

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**Alterações encefálicas causadas pela hipóxia intermitente em modelo
animal de apneia do sono**

Dissertação de Mestrado

Diego Moura Baronio

Porto Alegre, 2012

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**Alterações encefálicas causadas pela hipóxia intermitente em modelo
animal de apneia do sono**

*Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós Graduação em
Medicina: Ciências Médicas da
Universidade Federal do Rio Grande
do Sul para a obtenção do título de
Mestre.*

Autor: Diego Moura Baronio
Orientador: Prof. Dr. Denis Martinez

Porto Alegre, 2012

CIP - Catalogação na Publicação

Baronio, Diego Moura

Alterações encefálicas causadas pela hipóxia
intermitente em modelo animal de apneia do sono /
Diego Moura Baronio. -- 2012.

70 f.

Orientador: Denis Martinez.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2012.

1. Apneia do Sono. 2. Aquaporinas. 3. Dano
celular. 4. Edema. I. Martinez, Denis, orient. II.
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos

A todos os meus familiares, que me incentivaram de uma forma ou outra, em especial aos meus pais, Mauro e Fátima, por se privarem de tantas coisas em benefício da minha formação. São modelos que seguirei pelo resto da vida. A minha namorada, Mariane, pelo companheirismo, motivação e carinho, sem os quais certamente este percurso teria sido muito mais difícil.

Ao professor Denis Martinez, pela oportunidade, cobranças e conhecimento transmitido. Seguirei como exemplo sua dedicação à pesquisa científica e interesse na formação de pesquisadores capazes de contribuir de forma positiva com o país.

Aos colegas do LIPES, que contribuíram de forma significativa para a realização deste trabalho, em especial à Alicia, Cintia e Lenise. Aos colegas Felipe, Darlan e Victorio, e à professora Marcelle por contribuírem com o desenvolvimento deste trabalho. Aos amigos, colegas de profissão e mestrado, Jonathan e Mariana, que ao longo destes seis anos partilharam comigo momentos alegres, dúvidas e preocupações.

Lista de Figuras

Figura 1 – Imagem sagital, de indivíduo normal e com AOS, analisada por ressonância magnética. Indivíduo normal e destacadas as regiões da via aérea superior (A). Indivíduo com AOS grave com destaque para os tecidos moles. Observa-se que o paciente com AOS apresenta as regiões da via aérea superior mais estreitas, como a retropalatal e retroglossal, assim como o palato mole, a língua e a gordura subcutânea são maiores (B).

Figura 2 – Imunofluorescência demonstra ausência de caspases ativas no hipocampo de rato controle (A) e presença em rato submetido à hipóxia intermitente (B). Modificado de Aviles-Reyes et al. Ref 58.

Figura 3 – Fotomicrografias de cortes corticais ilustrando a imunoreatividade à Glial Fibrillary Acidic Protein em rato controle (A) e rato exposto à hipóxia intermitente por 14 dias (B). A maior presença de GFAP, indica gliose. Modificado de Gozal et al. Ref 59.

Figura 4 – Edema e ruptura do oócito de *Xenopus* expressando AQP1 (direita) VS. Oócito controle (esquerda). Modificado de Preston et al. Ref 73.

Figura 5 – Árvore filogenética das AQPs de estrutura atômica conhecida. Modificado de Gonen e Walz. Ref 115.

Figura 6 – AQPs são tetrâmeros com 4 poros independentes (*). O monômero é composto de duas metades semelhantes que estão estruturalmente relacionadas. O eixo de simetria dessas metades é representado pela linha tracejada. O quadrado vermelho representa o eixo do tetrâmero. Modificado de Murata et al. Ref 114.

Figura 7 – A proteína possui duas metades com uma pseudosimetria. Cada uma tem três domínios transmembranais (1, 2, 3, na metade 1; e 4, 5, 6, para a metade 2). Estes domínios estão unidos por cinco alças (A, B, C, D, E). As alças B e E possuem os motivos conservados aspargina, prolina, alanina [Asn-

Pro-Ala, NPA]. O C próximo ao NPA representa cisteína 189, sensível ao bloqueio por compostos de mercúrio.

Figura 8 – Passagem de moléculas de água através da AQP1. Devido à carga positiva no centro do canal, íons carregados positivamente como o H_3O^+ são defletidos. Isto evita o vazamento de prótons pelo canal.

Figura 9 – Eletromicrografia demonstrando edema perivascular nos pés dos astrócitos de camundongos controles (flechas brancas). Animais knockout para AQP4 não apresentam edema celular citotóxico (flechas pretas). Modificado de Manley et al. Ref 145.

Figura 10 – Lesão por congelamento no córtex causa rompimento da BHE demonstrado pelo azul de Evans, e edema vasogênico. Modificado de Papadopoulos et al. Ref 149.

Figura 11 – Imunolocalização da AQP3 na epiderme de (a) humano e camundongo (b) através de imunofluorescência indireta (verde). Na epiderme humana, a AQP3 é encontrada no estrato basal e estrato espinhoso. Na epiderme de camundongo a AQP3 é somente encontrada no estrato basal.

Lista de Abreviaturas

- AOS – Apneia Obstrutiva do Sono
- HI – Hipóxia Intermitente
- IAH – Índice de apneia-hipopneia
- AQP – Aquaporina
- CPAP – Continuous positive airway pressure
- SNC – Sistema Nervoso Central
- ERO – Espécies reativas de oxigênio
- MIP – Major Intrinsic Protein
- LCR – Líquido cefalorraquidiano
- NPA – Asparagina, Prolina e Alanina
- BHE – Barreira hematoencefálica
- HIF-1a - Fator induzível por hipóxia-1-alfa

Sumário

1. Resumo.....	9
2. Abstract.....	10
3. Introdução.....	11
4. Revisão da literatura.....	13
4.1. Transtornos respiratórios do sono.....	13
4.2. Apneia Obstrutiva do Sono.....	13
4.3. Fisiopatologia da AOS.....	14
4.4. Consequências da AOS.....	15
4.4.1 AOS, Hipóxia intermitente e Alterações encefálicas.....	17
4.5. Tratamento.....	19
4.6. Aquaporinas.....	19
4.6.1. Transportes mediados pelas AQP's.....	22
4.6.2. Estrutura das AQP's.....	23
4.7. Aquaporinas no Sistema Nervoso Central.....	25
4.7.1. AQP1.....	26
4.7.2. AQP4.....	27
4.7.3. AQP9.....	28
4.8. Aquaporinas e Pele.....	29
4.9. O sono e a pele.....	30
5. Objetivos.....	32
5.1. Gerais.....	32
5.2. Específicos.....	32
6. Referências.....	33
7. Artigo.....	50
8. Considerações Gerais.....	71

1. Resumo

Introdução

Pacientes com apneia obstrutiva do sono exibem alterações morfológicas encefálicas. A hipóxia intermitente causa morte celular em 90% dos neurônios de Purkinje. Aquaporinas são proteínas de membrana que formam canais de água. O conhecimento do papel das aquaporinas nas alterações encefálicas causadas pela apneia obstrutiva do sono é limitado.

Objetivos

Avaliar o efeito da hipóxia intermitente isocápnica nas aquaporinas e no dano celular em diferentes tecidos de camundongos C57/bl.

Métodos

Conteúdo cerebral de água e expressão de aquaporinas 1, 3, 4, 9, e HIF-1a foram medidos. Realizou-se coloração com hematoxilina-eosina e marcação por imunohistoquímica, além de técnicas de Western blot e ELISA.

Resultados

Os níveis de HIF-1a no córtex frontal foram maiores no grupo exposto a hipóxia intermitente isocápnica do que no grupo controle, confirmando hipóxia efetiva. O peso molhado e o conteúdo de água do encéfalo foram maiores no grupo hipóxia. Os níveis cerebelares de aquaporina 1 foram menores no grupo hipóxia. Os níveis de aquaporina 3 no hipocampo e pele foram similares em ambos os grupos. Aquaporina 4 no córtex frontal foi mais expressa no grupo hipóxia. Aquaporina 9 apresentou maiores níveis no córtex frontal e estriado do grupo hipóxia. Observou-se dano celular em 88% das células de Purkinje no grupo hipóxia. A marcação de S100B no cerebello de grupo hipóxia foi mais evidente do que nos controles.

Conclusão

Exposição crônica a hipóxia simulando apneia do sono causa edema encefálico e altera a concentração de aquaporinas. Alterações em proteínas de canal de água podem estar envolvidas no mecanismo do dano observado em estruturas cerebrais na apneia obstrutiva do sono.

2. Abstract

Background

Patients with obstructive sleep apnea exhibit cerebral morphological changes. The damaging effect of intermittent hypoxia was already demonstrated in a study where mice exposed to this condition had 90% of degeneration of Purkinje cells. Aquaporins are membrane proteins responsible for the transport and the balance of water content in the brain. Little attention has been dedicated to the role of aquaporins in sleep apnea-related brain alterations.

Objectives

To evaluate the effect of isocapnic intermittent hypoxia on water-transport proteins and cellular damage in different tissues of C57/bl mice.

Methods

Brain water content, aquaporins 1, 3, 4, 9, and HIF-1a were measured. Staining with hematoxylin-eosin and immunohistochemistry were performed.

Results

HIF-1a expression in the frontal cortex was higher in the exposed than in the sham group, confirming effective hypoxia. The brain wet weight and brain water content were higher in the hypoxia group. Cerebellar Aquaporin-1 levels were lower in the hypoxia group. Aquaporin 3 levels in hippocampus and skin were similar in both groups. Aquaporin 4 expression in the frontal cortex was higher in the hypoxia group. Aquaporin 9 expression of the hypoxia group was greater in the cortex and striatum. Death rate of Purkinje cells in the hypoxia group was 88%. Stronger immunoreactivity to S100B was detected in the hypoxia group.

Conclusions

Chronic exposure to hypoxia simulating sleep apnea causes brain edema and alters the concentration of aquaporins. Water channel proteins are possibly implicated in the cellular damage to brain structures seen in obstructive sleep apnea.

3. Introdução

A apneia obstrutiva do sono (AOS) é caracterizada pelo fechamento parcial ou total da via aérea superior durante o sono, causando hipóxia intermitente (HI) (1). Doença cardiovascular e acidente vascular cerebral são consequências comuns (2-4).

AOS causa alterações encefálicas. Modificações morfológicas, como redução da substância cinzenta, levam a danos cognitivos (5). Exames de imagem, como a ressonância magnética funcional, mostram alterações no fluxo sanguíneo cerebral, metabolismo e ativação cerebral de pacientes com apneia (6). Níveis séricos elevados da proteína S100B são alterações bioquímicas encontradas em pacientes com AOS (7).

Ao deitar, líquidos acumulados em membros inferiores são reabsorvidos. Simultaneamente, observa-se aumento da circunferência do pescoço. O possível deslocamento de líquidos dos membros inferiores para o pescoço durante a noite tem sido investigado como potencial determinante da severidade da AOS (8). O aumento da circunferência do pescoço, como consequência do deslocamento de líquidos em decúbito, é associado com maior índice de apneia-hipopneia (IAH) (9).

Aquaporinas (AQP) são proteínas envolvidas no transporte de água através da membrana celular (10). A descoberta dessas proteínas rendeu ao pesquisador Peter Agre o Prêmio Nobel em Química de 2003. Agre é formado em medicina pela Johns Hopkins. Na mesma universidade, em 1988, conduzindo estudo envolvendo antígenos Rh, Agre e seu grupo descobriram uma proteína de 28-KDa que pensavam ser fragmento protéico do grupo Rh. Após alguns anos de estudo foi descoberto que a proteína em questão não era relacionada com o grupo Rh, e que se tratava de proteína de membrana abundante nos túbulos renais e nas hemácias, embora sua função ainda fosse desconhecida.

Em visita ao seu amigo e antigo mentor, Johh Parker, Agre descreveu as propriedades da proteína de 28-KDa e Parker sugeriu testá-la como canal de água. Agre e colaboradores testaram esta hipótese expressando a proteína em oócitos de *Xenopus*, que tipicamente apresentam baixa permeabilidade à água. Quando os oócitos foram colocados em uma solução hipotônica, eles incharam

e explodiram, revelando a função da proteína como canal de água, que eles nomearam como *aquaporina*.

AQPs 1, 4 e 9 são as mais presentes no encéfalo, e estão envolvidas na regulação do conteúdo de água do mesmo (11-13). A literatura sobre AQPs e AOS se resume a um estudo que aborda a excreção da AQP2 pela urina (14). Levando em consideração a potencial importância da água nos mecanismos da AOS, AQPs podem estar envolvidas na patogênese desta doença.

4. Revisão da literatura

4.1. Transtornos respiratórios do sono

O sono fragiliza o controle ventilatório, permitindo o surgimento de transtornos da respiração. Apneias, hipopneias, hipoventilação e respiração periódica são os principais distúrbios respiratórios do sono. Os transtornos respiratórios do sono podem estar relacionados com redução do estímulo central que gera o esforço ventilatório, ou podem ser de causa obstrutiva, mesmo em presença de esforço. Perturbações da respiração durante o sono levam a despertares e fragmentação do sono. Sono fragmentado pode causar sonolência diurna excessiva, fadiga, distúrbios de humor, irritabilidade e apatia.

4.2. Apneia Obstrutiva do Sono

A AOS é causada por repetitivos colapsos e reaberturas da via aérea superior, causando supressão do fluxo respiratório e trazendo como consequência asfixia, ou seja, hipóxia e hipercapnia (1). Durante o colapso da via aérea, a resistência ao fluxo do ar resulta em aumento do esforço respiratório e mudanças de pressão intratorácica. A asfixia excita o sistema nervoso, aumenta o esforço respiratório até que ocorra despertar. O despertar interrompe o sono e ativa os músculos da faringe, causando reabertura da via aérea (15). O estresse provocado pela AOS pode causar sonolência diurna e doenças cardiovasculares (16).

O dano vascular é causado através de inflamação e estresse oxidativo, com diminuição de NO e de capacidade de reparo. Níveis de ciclooxygenase-2 e nitrotirosina, marcadores de inflamação e estresse oxidativo, respectivamente, foram medidos em 32 pacientes com AOS e foi constatado que eram maiores nestes pacientes do que em controles (17).

A AOS pode acometer qualquer faixa etária. O maior estudo populacional conhecido foi realizado no Brasil. Os autores encontraram prevalência de AOS crescente com a idade, atingindo 95% na faixa acima dos 80 anos. A proporção feminino:masculino na faixa de 20-29 anos é de aproximadamente 1:12. Após os 60 anos, quando todas as mulheres já estão

em menopausa, as proporções se igualam, sugerindo influência hormonal na fisiopatologia da AOS (18).

A polissonografia é o método utilizado usualmente para diagnosticar a AOS. O exame mede variáveis neurológicas e cardiorrespiratórias durante o sono. Sensores respiratórios detectam diminuições na ventilação que são classificadas como apneias (cessação do fluxo de ar), hipopneias (diminuição parcial do fluxo de ar), ou despertares esforço respiratório-relacionados (redução no fluxo de ar devido a aumento da resistência da via aérea superior que resulta em despertares) (19). O Índice de apneia-hipopneia (IAH) é a medida usual da gravidade dos distúrbios respiratórios do sono. É definido como a soma das apneias e hipopneias durante o sono, dividida pelo número de horas dormidas. De acordo com a Academia Americana de Medicina do Sono (20), o IAH menor que 5 por hora é normal. IAH acima de 5 por hora, na presença de sintomas indica síndrome da apneia do sono. A síndrome é classificada como:

1. Leve entre 5 e 15 eventos/hora
2. Moderada entre 15 e 30 eventos/hora
3. Grave se for maior do que 30 eventos/hora.

IAH acima de 15/hora pode ser chamado de síndrome da apneia do sono mesmo sem a presença de sintomas.

4.3. Fisiopatologia da AOS

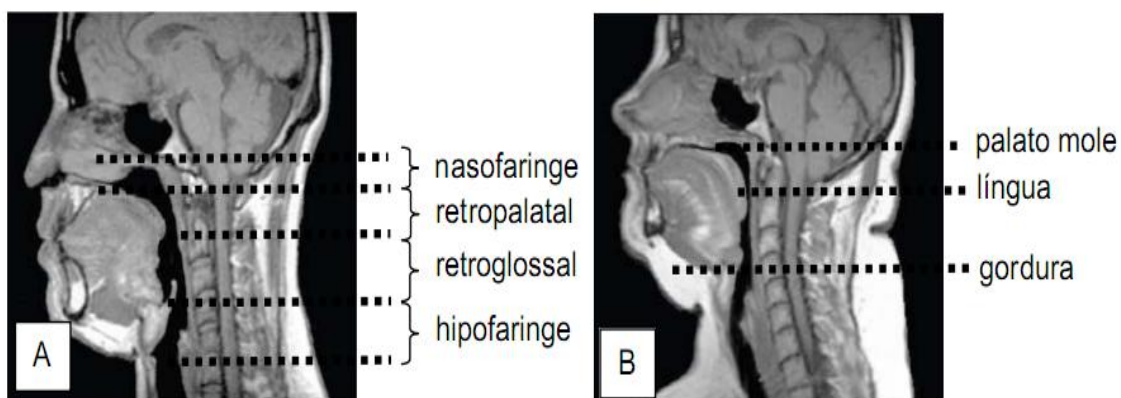


Figura 1 - Imagens sagitais, de indivíduo normal e com AOS, analisada por ressonância magnética. Indivíduo normal, destacando-se as regiões da via aérea superior (A). Indivíduo com AOS grave com destaque para os tecidos moles. Observa-se que o paciente com AOS apresenta as regiões da via aérea superior mais estreitas, como a retropalatal e retroglossal, assim como o palato mole, a língua e a gordura subcutânea são maiores (B).

Nasofaringe, orofaringe (regiões retropalatal e retroglossal) e hipofaringe são regiões da faringe com possibilidade de colapso na AOS (21). Embora a região retropalatal da orofaringe seja o local mais comum de colapso, o estreitamento das vias aéreas é dinâmico, variando frequentemente entre os espaços retropalatal, retrolingual e a hipofaringe (figura 1) (22).

Estruturas craniofaciais e tecidos moles de pacientes com AOS apresentam alterações, mostradas por técnicas de imagem. Redução do comprimento do corpo mandibular, posição inferior do osso hióide e retro posição do maxilar são anormalidades presentes nos ossos da face de alguns pacientes com AOS, comprometendo o espaço aéreo da faringe (23-25).

O aumento das partes moles em torno da via aérea contribui significativamente para o estreitamento da faringe em muitos casos de AOS. O aumento do palato mole ou da língua diminui o diâmetro ântero-posterior, enquanto o acúmulo de gordura lateralmente às paredes da faringe diminui o espaço no plano lateral (26, 27). Cerca de 70% dos pacientes com AOS são obesos. Índice de massa corporal maior do que 30 kg/m² aumenta 10 vezes o risco para a doença (18).

A hipótese de que deslocamento de fluidos dos membros inferiores em direção ao pescoço, durante o decúbito, possa causar distúrbios respiratórios do sono tem sido investigada sob a liderança de Douglas Bradley, em Toronto (28, 29). Em estudo com 27 indivíduos saudáveis não obesos foi aplicada pressão nos membros inferiores e foi verificado deslocamento de fluido das pernas, seguido de aumento da circunferência do pescoço e estreitamento das vias aéreas superiores (30). O papel do deslocamento de fluido na AOS também foi constatado na insuficiência cardíaca congestiva (31). Apesar de contestado (32), parece inegável alguma influência do deslocamento de fluidos na patogênese da AOS.

4.4. Consequências da AOS

A hipóxia intermitente provocada pelas apneias é responsável por vários danos ao organismo, entre eles a inflamação sistêmica (33). Citocinas (34), proteína C reativa (35), moléculas de adesão leucocitária (36), são alguns dos marcadores inflamatórios elevados em pacientes com AOS. Os níveis de NF-

kB são elevados nos pulmões de ratos em modelo animal de AOS. No mesmo estudo níveis elevados de TNF- α e IL-1 β foram encontrados, e considerados consequência de um aumento do esforço respiratório (37).

A síndrome metabólica está associada com a AOS. Em estudo com 61 pacientes apneicos e 43 controles a AOS foi associada com aumento de insulina em jejum e concentrações de triglicérides, colesterol HDL diminuído, independentemente de idade, IMC, tabagismo e consumo de álcool (38). A hipóxia gerada durante o sono causa alteração de hormônios relacionados com a obesidade. Resistência à insulina tem correlação positiva significativa com a severidade da AOS (33). Grelina, hormônio responsável por estimular o apetite, é encontrado em nível maior em pacientes com AOS do que em pacientes controles e com uma correlação positiva significativa com o IAH. Após tratamento com pressão aérea positiva contínua (em inglês, *continuous positive airway pressure*; CPAP) os pacientes com apneia apresentaram redução nos níveis desse hormônio (40).

Doença cardiovascular é mais prevalente em homens de meia idade com AOS do que em indivíduos sem a doença, independente de idade, índice de massa corporal, pressão arterial sistólica e diastólica e tabagismo (41). Nas suas formas moderada e severa a AOS pode contribuir para a fibrilação atrial e insuficiência cardíaca congestiva (42).

O risco de sofrer acidente de trânsito causado por sonolência é maior em pacientes com AOS. Motoristas japoneses com AOS, quando comparados a indivíduos sem a doença, apresentaram histórico maior de acidentes automobilísticos e de sonolência no volante. A ocorrência de acidentes foi associada ao IAH elevado (≥ 40) e à pontuação alta em questionário de medida de sonolência (43).

Pessoas com profissões que levam ao sedentarismo, como os motoristas profissionais, possuem maior risco de se tornarem obesas. Baseando-se no IAH, 44% de uma amostra de motoristas de ônibus foram diagnosticados com AOS, sendo que o peso corporal estava significativamente associado com a doença (44). Em questionário por 262 motoristas de ônibus, 68% apresentaram peso corporal acima do ideal, 34% possuíam a circunferência do pescoço igual a 42 cm (45). O tratamento com CPAP reduz significativamente os acidentes de trânsito de pacientes com AOS (46, 47).

4.4.1 AOS, Hipóxia intermitente e Alterações encefálicas

A AOS causa alterações anatômicas no sistema nervoso central (SNC) que se refletem em danos funcionais. Déficits de memória, dificuldade em aprender novas tarefas, fluência verbal alterada e problemas de atenção, são algumas das alterações cognitivas que pacientes com AOS apresentam (48, 49).

As alterações na morfologia encefálica de pacientes com AOS são bem conhecidas. Redução no volume de substância cinzenta já foi reportada em indivíduos com AOS (50). O cerebelo é afetado por essa perda de substância cinzenta, o que pode resultar em disfunção motora (51). O hipocampo esquerdo também é modificado morfologicamente (52).

Na substância branca de pacientes com apneia ocorrem alterações metabólicas, sem necessariamente haver modificação na morfologia do tecido. A relação N-acetilaspártato/colina medida por espectroscopia de ressonância magnética é significativamente menor na substância branca de pacientes adultos com AOS de moderada a grave (53). Crianças apresentaram algo semelhante, sendo a relação N-acetilaspártato/Colina alterada no hipocampo esquerdo e no córtex frontal direito, além de apresentarem baixa pontuação em teste de QI (54).

Sintomas de ansiedade foram verificados em pacientes com AOS através da aplicação de questionário. Em exame de imagem foi visto que esses pacientes apresentavam alterações em regiões ligadas ao sistema límbico, como o córtex do cíngulo e a amígdalas (55). Regiões límbicas, como amígdalas, são ativadas durante a dispneia (56).

Em ratos, após cinco horas de exposição à HI já é possível constatar danos nas células de Purkinje. Após 30 horas de exposição 90% das células apresentam-se lesionadas (57). Já foi visto também que a HI promove alterações morfológicas, redução das ramificações dendríticas e ativação de caspases (figura 2) em neurônios hipocampais e induz gliose reativa em ratos,

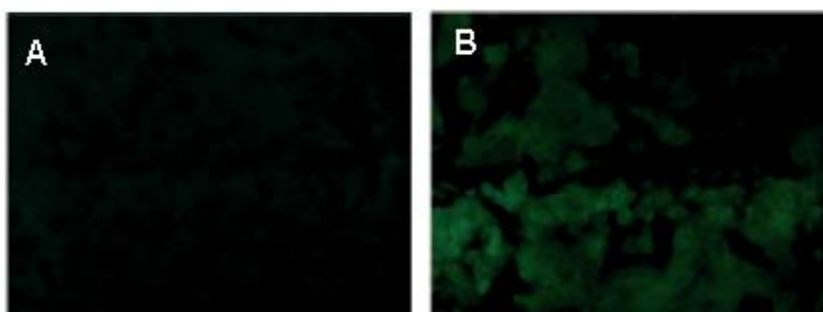


Figura 2 - Imunofluorescência demonstra ausência de caspases ativas no hipocampo de rato controle (A) e presença em rato submetido à hipóxia intermitente (B). Modificado de Aviles-Reyes et al. Ref 58.

demonstrada com grande expressão da proteína S100B (58).

Ratos submetidos à HI sofrem mais apoptose na região hipocampal CA1 e no córtex. Ativação glial, com grande marcação de GFAP na imunohistoquímica, também foi vista no córtex dos animais (figura 3). Estas modificações causadas pela HI foram associadas a déficits cognitivos (59).

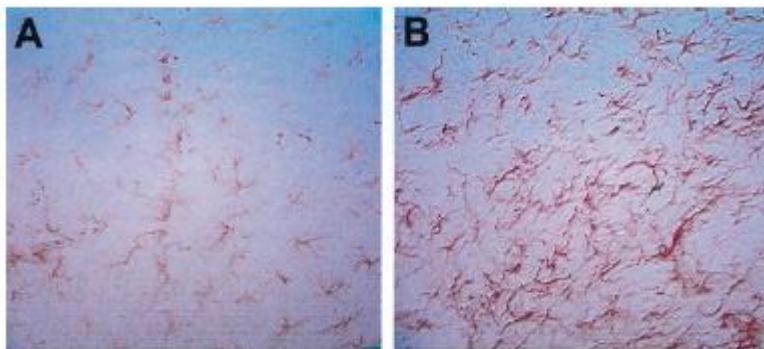


Figura 3 - Fotomicrografias de cortes corticais ilustrando a imunoreatividade à Glial Fibrillary Acidic Protein em rato controle (A) e rato exposto à hipóxia intermitente por 14 dias (B). A maior presença de GFAP, indica gliose. Modificado de Gozal et al. Ref 59.

O estresse oxidativo pode estar envolvido nas alterações morfológicas encefálicas. Ratos expostos a HI apresentam aumento da peroxidação lipídica e concentração cerebral de isoprostano. A ação da pirrolopirimidina PNU-101033-E, antioxidante potente, atenuou déficits de aprendizado de ratos e reduziu a peroxidação lipídica, bem como a concentração de isoprostano (60).

Ratos idosos, de 20 meses de idade, quando comparados a ratos jovens, de três meses, ambos expostos a HI, mostraram maior suscetibilidade à apoptose. Diminuição da fosforilação do fator de transcrição CREB e mau funcionamento da via ubiquitina-proteassoma causados pelo estresse oxidativo da HI podem estar envolvidos (61). Isto vai de acordo com relatos de redução da capacidade antioxidante de neurônios velhos (62).

Camundongos modificados geneticamente, com expressão exacerbada de Cu, Zn-superoxido dismutase (SOD1) expostos à HI tiveram menor nível de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e diminuição da apoptose neuronal no córtex quando comparados a controles normais submetidos à HI (63). Esses achados indicam associação do estresse oxidativo causado pela HI com alterações encefálicas na AOS.

4.5. Tratamento

O CPAP é o tratamento recomendado para a AOS. O uso adequado do CPAP elimina a sonolência diurna excessiva, reduz a pressão arterial e melhora funções neurocognitivas (64, 65). O controle do peso corporal, através de cirurgia ou de mudança de hábitos de vida, também são tratamentos da AOS (66). Após exames de imagem específicos, cirurgias como uvulofaringopalatoplastia, tonsilectomia e cirurgia nasal são consideradas (67).

4.6. Aquaporinas

A AQP1 foi a primeira AQP a ser descoberta, durante pesquisa de antígenos do grupo Rh. Um dos antígenos Rh foi isolado e foi visto que ele tinha tamanho de 32-kDa (68, 69). O uso de corantes demonstrou a presença de outra proteína de 28-kDa. Primeiramente acreditou-se que se tratava de parte da proteína de 32-kDa, mas o anticorpo específico para a proteína de 28-kDa não se ligou à proteína de 32-kDa. Posteriormente constatou-se que a proteína de 28-kDa não estava relacionada com a de 32-kDa (70) e que tinha várias propriedades físicas semelhantes a canais de membrana. Como resultado, a proteína de 28-kDa foi temporariamente nomeada *CHIP28*, acrônimo para *channel-like integral protein of 28 kDa* (71). Com base na sua localização nas células vermelhas, na borda em escova dos túbulos renais proximais, e no ramo descendente fino da alça de Henle, foi sugerido que a CHIP28 era um canal de água.

A expressão da CHIP28 no oócito de *Xenopus laevis* levou a crer que a proteína classificava-se como canal de água. Oócitos já foram usados para expressar e estudar outras proteínas de transporte (72). Quando oócitos expressando CHIP28 foram colocados em solução Barth modificada, eles rapidamente incharam e explodiram. Oócitos controles não apresentaram grande alteração de volume (figura 4) (73). Agre recebeu o prêmio Nobel de Química por esta descoberta e propôs o nome *aquaporina* para a família de canais de água à medida que homólogos da CHIP28 foram identificados (74). O nome de CHIP28 foi mudado para AQP1.

Treze membros funcional e filogeneticamente diferentes da família das AQPs foram identificados em mamíferos (AQP0–AQP12). Com base nas propriedades de permeabilidade de cada poro, a família das AQPs é dividida

em duas subfamílias, as *aquaporinas*, que só permitem que a água penetre os poros, e as *aquagliceroporinas*, que também são permeáveis ao glicerol e outros pequenos solutos neutros (75).

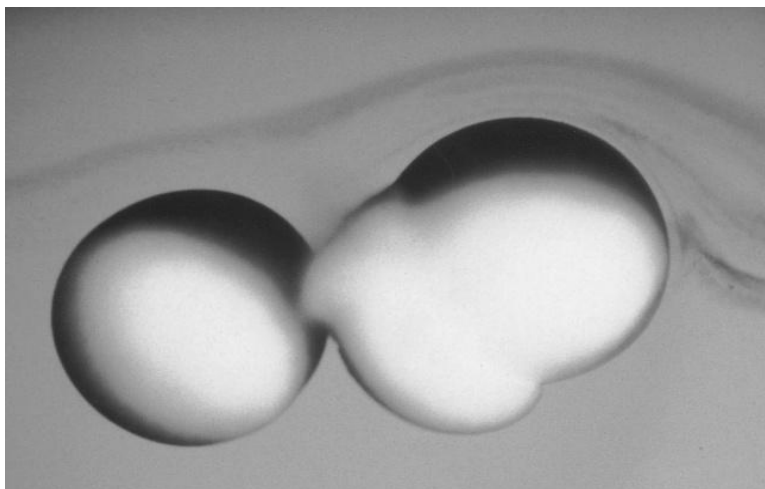


Figura 4 - Edema e ruptura do oócito de *Xenopus* expressando AQP1 (direita) VS. Oócito controle (esquerda). Modificado de Preston et al. Ref 73.

AQPs 0, 1, 2, 4, 5, 6 e 8 são aquaporinas, embora AQP6 e AQP8 só pertençam a este grupo com base em sua sequência de aminoácidos, já que a AQP6 forma um canal de ânion e a AQP8 é permeável à uréia (76, 77). AQPs 3, 7, 9 e 10 são aquagliceroporinas. Os substratos específicos para as AQPs 11 e 12, classificadas como superaquaporinas ainda não foram determinados (78). A presença de AQPs ainda se dá em plantas e bactérias (Figura 5). Conhecida no passado como proteína intrínseca maior (em inglês, *major intrinsic protein*; MIP), a AQP0 é expressa nas células do cristalino do olho (79).

Muitos tecidos expressam a AQP1. No rim, a AQP1 é encontrada nas células endoteliais da *vasa recta*, no túbulo proximal, e na porção fina descendente da alça de Henle (70). Nos pulmões, a AQP1 é expressa nas células endoteliais dos capilares onde ocorre troca de gás. A AQP1 é encontrada também no plexo coróide, onde está envolvida na produção do líquido cefalorraquidiano (LCR) (80).

AQP2 é expressa no túbulo coletor e no ducto coletor do rim, onde se encontra dentro de vesículas. Em resposta à vasopressina, se dirige à membrana plasmática, aumentando a reabsorção da água para o organismo (81). A AQP3 é expressa no ducto coletor do rim, epitélio da via aérea, glândulas secretoras e pele (82-85).

A maioria dos estudos envolvendo a AQP4 aborda suas funções no SNC, mas ela também é expressa no ducto coletor do rim (86). AQP5 é expressa nas porções exócrinas do pâncreas, glândulas lacrimais e salivares, no pulmão e no olho (83, 87). AQP6 é encontrada em vesículas intracelulares do epitélio renal, podendo estar envolvida em processos fisiológicos como a filtração glomerular (88).

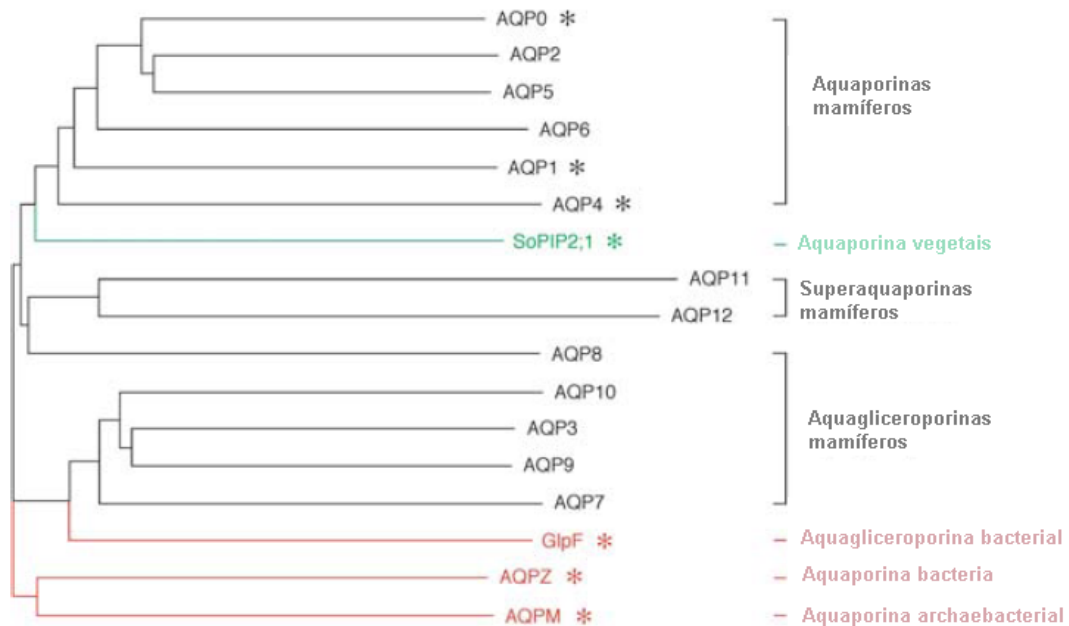


Figura 5 - Árvore filogenética das AQPs de estrutura atômica conhecida. Modificado de Gonen e Walz. Ref 115.

AQP7 é presente no tecido adiposo e está envolvida no metabolismo de lipídios. Camundongos sem AQP7 aumentam a gordura corporal e se tornam resistentes à insulina (89). AQP8 é encontrada principalmente no trato digestivo, em células pancreáticas e hepatócitos. Nas células pancreáticas a AQP8 pode ser encontrada na membrana ou no meio intracelular em vesículas. Nos hepatócitos a AQP8 é localizada no citoplasma e pode se fundir à membrana por estimulação com AMPc (90, 91).

AQP9 é expressa no SNC, onde está envolvida no metabolismo do glicerol e na homeostase da água. No fígado faz a captação do glicerol para a gliconeogênese durante o jejum (92). AQP10 é abundante no duodeno e no jejuno, onde está envolvida no transporte de água (93).

Mutações em AQPs levam a perda de função. Diabetes insipidus nefrogênico é causado por mutações na AQP2, porém a incidência dessa doença é de menos de um em 20 milhões de nascimentos (94). Indivíduos que não apresentam AQP1 são fenotipicamente normais, mas apresentam concentração urinária alterada (95). Mutações na AQP0 do cristalino causam catarata congênita (96).

AQP4 facilita a migração de astrócitos. Após lesão no cérebro, camundongos AQP4 *knockout* tiveram células astrogliais positivas para a proteína, marcadas fluorescentemente, injetadas a 3 mm da lesão. A presença do canal de água influenciou na mudança do formato das células, promoveu migração mais rápida e formação de cicatriz glial no local da lesão (97). AQP3 facilita a migração de células do epitélio corneal e células epidérmicas. Após raspagem do epitélio corneal, camundongos AQP3 *knockout* tiveram a reepitelização mais lenta. A cicatrização de lesões na pele de camundongos AQP3 *knockout* é mais lenta, devido a diminuição na proliferação de queratinócitos (98, 99). AQP1 facilita a migração de células do túbulo proximal na resposta a lesões no túbulo proximal (100).

Os bloqueadores das AQPs são utilizados para entender o papel das dessas proteínas em diferentes condições. AQP1 é sensível à mercúrio (73). O bloqueio com HgCl₂ ocorre devido à modificação covalente de resíduos de cisteína dentro do poro de água e em outras regiões da proteína causando obstrução do poro ou mudanças de conformação que inibem o transporte de água (101).

4.6.1. Transportes mediados pelas AQPs

AQPs e aquagliceroporinas são capazes de mediar diferentes tipos de transporte. A primeira aquagliceroporina a ser clonada, AQP3, é permeável ao glicerol e água (102). AQP7 e AQP10 transportam água, glicerol, e uréia. Quando expressos em oócitos de *Xenopus* (103, 104). AQP9 transporta água, glicerol, e uréia, mas também é permeável a vários solutos nos oócitos (105).

Gases também podem atravessar as AQPs. A AQP1 transporta CO₂ de forma rápida em oócitos (106). Células vermelhas de camundongos sem AQP1 não tiveram sua permeabilidade ao CO₂ afetada (107). Células vermelhas humanas sem AQP1 perdem 60% de sua permeabilidade ao CO₂ (108). A

AQP1 é permeável ao NO e quando ela é bloqueada esta permeabilidade se reduz em 71% (109). A AQP1 é expressa em células endoteliais e células de músculo liso na parede de vasos, facilitando a ação vasodilatadora do NO (110).

AQPs 3, 9 e 10 de peixe zebra são capazes de mediar o transporte de arsênio, gerando acúmulo desse metalóide em vários tecidos (111). A AQP8 foi identificada como canal de transporte para peróxido de hidrogênio (112). A permeabilidade a determinados tipos de ânions foi atribuída à AQP6 (113).

4.6.2. Estrutura das AQPs

As AQPs são tetrâmeros, onde cada monômero funciona como poro independente (figura 6) (114). Os monômeros são formados por 269 aminoácidos, e constituídos de seis segmentos transmembranais e alças de ligação com tamanho variável. Como resultado de duplicação gênica antiga, os monômeros apresentam duas metades com pseudo-simetria (115). Com cada metade contendo três domínios transmembrana, as duas devem integrar a membrana em orientações opostas, propriedade estrutural básica das AQPs. Começando no grupo amino-terminal, a primeira metade é formada pelos segmentos 1, 2 e 3; e a segunda, pelos segmentos 4, 5 e 6 terminando com o grupo carboxi-terminal (116).

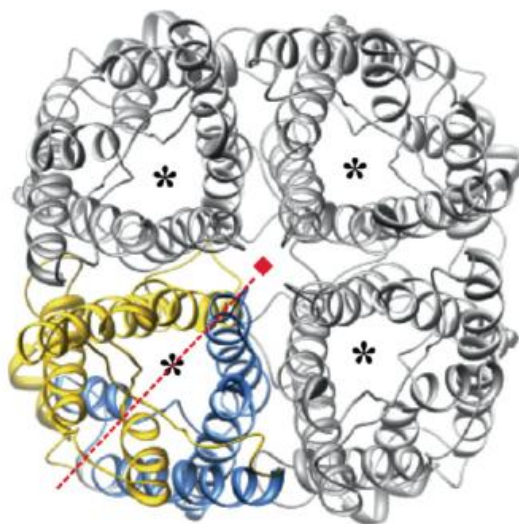


Figura 6 - AQPs são tetrâmeros com 4 poros independentes (*). O monômero é composto de duas metades semelhantes que estão estruturalmente relacionadas. O eixo de simetria dessas metades é representado pela linha tracejada. O quadrado vermelho representa o eixo do tetrâmero. Modificado de Murata et al. Ref 114.

A estrutura transmembrana tem seis segmentos (1 a 6 na figura 7) conectados por cinco alças (A a E na figura 7). A, C e E são extracelulares, B e D intracelulares. As duas alças longas, B e E, se curvam e penetram a bicamada lipídica (B proveniente do lado citosólico e E do extracelular) e se ligam para formar um filtro de seletividade. O filtro de seletividade é formado por um *motif* de três aminoácidos nas alças B e E, aspargina, prolina, e alanina (NPA) (figura 7) (117).

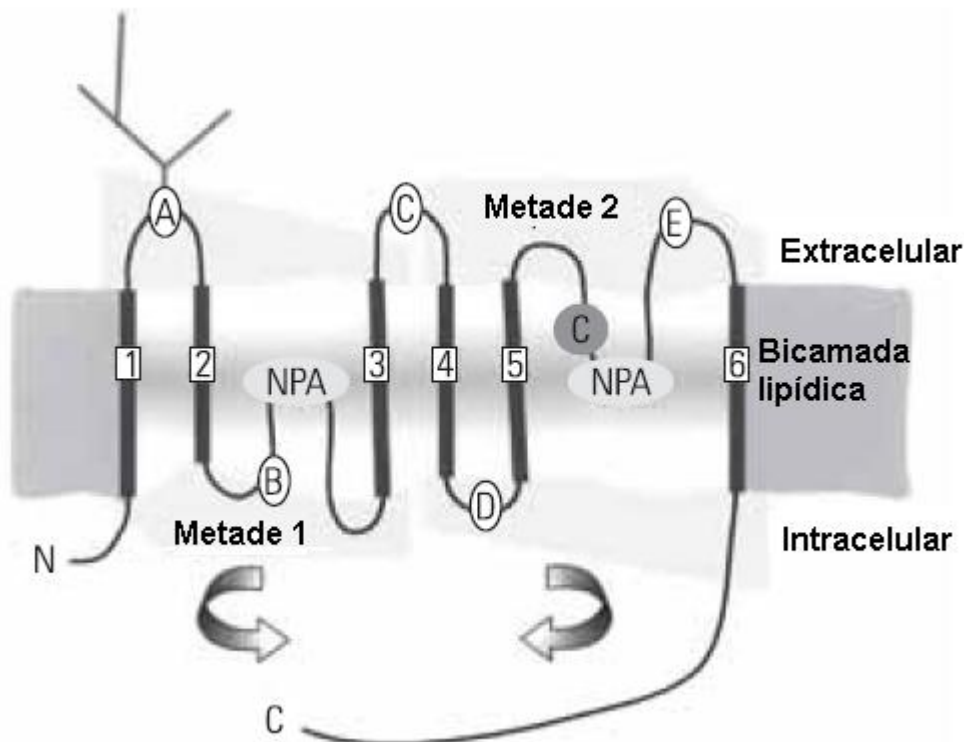


Figura 7 - A proteína possui duas metades com uma pseudosimetria. Cada uma tem três domínios transmembranais (1, 2, 3, na metade 1; e 4, 5, 6, para a metade 2). Estes domínios estão unidos por cinco alças (A, B, C, D, E). As alças B e E possuem os motivos conservados aspargina, prolina, alanina [Asn-Pro-Ala, NPA]. O C próximo ao NPA representa cisteína 189, sensível ao bloqueio por compostos de mercúrio.

A seletividade conferida por esses três aminoácidos impede a entrada de prótons (H_3O^+), mas mantém alta taxa de permeabilidade de água. A diferença de concentração hidrogeniônica entre o interior e o exterior da célula é a base para o sistema celular de armazenamento de energia. A arquitetura dos canais (Figura 8) permite que somente moléculas de água passem em fila indiana, sendo que os *motifs* positivamente carregados, presentes no canal,

repelem os íons H_3O^+ . Além disso, o campo eletrostático local gerado pela proteína muda de polaridade no meio do canal, o que obriga as moléculas de água a girar de modo que seus dipolos ficam orientados em direções diferentes nas extremidades intra e extracelular do canal. Isso evita a formação de uma cadeia contínua de moléculas de água conectadas por pontes de hidrogênio. Isso impede a formação de um “fio de prótons” que facilitaria a passagem de prótons via *mecanismo de Grotthuss* (118).

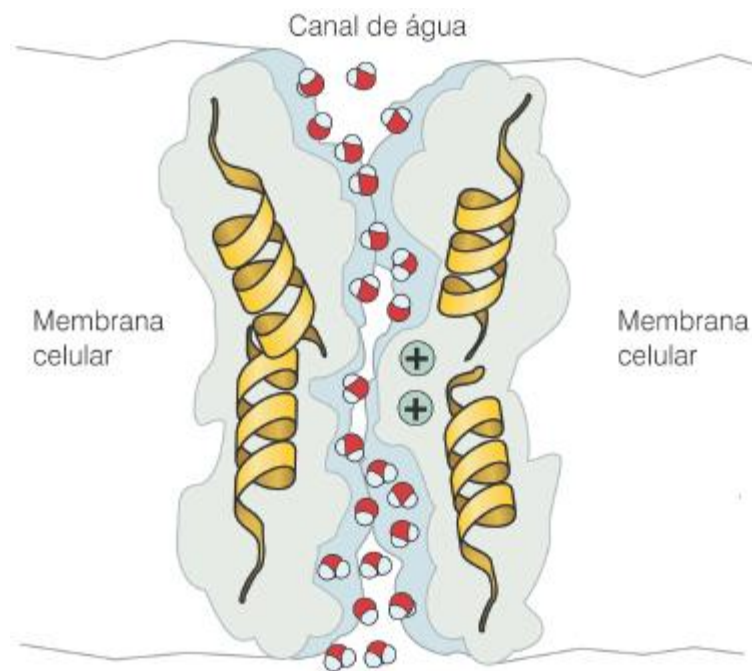


Figura 8 - Passagem de moléculas de água através da AQP1. Devido à carga positiva no centro do canal, íons carregados positivamente como o H_3O^+ são defletidos. Isto evita o vazamento de prótons pelo canal.

4.7. Aquaporinas no Sistema Nervoso Central

A água se desloca continuamente entre os componentes do sistema nervoso. Distúrbios na sua homeostase podem prejudicar funções em casos onde a água se acumula devido a doenças, isquemia, hemorragia ou traumatismo. As AQPs estão envolvidas nos mecanismos moleculares de transporte de água no encéfalo.

É possível que estas proteínas participem na fisiopatologia de doenças neurodegenerativas. Os cérebros de pacientes com doença de Alzheimer apresentam edema, ruptura ou atrofia de alguns tipos celulares, incluindo

astrócitos (119). Fatos como estes dão suporte à idéia de que o transporte de água e nutrientes está alterado na doença de Alzheimer. Camundongos com depósitos amilóides em vasos sanguíneos cerebrais, característica comum na doença de Alzheimer, apresentam perda de canais de água astrocitários (120).

As principais AQPs encontradas no SNC são as AQP1, 4 e 9. Essas proteínas são expressas em diferentes tipos celulares e regulam a produção e remoção do LCR, fluxo de água através de compartimentos, manutenção da pressão intracraniana e da barreira hematoencefálica (BHE), migração de astrócitos (121, 122).

4.7.1. AQP1

A AQP1 é expressa principalmente na membrana apical do plexo coróide, e está envolvida na produção de LCR. A produção de LCR é de 20-25% menor em camundongos que não apresentam AQP1 (123). Outras regiões, como cerebelo, também podem expressar AQP1 (124).

O bloqueio da AQP1 com HgCl_2 reduz o edema causado por lesão cerebral traumática (125). Foi comprovada redução da expressão de AQP1 no plexo coróide de ratos com hidrocefalia congênita. Acredita-se que a redução da AQP1 seja parte do mecanismo adaptativo à hipertensão endocraniana, diminuindo a produção de LCR (126). O mesmo parece ocorrer em humanos. Segundo relato de caso em criança de 15 meses com hiperplasia do plexo coróide, condição que eleva a produção de LCR, a marcação imunohistoquímica com anticorpos para AQP1 mostrou presença diminuída de imunoreatividade no plexo coróide (127).

Outras condições reduzem os níveis de AQP1. Alteração da gravidade por meio de centrifugação reduz os níveis de AQP1 no plexo coróide de ratos (128). Tumores no sistema nervoso central modificam a expressão de AQP1. Em biópsias de gliomas de pacientes, a expressão da AQP1 é aumentada (129). Tanto proteína como mRNA de AQP1 quase não são detectáveis em meduloblastomas pediátricos (130). O efeito da hipóxia regula a expressão do mRNA e da proteína AQP1 em diversos tecidos (131). A resposta dessa proteína à hipóxia intermitente não é conhecida.

4.7.2. AQP4

Localizada nas membranas da glia, principalmente das células ependimais e astrócitos (132, 133), a AQP4 é o canal de água mais presente em todo o SNC (134) e constituinte essencial da BHE (135).

Anormalidades da AQP4 astrocitária participam na fisiopatologia das convulsões, já que possui papel na remoção de K^+ (136). Camundongos sem AQP4 apresentam aumento no limiar, mas também na duração de convulsões (137, 138).

Anticorpos presentes na neuromielite óptica se ligam à AQP4. Essa ligação, de alguma maneira está relacionada com lesões desmielinizantes no encéfalo e na medula (139, 140). Em 2004, Lennon e colaboradores informaram a descoberta de anticorpo IgG, altamente específico para pacientes com neuromielite óptica. O auto-anticorpo (NMO-IgG) auxilia na diferenciação entre a neuromielite e a esclerose múltipla. Este anticorpo reage contra o canal de água AQP4 que está concentrado no pé dos astrócitos (141, 142).

A formação de tumores também é influenciada por modificações na expressão de AQP4. A expressão aumentada da proteína é vista em tumores de origem astrocítica e em meningiomas (143,144). Surpreendentemente, estudo com camundongos *knockout* para AQP4 mostrou que a proliferação de astrócitos é normal (145).

A AQP4 desempenha papel importante na formação/resolução de edema cerebral. Em modelos de edemas citotóxicos, camundongos *knockout* para AQP4 foram protegidos contra os efeitos de acúmulo de água na hiponatremia, inflamação, meningite, tumores. A intoxicação aguda com água, após 30 minutos, não provoca alteração nos pés terminais dos astrócitos de camundongos sem AQP4, enquanto animais com a proteína apresentam edema na mesma localização (figura 9) (146-148). A expressão exagerada da AQP4 em camundongos transgênicos provoca acúmulo de água no cérebro (149).

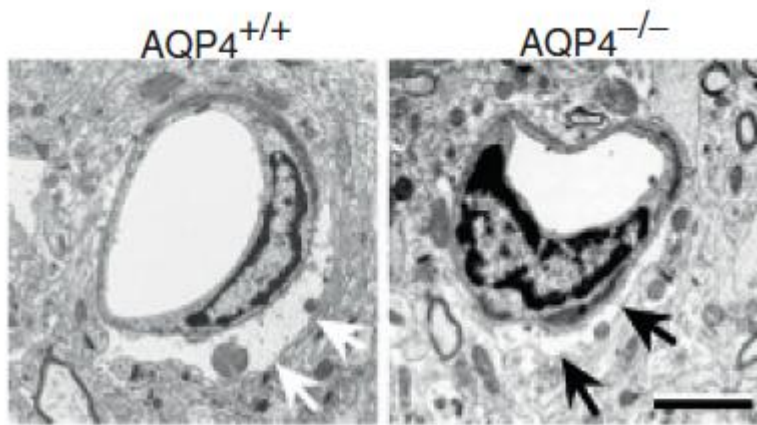


Figura 9 – Eletromicrografia demonstrando edema perivascular nos pés dos astrócitos de camundongos controles (flechas brancas). Animais *knockout* para AQP4 não apresentam edema celular citotóxico (flechas pretas).

Em modelos de edema cerebral vasogênico, como a lesão por congelamento, camundongos AQP4 *knockout* apresentam abertura da BHE que aumenta a pressão intracranial e do conteúdo de água do cérebro (figura 10) (13). AQP4 não foi estudada em modelos de hipóxia ou hipóxia intermitente.

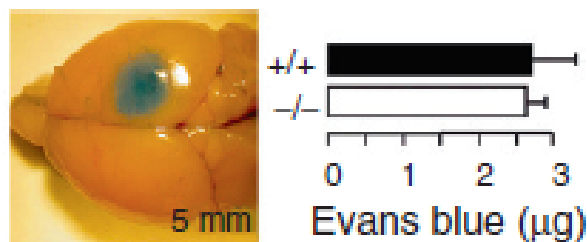


Figura 10 – Lesão por congelamento no córtex causa rompimento da BHE demonstrado pelo azul de Evans, e edema vasogênico. Modificado de Papadopoulos et al. Ref 149.

4.7.3. AQP9

Além de permeável à água, a AQP9 o é a outros moléculas como lactato e glicerol (151). AQP9 se encontra em células gliais, células endoteliais e neurônios (152-155). Mitocôndrias de astrócitos e neurônios dopaminérgicos apresentam outra isoforma de AQP9 que está associada à seletividade da membrana mitocondrial interna (156).

A função da AQP9 no encéfalo permanece inexplicada. A atividade elétrica dos neurônios catecolaminérgicos é modificada quando as

concentrações de glicerol e lactato aumentam (157), sugerindo envolvimento da AQP9 no metabolismo energético do encéfalo. Sua presença facilitaria a difusão de glicerol, substrato energético para o neurônio (158).

A síndrome do desequilíbrio da diálise, complicação da hemodiálise, caracterizada por sintomas neurológicos incluindo dor de cabeça, desorientação, náusea, convulsão e coma, ocorre aumento da expressão da AQP9. Foi sugerido que a AQP9 poderia estar envolvida no edema cerebral característico dessa síndrome (159).

Foi demonstrado que a expressão da AQP9 está aumentada em astrócitos durante a isquemia, mas que isto não se correlaciona com a formação de edema (160). Em modelo de edema cerebral infeccioso, porém, a expressão da AQP9 aumenta no cérebro de ratos (12).

4.8. Aquaporinas e Pele

A AQP3 foi localizada pela primeira vez na epiderme e glândulas sebáceas de ratos (82). É classificada como aquagliceroporina e encontrada em grande quantidade na epiderme humana, localizando-se nas membranas dos queratinócitos (161).

Alterações na AQP3 podem estar relacionadas com a hidratação da pele. A deleção do gene da AQP3 reduz a hidratação do estrato córneo (162). A hidratação do estrato córneo está ligada à aparência da pele, já que em peles envelhecidas e em algumas doenças dermatológicas há redução na hidratação do estrato córneo (163, 164). Foi visto que radiação UV diminui a expressão de AQP3, e reduz a permeabilidade de água em queratinócitos humanos (165). A figura 11 mostra a localização da AQP3 na epiderme humana e de camundongo.

A AQP3 está envolvida na cicatrização. A deleção da AQP3 em camundongos torna o processo de cicatrização mais demorado, devido à baixa taxa de proliferação e migração de queratinócitos. Acredita-se que isso ocorra devido à diminuição de captação de glicerol pela célula sem AQP3. O glicerol é importante no metabolismo celular, já que o glicerol-3-fosfato é intermediário na produção de ATP (166).

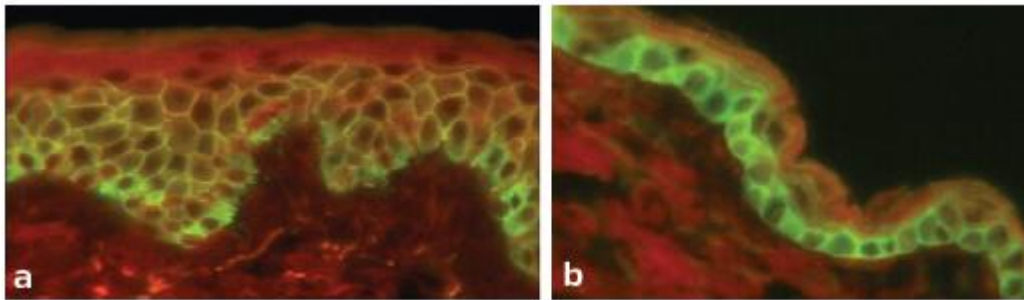


Figura 11 – Imunolocalização da AQP3 na epiderme de (a) humano e camundongo (b) através de imunofluorescência indireta (verde). Na epiderme humana, a AQP3 é encontrada no estrato basal e estrato espinhoso. Na epiderme de camundongo a AQP3 é somente encontrada no estrato basal.

O envolvimento da AQP3 nos cânceres de pele é incerto. Foi demonstrada maior resistência à formação de tumores de pele em ratos *knockout* para AQP3 (167). Outro estudo mostra níveis reduzidos da proteína em câncer de pele e em psoríase (168).

A AQP5 está presente nas glândulas sudoríparas, acredita-se que ela esteja envolvida diretamente na produção de suor (169). Foi constada presença exacerbada de AQP5 nas glândulas sudoríparas de paciente com hiperidrose nas palmas das mãos (170). AQP1 e AQP7 foram detectadas em células endoteliais da derme e em adipócitos, respectivamente (171, 172).

4.9. O sono e a pele

Alterações cutâneas como a psoríase e a dermatite atópica, associadas a funcionamento anormal da barreira epidérmica, podem ser desencadeadas por situações de estresse (173, 174) ou por mecanismos imunes e neuroendócrinos (175). Privação e restrição do sono se associam a alterações na função do sistema imune (176, 177).

Ratos privados de sono apresentam alteração da camada córnea da epiderme. O estresse provocado pela insônia diminui a proliferação e prejudica a diferenciação de células epidérmicas e diminui a densidade e tamanho dos corneodesmossomas (178).

Dados sobre a privação de sono e cicatrização são conflitantes. Em ratos privados de sono e que sofreram queimaduras na pele, quando comparados a controles, a cicatrização é mais lenta. Estes animais apresentam

menor número de fibroblastos e menor revascularização (179) porém, biópsias do dorso de ratos controles e de animais privados de sono por cinco dias não mostraram efeitos significativos na cicatrização (180). O efeito de hipóxia ou hipóxia intermitente sobre a pele e a AQP3 não está descrito na literatura acessada.

5. Objetivos

5.1. Gerais

Avaliar alterações induzidas por 35 dias de hipóxia intermitente no tecido nervoso e dérmico de camundongos.

5.2. Específicos

1. Determinar os níveis de AQP1 no cerebelo e de AQP1 e AQP3 no hipocampo de camundongos expostos a 35 dias de hipóxia intermitente ou simulada;
2. Determinar os níveis de AQP4, AQP9 e HIF-1a no estriado e no córtex frontal expostos a 35 dias de hipóxia intermitente ou simulada;
3. Avaliar danos celulares no hipocampo e cerebelo de camundongos expostos a 35 dias de hipóxia intermitente ou simulada, através de imunohistoquímica e hematoxilina-eosina;
4. Verificar alteração no conteúdo de água dos encéfalos de camundongos expostos a 35 dias de hipóxia intermitente ou simulada;
5. Determinar os níveis de AQP3 na pele de camundongos expostos a 35 dias de hipóxia intermitente ou simulada;

6. Referências

- (1) Dempsey JA, Veasey SC, Morgan BJ, O'Donnell CP. Pathophysiology of sleep apnea. *Physiol Rev.* 2010;90:47-112.
- (2) Calhoun DA, Jones D, Textor S, et al. 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;117:510-26.
- (3) Kohler M, Stradling JR. Mechanisms of vascular damage in obstructive sleep apnea. *Nat Rev Cardiol* 2010;7:677-85.
- (4) Yaggi HK, Concato J, Kernan WN, Lichtman JH, Brass LM, Mohsenin V. Obstructive sleep apnea as a risk factor for stroke and death. *N Engl J Med* 2005;353:2034-41.
- (5) Canessa N, Castronovo V, Cappa SF, et al. Obstructive Sleep Apnea: Brain Structural Changes and Neurocognitive Function Before and After Treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:1419-1426
- (6) Ayalon L, Peterson S. Functional central nervous system imaging in the investigation of obstructive sleep apnea. *Curr Opin Pulm Med* 2007;13:479-83.
- (7) Braga CW, Martinez D, Wofchuk S, Portela LV, Souza DO. S100B and NSE serum levels in obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep Med* 2006;7:431-5.
- (8) Redolfi S, Arnulf I, Pottier M, Bradley TD, Similowski T. Effects of venous compression of the legs on overnight rostral fluid shift and obstructive sleep apnea. *Respir Physiol Neurobiol.* 2011;175:390-3.
- (9) Redolfi S, Yumino D, Ruttanaumpawan P, et al. Relationship between overnight rostral fluid shift and Obstructive Sleep Apnea in non obese men. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179:241-6.
- (10) Tait MJ, Saadoun S, Bell BA, Papadopoulos MC. Water movements in the brain: role of aquaporins. *Trends Neurosci* 2008;31:37-43.
- (11) Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin-4 and brain edema. *Pediatr Nephrol* 2007;22:778-84.

- (12) Wang H, Jin R, Tian P, Zhuo Z. Enhanced expression of aquaporin-9 in rat brain edema induced by bacterial lipopolysaccharides. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2009;29:150-5.
- (13) Papadopoulos MC, Manley GT, Krishna S, Verkman AS. Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema. *FASEB J* 2004;18:1291-3.
- (14) Gjørup PH, Sadauskiene L, Wessels J, Nyvad O, Strunge B, Pedersen EB. Increased nocturnal sodium excretion in obstructive sleep apnoea. Relation to nocturnal change in diastolic blood pressure. *Scand J Clin Lab Invest* 2008;68:11-21.
- (15) Gleeson K, Zwillich CW, White DP. The influence of increasing ventilatory effort on arousal from sleep. *Am Rev Respir Dis* 1990;142:295-300.
- (16) Shamsuzzaman AS, Gersh BJ, Somers VK. Obstructive sleep apnea: implications for cardiac and vascular disease. *JAMA* 2003;290:1906-1914.
- (17) Jelic S, Padeletti M, Kawut SM, et al. Inflammation, oxidative stress, and repair capacity of the vascular endothelium in obstructive sleep apnea. *Circulation*. 2008;117:2270-8.
- (18) Tufik S, Santos-Silva R, Taddei JA, Bittencourt LR. Obstructive sleep apnea syndrome in the Sao Paulo Epidemiologic Sleep Study. *Sleep Med*. 2010;11:441-6.
- (19) Patil SP, Schneider H, Schwartz AR, Smith PL. Adult obstructive sleep apnea: pathophysiology and diagnosis. *Chest*. 2007;132:325-37.
- (20) American Academy of Sleep Medicine. International classification of sleep disorders, revised: Diagnostic and coding manual. Chicago, Illinois: American Academy of Sleep Medicine, 2001.
- (21) Schwab RJ, Pasirstein M, Pierson R, Mackley A, Hachadoorian R, Arens R, Maislin G, Pack AI. Identification of upper airway anatomic risk factors for obstructive sleep apnea with volumetric magnetic resonance imaging. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168:522-30.
- (22) Hudge DW. Variable site of airway narrowing among obstructive sleep apnea patients. *J Appl Physiol*. 1986;61:1403-9.
- (23) Bacon WH, Turlot JC, Krieger J, Stierle JL. Cephalometric evaluation of pharyngeal obstructive factors in patients with sleep apneas syndrome. *Angle Orthod*. 1990;60:115-22.

- (24) Riley R, Guilleminault C, Herran J, Powell N. Cephalometric analyses and flow-volume loops in obstructive sleep apnea patients. *Sleep*. 1983;6:303-11.
- (25) Rivlin J, Hoffstein V, Kalbfleisch J, McNicholas W, Zamel N, Bryan AC. Upper airway morphology in patients with idiopathic obstructive sleep apnea. *Am Rev Respir Dis*. 1984;129:355-60.
- (26) Ciscar MA, Juan G, Martínez V, Ramón M, Lloret T, Mínguez J, Armengot M, Marín J, Basterra J. Magnetic resonance imaging of the pharynx in OSA patients and healthy subjects. *Eur Respir J*. 2001;17:79-86.
- (27) Huang Y, White DP, Malhotra A. The impact of anatomic manipulations on pharyngeal collapse: results from a computational model of the normal human upper airway. *Chest*. 2005;128:1324-30.
- (28) Chiu KL, Ryan CM, Shiota S, Ruttanaumpawan P, Arzt M, Haight JS, Chan CT, Floras JS, Bradley TD. Fluid shift by lower body positive pressure increases pharyngeal resistance in healthy subjects. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174:1378-83.
- (29) Su MC, Chiu KL, Ruttanaumpawan P, Shiota S, Yumino D, Redolfi S, Haight JS, Bradley TD. Lower body positive pressure increases upper airway collapsibility in healthy subjects. *Respir Physiol Neurobiol*. 2008;161:306-12.
- (30) Shiota S, Ryan CM, Chiu KL, Ruttanaumpawan P, Haight J, Arzt M, Floras JS, Chan C, Bradley TD. Alterations in upper airway cross-sectional area in response to lower body positive pressure in healthy subjects. *Thorax*. 2007;62:868-72.
- (31) Yumino D, Redolfi S, Ruttanaumpawan P, Su MC, Smith S, Newton GE, Mak S, Bradley TD. Nocturnal rostral fluid shift: a unifying concept for the pathogenesis of obstructive and central sleep apnea in men with heart failure. *Circulation*. 2010;121:1598-605.
- (32) Jafari B, Mohsenin V. Overnight rostral fluid shift in obstructive sleep apnea: does it affect the severity of sleep-disordered breathing? *Chest*. 2011;140:991-7.
- (33) Peled N, Kassirer M, Shitrit D, Kogan Y, Shlomi D, Berliner AS, Kramer MR. The association of OSA with insulin resistance, inflammation and metabolic syndrome. *Respir Med*. 2007;101:1696-701.

- (34) Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation* 2005;112: 2660–2667.
- (35) Larkin EK, Rosen CL, Kirchner HL, et al. Variation of C-reactive protein levels in adolescents: association with sleep-disordered breathing and sleep duration. *Circulation* 2005;111:1978–1984.
- (36) Dyugovskaya L, Lavie P, Lavie L. Increased adhesion molecules expression and production of reactive oxygen species in leukocytes of sleep apnea patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:859–860.
- (37) Nácher M, Farré R, Montserrat JM, Torres M, Navajas D, Bulbena O, Serrano-Mollar A. Biological consequences of oxygen desaturation and respiratory effort in an acute animal model of obstructive sleep apnea (OSA). *Sleep Med.* 2009;10:892-7.
- (38) Coughlin SR, Mawdsley L, Mugarza JA, Calverley PM, Wilding JP. Obstructive sleep apnoea is independently associated with an increased prevalence of metabolic syndrome. *Eur Heart J.* 2004;25:735-41.
- (39) Peled N, Kassirer M, Shitrit D, Kogan Y, Shlomi D, Berliner AS, Kramer MR. The association of OSA with insulin resistance, inflammation and metabolic syndrome. *Respir Med.* 2007;101:1696-701.
- (40) Ursavas A, Ilcol YO, Nalci N, Karadag M, Ege E. Ghrelin, leptin, adiponectin, and resistin levels in sleep apnea syndrome: Role of obesity. *Ann Thorac Med.* 2010;5:161-5.
- (41) Peker Y, Hedner J, Norum J, Kraiczi H, Carlson J. Increased incidence of cardiovascular disease in middle-aged men with obstructive sleep apnea: a 7-year follow-up. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166:159-65.
- (42) Romero-Corral A, Somers VK, Pellikka PA, Olson EJ, Bailey KR, Korinek J, Orban M, Sierra-Johnson J, Kato M, Amin RS, Lopez-Jimenez F. Decreased right and left ventricular myocardial performance in obstructive sleep apnea. *Chest.* 2007;132:1863-70.
- (43) Komada Y, Nishida Y, Namba K, Abe T, Tsuiki S, Inoue Y. Elevated risk of motor vehicle accident for male drivers with obstructive sleep apnea syndrome in the Tokyo metropolitan area. *Tohoku J Exp Med.* 2009;219:11-6.

- (44) Yusoff MF, Baki MM, Mohamed N, Mohamed AS, Yunus MR, Ami M, Othman I, Ishak AI. Obstructive sleep apnea among express bus drivers in Malaysia: important indicators for screening. *Traffic Inj Prev.* 2010;11:594-9.
- (45) Viegas CA, de Oliveira HW. Prevalence of risk factors for obstructive sleep apnea syndrome in interstate bus drivers. *J Bras Pneumol.* 2006;32:144-9.
- (46) Findley L, Smith C, Hooper J, Dineen M, Suratt PM. Treatment with nasal CPAP decreases automobile accidents in patients with sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161:857-9.
- (47) George CF. Reduction in motor vehicle collisions following treatment of sleep apnoea with nasal CPAP. *Thorax* 2001;56:508–512.
- (48) Naëgelé B, Thouvard V, Pépin JL, Lévy P, Bonnet C, Perret JE, Pellat J, Feuerstein C. Deficits of cognitive executive functions in patients with sleep apnea syndrome. *Sleep.* 1995;18:43-52.
- (49) Verstraeten E, Cluydts R, Pevernagie D, Hoffmann G. Executive function in sleep apnea: controlling for attentional capacity in assessing executive attention. *Sleep.* 2004 Jun 15;27(4):685-93.
- (50) Macey PM, Henderson LA, Macey KE, Alger JR, Frysinger RC, Woo MA, Harper RK, Yan-Go FL, Harper RM. Brain morphology associated with obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166:1382-7.
- (51) Morrell MJ, Jackson ML, Twigg GL, Ghiassi R, McRobbie DW, Quest RA, Pardoe H, Pell GS, Abbott DF, Rochford PD, Jackson GD, Pierce RJ, O'Donoghue FJ, Corfield DR. Changes in brain morphology in patients with obstructive sleep apnoea. *Thorax.* 2010;65:908-14.
- (52) Morrell MJ, McRobbie DW, Quest RA, Cummin AR, Ghiassi R, Corfield DR. Changes in brain morphology associated with obstructive sleep apnea. *Sleep Med.* 2003;4:451-4.
- (53) Kamba M, Suto Y, Ohta Y, Inoue Y, Matsuda E. Cerebral metabolism in sleep apnea. Evaluation by magnetic resonance spectroscopy. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156:296-8.
- (54) Halbower AC, Degaonkar M, Barker PB, Earley CJ, Marcus CL, Smith PL, Prahme MC, Mahone EM. Childhood obstructive sleep apnea associates with neuropsychological deficits and neuronal brain injury. *PLoS Med.* 2006;3:e301.

- (55) Kumar R, Macey PM, Cross RL, Woo MA, Yan-Go FL, Harper RM. Neural alterations associated with anxiety symptoms in obstructive sleep apnea syndrome. *Depress Anxiety*. 2009;26:480-91.
- (56) Evans KC, Banzett RB, Adams L, McKay L, Frackowiak RS, Corfield DR. BOLD fMRI identifies limbic, paralimbic, and cerebellar activation during air hunger. *J Neurophysiol*. 2002 Sep;88(3):1500-11.
- (57) Pae EK, Chien P, Harper RM. Intermittent hypoxia damages cerebellar cortex and deep nuclei. *Neurosci Lett*. 2005;375:123-8
- (58) Aviles-Reyes RX, Angelo MF, Villarreal A, Rios H, Lazarowski A, Ramos AJ. Intermittent hypoxia during sleep induces reactive gliosis and limited neuronal death in rats: implications for sleep apnea. *J Neurochem*. 2010;112:854-69.
- (59) Gozal D, Daniel JM, Dohanich GP. Behavioral and anatomical correlates of chronic episodic hypoxia during sleep in the rat. *J Neurosci*. 2001;21:2442-50.
- (60) Row BW, Liu R, Xu W, Kheirandish L, Gozal D. Intermittent hypoxia is associated with oxidative stress and spatial learning deficits in the rat. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167:1548-53.
- (61) Gozal D, Row BW, Kheirandish L, Liu R, Guo SZ, Qiang F, Brittan KR. Increased susceptibility to intermittent hypoxia in aging rats: changes in proteasomal activity, neuronal apoptosis and spatial function. *J Neurochem*. 2003;86:1545-52.
- (62) Joseph JA, Denisova N, Villalobos-Molina R, Erat S, Strain J. Oxidative stress and age-related neuronal deficits. *Mol Chem Neuropathol*. 1996;28:35-40.
- (63) Xu W, Chi L, Row BW, Xu R, Ke Y, Xu B, Luo C, Kheirandish L, Gozal D, Liu R. Increased oxidative stress is associated with chronic intermittent hypoxia-mediated brain cortical neuronal cell apoptosis in a mouse model of sleep apnea. *Neuroscience*. 2004;126:313-23.
- (64) Gordon P, Sanders M. Sleep 7: positive airway pressure therapy for obstructive sleep apnoea/ hypopnoea syndrome. *Thorax* 2005;60:68– 75.
- (65) Jenkinson C, Davies R, Mullins R, et al. Long-term benefits in self-reported health status of nasal continuous positive airway pressure therapy for obstructive sleep apnoea. *J Assoc Physicians India* 2001;94:95 –9.

- (66) Hiestand DM, Britz P, Goldman M, Phillips B. Prevalence of symptoms and risk of sleep apnea in the US population: Results from the national sleep foundation sleep in America 2005 poll. *Chest*. 2006;130:780-6.
- (67) Couch ME, Senior B. Nonsurgical and surgical treatments for sleep apnea. *Anesthesiol Clin North America*. 2005;23:525-34.
- (68) Agre P, Saboori AM, Asimos A, Smith BL. Purification and partial characterization of the Mr 30,000 integral membrane protein associated with the erythrocyte Rh(D) antigen. *J Biol Chem*. 1987;262:17497-503.
- (69) Saboori AM, Smith BL, Agre P. Polymorphism in the Mr 32,000 Rh protein purified from Rh(D)-positive and -negative erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85:4042-5.
- (70) Denker BM, Smith BL, Kuhajda FP, Agre P. Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. *J Biol Chem*. 1988;263:15634-42.
- (71) Smith BL, Agre P. Erythrocyte Mr 28,000 transmembrane protein exists as a multisubunit oligomer similar to channel proteins. *J Biol Chem*. 1991;266:6407-15.
- (72) Hediger MA, Coady JM, Ikeda TS, Wright EM. Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose co-transporter. *Nature* 1987;330:379–381
- (73) Preston GM, Carroll T, Guggino WB, Agre P. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 1992;256:385–387
- (74) Agre P, Sasaki S, Chrispeels MJ. Aquaporins, a family of membrane water channels. *Am J Physiol* 1993;265:F461
- (75) Zardoya R. Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein family. *Biol Cell* 2005;97:397–414
- (76) Yasui M, Hazama A, Kwon TH, Nielsen S, Guggino WB, Agre P. Rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin. *Nature*. 1999;402:184-7.
- (77) Ma T, Yang B, Verkman AS. Cloning of a novel water and urea-permeable aquaporin from mouse expressed strongly in colon, placenta, liver, and heart. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;240:324-8.
- (78) Morishita Y, Sakube Y, Sasaki S, Ishibashi K. Molecular mechanisms and drug development in aquaporin water channel diseases: aquaporin superfamily

(superaquaporins): expansion of aquaporins restricted to multicellular organisms. *J Pharmacol Sci.* 2004;96:276-9.

⁽⁷⁹⁾ Gorin MB, Yancey SB, Cline J, Revel JP, Horwitz J. The major intrinsic protein (MIP) of the bovine lens fiber membrane: characterization and structure based on cDNA cloning. *Cell.* 1984;39:49-59.

⁽⁸⁰⁾ Nielsen S, Smith BL, Christensen EI, Agre P. Distribution of the aquaporin CHIP in secretory and resorptive epithelia and capillary endothelia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:7275-9.

⁽⁸¹⁾ Nielsen S, DiGiovanni SR, Christensen EI, Knepper MA, Harris HW. Cellular and subcellular immunolocalization of vasopressin-regulated water channel in rat kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:11663-7.

⁽⁸²⁾ Ecelbarger CA, Terris J, Frindt G, Echevarria M, Marples D, Nielsen S, Knepper MA. Aquaporin-3 water channel localization and regulation in rat kidney. *Am J Physiol.* 1995;269:F663-72.

⁽⁸³⁾ Nielsen S, King LS, Christensen BM, Agre P. Aquaporins in complex tissues. II. Subcellular distribution in respiratory and glandular tissues of rat. *Am J Physiol.* 1997;273:C1549-61.

⁽⁸⁴⁾ Frigeri A, Gropper MA, Umenishi F, Kawashima M, Brown D, Verkman AS. Localization of MIWC and GLIP water channel homologs in neuromuscular, epithelial and glandular tissues. *J Cell Sci* 1995;108:2993–3002

⁽⁸⁵⁾ Matsuzaki T, Suzuki T, Koyama H, Tanaka S, Takata K. Water channel protein AQP3 is present in epithelia exposed to the environment of possible water loss. *J Histochem Cytochem.* 1999 Oct;47(10):1275-86.

⁽⁸⁶⁾ Terris J, Ecelbarger CA, Marples D, Knepper MA, Nielsen S. Distribution of aquaporin-4 water channel expression within rat kidney. *Am J Physiol.* 1995;269:F775-85.

⁽⁸⁷⁾ Hamann S, Zeuthen T, La Cour M, Nagelhus EA, Ottersen OP, Agre P, Nielsen S. Aquaporins in complex tissues: distribution of aquaporins 1-5 in human and rat eye. *Am J Physiol.* 1998;274:C1332-45.

⁽⁸⁸⁾ Yasui M, Kwon TH, Knepper MA, Nielsen S, Agre P. Aquaporin-6: An intracellular vesicle water channel protein in renal epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:5808-13.

⁽⁸⁹⁾ Hibuse T, Maeda N, Funahashi T, Yamamoto K, Nagasawa A, Mizunoya W, Kishida K, Inoue K, Kuriyama H, Nakamura T, Fushiki T, Kihara S, Shimomura

I. Aquaporin 7 deficiency is associated with development of obesity through activation of adipose glycerol kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:10993-8.

⁽⁹⁰⁾ Hurley PT, Ferguson CJ, Kwon TH, Andersen ML, Norman AG, Steward MC, Nielsen S, Case RM. Expression and immunolocalization of aquaporin water channels in rat exocrine pancreas. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001;280:G701-9.

⁽⁹¹⁾ García F, Kierbel A, Larocca MC, Gradilone SA, Splinter P, LaRusso NF, Marinelli RA. The water channel aquaporin-8 is mainly intracellular in rat hepatocytes, and its plasma membrane insertion is stimulated by cyclic AMP. *J Biol Chem.* 2001 Apr 13;276:12147-52.

⁽⁹²⁾ Carbrey JM, Gorelick-Feldman DA, Kozono D, Praetorius J, Nielsen S, Agre P. Aquaglyceroporin AQP9: solute permeation and metabolic control of expression in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:2945-50.

⁽⁹³⁾ Hatakeyama S, Yoshida Y, Tani T, Koyama Y, Nihei K, Ohshiro K, Kamiie JI, Yaoita E, Suda T, Hatakeyama K, Yamamoto T. Cloning of a new aquaporin (AQP10) abundantly expressed in duodenum and jejunum. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;287:814-9.

⁽⁹⁴⁾ Bichet DG. Hereditary polyuric disorders: new concepts and differential diagnosis. *Semin Nephrol.* 2006;26:224-33.

⁽⁹⁵⁾ King LS, Choi M, Fernandez PC, Cartron JP, Agre P. Defective urinary-concentrating ability due to a complete deficiency of aquaporin-1. *N Engl J Med.* 2001;345:175-9.

⁽⁹⁶⁾ Berry V, Francis P, Kaushal S, Moore A, Bhattacharya S. Missense mutations in MIP underlie autosomal dominant 'polymorphic' and lamellar cataracts linked to 12q. *Nat Genet.* 2000;25:15-7.

⁽⁹⁷⁾ Auguste KI, Jin S, Uchida K, Yan D, Manley GT, Papadopoulos MC, Verkman AS. Greatly impaired migration of implanted aquaporin-4-deficient astroglial cells in mouse brain toward a site of injury. *FASEB J.* 2007 ;21:108-16.

⁽⁹⁸⁾ Levin MH, Verkman AS. Aquaporin-3-dependent cell migration and proliferation during corneal re-epithelialization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47:4365-72.

- (99) Hara-Chikuma M, Verkman AS. Aquaporin-3 facilitates epidermal cell migration and proliferation during wound healing. *J Mol Med* 2008a;86:221–231
- (100) Hara-Chikuma M, Verkman AS. Aquaporin-1 facilitates epithelial cell migration in kidney proximal tubule. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17:39-45.
- (101) Savage DF, Stroud RM. Structural basis of aquaporin inhibition by mercury. *J Mol Biol*. 2007;368:607-17.
- (102) Echevarria M, Windhager EE, Tate SS, Frindt G. Cloning and expression of AQP3, a water channel from medullary collecting duct of rat kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:10997–11001.
- (103) Ishibashi K, Kuwahara M, Gu Y, Kageyama Y, Tohsaka A, Suzuki F, Marumo F, Sasaki S. Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol, and urea. *J Biol Chem* 1997;272:20782–20786.
- (104) Ishibashi K, Morinaga T, Kuwahara M, Sasaki S, Imai M. Cloning and identification of a new member of water channel (AQP10) as an aquaglyceroporin. *Biochim Biophys Acta* 2002;1576:335–340.
- (105) Tsukaguchi H, Shayakul C, Berger UV, Mackenzie B, Devidas S, Guggino WM, van Hoek AN, Hediger MA. Molecular characterization of a broad selectivity neutral solute channel. *J Biol Chem* 1998;273:24737–24743.
- (106) Nakhoul NL, Davis BA, Romero MF, Boron WF. Effect of expressing the water channel aquaporin-1 on the CO₂ permeability of *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol* 1998; 274:C543–C548.
- (107) Yang B, Fukuda N, van Hoek A, Matthay MA, Ma T, Verkman AS. Carbon dioxide permeability of aquaporin-1 measured in erythrocytes and lung of aquaporin-1 null mice and in reconstituted proteoliposomes. *J Biol Chem* 2000;275:2686–2692.
- (108) Endeward V, Musa-Aziz R, Cooper GJ, Chen LM, Pelletier MF, Virkki LV, Supuran CT, King LS, Boron WF, Gros G. Evidence that aquaporin 1 is a major pathway for CO₂ transport across the human erythrocyte membrane. *FASEB J* 2006;20:1974–1981.
- (109) Herrera M, Hong NJ, Garvin JL. Aquaporin-1 transports NO across cell membranes. *Hypertension* 2006;48:157–164.
- (110) Herrera M, Garvin JL. Novel role of AQP-1 in NO-dependent vasorelaxation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;292:F1443–F1451.

- (¹¹¹) Hamdi M, Sanchez MA, Beene LC, Liu Q, Landfear SM, Rosen BP, Liu Z. Arsenic transport by zebrafish aquaglyceroporins. *BMC Mol Biol*. 2009;10:104.
- (¹¹²) Bienert GP, Møller AL, Kristiansen KA, Schulz A, Møller IM, Schjoerring JK, Jahn TP. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J Biol Chem*. 2007;282:1183-92.
- (¹¹³) Ikeda M, Beitz E, Kozono D, Guggino WB, Agre P, Yasui M. Characterization of aquaporin-6 as a nitrate channel in mammalian cells. Requirement of pore-lining residue threonine 63. *J Biol Chem*. 2002;277:39873-9.
- (¹¹⁴) Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, Walz T, Agre P, Heymann JB, Engel A, Fujiyoshi Y. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature*. 2000;407:599-605.
- (¹¹⁵) Gonen T, Walz T. The structure of aquaporins. *Q Rev Biophys*. 2006;39:361-96.
- (¹¹⁶) Yasui M. Molecular mechanisms and drug development in aquaporin water channel diseases: structure and function of aquaporins. *J Pharmacol Sci*. 2004;96:260-3.
- (¹¹⁷) Sui H, Han BG, Lee JK, Walian P, Jap BK. Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature*. 2001;414:872-8.
- (¹¹⁸) de Groot BL, Grubmüller H. The dynamics and energetics of water permeation and proton exclusion in aquaporins. *Curr Opin Struct Biol*. 2000;15:176-83.
- (¹¹⁹) Iadecola C. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*. 2004;5:347-60.
- (¹²⁰) Wilcock DM, Vitek MP, Colton CA. Vascular amyloid alters astrocytic water and potassium channels in mouse models and humans with Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 2009;159:1055-69.
- (¹²¹) Yool AJ. Aquaporins: multiple roles in the central nervous system. *Neuroscientist*. 2007;13:470-85.
- (¹²²) Sulyok E, Vajda Z, Dóczi T, Nielsen S. Aquaporins and the central nervous system. *Acta Neurochir (Wien)*. 2004;146:955-60.
- (¹²³) Oshio K, Song Y, Verkman AS, Manley GT. Aquaporin-1 deletion reduces osmotic water permeability and cerebrospinal fluid production. *Acta Neurochir Suppl* 2003;86:525–528

- (124) Wiegman MJ, Bullinger LV, Kohlmeyer MM, Hunter TC, Cipolla MJ. Regional expression of aquaporin 1, 4, and 9 in the brain during pregnancy. *Reprod Sci* 2008;15:506-16.
- (125) Tran ND, Kim S, Vincent HK, Rodriguez A, Hinton DR, Bullock MR, Young HF. Aquaporin-1 mediated cerebral edema following traumatic brain injury: effects of acidosis and corticosteroid administration. *J Neurosurg*. 2010;112:1095-104.
- (126) Paul L, Madan M, Rammling M, Behman B, Pattisapu JV. The altered expression of aquaporin 1 and 4 in choroid plexus of congenital hydrocephalus. *Cerebrospinal Fluid Res* 2009;6:S7.
- (127) Smith ZA, Moftakhar P, Malkasian D, Xiong Z, Vinters HV, Lazareff JA. Choroid plexus hyperplasia: surgical treatment and immunohistochemical results. Case report. *J Neurosurg* 2007;107:255–262
- (128) Masseguin C, Corcoran M, Carcenac C, Daunton NG, Güell A, Verkman AS, Gabrion J. Altered gravity downregulates aquaporin-1 protein expression in choroid plexus. *J Appl Physiol* 2000;88:843–850
- (129) McCoy E, Sontheimer H, McCoy E, et al. Expression and function of water channels (aquaporins) in migrating malignant astrocytes. *Glia* 2007;55:1034–43.
- (130) Wang D, Oowler BK. Expression of AQP1 and AQP4 in paediatric brain tumours. *J Clin Neurosci*. 2011;18:122-7.
- (131) Abreu-Rodríguez I, Sánchez Silva R, Martins AP, Soveral G, Toledo-Aral JJ, López-Barneo J, Echevarría M. Functional and transcriptional induction of aquaporin-1 gene by hypoxia; analysis of promoter and role of hif-1 α . *PLoS One*. 2011;6:e28385.
- (132) Nagelhus EA, Veruki ML, Torp R, Haug FM, Laake JH, Nielsen S, Agre P, Ottersen OP. Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Muller cells and fibrous astrocytes. *J. Neurosci*. 1998;18:2506–2519.
- (133) Nielsen S, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, Bourque C, Agre P, Ottersen OP. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J. Neurosci*. 1997;17:171–180.

- (134) Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP. The molecular basis of water transport in the brain. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4:991-1001.
- (135) Nicchia GP, Nico B, Camassa LMA, et al. The role of aquaporin-4 in the blood-brain barrier development and integrity: studies in animal and cell culture models. *Neuroscience*. 2004;129:935-945.
- (136) Amiry-Moghaddam M, Williamson A, Palomba M, et al. Delayed K⁺ clearance associated with aquaporin-4 mislocalization: phenotypic defects in brains of alpha-syntrophin-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:13615-20.
- (137) Binder DK, Oshio K, Ma T, Verkman AS, Manley GT. Increased seizure threshold in mice lacking aquaporin-4 water channels. *Neuroreport*. 2004;15:259-62.
- (138) Binder DK, Yao X, Verkman AS, Manley GT. Increased seizure duration in mice lacking aquaporin-4 water channels. *Acta Neurochir Suppl*. 2006;96:389-92.
- (139) Lennon VA, Kryzer TJ, Pittock SJ, Verkman AS, Hinson SR. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J Exp Med*. 2005 Aug 15;202(4):473-7.
- (140) Jarius S, Paul F, Franciotta D, Waters P, Zipp F, Hohlfeld R, Vincent A, Wildemann B. Mechanisms of disease: aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica. *Nat Clin Pract Neurol*. 2008;4:202-14.
- (141) Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Fujihara K, Nakashima I, Weinshenker BG. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet*. 2004;364:2106-12.
- (142) Roemer SF, Parisi JE, Lennon VA, Benarroch EE, Lassmann H, Bruck W, Mandler RN, Weinshenker BG, Pittock SJ, Wingerchuk DM, Lucchinetti CF. Pattern-specific loss of aquaporin-4 immunoreactivity distinguishes neuromyelitis optica from multiple sclerosis. *Brain*. 2007;130:1194-205.
- (143) Saadoun S, Papadopoulos MC, Davies DC, et al. Aquaporin-4 expression is increased in oedematous human brain tumours. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2002;72:262-5.
- (144) Ng WH, Hy JW, Tan WL, Liew et al. Aquaporin-4 expression is increased in edematous meningiomas. *J Clin Neurosci*. 2009;16:441-3.

- (145) Saadoun S, Papadopoulos MC, Watanabe H, Yan D, Manley GT, Verkman AS. Involvement of aquaporin-4 in astroglial cell migration and glial scar formation. *J Cell Sci.* 2005;118:5691-8.
- (146) Manley GT, Fujimura M, Ma T, Noshita N, Filiz F, Bollen AW, Chan P, Verkman AS. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat Med* 2000; 6:159–163
- (147) Zador Z, Stiver S, Wang V, Manley GT. Role of aquaporin-4 in cerebral edema and stroke. *Handb Exp Pharmacol.* 2000;159-70.
- (148) Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin-4 gene disruption in mice reduces brain swelling and mortality in pneumococcal meningitis. *J Biol Chem* 2005;280:13906–13912
- (149) Yang B, Zador Z, Verkman AS. Glial cell aquaporin-4 overexpression in transgenic mice accelerates cytotoxic brain swelling. *J. Biol. Chem* 2008;283:15280–15286.
- (150) Papadopoulos MC, Manley GT, Krishna S, Verkman AS. Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema. *FASEB J.* 2004;18:1291-3.
- (151) Ko SB, Uchida S, Naruse S, Kuwahara M, Ishibashi K, Marumo F, Hayakawa T, Sasaki S. Cloning and functional expression of rAQP9L a new member of aquaporin family from rat liver. *Biochem Mol Biol Int* 1999;47:309–318.
- (152) Badaut J, Hirt L, Granziera C, Bogousslavsky J, Magistretti PJ, Regli L. Astrocyte-specific expression of aquaporin-9 in mouse brain is increased after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001;21:477–482.
- (153) Badaut J, Petit JM, Brunet JF, Magistretti PJ, Charriaut-Marlangue C, Regli L. Distribution of aquaporin 9 in the adult rat brain: preferential expression in catecholaminergic neurons and in glial cells. *Neuroscience* 2004;128:27–38.
- (154) Nicchia GP, Frigeri A, Nico B, Ribatti D, Svelto M. Tissue distribution and membrane localization of aquaporin-9 water channel: evidence for sex-linked differences in liver. *J Histochem Cytochem* 2001; 49:1547–1556.
- (155) Badaut J, Petit JM, Brunet JF, Magistretti PJ, Villemure JG, Charriaut-Marlangue C, Regli L. Aquaglyceroporin 9 in brain catecholaminergic neurons: involvement in glucose metabolism? *Soc Neurosci* 2003;193:13.

- (156) Amiry-Moghaddam M, Lindland H, Zelenin S, Roberg BA, Gundersen BB, Petersen P, Rinvik E, Torgner IA, Ottersen OP. Brain mitochondria contain aquaporin water channels: evidence for the expression of a short AQP9 isoform in the inner mitochondrial membrane. *FASEB J* 2005;19:1459–1467.
- (157) Yang XJ, Kow LM, Funabashi T, Mobbs CV. Hypothalamic glucose sensor: similarities to and differences from pancreatic beta-cell mechanisms. *Diabetes* 1999;48:1763–1772.
- (158) Nguyen NH, Brathe A, Hassel B. Neuronal uptake and metabolism of glycerol and the neuronal expression of mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *J Neurochem* 2003;85:831–842.
- (159) Trinh-Trang-Tan MM, Cartron JP, Bankir L. Molecular basis for the dialysis disequilibrium syndrome: altered aquaporin and urea transporter expression in the brain. *Nephrol Dial Transplant*. 2005;20:1984-8.
- (160) Ribeiro M de C, Hirt L, Bogousslavsky J, Regli L, Badaut J. Time course of aquaporin expression after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci Res*. 2006;83:1231-40.
- (161) Sougrat R, Morand M, Gondran C, Barré P, Gobin R, Bonté F, Dumas M, Verbavatz JM. Functional expression of AQP3 in human skin epidermis and reconstructed epidermis. *J Invest Dermatol* 2002;118:678–685
- (162) Ma T, Hara M, Sougrat R, Verbavatz JM, Verkman AS. Impaired stratum corneum hydration in mice lacking epidermal water channel aquaporin-3. *J Biol Chem* 2002;277:17147–17153.
- (163) Tagami H, Kobayashi H, Zhen XS, Kikuchi K. Environmental effects on the functions of the stratum corneum. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2001; 6:87–94.
- (164) Chuong CM, Nickoloff BJ, Elias PM, Goldsmith LA, Macher E, Maderson PA *et al*. What is the "true" function of skin? *Exp Dermatol* 2002;11:159–187.
- (165) Cao C, Wan S, Jiang Q, Amaral A, Lu S, Hu G, Bi Z, Kouttab N, Chu W, Wan Y. All-trans retinoic acid attenuates ultraviolet radiation-induced down-regulation of aquaporin-3 and water permeability in human keratinocytes. *J Cell Physiol* 2008;215:506–516.
- (166) Brisson D, Vohl MC, St-Pierre J, Hudson TJ, Gaudet D. Glycerol: a neglected variable in metabolic processes? *Bioessays* 2001;23:534–542

- (167) Hara-Chikuma M, Verkman AS. Prevention of skin tumorigenesis and impairment of epidermal cell proliferation by targeted aquaporin-3 gene disruption. *Mol Cell Biol*. 2008;28:326-32.
- (168) Voss KE, Bollag RJ, Fussell N, By C, Sheehan DJ, Bollag WB. Abnormal aquaporin-3 protein expression in hyperproliferative skin disorders. *Arch Dermatol Res*. 2011;303:591-600.
- (169) Nejsum LN, Kwon TH, Jensen UB, Fumagalli O, Frøkiaer J, Krane CM, Menon AG, King LS, Agre PC, Nielsen S. Functional requirement of aquaporin-5 in plasma membranes of sweat glands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:511-6.
- (170) Kabashima K, Shimauchi T, Kobayashi M, et al. Aberrant aquaporin 5 expression in the sweat gland in aquagenic wrinkling of the palms. *J Am Acad Dermatol*. 2008;59:S28-32.
- (171) Mobasher A, Marples D. Expression of the AQP-1 water channel in normal human tissues: a semiquantitative study using tissue microarray technology. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004 ;286:C529-37.
- (172) Hara-Chikuma M, Sohara E, Rai T, Ikawa M, Okabe M, Sasaki S, Uchida S, Verkman AS. Progressive adipocyte hypertrophy in aquaporin-7-deficient mice: adipocyte glycerol permeability as a novel regulator of fat accumulation. *J Biol Chem*. 2005;280:15493-6.
- (173) Tausk FA, Nousari H: Stress and the skin. *Arch Dermatol* 2001;137:78–82.
- (174) Sugarman JL, Fluhr JW, Fowler AJ, Bruckner T, Diepgen TL, Williams ML: The objective severity assessment of atopic dermatitis score: An objective measure using permeability barrier function and stratum corneum hydration with computer-assisted estimates for extent of disease. *Arch Dermatol* 2003;139:1417–1422.
- (175) O’Sullivan RL, Lipper G, Lerner EA: The neuro-immuno-cutaneous-endocrine network: Relationship of mind and skin. *Arch Dermatol* 1998;134:1431–1435.
- (176) Everson CA. Clinical assessment of blood leukocytes, serum cytokines, and serum immunoglobulins as responses to sleep deprivation in laboratory rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;289:R1054–1063.
- (177) Zager A, Andersen ML, Lima MM, Reksidler AB, Machado RB, Tufik S. Modulation of sickness behavior by sleep: the role of neurochemical and

neuroinflammatory pathways in mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 2009;19:589–602.

⁽¹⁷⁸⁾ Choi EH, Brown BE, Crumrine D, Chang S, Man MQ, Elias PM, Feingold KR. Mechanisms by which psychologic stress alters cutaneous permeability barrier homeostasis and stratum corneum integrity. *J Invest Dermatol*. 2005;124:587-95.

⁽¹⁷⁹⁾ Gümüştékín K, Seven B, Karabulut N, Aktaş O, Gürsan N, Aslan S, Keleş M, Varoglu E, Dane S. Effects of sleep deprivation, nicotine, and selenium on wound healing in rats. *Int J Neurosci*. 2004;114:1433-42.

⁽¹⁸⁰⁾ Mostaghimi L, Obermeyer WH, Ballamudi B, Martinez-Gonzalez D, Benca RM. Effects of sleep deprivation on wound healing. *J Sleep Res*. 2005;14:219.

7. Artigo

Water Channel Proteins and Brain Cellular Damage under Intermittent Hypoxia model of Sleep Apnea

Diego Baronio,^{1,4} Denis Martinez,^{1,2,3,4} Cintia Zappe Fiori,^{2,4} Alicia Carissimi,^{1,4} Victorio Bambini Júnior,⁵ Luiz Felipe Forgiarini,⁶ Darlan Pase da Rosa,¹ Lenise Jihe Kim,⁴ Dennis Baroni Cruz,^{6,8} Marcelle Reesink Cerski⁷

¹Graduate Program in Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil

²Graduate Program in Cardiology, UFRGS

³Cardiology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), UFRGS

⁴LIPES – Laboratório Interdisciplinar de Pesquisa em Sono, HCPA, UFRGS

⁵Graduate Program in Biochemistry, UFRGS

⁶Graduate Program in Pulmonology, UFRGS

⁷Pathology Division, HCPA, UFRGS

⁸Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC), Brazil

ABSTRACT

Rationale: Fluid displacement may be implicated in sleep apnea pathogenesis and in the associated morphological and functional brain alterations.

Objective: To test the hypothesis that isocapnic intermittent hypoxia alters the expression of water channel proteins.

Methods: Fifty-two C57/bl mice were exposed during 35 days to 30-sec of progressive hypoxia to $F_{I}O_2$ $7\pm 1\%$, followed by 30 sec of normoxia during eight hours/day, or to sham intermittent hypoxia.

Measurements: Brain water content, Aquaporin-1, Aquaporin-3, Aquaporin-4, Aquaporin-9, and hypoxia inducible factor 1-alpha were measured. Staining with hematoxylin-eosin and immunohistochemistry were performed.

Results: Hypoxia inducible factor was higher in the frontal cortex of the hypoxia group than in the sham-hypoxia group, confirming effective exposure. The brain wet weight and brain water content were higher in the hypoxia group. Cerebellar Aquaporin-1 levels were lower in the hypoxia group. Aquaporin-3 levels in hippocampus and skin were similar in both groups. Aquaporin-4 expression in the frontal cortex was higher in the hypoxia group. Aquaporin-9 expression was greater in the cortex and striatum of the hypoxia group. Death rate of Purkinje cells in the hypoxia group was 88%. Stronger immunoreactivity to S100B was detected in the hypoxia group in areas of extensive gliosis.

Conclusions: Chronic intermittent hypoxia simulating sleep apnea alters the concentration of aquaporins. Water channel proteins are possibly implicated in the observed brain edema and cellular damage to brain structures. These findings are potentially relevant to the mechanisms of obstructive sleep apnea.

INTRODUCTION

Obstructive sleep apnea (OSA) leads to intermittent hypoxia (IH) (1). IH is a recognized cause of vascular disease and stroke (2-4). OSA causes morphological (5), biochemical (6), and functional brain alterations (7). Animal models using IH to simulate OSA are often employed to assess potential brain damage. For instance, 30 hours of IH causes the death of 90% of Purkinje cells (8).

Aquaporins are water channel proteins involved in the water transport across the cellular membrane (9). Aquaporin-1, Aquaporin-4 and Aquaporin-9 are involved in brain edema (10-12). Aquaporin-3 has been identified in several tissues, including the brain (13).

Aquaporin-1 is mainly expressed in the choroid plexus where it is involved with cerebrospinal fluid (CSF) production (14), although it was found in other locations, like the cerebellum (15). Aquaporin-3 is abundant in the skin, where it plays a role in hydration, regulation of keratinocytes activity, and in the metabolism of lipids (16, 17). Hypoxia and OSA may affect the skin physiology (18, 19). Brain ischemia increases Aquaporin-3 levels. The response of Aquaporin-3 in brain tissue to hypoxia and to isocápnica intermittent hypoxia (IIH) has been insufficiently explored. Aquaporin-4 is localized mainly in astrocytes and ependymal cells (20, 21). It is the most abundant aquaporin in the central nervous system (CNS) and an essential component of blood brain barrier (BBB) (22, 23). Aquaporin-9 is present in neurons and glial cells (24, 25). It has an isoform localized in the mitochondria of dopaminergic neurons and astrocytes (26).

The response of aquaporins in brain tissue to intermittent hypoxia and brain edema formation has been insufficiently explored. The literature on aquaporins and OSA is limited to a study of the excretion of Aquaporin-2 in the urine (27).

Considering the potential importance of water transport in the causation (28) and in the consequences of OSA, implications of aquaporins in OSA mechanisms deserve further investigation. The present study aims to test the hypothesis that the effects of IHH on brain cellular damage and water content involve water channel proteins. We studied Aquaporin-1, Aquaporin-3, Aquaporin-4, and Aquaporin-9 in relation to brain edema and damage to Purkinje cells and to neurons from dentate gyrus.

METHODS

Two-month-old male C57bl mice were exposed to IIH or to sham intermittent hypoxia (SIH) during 35 days. The animals were housed under temperatures ranging between 22.5 - 24.5°C and received *ad libitum* standard mice chow and water. The protocol was approved by the institutional Ethics Committee.

The IIH system was described in detail before (29). In brief, during five weeks, 7 days per week, 8 hours a day, from 9 AM to 5 PM, in the lights on period, the animals were placed in the system. A mixture with 92% nitrogen and 8% CO₂ was released in the hypoxia chamber, during 30 seconds, reducing the oxygen fraction to 7±1% and increasing the CO₂ fraction to 5±1%. After that, room air was insufflated in the chamber during 30 seconds. The exposure was equivalent to an apnea index of 60 per hour. The SIH group remained in an adjacent cage and underwent the same fan activity as the IIH group. No gas mixture entered the cage during the hypoxia cycle.

The animals were anesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) intraperitoneally. After deep anesthesia was confirmed, the brains were rapidly dissected. The cerebella, hippocampi, cortices, striata and skins samples of twenty-three mice (11 IIH and 12 SIH) were dissected for aquaporins analyses. Sixteen mice (8 IIH and 8 SIH) had the brains removed and fixed to be stained with hematoxylin-eosin and marked with antibodies against S100B and GFAP.

Twelve mice (6 IIH and 6 SIH) had the brains kept intact for water content determination. These brains were weighted while wet, placed in an

oven at 95°C during 48 hours and re-weighted after dry. Water content was calculated as $[(\text{wet weight} - \text{dry weight})/\text{wet weight}] \times 100$.

Tissues were homogenized as described before (30). Homogenates were used to determine hippocampal levels of Aquaporin-1 and Aquaporin-3, and skin levels of Aquaporin-3 by ELISA test (CUSABIO, Wuhan, China). Aquaporin-1 levels were also measured in a cerebellum homogenate. Western blotting was performed using Aquaporin-4, Aquaporin-9 and HIF-1a antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) to determine their levels. The method was described previously (25).

The brains were removed and placed overnight in 10% formalin at 4°C. Sagittal 10µm thick brain sections were cut and stained with HE. Immunohistochemical staining with antibodies specific for S100B (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and GFAP (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) were performed in the cerebella. The following pathological features were distinguished: cariolysis, gliosis, picnosis, and cariorrexis. Cells, in a total of ten sections per slide, were counted in the cerebellum and dentate gyrus to compute the percentage of damaged cells in relation to intact neurons.

Statistical analysis

The results in figures are expressed as mean and one standard error of mean. SPSS v16 was used for all statistical analyses (SPSS Chicago, IL, USA). To compare the differences between two means we used the Student's t-test for independent samples and between two proportions, the chi-square test. Results with probability of alpha error < 5% were considered significant.

RESULTS

Data on Aquaporin-1 and Aquaporin-3 are shown in Figure 1. Significant difference was observed in Aquaporin-1 levels in the cerebellum between IIH and SIH groups. The hippocampi and skin samples of both groups presented similar Aquaporin-3 levels.

Striata and cortices from IIH group presented higher levels of Aquaporin-4 and Aquaporin-9. HIF-1a was measured in the frontal cortex and hypoxia exposure was confirmed with higher levels IIH animals. (Figure 2)

Data about lesions in Purkinje cells and neurons from dentate gyrus are presented in Figures 3. Overall, the IIH group had the double rate of hippocampal neurons damage. In the IIH group, Purkinje cellular death was also superior when compared to the SIH group. In Figure 4 we see the lesions caused by IIH on neurons from dentate gyrus. Lesions such as cariorexix and picnosis are observed in the Purkinje cells from IIH group (Figure 5.A).

The staining with GFAP and S100B showed that IIH group displayed stronger immunoreactivity in the cerebellum, confirming the reactive gliosis and neuronal damage caused by IIH. The IIH group presented astrocytes with hypertrophic cell bodies (Figure 5.C). S100B staining in the cerebellum is compared between the two groups in Figures 5.E and 5.F, where we can see strong positivity in the Purkinje cells of IIH group.

The data on brain weight and water content are presented in Figure 6. IIH mice had higher wet weight and lower dry weight than the SIH mice. Consequently, the calculated brain water content was higher in IIH animals.

DISCUSSION

A model of severe OSA, with 60 cycles of hypoxia per hour to a nadir of 7%, eight hours a day, during 35 days, was utilized to investigate the role water-channel proteins on encephalic consequences of OSA. Neuronal damage and reactive gliosis were the main outcomes.

The role of the aquaporins in these outcomes can only be inferred since interventions that would allow studying mechanisms – such as aquaporin blocking or aquaporin knockout-mice – were not employed in this preliminary investigation. When the investigation was undertaken, the behavior of the channel proteins on IIH was unknown. For instance, the lack of response of Aquaporin-3 could not be anticipated. The blocking agents are relatively specific and could have helped understanding the aquaporin-hypoxia relationship. The present results will serve as a guideline for future research. Although there are some studies and hypotheses indicating that a disturbed sleep can affect the skin (31, 32), the Aquaporin-3 levels in IIH group and SIH group were practically the same.

The reduction in cerebellar Aquaporin-1 levels may result from an adaptive mechanism. Higher intracranial pressure seems to reduce Aquaporin-1 expression. In a case report of a patient with choroid plexus hyperplasia, leading to an exaggerated production of CSF, immunohistochemistry revealed a weaker reactivity of Aquaporin-1 when compared with normal choroid plexuses (33). Aquaporin-1 levels are reduced also in the choroid plexuses of postnatal hydrocephalic animals (34). The present findings contrast with studies that showed hypoxia increasing Aquaporin-1 levels (35).

Brains of rats after permanent ischemia show significantly higher Aquaporin-3 levels than controls (13). In the present study, the levels of Aquaporin-3 in the hippocampi are similar in the IIH and SIH groups. Because Aquaporin-3 is intensely expressed in the skin, we performed ELISA analysis of this protein in skin homogenates. The concentrations were 57 pg/ml in hypoxia and sham groups.

A higher level of Aquaporin-4 was detected in the striata and cortices of the IIH group. This may be related with increased brain water content in the same group. Exaggerated expression of Aquaporin-4 in transgenic mice was associated with brain edema formation (36). In models of cytotoxic brain edema, Aquaporin-4 knockout mice are resistant to edema formation by ischemic stroke and pneumococcal meningitis (37, 38).

Aquaporin-9 levels were superior in the striata and cortices from hypoxic animals. Strong positive correlations among the brain water content, the disruption of the blood-brain barrier and the enhanced expressions of Aquaporin-9 mRNA was found in an infectious rat brain edema model (12). Contradicting our findings, Aquaporin-9 was not found to be correlated with brain swelling after transient cerebral ischemia in mice (39).

IIH in the present study increased wet weight and brain water content. This is in agreement with the report that HIF-1a is involved in brain edema formation and blood brain barrier disruption in association with Aquaporin-4 (40). Closed head injury in rats leads to a significant increase in gene expression of HIF-1a, Aquaporin-4 and Aquaporin-9. When HIF-1a is pharmacologically inhibited, Aquaporins levels are reduced (41). We also found increased levels of HIF-1a following enhanced expression of Aquaporins.

One possibility suggested by our data is that brain edema may occur in OSA patients. This would be supported by reports of changes in brain imaging of OSA patients (42). To the best of our knowledge, no clear evidence of brain edema in OSA patients has been reported. The increase of 4% in brain water content here observed may be difficult to detect by usual imaging methods. Additionally, edema is rapidly reversible and would be necessary to study patients immediately after awakening from episodes of severe hypoxia to document edematous brain images.

One can speculate that water channel proteins may be involved in the rostral fluid displacement observed during recumbence. Most studies found a correlation between overnight fluid shift to the neck and OSA severity (28). This influence on OSA severity is controversial. A significant rostral fluid shift was observed in both OSA and non-OSA subjects, which was not associated with worsening of OSA (43). If IH increases the expression of Aquaporin-4 and Aquaporin-9 in tissues other than the brain, this could explain the progression of OSA, in a vicious cycle with more IH leading to more edema.

We confirmed previous results of a damaging effect of IH on cerebellar cells (44). Study in mice showed degeneration of 90% of the Purkinje cells similar to the present data (8). Patients with OSA display reduction of grey matter in the cerebellum (45) which may be involved in the already described motor dysfunction and cognitive impairment of these patients (46).

S100B and GFAP staining was performed in the cerebellum for it being the structure with higher damage rate. Increased immunoreactivity of GFAP is a sensitive indicator of reactive gliosis and neuronal injury (47, 48). Hypoxic animals presented extensive glial proliferation. Gozal and colleagues reported

glial activation, indicated by increased presence of GFAP in the cortex of rats exposed to intermittent hypoxia (49).

Purkinje cells of hypoxic animals presented increased immunoreactivity to S100B. Presence of S100B positive Purkinje cells in mice after yessotoxin administration was associated with cytoskeleton disassembly (50). In nanomolar concentrations S100B is related with neurite development and neuronal survival during development and after injury. In micromolar concentrations, S100B may lead to neuronal death (51). Overexpression of S100B also enhances brain damage after permanent focal ischemia, probably due proinflammatory events associated with accelerated glial activation (52).

We have reported increased serum S100B in patients with OSA (53) and in individuals with morbid obesity (54). Because the neuron-specific enolase (NSE) levels, indicator of neuronal death, were similar to controls in both groups, the high S100B was interpreted as indicative of successful neuron protection by the astrocytes. Vis-a-vis the present results, the high S100B levels may need to be reinterpreted. The high serum levels of S100B in OSA patients may indicate, alternatively, the presence of gliosis.

In conclusion, IIH can lead to brain edema, reduction of cerebellar Aquaporin-1 levels and higher levels of Aquaporin-4 and Aquaporin-9 in cortices and striata. IIH causes reactive gliosis and irreversible lesions in Purkinje and dentate gyrus neurons. The relevance of these findings needs to be explored in further detail.

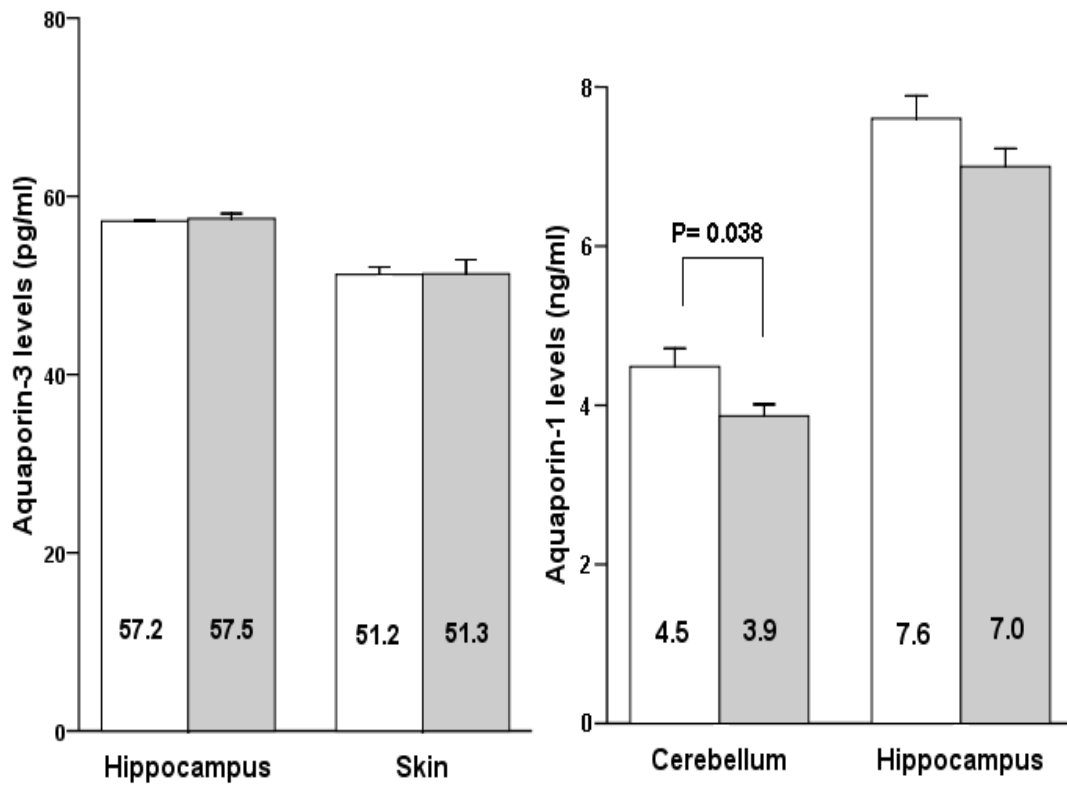


Figure 1. Aquaporin-3 and Aquaporin-1 levels measured by ELISA test. Aquaporin-3 presented similar levels in hippocampus and skin of SIH and IIH groups. Aquaporin-1 levels were significantly lower in the cerebella of IIH group. Aquaporin-1 levels in the hippocampus of both groups were not different statistically. Data are presented as means and \pm SE.

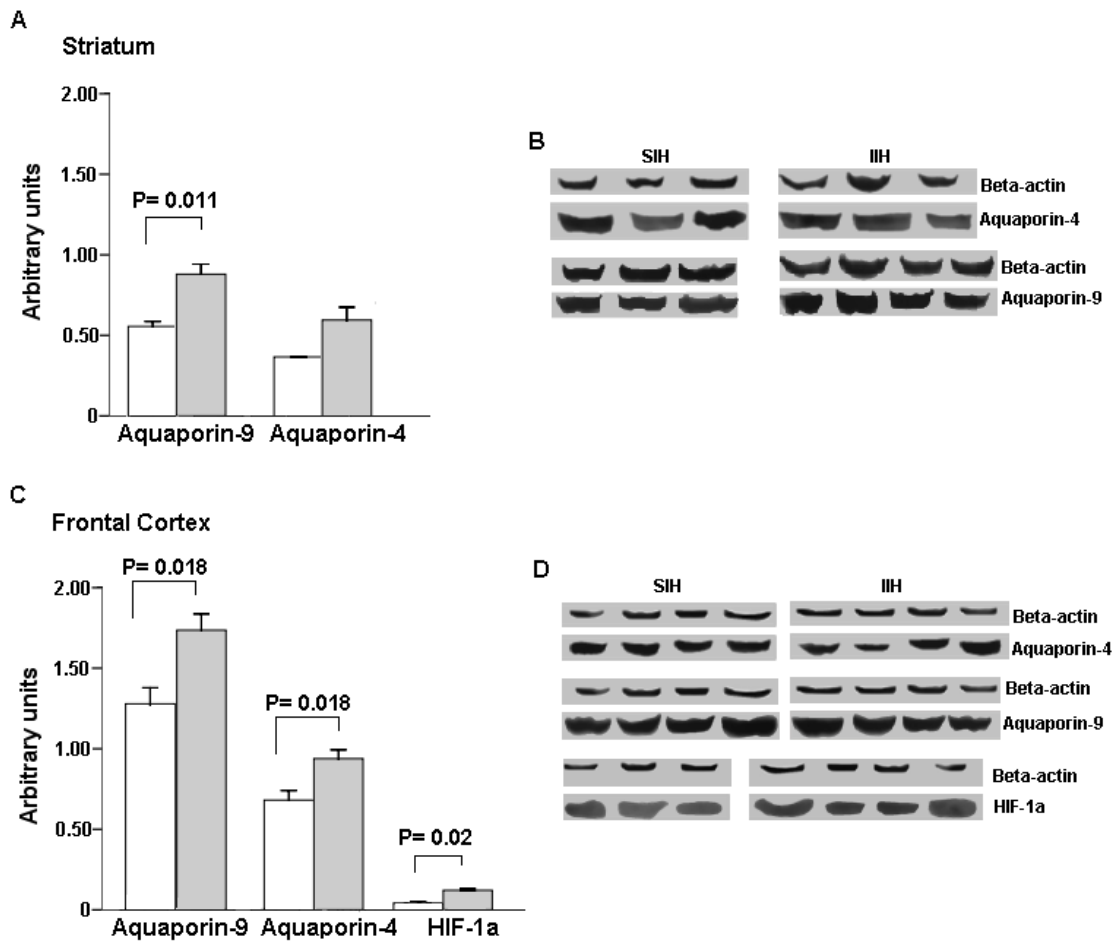


Figure 2. Expression of Aquaporin-4 and Aquaporin-9 in the frontal cortex and striatum of SIH and IIH animals. (A) Densitometry of Aquaporin-9 and Aquaporin-4 normalized to beta-actin in striatum of both groups. (B) Western blots for Aquaporin-9 and Aquaporin-4 normalized to beta-actin in frontal cortex of both groups. (C) Densitometry of Aquaporin-9, Aquaporin-4 and HIF-1a in the frontal cortex of SIH and IIH animals. (D) Western blots for Aquaporin-9, Aquaporin-4 and HIF-1a normalized to beta-actin in frontal cortex. Data are presented as means and \pm SE.

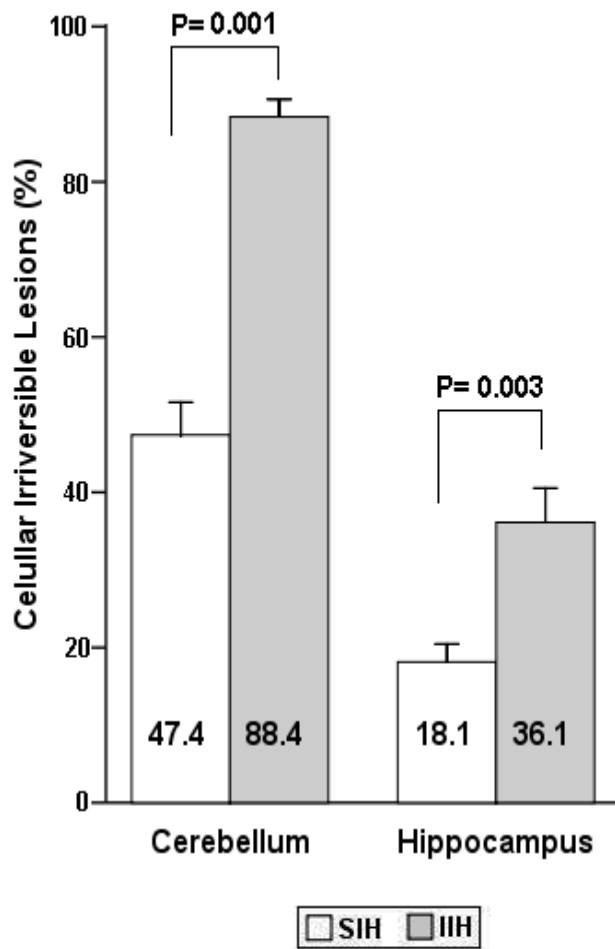


Figure 3. Percentage of damaged Purkinje cells and hippocampal neurons in response to IIH and SIH (number of damaged cells/number of damaged and normal cells $\times 100$). Cells were counted in a total of ten sections per slide, in the cerebellum and dentate gyrus. Data are presented as means and \pm SE.

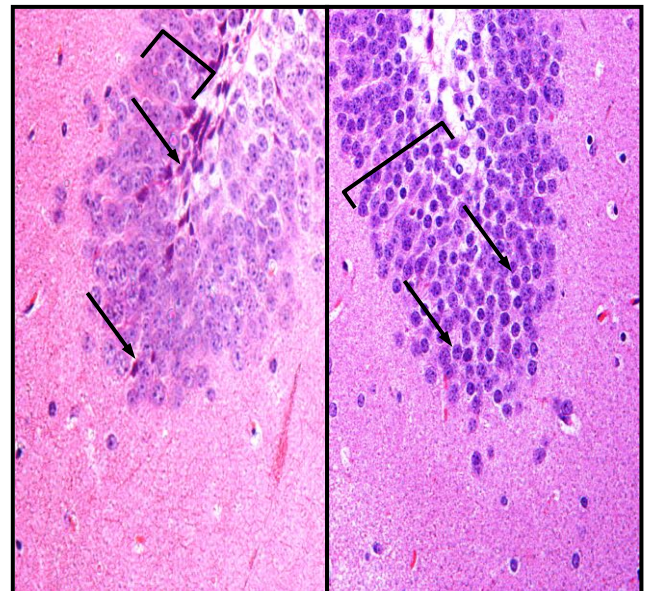


Figure 4. Morphological changes representing damage in neurons of dentate gyrus IIH exposure. (A) IIH promoted a reduction in number of neurons (bracket) when compared with SIH group. Arrows show damaged cells. (B) SIH neurons exhibited homogeneity in color and shape (arrows). A bigger layer of cells is present. (bracket).

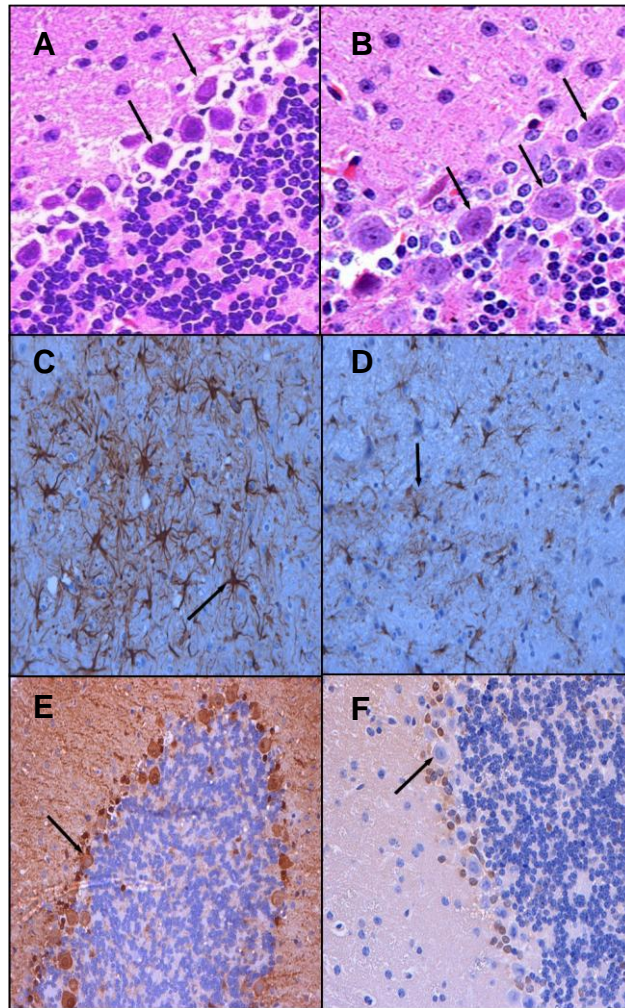


Figure 5. (A) IIH-associated damage to Purkinje cells. Picnosis and cariorexix were distinctive features of the cells (arrows). (B) Purkinje cells of SIH group presented normal color and shape (arrows). (C) GFAP immunostaining showing the astrocytic morphology in cerebellum after IIH exposure. Distinctive features of reactive gliosis in IIH exposed animals: increased astroglial cell area with increased cell body size and enlarged projections (arrow). (D) SIH group astrocytes (arrow). (E) S100B immunostaining showing the expression of the glial soluble factor S100B inside Purkinje cells (arrow). (F) Purkinje cells from the sham hypoxia group present weaker S100B immunostaining.

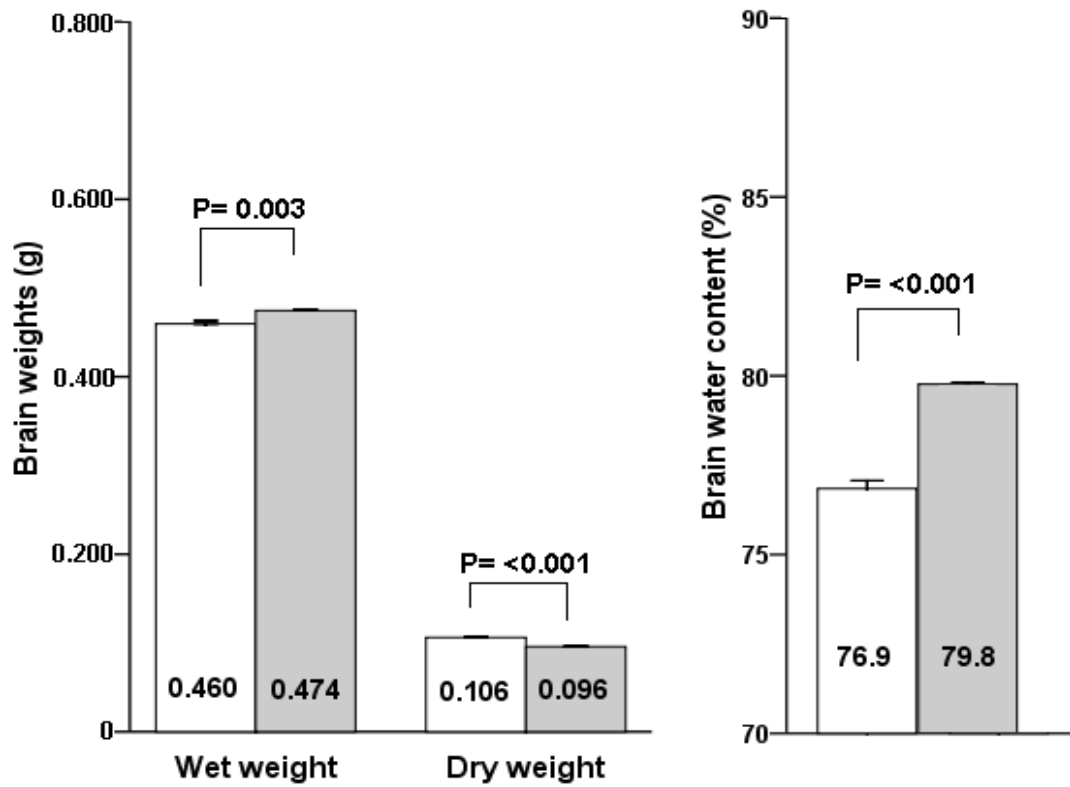


Figure 6. Brain weight and water content. IIH group had higher brain wet weight and lower brain dry weight. The brain water content was greater in the IIH group. Data are presented as means and \pm SE.

REFERENCES

- (1) Dempsey JA, Veasey SC, Morgan BJ, O'Donnell CP. Pathophysiology of sleep apnea. *Physiol Rev* 2010;90:47-112.
- (2) Somers VK, White DP, Amin R, Abraham WT, Costa F, Culebras A, Daniels S, Floras JS, Hunt CE, Olson LJ, Pickering TG, Russell R, Woo M, Young T. Sleep apnea and cardiovascular disease: an American Heart Association/American College of Cardiology Foundation Scientific Statement from the American Heart Association Council for High Blood Pressure Research Professional Education Committee, Council on Clinical Cardiology, Stroke Council, and Council on Cardiovascular Nursing. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52:686-717.
- (3) Kohler M, Stradling JR. Mechanisms of vascular damage in obstructive sleep apnea. *Nat Rev Cardiol* 2010;7:677-85.
- (4) Yaggi HK, Concato J, Kernan WN, Lichtman JH, Brass LM, Mohsenin V. Obstructive sleep apnea as a risk factor for stroke and death. *N Engl J Med* 2005;353:2034-41.
- (5) Canessa N, Castronovo V, Cappa SF, *et al*. Obstructive Sleep Apnea: Brain Structural Changes and Neurocognitive Function Before and After Treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:1419-1426
- (6) Braga CW, Martinez D, Wofchuk S, Portela LV, Souza DO. S100B and NSE serum levels in obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep Med* 2006;7:431-5.
- (7) Ayalon L, Peterson S. Functional central nervous system imaging in the investigation of obstructive sleep apnea. *Curr Opin Pulm Med* 2007;13:479-83.
- (8) Pae EK, Chien P, Harper RM. Intermittent hypoxia damages cerebellar cortex and deep nuclei. *Neurosci Lett* 2005;375:123-8.
- (9) Hachez C, Chaumont F. Aquaporins: a family of highly regulated multifunctional channels. *Adv Exp Med Biol* 2010;679:1-17.
- (10) Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin-4 and brain edema. *Pediatr Nephrol* 2007;22:778-84.
- (11) Tran ND, Kim S, Vincent HK, Rodriguez A, Hinton DR, Bullock MR, Young HF. Aquaporin-1 mediated cerebral edema following traumatic brain injury: effects of acidosis and corticosteroid administration. *J Neurosurg* 2010;112:1095-104.

- (12) Wang H, Jin R, Tian P, Zhuo Z. Enhanced expression of aquaporin-9 in rat brain edema induced by bacterial lipopolysaccharides. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2009 ;29:150-5.
- (13) Yang M, Gao F, Liu H, Yu WH, Sun SQ. Temporal changes in expression of aquaporin-3, -4, -5 and -8 in rat brains after permanent focal cerebral ischemia. *Brain Res* 2009;1290:121-32.
- (14) Filippidis AS, Kalani MY, ReKate HL. Hydrocephalus and aquaporins: lessons learned from the bench. *Childs Nerv Syst* 2011;27:27-33.
- (15) Wiegman MJ, Bullinger LV, Kohlmeyer MM, Hunter TC, Cipolla MJ. Regional expression of aquaporin 1, 4, and 9 in the brain during pregnancy. *Reprod Sci* 2008;15:506-16.
- (16) Hara-Chikuma M, Verkman AS. Aquaporin-3 facilitates epidermal cell migration and proliferation during wound healing. *J Mol Med* 2008;86:221-3.
- (17) Boury-Jamot M, Daraspe J, Bonté F, et al. Skin aquaporins: function in hydration, wound healing, and skin epidermis homeostasis. *Handb Exp Pharmacol* 2009;190:205-17.
- (18) Modarressi A, Pietramaggiore G, Godbout C, Vigato E, Pittet B, Hinz B. Hypoxia impairs skin myofibroblast differentiation and function. *J Invest Dermatol* 2010;130:2818-27.
- (19) Yim-Yeh S, Rahangdale S, Nguyen AT, et al. Obstructive sleep apnea and aging effects on macrovascular and microcirculatory function. *Sleep* 2010;33:1177-83.
- (20) Nagelhus EA, Veruki ML, Torp R, Haug FM, Laake JH, Nielsen S, Agre P, Ottersen OP. Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Muller cells and fibrous astrocytes. *J Neurosci* 1998;18:2506–2519.
- (21) Nielsen S, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, Bourque C, Agre P, Ottersen OP. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci* 1997;17:171–180.
- (22) Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP. The molecular basis of water transport in the brain. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4:991-1001.

- (23) Nicchia GP, Nico B, Camassa LMA, *et al.* The role of aquaporin-4 in the blood-brain barrier development and integrity: studies in animal and cell culture models. *Neuroscience* 2004;129:935-945.
- (24) Badaut J, Hirt L, Granziera C, Bogousslavsky J, Magistretti PJ, Regli L. Astrocyte-specific expression of aquaporin-9 in mouse brain is increased after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001;21:477–482.
- (25) Badaut J, Petit JM, Brunet JF, Magistretti PJ, Charriaut-Marlangue C, Regli L. Distribution of aquaporin 9 in the adult rat brain: preferential expression in catecholaminergic neurons and in glial cells. *Neuroscience* 2004;128:27–38.
- (26) Amiry-Moghaddam M, Lindland H, Zelenin S, *et al.* Brain mitochondria contain aquaporin water channels: evidence for the expression of a short AQP9 isoform in the inner mitochondrial membrane. *FASEB J* 2005;19:1459–1467
- (27) Gjørup PH, Sadauskiene L, Wessels J, Nyvad O, Strunge B, Pedersen EB. Increased nocturnal sodium excretion in obstructive sleep apnoea. Relation to nocturnal change in diastolic blood pressure. *Scand J Clin Lab Invest* 2008;68:11-21.
- (28) Redolfi S, Arnulf I, Pottier M, Bradley TD, Similowski T. Effects of venous compression of the legs on overnight rostral fluid shift and obstructive sleep apnea. *Respir Physiol Neurobiol* 2011;175:390-3.
- (29) Martinez D, Fiori CZ, Baronio D, *et al.* Brown adipose tissue: is it affected by intermittent hypoxia? *Lipids Health Dis* 2010;9:121.
- (30) Lee J, Chan SL, Mattson MP. Adverse effect of a presenilin-1 mutation in microglia results in enhanced nitric oxide and inflammatory cytokine responses to immune challenge in the brain. *Neuromolecular Med* 2002;2:29-45.
- (31) Choi EH, Brown BE, Crumrine D, Chang S, Man MQ, Elias PM, Feingold KR. Mechanisms by which psychologic stress alters cutaneous permeability barrier homeostasis and stratum corneum integrity. *J Invest Dermatol.* 2005;124:587-95.
- (32) Kahan V, Andersen ML, Tomimori J, Tufik S. Can poor sleep affect skin integrity? *Med Hypotheses* 2010;75:535-7.
- (33) Smith ZA, Moftakhar P, Malkasian D, Xiong Z, Vinters HV, Lazareff JA. Choroid plexus hyperplasia: surgical treatment and immunohistochemical results. Case report. *J Neurosurg* 2007;107:255-62.

- (34) Paul L, Madan M, Rammling M, Chigurupati S, Chan SL, Pattisapu JV. Expression of aquaporin1 and 4 in a congenital hydrocephalus rat model. *Neurosurgery* 2011;68:462-73.
- (35) Echevarría M, Muñoz-Cabello AM, Sánchez-Silva R, Toledo-Aral JJ, López-Barneo J. Development of cytosolic hypoxia and hypoxia-inducible factor stabilization are facilitated by aquaporin-1 expression. *J Biol Chem* 2007;282:30207-15.
- (36) Yang B, Zador Z, Verkman AS. Glial cell aquaporin-4 overexpression in transgenic mice accelerates cytotoxic brain swelling. *J Biol Chem* 2008;283:15280–15286.
- (37) Zador Z, Stiver S, Wang V, Manley GT. Role of aquaporin-4 in cerebral edema and stroke. *Handb Exp Pharmacol* 2000;190:159-70.
- (38) Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin-4 gene disruption in mice reduces brain swelling and mortality in pneumococcal meningitis. *J Biol Chem* 2005;280:13906–13912
- (39) Ribeiro Mde C, Hirt L, Bogousslavsky J, Regli L, Badaut J. Time course of aquaporin expression after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci Res* 2006;83:1231-40.
- (40) Higashida T, Kreipke CW, Rafols JA, *et al.* The role of hypoxia-inducible factor-1 α , aquaporin-4, and matrix metalloproteinase-9 in blood-brain barrier disruption and brain edema after traumatic brain injury. *J Neurosurg* 2011;114:92-101.
- (41) Ding JY, Kreipke CW, Speirs SL, Schafer P, Schafer S, Rafols JA. Hypoxia-inducible factor-1 α signaling in aquaporin upregulation after traumatic brain injury. *Neurosci Lett* 2009;453:68-72.
- (42) Torelli F, Moscufo N, Garreffa G, *et al.* Cognitive profile and brain morphological changes in obstructive sleep apnea. *Neuroimage* 2011;54:787-93.
- (43) Jafari B, Mohsenin V. Overnight Rostral Fluid Shift in Obstructive Sleep Apnea: Does it affect the severity of Sleep-disordered Breathing? *Chest* 2011;140:991-7
- (44) Aviles-Reyes RX, Angelo MF, Villarreal A, Rios H, Lazarowski A, Ramos AJ. Intermittent hypoxia during sleep induces reactive gliosis and limited

neuronal death in rats: implications for sleep apnea. *J Neurochem* 2010;112:854-69.

(45) Morrell MJ, Jackson ML, Twigg GL, *et al.* Changes in brain morphology in patients with obstructive sleep apnoea. *Thorax* 2010;65:908-14.

(46) Jackson ML, Howard ME, Barnes M. Cognition and daytime functioning in sleep-related breathing disorders. *Prog Brain Res* 2011;190:53-68.

(47) Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 2005;50:427-34.

(48) Condorelli DF, Nicoletti VG, Dell'Albani P, *et al.* GFAP beta mRNA expression in the normal rat brain and after neuronal injury. *Neurochem Res* 1999;24:709-14.

(49) Gozal D, Daniel JM, Dohanich GP. Behavioral and anatomical correlates of chronic episodic hypoxia during sleep in the rat. *J Neurosci* 2001;21:2442-50.

(50) Franchini A, Marchesini E, Poletti R, Ottaviani E. Acute toxic effect of the algal yessotoxin on Purkinje cells from the cerebellum of Swiss CD1 mice. *Toxicol* 2004;43:347-52.

(51) Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J BiochemCell Biol* 2001;33:637-68.

(52) Mori T, Tan J, Arendash GW, Koyama N, Nojima Y, Town T. Overexpression of human S100B exacerbates brain damage and periinfarct gliosis after permanent focal ischemia. *Stroke* 2008;39:2114-21.

(53) Braga CW, Martinez D, Wofchuk S, Portela LV, Souza DO. S100B and NSE serum levels in obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep Med* 2006;7:431-5.

(54) da Silva LG, Mottin CC, Souza DO, Portela LV, Braga CW, Vargas CB, Padoin AV, Martinez D, Dias RD. Serum S100B but not NSE levels are increased in morbidly obese individuals affected by obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *Obes Surg* 2008;18:993-9.

8. Considerações Gerais

De acordo com nossos objetivos, os achados sinalizam que:

- Observou-se diminuição dos níveis de aquaporina 1 no cerebelo de camundongos exposto por 35 dias à hipóxia intermitente simulando apneia do sono. Até então a influencia da apneia do sono na expressão de aquaporinas no encéfalo não havia sido estudada.
- Os níveis de aquaporina 4 e aquaporina 9 apresentaram variações no estriado e córtex frontal de camundongos expostos por 35 dias à hipóxia intermitente, sendo que os níveis de aquaporina 9 eram maiores nas duas estruturas, enquanto os níveis de aquaporina 4 foram maiores apenas no córtex frontal. Como era de se esperar, o HIF-1a apresentou-se elevado nos animais do grupo hipóxia.
- A hipóxia intermitente causou danos celulares irreversíveis em neurônios do hipocampo e do cerebelo, algo já demonstrado anteriormente. Além das lesões neuronais, a gliose reativa foi vista no cerebelo.
- Os animais do grupo hipóxia apresentaram maior conteúdo de água no cérebro. As alterações cerebrais são características da apneia do sono, porém pouca informação havia disponível sobre a formação de edema cerebral.
- Embora existam relatos de que o estresse causado pela privação de sono possa afetar a pele, os níveis de aquaporina 3, proteína relacionada com a hidratação e integridade da pele não diferiram nos dois grupos.

Os achados acima precisam ser confirmados em pesquisas futuras, mas aumentam o conhecimento sobre a relação entre a apneia obstrutiva do sono, hipóxia, aquaporinas e alterações encefálicas. As alterações das aquaporinas após exposição à hipóxia intermitente indicam possível papel nas consequências da apneia do sono, que devem continuar sendo exploradas.