles	42

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Níveis do estado neurológico do egresso hospitalar – o desfecho clínico	25
TABELA 2	Nível de gravidade dos TCES da amostra de 184 pacientes selecionados para genotipagem	25
TABELA 3	Proporções de reagentes para uma reação-padrão de amplificação da região de interesse	28
TABELA 4	Iniciadores e condições utilizadas no método de PCR para o gene da AQP4	34
TABELA 5	Frequência dos genótipos de 87 controles e de 58 pacientes vítimas de TCE	42
TABELA 6	Resultados clínicos da amostra de 58 pacientes genotipados para o rs3763043	43
TABELA 7	Pacientes portadores do alelo CC, com suas respectivas lesões anatomopatológicas e prognósticos	46
TABELA 8	Pacientes portadores do alelo TC, com suas respectivas lesões anatomopatológicas e prognósticos	47
TABELA 9	Pacientes portadores do alelo TT, com suas respectivas lesões anatomopatológicas e prognósticos	48
TABELA 10	Frequência dos alelos da (variante b), SNPS rs35248769, em 48 pacientes	50
TABELA 11	Frequência da variante b em 48 pacientes	50
TABELA 12	Comparação entre os grupos controle e pacientes	51
TABELA 13	Partição do quiquadrado	52
TABELA 14	Comparação entre as medidas extremas e as de tendência central, relativas ao teste de Glasgow à admissão, entre os portadores dos diferentes alelos	53
TABELA 15	Comparação entre as medidas extremas e as de tendência central, relativas ao <i>Glasgow Outcome</i> , entre os portadores dos diferentes alelos.	53

LISTA DE ABREVIATURAS

ABIPEME	Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa
AQP1	Aquaporina-1
AQP2	Aquaporina-2
AQP3	Aquaporina-3
AQP4	Aquaporina-4
ATLS	<i>Advanced Trauma Life Support</i>
ATP	Tri-Fosfato de Adenosina
AVD	<i>Apoptotic Volume Decrease</i>
AVCI	Acidente Vascular Cerebral Isquêmico Agudo
AVP	Vasopressina
AZA	Acetazolamida
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CA	Anidrase Carbônica
CaMKII	Proteína Quinase do Tipo II Dependente de Cálcio Calmodulina
CKII	Caseína Quinase Tipo II
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EPO	Eritropoetina
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>

Código de campo alterado

NOS	Óxido Nítrico Sintetase
MIWC	<i>Mercurial Insensitive Water Channel</i>
mGluRI	Receptores Metabotrópicos do Glutamato Tipo I
OH	Radical Hidroxila
ONOO ⁻	Peróxinitrito
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PIC	Pressão Intracraniana
PKA	Fosfoquinase A
PKC	Fosfoquinase C
PLC	Fosfolipase C
RVD	<i>Regulatory Volume Decrease</i>
RVI	<i>Regulatory Volume Increase</i>
RMBH	Região Metropolitana de Belo Horizonte
SAMU	Serviço de Atendimento Médico de Urgência
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphism Synonymous</i>
SNPns	<i>Single Nucleotide Polymorphism Not Synonymous</i>
TA	Temperatura de Anelamento do Iniciador
TCE	Traumatismo Cranioencefálico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1	Canais de água e Aquaporina-4	3
2.2	Aquaporinas e Apoptose	10
2.3	A inflamação cerebral no TCE	12
2.4	A amplificação do edema pela agregação de leucócitos e migração leucocitária	15
2.5	Genética	15
2.6	Drogas com efeitos sobre a Aquaporina-4	17
3	OBJETIVOS	19
3.1	Objetivo Geral	19
3.2	Objetivos Específicos	19
4	O UNIVERSO AMOSTRAL, PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1	O universo amostral	20
4.2	Pacientes	20
4.3	Coleta do material	22
4.4	Método de extração do DNA e estocagem	22
4.5	Processamento e análise do material para avaliação dos polimorfismos gênicos	22
4.5.1	<i>Amplificação do material genético</i>	23
4.5.2	<i>Reação em cadeia da polimerase (PCR)</i>	23
4.5.3	<i>Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) e coloração pela</i>	25

	<i>prata</i>	
4.5.4	<i>Purificação do DNA amplificado</i>	26
4.5.5	<i>Análise da pureza e determinação espectrofotométrica da quantidade de DNA</i>	26
4.5.6	<i>Reação do Big Dye</i>	27
4.5.7	<i>A análise das sequências</i>	28
4.6	Base de dados	31
4.7	A análise das sequências	32
5	RESULTADOS	33
5.15.25.3	Resultados dos Primeiros 102 sequenciamentos para	33
6	Identificação da Variante A	
6.1	Resultados dos 48 Sequenciamentos do Éxon 2 para	34
	Identificação da Variante B	
6.1.1	Resultados pela Técnica do <i>PCR Real Time TaqMan</i> de 58	36
	Pacientes e 87 Controles para Identificação da Variante C	
6.2	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	44
6.2.1	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	44
7	Sobre a variante c, que ocorre na região UTR3', o	45
	rs3763043	45
7.1	<i>Teste do quiquadrado de comparação do grupo de estudo</i>	
	<i>com o grupo controle</i>	46
7.2	Estatística descritiva	46
	<i>Análise de Variâncias (ANOVA)</i>	48
	DISCUSSÃO	
7.2.1	Aspectos epidemiológicos dos traumatismos	48
7.2.2	craniencefálicos no mundo, no Brasil e em nossa região	51
7.2.3	Aspectos biológicos e ultraestruturais dos traumatismos	
7.2.4	craniencefálicos	

7.2.5		52
7.2.6	<i>A água no cérebro e como esta se distribui por compartimentos</i>	54
7.3		
8	<i>A restauração iônica de potenciais de membrana</i>	55
	<i>O equilíbrio da água no cérebro e a dinâmica do espaço extracelular</i>	56
	<i>Edema cerebral</i>	57
	<i>Edema intracelular</i>	58
	<i>Edema extracelular</i>	59
	Sobre o estudo genético	61
	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	70
	ANEXOS	