

Resumos de dissertações de mestrado e teses de doutorado apresentadas na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP de abril a junho de 2010

Biologia Celular e Molecular

ATIVÇÃO DE CASPASE-1 E FORMAÇÃO DE POROS EM MACRÓFAGOS INFECTADOS POR *Legionella pneumophila*

Tatiana Nunes Silveira

Orientador: Prof. Dr. Dario Simões Zamboni

Tese de Doutorado apresentada em 15/04/2010

Legionella pneumophila, o agente etiológico da doença dos Legionários, é conhecida por desencadear a formação de poro em membranas de macrófagos derivados de medula óssea (BMMs) por mecanismos dependentes do sistema de secreção do tipo IV conhecido como Dot/Icm. Neste trabalho, foram utilizados vários mutantes de *L. pneumophila* em combinação com camundongos nocautes para investigar os fatores bacterianos e do hospedeiro envolvidos na formação de poro em BMMs. Observamos que apesar da atividade do Dot/Icm, a formação de poro não ocorre em BMMs deficientes para caspase-1 e Nlrc4. A formação de poro foi temporalmente associada com a secreção de IL-1 β e precedeu a lise celular e a piroptose. A formação de poro foi dependente do Dot/Icm, mas independente de várias proteínas efetoras, da multiplicação bacteriana e da síntese de novo de proteínas. A flagelina, a qual é conhecida em ativar o inflamassoma de Nlrc4, foi necessária para a formação de poro; a bactéria mutante Δ flaA falhou em induzir a permeabilização celular. Consequentemente, a transfecção da flagelina purificada foi suficiente para desencadear a formação de poro independente da infecção. Utilizando 11 diferentes espécies de Legionella, nós observamos alta formação de poro em resposta à *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. gratiana*, *L. jordanis* e *L. rubrilucens*, e essa resposta estava correlacionada com a expressão de flagelina por essas espécies. Além disso, verificamos que as proteínas Asc e Caspase-11 apresentam fenótipo intermediário na formação de poro, sugerindo que outras vias podem estar envolvidas no processo. Observamos também que a formação de poro desencadeada por *L. pneumophila* difere daquela induzida pelo ATP. Em conjunto, nossos resultados sugerem que a formação de poro não é uma resposta específica de *L. pneumophila* nem o resultado de dano da membrana induzido pelo Dot/Icm. Ao invés disso, a formação de poro é uma resposta do hospedeiro altamente coordenada, dependente dos componentes do inflamassoma Nlrc4 e caspase-1 e é desencadeada em resposta a bactérias que expressam o sistema de secreção do tipo IV e flagelina.

AVLIAÇÃO DO EFEITO DE INIBIDORES DE MASTÓCITOS E DO FATOR DE NECROSE TUMORAL NA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

Daniela Dover de Araujo

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Ramos Costa

Tese de Doutorado apresentada em 20/04/2010

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença fatal causada pela ausência da distrofina e caracterizada por degeneração progressiva da musculatura esquelética. O camundongo *mdx*, modelo da DMD, apresenta susceptibilidade à lesão das miofibras, elevação da creatina quinase (CK) sérica e ciclos de degeneração e regeneração muscular, fenótipo intensificado por atividade física. A lesão muscular é exacerbada por um processo inflamatório crônico, do qual participam citocinas e células do sistema imunológico. Dentre estas células, destacam-se os mastócitos que se acumulam nos sítios de lesão, liberando mediadores como o TNF- α , que também é liberado pelos macrófagos, neutrófilos e miofibras lesadas. Este trabalho teve por objetivos: i) estudar o efeito da atividade física compulsória na degeneração muscular de camundongos *mdx*, a fim de otimizar as condições experimentais para o teste de drogas; ii) identificar marcadores de lesão muscular; e iii)

avaliar o potencial efeito anti-inflamatório das drogas cetotifeno e olopatadina (anti-histamínicos e inibidores da desgranulação de mastócitos), e LMP-420 (inibidor da transcrição do TNF- α) na progressão da DMD. Para tanto, camundongos *mdx* de 4 semanas de vida foram submetidos a atividade física e ao tratamento com as drogas por 5 semanas. Os resultados indicaram que a galectina-1 pode ser considerada um marcador de degeneração muscular. De acordo com os critérios analisados em conjunto (dosagem de CK e parâmetros quantitativos histológicos dos músculos gastrocnêmio, GA, diafragma, DIA), verificou-se que as três drogas resultaram em uma diminuição significativa da degeneração muscular. Camundongos *mdx* tratados com cetotifeno, olopatadina e LMP-420 apresentaram redução significativa tanto nos níveis séricos de CK (37%, 23% e 30% respectivamente), quanto na área relativa ocupada por miofibras apresentando lesão no sarcolema (ceto: 95% no GA e 98% no DIA; olo: 73% somente no GA; e LMP-420: 98,6% no GA e 83,6% no DIA). Estes dados indicaram que as três drogas contribuíram para manter a integridade da musculatura esquelética de camundongos *mdx*, com destaque para a LMP-420.

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE FRAÇÃO LIGANTE DE QUITINA DA PREPARAÇÃO PARACOCINA DE *Paracoccidioides brasiliensis*

Ana Claudia Paiva Alegre

Orientador: Prof. Dr. Ebert Seixas Hanna

Dissertação de Mestrado apresentada em 23/04/2010

Paracoccidioides brasiliensis é o agente causador da micose granulomatosa crônica mais prevalente na América do Sul, com alta incidência no Brasil. O fracionamento do extrato bruto de *P. brasiliensis*, chamado de preparação paracoccina, foi isolado por afinidades a *N*-acetilglicosamina e quitina. A preparação paracoccina possui componente(s) que contribui(em) para a adesão do fungo a matriz extracelular, e induz macrófagos a produzirem TNF- α e altas concentrações de NO. A partir da tecnologia IgY, descrita neste trabalho, tornou-se possível a produção de grandes quantidades de anticorpos policlonais contra a preparação paracoccina (PCN-prep), que viabilizaram os ensaios de rastreamento da biblioteca de cDNA de leveduras de *P. brasiliensis*. Alguns genes identificados continham sequência de tradução de proteínas já descritas para o isolado *Pb18*, como o gene PADG_02130.1, correspondente a uma ciclodrolase. Um dado importante foi a aplicação de técnicas de proteômica para identificar componentes da preparação paracoccina, que destacou o gene que codifica uma proteína hipotética de *P. brasiliensis*, anotado como PADG_03347. A proteína resultante desse gene apresenta sequência polipeptídica com alta homologia a proteínas compostas por domínios plurais distintos, sendo um ligante de quitina e outro com atividade quitinolítica. O maior *éxon* do gene PADG_03347 foi clonado em sistema bacteriano para a expressão de molécula recombinante, que corresponde a mais de 80% da sequência polipeptídica predita para a molécula nativa. O fragmento recombinante foi reconhecido pelos anticorpos IgY anti-PCN-prep, reforçando a idéia de que a proteína expressa por PADG_03347 deve estar presente na PCN-prep. Adicionalmente, anticorpos presentes no soro de pacientes com paracoccidioidomicose, que reagiram fortemente com diversas frações em PCN-prep, reagiram também com a fração recombinante. Esse fragmento recombinante foi caracterizado por possuir certa atividade de *N*-acetil- β -D-glicosaminidase, menor quando na comparação com o material purificado em coluna de quitina. Por outro lado, a atividade lectínica parece preservada na molécula recombinante, e essa atividade pode estar relacionada com a capacidade de induzir as produções de NO e TNF- α por macrófagos peritoneais, confirmadas nesse trabalho. Assim, os estudos de caracterização da molécula recombinante trouxeram informações importantes que devem guiar estudos futuros mais abrangentes com essa molécula.

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E CELULAR DO HOMÓLOGO DE LPIN1 EM DROSOPHILA MELANOGASTER

Rafaela Martins Maia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luisa Paçó-Larson

Tese de Doutorado apresentada em 05/05/2010

As lipinas definem uma nova família de fosfatases de ácido fosfatídico dependente de magnésio (PAP1), enzimas que catalizam a defosforilação de PA produzindo diacilglicerol (DAG), um importante intermediário no metabolismo de lipídio e na sinalização celular. Enquanto um único gene de lipina é detectado em organismos menos complexos, em mamíferos existem três parálogos (*Lpin1*, *Lpin-2* e *Lpin3*) que são diferencialmente expressos entre os tecidos. Em *Drosophila* existe um único ortólogo de *Lpin1*, anotado como CG8709. Neste trabalho contribuimos para a caracterização da estrutura e expressão deste *locus*, denominado por nós de *DmLpin*, e que expressa pelo menos três isoformas, *DmLpinA*, *B* e *C*. O transcrito de *DmLpinC* foi aqui isolado e codifica uma proteína de 962 aminoácidos que corresponde à isoforma *B* deletada em 74 aminoácidos na porção amino terminal. Apesar de conter apenas 32 resíduos do domínio NLIP, a Gly⁸⁴

necessária para a atividade PAP1 da lipina-1 é conservada na DmLpinC. Além disso, assim como as isoformas A e B, DmLpinC possui o domínio CLIP, que inclui o *motif*DXDXT característico das enzimas PAP1, e o *motif*LXXIL necessário para a atividade de co-ativador transcricional das lipinas 1 e 2 de mamíferos. Os estudos dos níveis dos transcritos das isoformas de *DmLpin* indicaram padrões de expressão distintos no desenvolvimento e entre tecidos. DmLpinA e B são expressos em maiores quantidades no embrião e em adultos, e DmLpinC é expresso a partir do terceiro estágio, e em pupas e adultos machos. Nos tecidos larvais, DmLpinA é o mais abundante em RNA extraído do intestino/túbulo de Malpighi, DmLpinB é predominantemente expresso em tecido nervoso e DmLpinC é detectado exclusivamente em testículos. Utilizando anticorpo que reconhece as três isoformas proteicas de *DmLpin* observamos por microscopia confocal que as lipinas de *Drosophila* apresentam padrões de localização subcelular peculiares nos diferentes tecidos. No corpo gorduroso o sinal da lipina é disperso no citoplasma e núcleo, mas apresenta-se concentrado na região perinuclear. Também no cordão nervoso ventral a marcação é restrita ao corpo celular de neurônios já que nos nervos segmentares a marcação de lipina é detectada na glia, mas não no feixe axonal. Nas glândulas anelares a marcação de DmLpin é difusa pelo citoplasma e é detectada no núcleo, onde se apresenta concentrada em uma região que aparenta ser o nucléolo. No intestino, assim como no aparelho reprodutor masculino, as lipinas são detectadas exclusivamente no músculo longitudinal do intestino médio e na camada muscular do testículo, apresentando padrão de distribuição sarcomérico. No ovário a marcação é difusa no citoplasma das células da câmara ovariana e notadamente concentrada nos *ring canals* que conectam as células nutridoras entre si e com o ócito. Estes padrões específicos de localização subcelular sugerem funções novas para as lipinas, possíveis de serem testadas experimentalmente. Com o objetivo de estabelecer ferramentas para estudos funcionais caracterizamos as linhagens transgênicas *36006GD* e *36007GD*, construídas para a expressão de RNA dupla-fita do CG8709 (*DmLpin*), quanto a capacidade de promover *knockdown* regulado das lipinas. Análise por *western blot* mostrou que as quantidades relativas de lipina estavam significativamente diminuídas em tecido onde o dsRNA de CG8709 foi expresso validando o uso das linhagens *36006GD* e *36007GD* para ensaios funcionais. Finalmente, ensaios preliminares sugerem que a superexpressão de *DmLpin* dirigida para o corpo gorduroso resulta no aumento de gotículas de lipídios pequenas nas células deste tecido, sugerindo que no corpo gorduroso as lipinas possam estar envolvidas na mobilização de lipídios de estocagem para a produção de energia.

O ORTÓLOGO DE A2BP1/FOX-1 EM *Drosophila melanogaster*: IMUNOLocalização NO SISTEMA VISUAL DURANTE O DESENVOLVIMENTO E ANÁLISES DE UMA FERRAMENTA POTENCIAL PARA ESTUDOS FUNCIONAIS *in vivo*

Mariana Santos de Queiroz

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luisa Paçó-Larson

Dissertação de Mestrado apresentada em 13/05/2010

A2BP1/FOX-1 pertence a uma nova família de proteínas ligantes de RNA conservadas evolutivamente. Em *Drosophila melanogaster* o ortólogo de FOX-1 é anotado como GC32062 e codifica cinco isoformas geradas por *splicing* alternativo, de acordo com análises *in silico* baseadas num cDNA completo e em ESTs. Com o objetivo de contribuir para o entendimento da função celular de GC32062, aqui denominado de dFox-1, analisamos por microscopia confocal o padrão de imunolocalização desta proteína no sistema visual de *D. melanogaster* durante o desenvolvimento. Nos discos imaginais de olho, a marcação foi localizada predominante na porção posterior ao sulco morfogenético, região de determinação, proliferação e diferenciação celular. As retinas pupais apresentaram um padrão de marcação temporal dinâmico e específico de tipo celular. A nível sub-celular, dFox-1 mostrou-se concentrada em focos citoplasmáticos sensíveis à tratamento com RNase e inibidores da síntese proteica (cicloheximida e puomicina), de modo similar ao demonstrado para proteínas constituintes de corpos de processamento de RNA (*P-bodies*). Adicionalmente, verificamos que ~55% dos focos positivos para dFox-1 colocalizaram-se com partículas contendo a RNA helicase Me31B, confirmando sua localização em *P-bodies*, partículas associadas com processos de triagem/degradação/estocagem de mRNAs. Juntos estes dados sugerem que dFox-1 participe do desenvolvimento do olho de *D. melanogaster*, atuando em processos com impacto no controle da tradução. Na tentativa de estabelecer uma ferramenta para estudos funcionais *in vivo* de dFox-1, analisamos a prole do cruzamento de linhagens transgênicas, construídas de modo a expressarem um RNA dupla-fita do CG32062 sob o comando de UAS (*34046/GD* e *34047/GD*), com animais carregando o transgene *gmr-Gal4*, que direciona a expressão dependente de UAS para as células precursoras do olho. Nossos resultados demonstraram que tanto os animais *gmr-Gal4; 34046/GD* como os *gmr-Gal4;34047/GD* apresentaram vários defeitos na formação do olho. No entanto, análises por qPCR e *western blot* indicaram que os níveis de dFox-1 nos discos imaginais de olho de pupas jovens *gmr-Gal4;34046/GD* ou *gmr-Gal4;34047/GD* não estavam significativamente alterados em relação ao controle, sugerindo que os fenótipos observados não são decorrentes de interferência na expressão de *dFox-1*.

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE NOVOS GENES COM MARCANTE EXPRESSÃO DIFERENCIAL NA PROGRESSÃO DO MELANOMA DETECTADA POR MICROARRANJO DE cDNA ORESTES

Kamila Chagas Peronni

Orientadora: Profa. Dra. Enilza Maria Espreafico
Tese de Doutorado apresentada em 14/05/2010

No intuito de encontrarmos novos genes envolvidos na progressão tumoral do melanoma, em estudo prévio, confeccionamos um microarranjo de cDNA ORESTES representando 1207 genes (a maioria sem caracterização funcional), o qual foi empregado no estudo da expressão comparativa entre duas linhagens celulares pareadas de melanoma, com diferenças fenotípicas marcantes, sendo uma derivada de tumor primário em fase de progressão vertical (WM278) e a outra de metástase (WM1617). A análise apontou 5 genes superexpressos e 75 subexpressos na linhagem metastática, das quais selecionamos um grupo para uma análise mais aprofundada por RT-PCR em tempo real e para caracterização funcional. CD63 e LRPAP1 mostraram-se superexpressos, 2 e 3 vezes, respectivamente, na linhagem metastática em relação a linhagem em fase de progressão vertical. No entanto, em comparação aos melanócitos, CD63 mostrou-se com expressão reduzida nas linhagens de melanoma de ambos os estágios, enquanto LRPAP1 mostrou-se 3 vezes mais expresso na linhagem metastática em relação aos melanócitos. Dentre os genes subexpressos na linhagem metastática CYR61, TMEPAI, BUB3, TMEM106C e HMG2, observamos níveis de mRNA reduzidos de 300, 120, 7, 6 e 4 vezes, respectivamente, em WM1617 vs WM278. Em um painel de amostras de nevo e melanoma (incluindo tumores primários e metástase), os genes TMEM106C, BUB3, CYR61 e TMEPAI apresentaram níveis de expressão altamente variável, mas superior em tumores primários. Uma vez que estes genes possuem ilhas CPG em seus promotores, analisamos a influência epigenética na repressão dos genes em estudo. Observamos um efeito ativador da droga inibidora de metilação (5-aza-2'-deoxycytidine) sobre a expressão dos genes CYR61 (8 vezes) e TMEPAI (14 vezes). Análise da localização celular das proteínas em fusão com EGFP em células transfectadas revelou que, durante a intérfase, as proteínas EGFP-HMG2 e EGFP BUB3 localizam-se no núcleo, CYR61-EGFP co-localiza com o marcador do aparelho de golgi e núcleo, e TMEM106C-EGFP co-localiza com o marcador do retículo endoplasmático. A superexpressão de TMEM106C, BUB3 e CYR61 na linhagem de melanoma metastática WM1617 causou diminuição da viabilidade celular, enquanto HMG2 não apresentou nenhum efeito. Utilizando um vetor lentiviral e obtendo alta eficiência de transdução observamos que BUB3 causa redução na viabilidade celular na linhagem de melanoma metastática WM1617, mas não causa qualquer alteração na viabilidade de WM278 e melanócitos. Nossos dados experimentais nos motivam a ampliar a caracterização destes genes como marcadores de prognóstico clínico e como ferramentas moleculares para terapias do melanoma.

INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPRESSÃO ECTÓPICA DE *SPLICED LEADER* SOBRE A SÍNTESE E DEGRADAÇÃO PROTÉICA GLOBAL EM *Leishmania major*

Tiago Rodrigues Ferreira

Orientadora: Profa. Dra. Angela Kaysel Cruz
Dissertação de Mestrado apresentada em 18/05/2010

A expressão gênica em *Leishmania spp.* é peculiar face aos demais eucariotos. A transcrição de seu genoma é policistrônica e gera pré-mRNAs que sofrem *trans-splicing* pela adição de um pequeno RNA nuclear de 39 nucleotídeos, o *spliced leader* (SL), à sequência 5' não-traduzida de cada mRNA maduro a ser gerado. Foi demonstrado anteriormente por Cruz e colaboradores que a expressão ectópica de um arranjo com 100 cópias do gene de SL RNA resulta na atenuação de virulência de *L. major* e *L. braziliensis* em modelo murino. Uma análise proteômica comparativa entre o transfectante de SL e a linhagem controle revelou a expressão diferencial de genes relacionados a proteólise e metabolismo energético. Os resultados obtidos até então resultaram na hipótese de que o acréscimo de SL disponível no mutante acarreta um aumento na geração de mRNAs maduros, e consequente aumento na síntese protéica global. Porém, o parasito seria capaz de manter a homeostase celular e de controlar, ainda que parcialmente, os níveis de proteínas por meio de vias proteolíticas. No trabalho aqui descrito foi analisada a relevância dos potenciais mecanismos proteolíticos utilizados pelo transfectante de SL para controlar o estresse molecular induzido artificialmente. O estudo baseou-se essencialmente em comparações experimentais entre os parasitos controle e os mutantes de SL. Foi evidenciado que o transfectante apresenta um incremento na síntese protéica por experimentos de incorporação de aminoácidos marcados e análise do perfil polissômico. A atividade proteolítica global mostrou-se elevada, assim como a atividade específica mediada por cisteínopeptidases, mas não por metalopeptidases, como quantificado por meio de ensaios *in vitro*. Foi demonstrada uma intensa marcação de

proteínas pelo via ubiquitina-proteassoma, no transfectante de SL. Além das abordagens bioquímicas, foi realizada uma análise de perfil de expressão diferencial por hibridação em microarranjos de oligonucleotídeos. Tal metodologia revelou 68 genes diferencialmente expressos entre os transfectantes, envolvendo funções moleculares relacionadas a tradução, proteólise, ligação a proteínas e ligação a ácidos nucleicos. Dentre esses genes, 15 foram avaliados por PCR em Tempo Real resultando na validação da expressão diferencial de 13 transcritos. Os dados encontrados reforçam o conceito de que a atenuação de virulência observada em *Leishmania* é, de fato, consequência de um conjunto complexo de mudanças em diversos processos celulares, ao contrário de alterações pontuais. A análise da modulação diferencial de vias celulares no transfectante pode direcionar novos estudos sobre expressão gênica e virulência nesses parasitos.

CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DOS MASTÓCITOS NO PROCESSO DE OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES | B ESTUDO *in vitro* DA INFLUÊNCIA DE NANOTOPOGRAFIA DE SUPERFÍCIES DE TITÂNIO

William Marcatti Amarú Maximiano

Orientadora: Profa. Dra. Constance Oliver

Dissertação de Mestrado apresentada em 27/05/2010

O desenvolvimento de superfícies de biomateriais nanoestruturadas visa estimular a atividade celular e consequentemente promover a resposta tecidual que ocorre na interface tecido-implante. Diversos eventos celulares e extracelulares estão envolvidos no início do processo de osseointegração dos implantes de titânio. Sendo assim, o estudo da caracterização de diferentes tipos celulares em resposta à nanotopografia de superfícies de titânio é importante para o desenvolvimento racional de implantes dentários e ortopédicos. Os mastócitos são células multifuncionais do tecido conjuntivo que produzem uma gama de mediadores envolvidos nos processos de hipersensibilidade, de defesa contra parasitas e de reparo dos tecidos. O objetivo deste estudo, portanto, foi investigar e caracterizar a influência da nanomodificação de superfície por tratamento químico com H_2SO_4/H_2O_2 em discos de titânio comercialmente puro na fisiologia de mastócitos. Os resultados mostram que a nanotopografia de superfícies de titânio não alterou a adesão inicial de mastócitos, porém promoveu a formação de placas de adesão e o espalhamento destas células, o que foi acompanhado pela reorganização do citoesqueleto de actina e de microtúbulos. Os dados mostram ainda que a nanotopografia de superfícies de titânio estimulou a migração e a proliferação celular, mas não alterou a liberação de mediadores por estas células. Além disso, os resultados mostram também que a nanotopografia de superfícies de titânio comprometeu a adesão, a proliferação e o espalhamento de fibroblastos. Esses achados sugerem que a nanotopografia de superfícies de titânio influencia seletivamente o comportamento celular *in vitro*, o que indica que este tipo de superfície pode modular a resposta tecidual na interface tecido-implante, representando uma estratégia vantajosa na produção de superfícies que estimulam o processo de reparo que ocorre ao redor dos implantes de titânio.

CARACTERIZAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO SUBCELULAR E TECIDUAL DA PROTEÍNA KIAA0090 E ESTUDOS DE SEU ENVOLVIMENTO EM CÂNCER E NA RESPOSTA A ESTRESSES

Roberto Augusto Silva Molina

Orientadora: Profa. Dra. Enilza Maria Espreafico

Dissertação de Mestrado apresentada em 07/06/2010

O gene humano KIAA0090 mapeia uma região cromossômica (1p36.13) com frequentes aberrações em cânceres humanos e é superexpresso em muitos tipos de tumores. É um gene altamente complexo cujas sequências de cDNA oriundas de bases de dados públicas apóiam a existência de mais de 20 transcritos alternativos. Sua RefSeq prediz a codificação de uma proteína altamente conservada com 993aa, cujo ortólogo em *S. cerevisiae* (ECM1) foi proposto recentemente atuar no envelhecimento de proteínas transmembrana no retículo endoplasmático (RE). O objetivo deste trabalho foi adquirir conhecimento sobre a localização e função da proteína KIAA0090, em células e tecidos normais e tumorais, bem como em células expostas a estresse. Geramos anticorpos policlonais (anti-K₂) contra a metade C-terminal da proteína e comparamos seu padrão ao tratamento obtido com o anticorpo (anti-K₁), previamente gerado contra a metade N-terminal. A proteína endógena foi localizada primariamente no Golgi e na mitocôndria, dependendo se o anticorpo utilizado foi contra a região N- ou C-terminal, respectivamente. Observamos também, embora menos notável, uma marcação sobreposta com a rede do RE e na margem celular, e variáveis graus de marcação dentro do núcleo e associada a pequenas partículas citoplasmáticas. A análise imunohistoquímica forneceu evidências que a KIAA0090 é ubiquamente expressa. O anti-K₂

marcou estruturas semelhantes a Golgi em todo tipo celular, predominando assim naquelas com Golgi mais visíveis, como células secretórias. Observamos para a maioria dos tecidos uma marcação leve a moderada para o anti-K₁, mas uma forte marcação foi encontrada em grupos restritos de células, como as células reticulares do timo, epitélio ductal das glândulas da língua e na lâmina basal do epitélio escamoso na zona de transição esôfago-gástrica. Em cortes histológicos de melanoma primário, observamos uma forte marcação para o anti-K₁, principalmente em vasos e em células invasoras na margem do tumor, enquanto o anti-K₂ mostrou um padrão sugestivo de infiltrado inflamatório e/ou células mesenquimais. Em tecidos de câncer de mama, vimos uma forte marcação nas células de carcinoma ductal em comparação ao epitélio ductal normal para o anti-K₂, ao passo que o anti-K₁ marcou fortemente vasos e células basais no epitélio de revestimento glandular, tanto no tecido normal como no tumoral. Utilizando uma matriz com amostras teciduais de câncer de mama obtidas de 96 pacientes, observamos uma marcação forte a moderada para o anti-K1 em 84% dos casos, enquanto 16% dos casos não apresentaram marcação. Notamos que os casos positivos para o anti-K1 estavam 100, 85 e 71% entre os casos de grade 1, 2 e 3, respectivamente, sugerindo uma tendência de perda da KIAA0090 associada à progressão do câncer de mama. Foi interessante notar que a brefeldina A e MG132 alteraram os níveis de RNAm da KIAA0090 e levaram à redistribuição da proteína endógena. Outros tratamentos de estresse, incluindo tunicamicina, complexo de rutênio doador de óxido nítrico e etoposídeo, também alteraram o padrão de distribuição da proteína. Este estudo fornece evidências preliminares que corroboram os resultados obtidos de estudos de expressão gênica em larga escala, fortalecendo os indícios de que a KIAA0090 desenvolve um papel na homeostase celular e está envolvida no câncer.

O GENE KIAA0090 É ATIVADO EM LESÃO PRÉ-NEOPLÁSICA E SEU SILENCIAMENTO POR SIRNA CAUSA MORTE CELULAR EM LINHAGEM DE MELANOMA

Rodrigo Ribeiro da Silva

Orientadora: Profa. Dra. Enilza Maria Espreafico

Dissertação de Mestrado apresentada em 11/06/2010

O gene KIAA0090, encontrado em todos os genomas eucariotos, está localizado em uma região cromossômica (1p36.13) com alta frequência de aberrações em tumores humanos. Além disso, os perfis de expressão disponíveis em bancos de dados públicos sugerem expressão alterada deste gene em muitos tumores e em resposta a diferentes tratamentos. Os objetivos deste trabalho foram investigar a possível ocorrência de múltiplos transcritos do gene KIAA0090 em linhagens celulares de melanoma humano; avaliar o padrão de expressão do gene em diferentes linhagens celulares e amostras de tumores, por RT-PCR tempo-real; e analisar o efeito do knockdown deste gene sobre a viabilidade de células de melanoma. O transcrito que observamos estar expresso em linhagem de células de melanoma parece corresponder à RefSeq completa. Observamos aumento da expressão do gene KIAA0090 em todas as linhagens celulares de melanoma humano em comparação com melanócitos. Curiosamente, entretanto, observou-se expressão significativamente maior em amostras de nevos (média = 11,02) em relação a melanoma primário (média = 2,87) ou metastático (média = 2,72) ($p < 0,01$). Não houve diferença significativa entre melanoma primário e metastático. O tratamento de células de melanoma, com um inibidor da metilação do DNA (5-Aza-2'-desoxicidina) e/ou desacetilação de histonas (tricostatina A) levou a um aumento da expressão KIAA0090, sugerindo que eventos epigenéticos possam estar envolvidos na modulação da expressão do gene KIAA0090. Não houve diferenças significativas nos níveis de expressão do mRNA KIAA0090 entre substância branca e glioblastoma, embora tenhamos observado uma discreta redução na taxa de sobrevivência associada com maiores níveis de mRNA KIAA0090 em glioblastomas, em estudo envolvendo amostras de 28 pacientes. Interessante que esta observação é compatível com dados de estudos de expressão gênica em larga escala onde se constata uma correlação direta entre superexpressão de KIAA0090 e menor probabilidade de sobrevivência em pacientes com glioblastoma (dados de 216 pacientes analisados - <https://cma.nci.nih.gov/cma-tcga/>). Em 31 amostras de pacientes com leucemia linfóide aguda não conseguimos encontrar qualquer relação entre a expressão do gene KIAA0090 e idade do paciente, sexo, contagem de leucócitos, risco, imunofenótipo e resposta clínica do paciente. Knockdown do gene KIAA0090 induziu morte celular em linhagem de melanoma metastático, e esta parece ser uma morte celular por apoptose, já que as células inviáveis são positivas para Anexina V. Os dados obtidos, assim como os dados depositados em bancos de dados, confirmam alteração na expressão do gene KIAA0090 durante progressão tumoral. Lesões pré-neoplásicas como nevos já apresentam alteração na expressão do gene em estudo, comparável com o que ocorre para oncogenes como BRAF. Assim como para outras moléculas envolvidas nas vias UPR e ERAD, knockdown do gene induz morte celular do tipo apoptótica. Portanto o gene KIAA0090 parece ser muito importante em ajudar a manter a capacidade tumorigênica das células em ambientes não favoráveis.

Bioquímica

PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA CALICREÍNAS-CININAS NA PROGRESSÃO DE MELANOMA

Patrícia Dillenburg Pilla

Orientador: Prof. Dr. Claudio Miguel Costa Neto

Tese de Doutorado apresentada em 28/04/2010

A incidência de casos de melanoma tem aumentado significativamente nos últimos anos e esse aumento tem sido correlacionado a uma maior exposição da população à radiação ultravioleta. O contexto de aumento de incidência e ainda baixa eficácia terapêutica levaram a grandes esforços na busca de novos alvos para terapias mais efetivas. Embora classicamente relacionados com regulação da pressão arterial sistêmica, os sistemas renina-angiotensina e calicreínas-cininas vêm sendo cada vez mais estudados com relação à atuação local, tendo importante contribuição em patologias como epilepsias, obesidade e inflamação. Com relação ao câncer, alguns trabalhos relatam a diminuição de tamanho da massa tumoral, diminuição de angiogênese e redução de casos de metástase após tratamento com inibidores da ECA (enzima conversora de angiotensina; cininase II), bloqueadores do receptor AT_1 de angiotensina e do receptor B2 de cininas. Com relação ao receptor B1 existem poucos estudos, e estes estão concentrados principalmente em tumores de próstata e de mama. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi investigar a participação do sistema calicreínas-cininas, com ênfase no receptor B1, em diferentes etapas da progressão tumoral de melanoma. Para isto, utilizamos a linhagem de melanoma murino Tm5, a qual constatamos expressar constitutivamente o RNA mensageiro deste receptor, bem como da enzima carboxipeptidase M (uma das enzimas responsáveis pela formação dos agonistas deste receptor); e não expressar o RNA mensageiro do receptor B2 de cininas e nem dos receptores AT_1 e AT_2 do sistema renina-angiotensina. A funcionalidade do receptor foi avaliada por ensaios de sinalização celular, tais como mobilização de cálcio intracelular e fosforilação de ERK1/2. Nos ensaios *in vivo*, constatamos que o receptor B1 é expresso 4,5 vezes mais em estágios avançados do que em fases iniciais do tumor; e interessantemente o pré-tratamento de células Tm5 com o agonista do receptor B1 antes do implante levou a uma queda de mais de 50% na incidência do aparecimento de tumores. No grupo de animais que receberam as células pré-tratadas com o agonista observamos que 60% destes animais mantiveram-se livres de tumor por 150 dias após inoculação das células tumorais, enquanto que 100% dos animais que receberam as células não estimuladas morreram até 40 dias após a inoculação. Na busca pelos mecanismos que poderiam explicar tais fenômenos, realizamos ensaios *in vitro* de motilidade celular, que mostraram uma diminuição de 50% na habilidade das células tumorais em migrar após estímulo com o agonista do receptor B1. Desta forma, nossos dados sugerem que, ao contrário do receptor B2, o receptor B1 de cininas possui um papel protetor frente a progressão de melanomas.

Clínica Cirúrgica

EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM TUMORES HIPOFISÁRIOS NÃO-SECRETORES

Beatriz Maria de Carvalho Paixão

Orientador: Prof. Dr. Hélio Rubens Machado

Tese de Doutorado apresentada em 19/04/2010

Introdução: Muitos dos mecanismos envolvidos na tumorigênese hipofisária ainda não estão elucidados. MicroRNAs (miRNAs) são moléculas que possivelmente contribuem para o desenvolvimento e progressão tumoral. A técnica de análise em série da expressão gênica (SAGE) permite uma análise em larga escala da expressão gênica. **Objetivo:** Gerar a primeira biblioteca de cDNA para tumor hipofisário não secretor (THNS); comparar o padrão de expressão gênica diferencial entre amostras de tecido hipofisário tumoral e normal; validar por PCR em tempo real (qPCR) a expressão de alguns genes potencialmente envolvidos na tumorigênese; analisar o padrão de expressão de um painel de miRNAs; validar possíveis correlações entre miRNAs e seus genes alvo, associar o padrão de expressão gênica com tamanho tumoral, controle clínico após cirurgia e imunohistoquímica nos THNS. **Materiais e Métodos:** Para confecção das bibliotecas de cDNA três amostras de hipófises normais e três de tumor hipofisário não-secretor foram utilizadas. Os genes diferencialmente expressos foram validados por qPCR (Applied Biosystems) em 29 amostras de THNS e em 15 amostras de hipófises normais. A quantificação relativa do padrão de expressão dos genes e miRNAs foi calculada pelos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. **Resultados:** Após as análises de bioinformática, selecionamos 111 genes hipoexpressos e 145 genes hiperexpressos na

biblioteca de THNS comparada à biblioteca de hipófise normal. Observamos que não houve expressão do gene DLK1; hipoxpressão do gene EGR1 (-16.6-fold; $p < 0.0001$) e a hiperexpressão dos genes GSTP1 (4.8-fold; $p = 0.0009$), NF κ BIA (3.1-fold; $p = 0.0004$), e APP (2.8-fold; $p = 0.01$) em THNS comparado às amostras controles normais. Observamos também a não-expressão de miR-21 e miR-145 e a hipoxpressão de miR-141 (-33.3-fold; $p = 0.002$), miR-16 (-14.3-fold; $p = 0.76$), let-7a (-11.1-fold; $p < 0.0001$), miR133a (-7.1-fold; $p = 0.001$), miR-150 (-6.6-fold; $p = 0.0008$), e miR-143 (-4.0-fold; $p < 0.0001$) em THNS comparado com as amostras de hipófises normais. Houve associação entre maior tamanho tumoral e imunohistoquímica positiva para os hormônios produzidos pela hipófise anterior ($p = 0.02$). Houve uma tendência de associação entre imunopositiva e ausência de controle clínico após cirurgia transesfenoidal ($p = 0.07$). Não encontramos associação entre a expressão dos genes estudados CD74, EGR1, DLK1, NNAT, NF κ BIA, e APP e o controle clínico e achados na imunohistoquímica. Por outro lado, maiores expressões de GSTP1 foram associadas com imunopositividade para hormônios da hipófise anterior ($p = 0.05$). Não encontramos associações entre a expressão dos miRNAs let-7a, miR-21, miR-133a, miR-141 e miR-145 e tamanho tumoral ou imunohistoquímica. No entanto, a menor expressão de miR-16 se mostrou associada a tumores de tamanhos maiores ($p = 0.01$). Pacientes que apresentaram baixa expressão de miR-143 também apresentaram imunopositividade para os hormônios produzidos pela hipófise anterior ($p = 0.03$). Observamos uma correlação entre a expressão do gene APP e de miR-16 nas amostras de hipófises normais ($r = -0.68$; $p = 0.004$) e nos THNS ($r = -0.58$; $p = 0.001$). **Conclusões:** O presente estudo demonstra, pela primeira vez, a confecção de uma biblioteca de SAGE para THNS. Confirmamos a associação entre miR-16/APP e miR150/GSTP1, sugerindo um papel destes miRNAs na modulação da expressão destes genes. Em nossos estudos, confirmamos que a menor expressão de DLK1 e MEG3 e a hiperexpressão de GSTP1 são importantes eventos na patogênese dos THNSs. Nossos estudos também mostram que a hiperexpressão de GSTP1 e a hipoxpressão de miR-143 parecem estar envolvidas na patogênese de um subgrupo de THNS que apresentam imunopositividade para os hormônios produzidos pela hipófise anterior, os quais se apresentam com diâmetros maiores e pior prognóstico após cirurgia transesfenoidal. Nosso trabalho também sugere que miR-16 possa estar envolvido no controle do tamanho tumoral. Assim, nosso estudo contribuiu para elucidar a patogênese molecular em THNS, um grupo heterogêneo de tumores hipofisários, auxiliando na compreensão dos processos de citodiferenciação destes tumores e possibilitando, no futuro, uma melhor caracterização da classificação de seus diferentes subtipos.

VALIAÇÃO E MENSURAÇÃO DA DOR LOMBAR PÓS-TÉCNICA ANALGÉSICA VIA PERIDURAL: UM ENFOQUE EXPERIMENTAL

Orlando Carlos Gomes Colhado

Orientadora: Profa. Dra. Fatima Aparecida Emm Faleiros Sousa

Tese de Doutorado apresentada em 20/04/2010

A dor lombar é uma das maiores causas de morbidade, por ser incapacitante e somente superada pelas cefaléias. Aproximadamente, 80% das pessoas em algum estágio de suas vidas sofrerão de dor lombar. Os objetivos deste estudo foram validar a mensuração da dor lombar baixa, utilizando o método estimativa de categorias, estimativa de magnitudes e emparelhamento intermodal com a modalidade de resposta comprimento de linhas, identificar a escala de maior eficácia e descrever a dor lombar pós-técnica anestésica peridural. Para atingir os objetivos, foram realizados quatro experimentos, cada um com diferentes testes psicofísicos. Experimento 1- Tarefa de determinação de limiares de dor; Experimento 2- Comparação entre os métodos psicofísicos escalares de estimativa de categorias e estimativa de magnitudes; Experimento 3- Validação psicofísica da escala de razão de percepção da dor lombar por meio do método de emparelhamento intermodal; Experimento 4- Descrição da dor lombar. Os estudos foram realizados em sessenta participantes que apresentavam dor lombar baixa secundária à hérnia de disco lombar, nos níveis L3-L4(4), L3-L4 e L4-L5(6), L4-L5(52), L4-L5 e L5-S1(12), L5-S1(46), divididos em dois grupos. O primeiro grupo recebeu solução de anestésico local mais corticóide e o segundo grupo recebeu solução salina 0.9% mais corticóide pela via bloqueio peridural lombar. A dor foi avaliada antes do bloqueio e 30 minutos, 6, 12 e 24 horas após o bloqueio. As escalas de magnitude e comprimento de linhas foram avaliadas em todos os tempos e não apresentaram diferença significativa, apenas entre os tempos de 12 e 24 horas após o primeiro bloqueio. O grupo que recebeu solução de anestésico local mais corticóide apresentou um alívio mais rápido (30 minutos) que o grupo que recebeu solução salina 0.9% mais corticóide, devido à ação da levobupivacaina, promovendo bloqueio sensitivo dos nervos banhados pela solução. Os cálculos para as funções de expoente para todas as avaliações variaram de 0,87 a 1,00, sendo que os expoentes obtidos nos diferentes momentos foram próximos do predito por Stevens (1,00). Segundo Stevens (1975), a comprovação da equivalência entre o expoente obtido e o predito, envolvendo diretamente sensações entre duas modalidades, constitui-se em forte evidência da validade por meio do método de emparelhamento intermodal. Concluiu-se que o manejo da dor no grupo do soro fisiológico apresentou dor média inferior no momento da alta e escala psicofísica é válida. Foi realizado o teste de correlação de Kendall que mostrou correlação significativa entre as escalas de magnitude e comprimento de linhas. Evidenciou-se que a escala psicofísica é válida e consistente.

OPERAÇÃO DE BLALOCK-TAUSSIG: EXPERIÊNCIA DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DE RIBEIRÃO PRETO EM UM PERÍODO DE 14 ANOS

Viviane Assunção Guimarães

Orientador: Prof. Dr. Walter Villela de Andrade Vicente

Dissertação de Mestrado apresentada em 18/05/2010

Nas crianças com cardiopatia congênita e hipofluxo pulmonar, a anastomose-sistêmico-pulmonar representa importante opção paliativa. O objetivo foi analisar os resultados das anastomoses sistêmico-pulmonar realizadas no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto de 1995 a 2008 para assegurar tempo de acompanhamento pós-operatório de pelo menos 1 ano e identificar os fatores de risco de mortalidade hospitalar. O estudo foi retrospectivo e incluíram dados clínicos e cirúrgicos no pré, intra e pós-operatório. Foram excluídos os casos em que a operação de Blalock-Taussig foi complemento a uma reconstrução cirúrgica de grande porte, como a operação de Norwood e a de Damus Stansel Kaye, naqueles submetidos à derivação sistêmico-pulmonar prévia em outros serviços e operações feitas em caráter de salvamento por insucesso de cirurgia corretiva da cardiopatia. Foram estudados 139 pacientes submetidos a 169 operações. Houve predominância do acesso por toracotomia (grupo T) (63,9%) em relação à esternotomia (grupo E). Entretanto, a proporção de neonatos foi maior no grupo E (n=35; 79,6%) em relação ao grupo T (n=44; 56,4%) (p=0,01). Na comparação dos neonatos quanto ao tipo de acesso cirúrgico, houve maior número de cirurgias realizadas em caráter de urgência (p<0,01) e maior tempo de acompanhamento pós-operatório (p<0,01) no grupo T. Por outro lado, tempo cirúrgico (p<0,01), fechamento cirúrgico do canal arterial (PCA) (p<0,01), uso de circulação extracorpórea (CEC) (p<0,01), transfusão intra-operatória (p<0,01) e pós-operatória (p<0,01), uso de drogas vasoativas (p<0,01), terapia diurética (p<0,01) e tempo de ventilação mecânica (VM) pós-operatório (PO) (p=0,05) foram estatisticamente superiores no grupo E. Em relação ao insucesso cirúrgico, ou seja, necessidade de reoperação e/ou óbito previamente ao reparo completo, houve maior proporção de óbito hospitalar nos neonatos do grupo esternotomia (p<0,01). A taxa de cardiopatias do AP com SIV íntegro foi estatisticamente maior no segundo período (2002-2008) (p=0,01), além de maior proporção de *shunts* centrais (p<0,01), de fechamento cirúrgico do PCA (p<0,01), de operações no período neonatal (p=0,02), com uso de CEC (p<0,01) e de heparina pós-operatória (p<0,01), por outro lado, menor diâmetro do enxerto (p<0,01) foi utilizado nesse período em relação ao primeiro período (1995-2001). As causas mais prevalentes de óbito hospitalar foram infecciosa no primeiro período, e choque cardiogênico no segundo. Não houve alteração nos índices de insucesso cirúrgico entre os períodos. Idade neonatal (p=0,03), baixo peso na operação (p=0,04), acesso por esternotomia (p=0,0004), uso de CEC (p=0,001) e tempo de VM prolongado (p=0,006) foram identificados como fatores de risco isolados de mortalidade hospitalar. Apenas tempo de ventilação mecânica prolongado (p=0,048) mostrou-se fator de risco independente desse desfecho. Por outro lado, acesso por esternotomia (p=0,006) e falha precoce da anastomose (p=0,001) revelaram-se fatores preditivos de tempo de VM prolongado. Conclui-se que o tempo de VM PO prolongado é fator de risco independente de mortalidade hospitalar após a realização da derivação sistêmico-pulmonar e, o acesso cirúrgico por esternotomia mediana e a falha precoce da anastomose são fatores preditivos de VM invasiva prolongada no pós-operatório.

ANÁLISE CLÍNICA E URODINÂMICA DE PACIENTES COM INCONTINÊNCIA URINÁRIA DE ESFORÇO E INCONTINÊNCIA URINÁRIA DE URGÊNCIA

Ana Paula Barbério Bogdan

Orientador: Prof. Dr. Haylton Jorge Suaid

Tese de Doutorado apresentada em 21/05/2010

Introdução: A Incontinência Urinária é duas vezes mais frequente na população feminina, devendo ser demonstrada objetivamente e, para tanto, necessita de avaliação diagnóstica criteriosa e apresenta como consequência problema social e higiênico. Para manter a continência e necessário que haja integridade e interação entre diversos sistemas e estruturas que incluem bexiga, uretra e assoalho pélvico. **Objetivos:** Correlacionar dados clínicos e exames complementares comparando pacientes com incontinência urinária de esforço (IUE) e hiperatividade detrusora (HD). **Pacientes e Métodos:** Foram estudadas 40 pacientes do sexo feminino com idade variando entre 25 e 65 anos com queixas de incontinência urinária. Foi aplicado o questionário V8 e realizados exame físico, teste da ponte líquida, estudo urodinâmico (fluxo, atividade detrusora, pressão abdominal de perda urinária e pressão de micção), perfil de pressão uretral (pressão uretral, comprimento uretral), determinação da área do perfil e da resistência uretral. As pacientes foram separadas em dois grupos de acordo com o diagnóstico urodinâmico. O Grupo I foi formado por pacientes com IUE e grupo II por pacientes com

Hiperatividade Detrusora. Os dados foram tabelados e comparados. Foram excluídas do estudo as pacientes que tiveram diagnóstico urodinâmico de incontinência mista. **Resultados:** Incontinência de esforço foi diagnosticada em 25 pacientes (62,5%), onde 5 (12,5%) apresentaram hiperatividade detrusora associada e foram excluídas do estudo. Em outras 15 pacientes (37,5%) foi diagnosticada Hiperatividade Detrusora pura. O V8 foi significativamente superior no grupo II ($p = 0,008$). Pacientes do Grupo I tiveram percentual de positividade no Teste da ponte Líquida significativamente superior ao grupo II ($p = 0,001$). O fluxo máximo, a pressão uretral, área do perfil, resistência uretral, comprimento uretral e pressão de micção não tiveram diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos. Houve correlação estatisticamente significativa entre a pressão uretral e a área do perfil, onde quanto maior a pressão uretral, maior a área do perfil ($p = 0,006$) e o ponto máximo encontrado para pressão uretral foi de 70 cm H₂O, com 66,7% de sensibilidade e 65% de especificidade para o grupo II. Percentualmente encontrou-se diferença entre os grupos quando as variáveis foram correlacionadas. No grupo I, 76% das pacientes com Ponte Líquida positiva tiveram pressões abdominais de perda urinária, menores que 90 cm H₂O e 84% tiveram pressões abdominais de perda urinária, menores que 60 cm H₂O. No grupo II, 20% das pacientes apresentaram Ponte Líquida positiva (20%) e 66% tiveram pressão uretral acima de 36 cm H₂O. No grupo I, 70% das pacientes tiveram área maior que 100 mm² e dessas 66% tinham pressões de perda maior que 90 cm H₂O. No grupo I, 50% das pacientes que tinham pressão de micção máxima maior que 20 cm H₂O, apresentavam área do perfil maior que 100 mm², diferente do grupo II, onde 73% das pacientes que tinham pressão de micção maior que 20, apresentaram área maior que 100 mm². No grupo II 80% das pacientes apresentaram pressão de micção acima de 20 cm H₂O. **Conclusões:** O questionário V8 mostrou-se fidedigno na avaliação de pacientes do grupo II. O Teste da Ponte Líquida pode ser usado como método diagnóstico diferencial entre esses dois grupos e mostrou-se um teste preditivo para estimativa das pressões de perda urinária. Pacientes do grupo II apresentaram maiores valores de pressão de micção e uretral máxima do que o grupo I. As medidas de resistência uretral, pressão uretral máxima e área do perfil de pressão uretral, isoladamente, não auxiliam no diagnóstico dos tipos de incontinência urinária.

UTILIZAÇÃO DE UMA MEMBRANA DERIVADA DO LÁTEX NATURAL (*hevea brasiliensis*) NA REGENERAÇÃO DO NERVO CIÁTICO DE RATO

Marcos Vinicius Muniz Ganga

Orientadora: Profa. Dra. Luiza da Silva Lopes

Dissertação de Mestrado apresentada em 21/05/2010

Lesões de nervos periféricos são frequentes na prática médica e, embora a utilização de auto-enxertos continue sendo o padrão "ouro" para o reparo das lesões com distanciamento entre os cotos proximal e distal, técnicas alternativas têm sido propostas para evitar complicações ao sítio doador e acelerar o processo de regeneração nervosa. Uma membrana produzida a partir de um látex natural, foi utilizada com sucesso tanto experimentalmente (arterioplastias, neoformação de esôfago, reconstituição da conjuntiva ocular), quanto clinicamente (miringoplastias, tratamento de úlceras cutâneas), demonstrando potencial angiogênico e indutor de neoformação tecidual. O propósito deste trabalho foi de avaliar a capacidade da membrana de látex natural em acelerar e melhorar a qualidade da regeneração do nervo ciático seccionados de ratos. Foram utilizados 40 ratos machos de linhagem Wistar, com peso de 250g (± 20 g), clinicamente sadios distribuídos em 4 grupos experimentais igual número cada um ($n=10$), anestesiados e operados com auto-enxerto, e com interposição de um tubo confeccionado com uma membrana derivada do látex natural (*Hevea brasiliensis*) de acordo com o grupo experimental 4 e 8 semanas submetidos a Avaliação da função neurológica, avaliação da marcha por impressão das pegadas e avaliação por eletroneuromiografia. Ao final dos tempos experimentais (4 ou 8 semanas), os animais de cada grupo foram mortos, por uma dose excessiva de anestésico e dessangramento. Ao final dos tempos experimentais, os animais de cada grupo foram mortos, por uma dose excessiva de anestésico e dessangramento o nervo ciático, o tubo e os músculos tibial anterior e gastrocnêmio foram retirados, processados para inclusão orientada em parafina, secção transversal de suas fibras e observação sob microscopia de luz para análise morfológica e morfométrica, avaliando-se o padrão de regeneração nervosa induzido pela membrana de látex, quando comparado com o enxerto do nervo autólogo. Para comprovar que os ratos operados com Látex se recuperam mais rapidamente que os operados com nervo autólogo foi utilizado o Teste T. Com base no teste t* a um nível de significância estipulado de 98% (Erro I = 2%), e nas tabelas com as médias das amostras dos 2 grupos comprovou-se que os ratos operados com Látex possuíam melhor taxa de recuperação que os operados com o nervo autólogo, dadas maiores taxas de utilização da pata operada. Na morfologia o grupo em que se utilizou a membrana também obteve maior regeneração do nervo ciático operado. Concluiu-se que a capacidade de regeneração da membrana de látex é maior que o auto-enxerto do nervo ciático de ratos.

APLICABILIDADE DA ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER NA AVALIAÇÃO DE ENXERTOS HEPÁTICOS HUMANOS

Rodrigo Borges dos Reis

Orientador: Prof. Dr. Orlando de Castro e Silva Junior

Tese de Doutorado apresentada em 21/05/2010

A avaliação da função do enxerto nas várias etapas do transplante é importante, particularmente no momento da captação, quando a decisão deve ser feita rapidamente na utilização do órgão. A espectroscopia de autofluorescência é uma técnica não invasiva utilizada para monitorar as condições metabólicas do fígado durante a realização do transplante, na avaliação inicial no doador, na isquemia fria durante o transporte e na reperfusão e reoxigenação no receptor. Resultados são apresentados em 31 transplantes desde a captação até o implante. O espectro de fluorescência induzida pelo laser na excitação de 532 nm foi investigada antes da perfusão fria (autofluorescência), após a perfusão fria, no *back-table*, e após 5 minutos e 1 hora após a reperfusão. Os resultados mostraram que a análise da fluorescência apresentou sensibilidade para detectar as mudanças no órgão durante todo o procedimento do transplante. A espectroscopia de autofluorescência tem o potencial de fornecer informações sobre o enxerto em tempo real, sendo uma técnica não invasiva para monitorar a função do enxerto hepático. Essas informações podem ser potencialmente valiosas nas decisões cirúrgicas e no sucesso do transplante.

ESTUDO ULTRAESTRUTURAL DO NERVO ÓPTICO DE RATOS *Wistar* APÓS RECUPERAÇÃO DA ANEMIA FERROPRIVA

Aline Santos de Maman

Orientador: Prof. Dr. João José Lachat

Tese de Doutorado apresentada em 25/05/2010

Deficiência em ferro é um grande problema nutricional, atingindo em torno de 3 a 5 bilhões de pessoas. Um suprimento adequado de ferro é essencial para o desenvolvimento normal do sistema nervoso central, pois o ferro é um componente importante para a síntese de mielina. No presente trabalho, os efeitos da reposição do ferro, administrada desde o desmame no 22º dia pós-natal até o 32º dia pós-natal, foram avaliados sobre o padrão de mielinização do nervo óptico de ratos alimentados com uma dieta deficiente em ferro durante todo o período de lactação. Os animais foram divididos em três grupos: Controle, Anêmico e Recuperado. No grupo controle as ratas-mãe receberam uma dieta com 35mg de ferro/Kg durante todo o período de amamentação e seus filhotes receberam a mesma dieta após o desmame. As rata-mãe dos grupos anêmico e recuperado receberam uma dieta com 4mg de ferro/Kg durante a amamentação, mas após o desmame, os filhotes do grupo anêmico permaneceram com uma ração deficiente em ferro (4mg de ferro/Kg) e os filhotes do grupo recuperado passaram a receber uma ração rica em ferro (35mg de ferro/Kg), até o 32º dia pós-natal, quando o sangue foi colhido para avaliação dos seguintes parâmetros: concentração de hemoglobina e porcentagem de hematócrito. Ainda nesse dia, os animais de cada grupo foram profundamente anestesiados e perfundidos por via transcardíaca com uma solução de salina tamponada, seguida por uma mistura fixadora de paraformaldeído a 2% e glutaraldeído a 1% diluídos em tampão fosfato. Posteriormente, os nervos ópticos foram dissecados, refixados em tetróxido de ósmio, desidratados e incluídos em araldite®. Cortes transversais ultrafinos do nervo óptico foram obtidos para análise em microscopia eletrônica. Eletronmicrografias foram obtidas e digitalizadas para realização de estudos qualitativos e quantitativos. O nível sérico de ferro nos ratos anêmicos foi menor que nos grupos controle e recuperado. A análise qualitativa dos nervos ópticos de animais anêmicos e recuperados mostrou acentuada lesão da bainha de mielina com separação de suas lamelas, quando comparados ao grupo controle. O nervo óptico do grupo anêmico apresentou redução da densidade de fibras mielínicas, em comparação ao grupo controle. A razão entre os axônios grandes e pequenos das fibras mielínicas do nervo óptico no dia pós-natal (DPN) 32 evidenciou que os axônios do grupo controle apresentam maiores valores de área da mielina, área do axônio e área total da fibra, em comparação aos grupos anêmico e recuperado. O grupo controle mostrou também maior espessura da bainha de mielina, quando comparado aos grupos anêmico e recuperado. Além disso, os resultados desta investigação concluem que o ferro é necessário para a manutenção da ultraestrutura do nervo óptico e, que as lesões morfológicas causadas pela deficiência em ferro não são facilmente revertidas pela reposição do ferro na dieta.

EFEITO DA OXIGENOTERAPIA HIPERBÁRICA NA LESÃO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO DO INTESTINO DELGADO. ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS

Rosemary Aparecida Furlan Daniel

Orientador: Prof. Dr. Omar Feres

Tese de Doutorado apresentada em 25/05/2010

A isquemia intestinal é uma condição clínica que aparece quando o fluxo sanguíneo do território mesentérico é insuficiente para satisfazer as necessidades do intestino. A reperfusão, embora necessária para reverter o estado isquêmico, piora as lesões já presentes no período de isquemia. A oxigenoterapia hiperbárica (OHB) é o emprego científico do oxigênio puro (100%) sob pressões elevadas para o tratamento de doenças. Quando são realizadas menos de 5 sessões, deve-se utilizar o termo aplicação de oxigênio hiperbárico (O2HB). Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do oxigênio hiperbárico na lesão de isquemia e reperfusão do intestino delgado. Foram selecionados 30 ratos (Wistar) distribuídos em 5 grupos: A- controle, B- isquemia e reperfusão sem O2HB, C- O2HB durante a reperfusão, D- O2HB pré-isquemia, E- O2HB realizada na préisquemia e durante a reperfusão. A lesão de isquemia foi realizada com a ligadura da artéria mesentérica superior por 1 hora e o tempo de reperfusão foi considerado de 3 horas. As variáveis estudadas foram: bioquímico- Methyl Thiazolyl Blue (MTT), Malondialdeído (MDA); histológico-hematoxilina-eosina (HE); imunohistoquímico- Caspase-3, CD34⁺, VEGF. Os dados foram analisados com o programa estatístico GraphPad Prism 5 e aplicado o teste Kolmogorov-Sminov, valor de $p < 0,05$. Foram encontrados os seguintes resultados: Macroscopicamente as alças intestinais do Grupo E apresentavam melhor coloração e viabilidade. Bioquímico: MTT- melhores resultados quando a O2HB foi realizada na pré-isquemia, MDA-grupo E apresentou o melhor resultado. Histológico: HE-utilizando a classificação de Chiu, o Grupo E apresentou menos lesões; Imunohistoquímico: Caspase-3 - os menores níveis foram encontrados no Grupo E; CD34⁺ - a contagem de células marcadas foi maior no Grupo E; VEGF - o Grupo E apresentou os melhores resultados. Conclui-se que a oxigenoterapia hiperbárica diminui os efeitos da lesão de isquemia e reperfusão do intestino delgado.

SAFENAS MAGNAS HUMANAS: AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA, IMUNO-HISTOQUÍMICA E BIOQUÍMICA, IMUNO-HISTOQUÍMICA E BIOQUÍMICA

Marcelo Bellini Dalio

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Barbosa Evora

Tese de Doutorado apresentada em 27/05/2010

Contexto: A falência precoce dos enxertos com veia safena magna humana é um problema clínico relevante. Estima-se que de 15 a 25% dos enxertos periféricos e 10 a 30% dos enxertos coronários ocluem com 5 anos da implantação no sistema arterial. A exposição da veia safena magna às forças mecânicas causa alterações morfológicas e funcionais que podem ser o gatilho para o processo de falência precoce dos enxertos. Estudo recente neste laboratório, mostrou que a distensão *in vitro* de veias safenas humanas distais com pressões de 300 mmHg provocou alterações morfológicas e diminuição da expressão imuno-histoquímica da óxido nítrico sintase, sem causar alterações na dosagem de nitrito/nitrato. A motivação do presente estudo foi dar continuidade à esta linha de pesquisa, com a realização da distensão com fluxo (perusão *ex vivo*) em veias safenas magnas humanas. **Objetivos:** O objetivo deste estudo foi verificar se segmentos de veia safena magna humana quando submetidos à perfusão *ex vivo* não pulsátil com pressões crescentes, por período de três horas, apresentam alterações morfológicas; alterações na expressão imuno-histoquímica das isoformas da óxido nítrico sintase; alterações na dosagem tecidual de nitrito/nitrato e; alterações nos produtos do estresse oxidativo. **Materiais e métodos:** Segmentos intactos de veia safena magna foram obtidos de 30 pacientes submetidos à cirurgia eletiva de revascularização do miocárdio. Os segmentos foram submetidos à perfusão *ex vivo* não pulsátil em um sistema experimental. A perfusão foi realizada com solução de Krebs oxigenada por três horas, com fluxo de 100 ml/min e pressões de 50, 100, 200 e 300 mmHg, definindo quatro grupos (n=6). Seis segmentos foram utilizados como controle, sem realização da perfusão (pressão 0 mmHg). Após a perfusão, os segmentos venosos foram submetidos à: 1) análise morfológica da parede venosa com microscopia óptica e eletrônica de transmissão, com quantificação das alterações, cálculo da área do lúmen e da porcentagem do perímetro luminal coberta por endotélio; 2) análise da expressão imuno-histoquímica das isoformas da óxido nítrico sintase; 3) análise imuno-histoquímica do CD34; 4) dosagem tecidual de nitrito/nitrato; 5) análise dos produtos do estresse oxidativo, por meio da expressão imunohistoquímica da nitrotirosina e da dosagem dos níveis teciduais de malondialdeído. **Resultados:** 1) A microscopia óptica mostrou áreas de desnudamento endotelial,

formação de processos endoteliais salientes e presença de fendas na luz, que foram mais frequentes nos grupos perfundidos com 200 e 300 mmHg. A área do lúmen foi significativamente maior no grupo perfundido com 300 mmHg. A porcentagem do perímetro luminal coberta por endotélio diminuiu conforme se aumentou as pressões de perfusão, sendo a diferença significativa comparando os grupos com pressões de perfusão de 0, 50 e 100 com os de 200 e 300 mmHg. A microscopia eletrônica de transmissão não mostrou alterações nos grupos perfundidos com 0, 50 e 100 mmHg. Nos grupos perfundidos com 200 e 300 mmHg, o endotélio apresentou projeções, pleiomorfismo celular e vacúolos citoplasmáticos. Na túnica média das veias destes grupos, foi observado formato irregular da membrana celular, heterocromatina e nucléolo amplo e vacúolos citoplasmáticos. 2) Observou-se expressão imuno-histoquímica das três isoformas da óxido nítrico sintase em todas as túnicas das veias, não havendo diferença significativa entre os grupos. 3) A expressão do CD34 foi observada também nas três túnicas com predomínio na íntima, sem diferença entre os grupos. 4) Os níveis teciduais de nitrito/nitrato não apresentaram diferença significativa entre as diferentes pressões de perfusão. 5) Não houve expressão imuno-histoquímica de nitrotirosina e a dosagem tecidual de malondialdeído não apresentou diferenças entre os grupos. **Conclusão:** A perfusão ex vivo com fluxo não pulsátil por três horas causou alterações morfológicas na veia safena humana, que não foram acompanhadas de alterações imuno-histoquímicas e bioquímicas. Mesmo com lesão mecânica nas túnicas íntima e média, a veia safena manteve a capacidade de expressar a óxido nítrico sintase e liberar óxido nítrico.

ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DOS EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO PROTÉICA NA COMISSURA ANTERIOR DO RATO WISTAR

Patricia Aparecida Pereira Pacagnella

Orientador: Prof. Dr. João José Lachat

Tese de Doutorado apresentada em 27/05/2010

A desnutrição é definida como falta ou insuficiência de nutrição, causada por desequilíbrio entre a necessidade do corpo e a ingestão de nutrientes essenciais. O objetivo desse estudo foi analisar, através de métodos morfológicos ao nível de microscopia eletrônica de transmissão, os possíveis efeitos da desnutrição protéica na comissura anterior de ratos albinos, variedade *Wistar* ao longo do desenvolvimento pós-natal. Para isso os animais foram divididos em três grupos: controle, nutrido e desnutrido. O grupo controle recebeu dieta comercial com 22% de proteína; o grupo nutrido, dieta balanceada com 16% de proteína; e o grupo desnutrido, dieta com 6% de proteína. Após 21, 28, 36, 50 e 120 dias de idade, seis animais de cada grupo experimental foram anestesiados com emanações de éter sulfúrico e perfundidos por via transcardíaca com uma solução de PBS a 0,05M (salina tampão fosfato), seguida por uma mistura fixadora composta de paraformaldeído 2% e glutaraldeído 1%, dissolvidos em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3. Após a perfusão, os animais foram decapitados, o encéfalo removido e colocado na mesma mistura fixadora por aproximadamente 12 horas (*overnight*). Os encéfalos foram divididos em duas metades. A metade direita foi utilizada para dissecação e coleta da comissura anterior. As amostras da comissura anterior foram refixadas em solução de tetróxido de ósmio 1% e processadas para a inclusão em araldite® 502. A seguir, foram obtidos cortes semifinos com 0,5µm de espessura, montados em lâminas histológicas, corados com azul de toluidina 1% e observados ao nível de microscopia de luz para a seleção das áreas a serem preparadas para o estudo através de microscopia eletrônica de transmissão. Foram obtidos cortes ultrafinos com 60nm de espessura, montados em grades de cobre de 200 mesh, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, e então, analisados e eletromicrografados ao microscópio eletrônico de transmissão. A análise dos parâmetros ponderais mostrou que as ratas-mãe desnutridas apresentaram diminuição do peso corporal durante o período de lactação, e conseqüentemente consumiram menor quantidade de ração, quando comparadas com as ratas-mãe controle e nutridas. Os animais desnutridos apresentaram peso corporal estatisticamente menor tanto no período de lactação como no período pós-lactação, quando comparados com os animais controle e nutridos. Os animais desnutridos também apresentaram peso encefálico estatisticamente menor do que os animais controle e nutridos. Na análise morfológica ultraestrutural da comissura anterior, ao nível de microscopia eletrônica de transmissão, foram observadas células gliais, predominantemente oligodendrócitos e astrócitos, vasos sanguíneos, fibras nervosas mielínicas e fibras nervosas amielínicas. A desnutrição provocou mudanças estruturais na comissura anterior, como desorganização estrutural e desintegração da bainha de mielina das fibras nervosas, formação de vacúolos e atraso na mielinização. Os animais controle e nutridos, aos 120 dias de idade, apresentaram lesões de fibras nervosas, compatíveis com o processo de envelhecimento.

AVALIAÇÃO DA SÍNDROME DA APNEIA/HIPOPNEIA OBSTRUTIVA DO SONO ANTES E APÓS CIRURGIA BARIÁTRICA

Melina Machado Viegas Silva

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo Ceneviva

Dissertação de Mestrado apresentada em 01/06/2010

A obesidade é doença grave e um importante problema de saúde pública pela sua prevalência alta e crescente. Tem características epidêmicas e é o principal fator de risco para síndrome da apneia/hipopneia obstrutiva do sono (SAHOS). Poucos estudos avaliaram a correlação entre redução de peso ou índice de massa corporal e dados obtidos na polissonografia, considerando-se porcentagem da perda de peso ao invés do tempo decorrido após a cirurgia. O presente estudo objetivou-se avaliar a evolução da SAHOS após cirurgia bariátrica nos momentos de perda de 10%, 20% e 30% do peso e correlacionar a evolução da gravidade da SAHOS com o IMC, a circunferência do pescoço, a circunferência abdominal e a sonolência diurna de 20 pacientes com obesidade grau III, 12 mulheres antes, e 8 pacientes, metade do sexo masculino, após a cirurgia. Os parâmetros utilizados foram a avaliação antropométrica, a avaliação subjetiva do ronco e da sonolência excessiva diurna, a polissonografia e a gasometria arterial. Para análise estatística foram utilizados modelos lineares de efeitos mistos e o coeficiente de correlação de Spearman, para medir o grau de correlação. Todos os pacientes apresentaram resultados significativos na perda ponderal e na redução do IMC, da circunferência do pescoço e do abdome nos três períodos após a cirurgia. Antes da cirurgia todos os pacientes eram roncadores e hipersonolentos, e com perda de 30% do peso o ronco foi solucionado e a sonolência diurna melhorada. A polissonografia revelou que 82% dos pacientes avaliados tinham índice de distúrbio respiratório (IDR) > 5. Houve queda significativa do IDR entre o pré e a perda de 30% no pós-operatório. Houve aumento significativo das médias do número total de despertares dos pacientes após cirurgia. A média da saturação de oxigênio, avaliada pela gasometria, foi de 94,84% ± 2,02 antes da operação e de 95,45% ± 1,26 na perda de peso de 30% e em nenhum tempo houve saturação média menor que 90% e hipercapnia. Houve correlação positiva entre o IDR e o IMC, a circunferência do pescoço e a circunferência do abdome apenas com perda de 20% e não houve correlação do IDR e sonolência em qualquer tempo. Conclui-se que antes da cirurgia bariátrica a maioria dos pacientes apresenta sono ineficiente, sonolência excessiva diurna e ronco. O sono, a sonolência excessiva diurna, o ronco e o IDR melhoram após a operação, embora a SAHOS não tenha sido solucionada em todos os pacientes. A redução do IDR relacionada à perda progressiva do peso corporal sugere que reduções maiores do peso possam levar a resultados melhores no tratamento da SAHOS. Embora não tenha havido correlação entre o IDR com IMC, circunferência do pescoço, circunferência do abdome e sonolência diurna em todos os tempos após a cirurgia, houve melhora dessas variáveis no pós-operatório. A cirurgia bariátrica pela técnica de Fobi-Capella é uma boa opção para tratamento da SAHOS em pacientes obesos mórbidos.

EFEITO DA OXIGENOTERAPIA HIPERBÁRICA NA CARCINOGENESE COLORRETAL INDUZIDA PELA 1,2-DIMETILHIDRAZINA. ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS

Emanuel Gois Junior

Orientador: Prof. Dr. Omar Feres

Dissertação de Mestrado apresentada em 24/06/2010

A Oxigenoterapia Hiperbárica (OHB) é uma modalidade terapêutica em que o paciente respira oxigênio puro (100%), em pressão ambiente maior que uma atmosfera, indicada como adjuvante no tratamento de doenças infecciosas, inflamatórias e isquêmicas. O câncer colorretal (CCR) é a quarta neoplasia maligna mais incidente entre os cânceres humanos e são esperados aproximadamente 27.000 casos por ano no Brasil. O estudo e a compreensão dos mecanismos oncogênicos poderiam resultar em abordagens mais efetivas de tratamento e prevenção do CRC. No presente trabalho foi estudado o efeito da OHB na carcinogênese do CCR induzido pela 1,2-dimetil-hidrazina (DMH). **Materiais e Métodos:** Foram utilizados ratos *Wistar* (n=48) que foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos: G1 - aplicação de DMH; G2 - aplicação de DMH e OHB; G3 - aplicação de OHB; G4 controle. Estes grupos ainda foram divididos aleatoriamente em subgrupos (a) - eutanásia com 6 semanas e (b) - eutanásia com 12 semanas. As 15 sessões de oxigenoterapia hiperbárica foram realizadas a cada 24 horas e sob pressão de 2,0 ATA. A indução do câncer foi realizada por injeção intraperitoneal de DMH. Foram determinados os índices de Focos de Criptas Aberantes (iFCA), Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (iPCNA) e da Ciclooxygenase-2 (iCOX-2). **Resultados:** O iFCA foram aumentados no grupo DMH, de 6 para 12 semanas (p<0,001). A OHB isoladamente não apresentou efeito sobre o iFCA (p>0,05). Houve aumento do iPCNA no grupo da G3 em relação ao G1

($p < 0,05$). O G2 teve iPCNA semelhante ao controle ($p > 0,05$). A iCOX-2 teve expressão aumentada no G1 em relação a G4 ($p < 0,0001$). No G2 houve diminuição do iCOX-2 em relação ao grupo G1 ($p < 0,0001$). **Conclusão:** Concluiu-se que a OHB não exerce efeito carcinogênico colorretal, não impede a iniciação do câncer quando induzido pela DMH e exerce efeito protetor da carcinogênese, mediado pela inibição da COX-2.

Farmacologia

EFEITO DO CONSUMO CRÔNICO DO ETANOL SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR À ADRENOMEDULINA EM AORTA DE RATOS

Ulisses Vilela Hipólito

Orientador: Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli

Dissertação de Mestrado apresentada em 1º/04/2010

O consumo crônico de etanol leva a alterações significativas das funções cardíacas e circulatórias, figurando como um importante fator de risco no desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Nossos resultados mostram que o relaxamento mediado pela adrenomedulina (AM) é dependente do endotélio e que o tratamento com etanol (solução 20%) por 6 semanas reduziu a resposta de relaxamento do referido peptídeo. O tratamento com etanol não induziu alteração na resposta de relaxamento mediada pelo CGRP, acetilcolina e nitroprussiato de sódio. O tratamento com etanol por 6 semanas não alterou os níveis basais de nitrato e nitrito em aorta de ratos. Também não houve alterações nas concentrações vasculares de metaloproteinase-2 (MMP-2).

O relaxamento induzido pela AM em aorta de rato envolve a produção de NO, ativação da enzima guanilato ciclase e abertura de canais para potássio (K^+). No entanto, o tratamento com etanol não altera o funcionamento dessas vias. O CGRP8-37, antagonista do receptor do CGRP, não inibiu a resposta de relaxamento induzida pela AM em anéis de aorta do grupo controle e etanol. Por outro lado, o AM22-52, antagonista do receptor de AM, inibiu a resposta de relaxamento induzida pela AM em anéis de aorta do grupo controle. Entretanto, em anéis de aorta do grupo etanol o AM22-52 não foi capaz de inibir a resposta da AM. Evidenciou-se que o tratamento com etanol aumenta os níveis de RNAm para a pré-pró-AM e da RAMP 1 mas não interfere na expressão de outros componentes do sistema AM (RAMP 2, RAMP 3 e CLRL) e da enzima eNOS.

Em síntese, os resultados evidenciam que o consumo crônico de etanol reduz a resposta de relaxamento induzida pela AM em aorta de ratos e aumenta os níveis de RNAm da pré-pró-AM. Portanto, os resultados obtidos confirmam a hipótese do projeto inicial de que o consumo crônico de etanol afeta o sistema AM vascular.

EFEITO PANICOLÍTICO DE AGONISTAS DE RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS DO TIPO 5-HT₂ DA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSOLATERAL: PAPEL DA NEUROTRANSMISSÃO GABAÉRGICA

Thatiane de Oliveira Sergio

Orientador: Prof. Dr. Hélio Zangrossi Júnior

Dissertação de Mestrado apresentada em 26/04/2010

A Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal (SCPD) tem sido relacionada com a mediação do comportamento defensivo. A estimulação elétrica desta estrutura mesencefálica evoca reações de fuga acompanhada por mudanças neurovegetativas, que têm sido associadas a ataques de pânico. Vários estudos indicam que a serotonina (5-HT) inibe a aversão gerada pela estimulação da SCPD e que os receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} modulem o efeito do tipo pânico da serotonina nesta estrutura. Curiosamente, as respostas celulares promovidas por esses receptores são opostas, enquanto a ativação de receptores do tipo 5-HT_{2A} promove respostas celulares excitatórias a ativação de receptores 5-HT_{1A} evoca respostas inibitórias. Desta forma, sugere-se que o efeito antiaversivo decorrente da ativação de receptores do tipo 5-HT_{2A} seja mediado pela ativação de interneurônios GABAérgicos na SCPD. No presente trabalho, verificamos se o efeito antiaversivo decorrente da administração de agonistas de receptores do tipo 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} na porção dorsolateral da SCPD é decorrente da facilitação da neurotransmissão GABAérgica nesta mesma estrutura encefálica. Nossos resultados mostram que a administração prévia intra-SCPD do antagonista de receptores GABA_A bicuculina

bloqueou o efeito promovido pela injeção intra-SCPdl do agonista endógeno 5-HT, do agonista de receptores do tipo 5-HT_{2A} DOI, do agonista não seletivo de receptores do tipo 5-HT_{2C} mCPP e do agonista de receptores do tipo 5-HT_{2C} RO 60-0175. No entanto, o antagonista de receptores do tipo 5-HT_{2C}, SB-242084 não bloqueou a resposta promovida pelo RO 60-0175. Além disso, a administração prévia do antagonista de receptores do tipo 5-HT_{2A}, quetanserina bloqueou o efeito do DOI, mCPP e do RO 60-0175, indicando que tais drogas atuaram através da interação com receptores do tipo 5-HT_{2A}. Em suma, nossos dados mostram que o efeito antiaversivo promovido pela ativação de receptores do tipo 5-HT_{2A} na SCPdl seja mediado pela facilitação da neurotransmissão GABAérgica.

ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS DO TIPO 5-HT_{2C} DA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL NA MODULAÇÃO DE RESPOSTAS DEFENSIVAS RELACIONADAS À ANSIEDADE E AO PÂNICO

Paula Shimene de Melo Yamashita

Orientador: Prof. Dr. Hélio Zangrossi Júnior

Dissertação de Mestrado apresentada em 30/04/2010

Evidências experimentais indicam que a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD) participa de processos emocionais como ansiedade e medo. A estimulação elétrica ou química desta estrutura promove mudanças comportamentais e alterações fisiológicas, sugerindo que o animal experimental esteja passando por uma experiência aversiva. A resposta de fuga induzida pela estimulação elétrica da SCPD tem sido utilizada como um modelo animal para o estudo de ataques de pânico em humanos. Utilizando esse modelo experimental, tem sido demonstrado que a serotonina (5-HT) desempenha papel inibitório na regulação do comportamento de fuga, sugerindo um efeito do tipo panicolítico. A ativação de receptores serotoninérgicos da SCPD também inibe a resposta de fuga gerada em outro modelo experimental que relaciona esta resposta defensiva ao pânico, o labirinto em T elevado (LTE). Além da resposta de fuga, esse modelo é capaz de gerar, em um mesmo animal, a resposta de esquiva inibitória que está relacionada com o transtorno de ansiedade generalizada. Estudos prévios no LTE indicam que a injeção intra-SCPD de 5-HT desencadeia efeitos ansiogênico e panicolítico. Evidências indiretas sugerem que o efeito ansiogênico da 5-HT é mediado por receptores dos tipos 5-HT_{2C}, enquanto que o efeito panicolítico parece ser modulado por receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}. Neste trabalho procuramos estender as investigações acerca do papel dos receptores 5-HT_{2C} da SCPD na regulação de respostas de defesa associadas à ansiedade e ao pânico, medidas no LTE. Para tal, observamos os efeitos da microinjeção na SCPD dos agonistas preferenciais de receptores 5-HT_{2C}, MK-212 e RO-600175, e do antagonista seletivo desses receptores, SB-242084. Os resultados mostraram que os agonistas MK-212 e RO-600175 facilitaram a aquisição de esquiva inibitória, sugerindo efeito ansiogênico, sem afetar a resposta de fuga. Além disso, a microinjeção prévia de SB-242084 preveniu o efeito ansiogênico gerado pelo MK-212. Em relação à participação dos receptores 5-HT_{2C} da SCPD nas respostas associadas ao pânico, verificamos que o agonista MK-212 também não alterou a resposta de fuga induzida pela estimulação elétrica da SCPD. Assim, nossos resultados sugerem que o efeito ansiogênico da 5-HT sobre a resposta de esquiva inibitória é mediado por receptores do tipo 5-HT_{2C}. Por outro lado, a ativação desses receptores, embora promova efeito do tipo ansiogênico, não altera a resposta de fuga, indicando que esses receptores estão envolvidos na regulação de respostas defensivas relacionadas à ansiedade, mas não ao pânico.

ENVOLVIMENTO DE CIRCUITOS COLINÉRGICOS DO HIPOCAMPO DORSAL E DE VIAS OPIOIDES E SEROTONINÉRGICAS DO SISTEMA ENDÓGENO DE INIBIÇÃO DE DOR NA ANALGESIA PÓS-ICTAL

Renato Leonardo Freitas

Orientador: Prof. Dr. Noberto Cysne Coimbra

Tese de Doutorado apresentada em 04/05/2010

Tem sido descrito na clínica médica que alguns pacientes relatam hipotalgesia, um fenômeno que necessita ser mais estudado, quando consideramos sua causa reações convulsivas. O presente trabalho foi realizado com o intuito de fazer um estudo do envolvimento neuroanatômico, neurofisiológico e neurofarmacológico do hipocampo dorsal (Hd), da substância cinzenta periaquedutal (SCP) e do *locus coeruleus* (LC) na elaboração da analgesia pós-ictal em um modelo animal de convulsões tônico-clônicas (*Rattus norvegicus*, *Rodentia*, *Muridae*). O limiar nociceptivo foi aferido imediatamente após as crises convulsivas tônico-clônicas induzidas pelo bloqueio ionóforo de canais de cloreto ligados ao receptor GABAA, através da administração por via periférica de pentilenotetrazol (PTZ; 64 mg/kg; IP). A presente investigação foi feita em três

etapas: **1) Estudo Neuroanatômico:** foi realizado através da microinjeções de biodextrana conjugada a "Texas Red" a 10% (BDA: 3000 MW, no volume de 0,2 µL), um neurotraçador fluorescente bidirecional, no Hd. Demonstraram-se conexões entre estruturas corticais, como o córtex somatossensorial primário (como a camada piramidal interna e camada piramidal externa) e o córtex somatossensorial (campo de Barrel), área septal medial (ASM), área septal lateral (ASL), a banda diagonal de Broca (BDB), áreas da camada radial e a camada granular do giro dentado do hipocampo, que podem elaborar pelo menos parte das atividades convulsivas, segundo alguns relatos na literatura. Também foram observadas conexões do Hd com o núcleo linear da rafe (NLR), núcleo mediano da rafe (NMdR), núcleo dorsal da rafe (NDR) e LC, os quais podem estar envolvidos através da ativação do sistema endógeno de inibição de dor, na elaboração do processo antinociceptivo pós-ictal. **2) Estudo Neurofisiológico:** a inativação da neurotransmissão por meio da microinjeção intra-Hd, intra-SCPdm, intra-SCPvl e intra-LC de cloreto de cobalto (1,0 mM/0,2µL), um bloqueador de sinapses, através da supressão do influxo de cálcio, diminuiu a analgesia pós-ictal. **3) Estudo Neurofarmacológico:** microinjeções intra-Hd de atropina (antagonista de receptores muscarínicos) ou mecamilamina (antagonista de receptores nicotínicos), nas doses de 1,0 e 5,0 µg/0,2µL diminuíram a analgesia pós-ictal. Atropina e a mecamilamina microinjetados no Hd na dose de 5,0 µg/0,2µL não alteram os limiares nociceptivos basais dos animais sem a indução de crises convulsivas. A microinjeção de naltrexona (antagonista não-seletivo para receptores opioides), de naloxonazina (antagonista seletivo para receptores µ1-opioides), da metisergida (antagonista não-seletivo para receptores serotoninérgicos) e da cetanserina (antagonista com maior afinidade para receptores 5-HT_{2A/2C}) na SCPdm, da SCPvl e do LC diminuíram a analgesia pós-ictal. Esses dados sugerem o envolvimento do Hd e de suas redes neurais colinérgicas muscarínicas e nicotínicas, da neurotransmissão opioide e de receptores do tipo µ1, assim como da neurotransmissão serotoninérgica e de receptores 5-HT_{2A/2C} da SCPdm, da SCPvl e do LC na elaboração da analgesia que segue as crises convulsivas tônico-clônicas generalizadas induzidas pelo PTZ.

EFEITOS DE DROGAS CARDIOVASCULARES SOBRE OS AUMENTOS DAS CONCENTRAÇÕES DE DNA LIVRE NO PLASMA EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE TROMBOEMBOLIA PULMONAR AGUDA

Juliana Alves Uzuelli

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos
Tese de Doutorado apresentada em 18/06/2010

A embolia pulmonar aguda (EPA) é uma síndrome grave de difícil diagnóstico. O sildenafil, um inibidor oral da fosfodiesterase-5, exerce efeitos vasodilatadores e melhora a hemodinâmica pulmonar em modelos animais e pacientes com EPA. A atorvastatina, um inibidor da HMG-CoA redutase, além de reduzir a concentração de colesterol no sangue, também apresenta efeitos pleiotrópicos. Estudos recentes mostram um aumento das concentrações do DNA livre no plasma como marcador de inúmeras doenças. Nenhum estudo examinou se há uma relação linear entre a concentração do DNA livre e a gravidade da EPA em cães, e quais os efeitos do pré-tratamento com atorvastatina sobre as concentrações do DNA livre em carneiros tratados agudamente com sildenafil.

No estudo com cães, a EPA foi induzida de duas formas: uma com coágulos de sangue autólogo (salina, 1,3 e 5 mL/Kg) injetados no átrio direito e, a outra com microesferas de *Sephadex* (300µm) injetadas na veia cava inferior. As avaliações hemodinâmicas continuaram-se por mais 120 minutos pós EPA.

Em outro estudo com carneiros, foi realizado o pré-tratamento com atorvastatina (30 mg/Kg, s.c.) durante 7 dias. A EPA foi induzida com coágulos autólogo (0,5 g/Kg) injetados no átrio direito. As avaliações hemodinâmicas continuaram-se por mais 60 minutos pós EPA. Então sildenafil (0,7 mg/Kg, i.v.) ou salina foi injetada na veia femoral esquerda e as avaliações continuaram-se por mais 90 minutos.

O DNA foi extraído do plasma dos animais, de ambos os estudos, com o kit QIAmp DNA Blood Mini Kit e quantificado com o kit Quant-iT Pico Green ds DNA.

A EPA produziu um aumento dose dependente da concentração do DNA livre no plasma de cães, que se correlacionou positivamente com a resistência vascular e com a pressão média da artéria pulmonar. A embolização com microesferas não produziu mudanças na concentração do DNA.

O pré-tratamento com atorvastatina não atenuou significativamente o aumento da concentração do DNA livre, diferentemente do sildenafil que produziu esse efeito, sozinho ou em associação com a atorvastatina.

A concentração do DNA livre aumentou em proporção à gravidade da EPA, provavelmente como resultado do aumento de trombos obstruindo os vasos pulmonares. Tratamentos com algumas drogas, tais como o sildenafil parece atenuar o aumento da concentração do DNA livre circulante no plasma após a EPA, embora outras drogas não o façam. É sugestivo que o sildenafil possa interferir em mecanismos fisiopatológicos que levam ao aumento do DNA livre circulante no plasma.

EFEITOS DE DIFERENTES DIIDROPIRIDINAS SOBRE ALTERAÇÕES VASCULARES EM MODELO DE HIPERTENSÃO RENOVASCULAR (2R-1C)

Diogo Marçal Machado de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

Dissertação de Mestrado apresentada em 22/06/2010

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é considerada um grande problema de saúde pública no mundo, e está amplamente relacionada a significativas alterações morfológicas e funcionais no aparelho cardiovascular.

O remodelamento vascular acelerado presente na hipertensão está associado a ativação de um grupo de endopeptidases zinco-dependentes denominadas metaloproteinases, que apresentam um papel importante na disfunção endotelial de várias doenças cardiovasculares. Aumentos na atividade destas enzimas podem levar à degradação excessiva das proteínas da matriz extracelular (MEC), além de acentuar a migração de células musculares lisas e monócitos.

Um dos modelos mais semelhantes ao quadro de hipertensão renovascular em humanos é o modelo de hipertensão renovascular unilateral (2R-1C), que é produzido pelo clampeamento de uma das artérias renais e manutenção do rim contra lateral intacto. O modelo experimental 2R-1C foi proposto para este estudo por apresentar concentrações elevadas de EROs associadas a um aumento da renina plasmática e angiotensina II. Estas ações associadas a um aumento da pressão intra-luminal, podem ser muito importantes para ativação das MMPs, o que pode contribuir para as alterações vasculares observadas neste modelo de hipertensão.

Nifedipina, Nimodipina e Amlodipina são bloqueadores de canal de cálcio (CCB) da classe das diidropiridinas usada no tratamento da hipertensão. Além de reduzir a pressão arterial, há evidências de que estas diidropiridinas tenham ações pleiotrópicas que possam significativamente contribuir para os benefícios que ela produz na terapia da hipertensão. É possível que a Nifedipina, a Nimodipina e a Amlodipina e outros CCBs com efeitos antioxidantes reduzam a atividade/expressão/níveis das MMPs na hipertensão. Baseado nestas informações, os objetivos do nosso trabalho foram primeiramente, verificar possíveis aumentos de estresse oxidativo e de MMP-2 nos vasos de ratos no modelo de hipertensão renovascular. Objetivamos ainda estudar os efeitos do tratamento com estas diidropiridinas sobre as alterações mencionadas anteriormente.

Os resultados mostraram que o tratamento com as diidropiridinas reduziu a pressão arterial sistólica nos ratos hipertensos, preveniu aumentos na espessura da camada média da aorta e apresentou uma redução significativa nos níveis plasmáticos de malondialdeído e na atividade de MMP-2.

Estes resultados sugerem que 1) as MMPs podem contribuir para as alterações vasculares observadas neste modelo experimental e 2) aumentos nas concentrações de EROs podem estar diretamente relacionados com esta atividade aumentada da MMP-2 e que 3) o tratamento com diidropiridinas pode reverter a disfunção e o remodelamento vascular durante a hipertensão 2R-1C pela diminuição na atividade/níveis de MMP-2.

ENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS QUE DESCEM PELO FUNÍCULO DORSOLATERAL DO CONTROLE GABAÉRGICO ESPINAL DA DOR INDUZIDA POR LIGADURA DE NERVO EM RATOS

Quintino Moura Dias Junior

Orientador: Prof. Dr. William Alves do Prado

Tese de Doutorado apresentada em 25/06/2010

Interneurônios GABAérgicos espinais podem modular os sistemas de origem supraespinal que descem à medula espinal primariamente através do funículo dorsolateral (FDL). A redução do controle inibitório exercido pelos sistemas GABAérgicos espinais e as mudanças na atividade dos mecanismos que controlam a nocicepção podem ser importantes processos relacionados com o surgimento e manutenção da alodinia resultante de lesão de nervo. Este estudo examinou o efeito da lesão do FDL sobre o efeito antialadínico da injeção intratecal de muscimol, baclofeno ou gabapentina em dois momentos diferentes da alodinia mecânica induzida por ligadura dos troncos dos nervos espinais L5 e L6 em ratos. Também avaliamos o efeito de injeção intratecal de bicuculina ou flaclofeno sobre a alodinia mecânica induzida por ligadura de nervos em animais submetidos à falsa ou efetiva lesão do FDL. Inicialmente mostramos que a ligadura de nervos, em animais com falsa lesão do FDL, reduziu significativamente o limiar de resposta à aplicação de estímulos mecânicos (alodinia mecânica) por pelo menos 21 dias. De maneira similar, a ligadura de nervo em animais submetidos à efetiva lesão do FDL induziu alodinia mecânica no 2º e 7º dia pós-cirúrgico, mas este efeito foi revertido no 14º dia, retornando aos

valores basais no 21º dia pós-cirúrgico. No estudo também mostramos que a alodinia mecânica induzida por ligadura de nervos, em animais submetidos à falsa lesão de FDL, foi significativamente reduzida pela injeção intratecal de gabapentina (200 µg/10 µL), baclofeno (0.8 µg/10 µL) ou muscimol (0.2 µg/10 µL), tanto no 2º quanto no 7º dia pós-cirúrgico. O efeito antialodínico do muscimol e baclofeno, mas não a gabapentina, foi significativamente bloqueado pelo pré-tratamento com bicuculina e faclofeno, respectivamente. Também mostramos que a injeção intratecal de bicuculina e faclofeno induziu significativa redução do limiar mecânico em animais com falsa ligadura de nervos e falsa lesão de FDL. No entanto, a bicuculina ou o faclofeno não agravaram significativamente a alodinia mecânica induzida por ligadura de nervos, tanto nos animais submetidos à falsa quanto à efetiva lesão de FDL. Por fim avaliamos o efeito da lesão do FDL sobre o efeito antialodínico da injeção intratecal de gabapentina, muscimol e baclofeno em animais submetidos à ligadura de nervos. A lesão de FDL não alterou significativamente o efeito antialodínico da gabapentina quando comparado com o grupo submetido à falsa lesão de FDL. Já o efeito antialodínico do muscimol teve início rápido e foi significativamente mais intenso e duradouro no 2º dia pós-cirúrgico, e pelo menos 30 minutos mais curto no 7º dia pós-cirúrgico. Por fim, o efeito antialodínico do baclofeno foi mais intenso e se desenvolveu mais rapidamente no 2º dia pós-cirúrgico, enquanto que no 7º dia o efeito se desenvolveu rapidamente, mas foi de curta duração. Os resultados do presente estudo mostram que o efeito antialodínico do baclofeno pode resultar da inibição pré-sináptica de terminais de neurônios facilitatórios do tronco encefálico que descem pelo FDL. Já o efeito antialodínico do muscimol e gabapentina resulta da inibição da transmissão nociceptiva entre o neurônio aferente primário e neurônio de segunda ordem.

EFEITOS DO CLONAZEPAM SOBRE AS RESPOSTAS DEFENSIVAS MEDIDAS EM RATOS SUBMETIDOS AO LABIRINTO EM T ELEVADO

Marcel Adriano Lopes

Orientador: Prof. Dr. Hélio Zangrossi Júnior

Dissertação de Mestrado apresentada em 29/06/2010

O labirinto em T elevado (LTE) é um modelo etológico, que evoca comportamentos defensivos correlacionados com o transtorno de ansiedade generalizada (esquiva inibitória) e o transtorno do pânico (fuga). Apesar da validação farmacológica da tarefa de esquiva inibitória deste modelo estar bem estabelecida, algumas questões em relação à tarefa de fuga não estão claras. Resultados prévios da literatura mostram que drogas clinicamente eficazes no tratamento do transtorno do pânico, como antidepressivos tricíclicos (ex: imipramina e clomipramina) e inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ex: fluoxetina e escitalopram), aumentam a latência de fuga no LTE, sugerindo efeito do tipo panicolítico. Entretanto, em relação aos benzodiazepínicos de alta potência, também amplamente utilizados na clínica para o tratamento do transtorno do pânico, os dados em relação ao LTE permanecem desconhecidos. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito da administração aguda ou repetida (7 ou 14 dias) de clonazepam em ratos submetidos ao LTE. Dada a importância da substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD) na gênese do transtorno do pânico, verificamos se o efeito da administração aguda de clonazepam no LTE era bloqueado pela administração prévia intra-SCPD do antagonista de receptores BZD flumazenil. Nossos resultados mostram que o tratamento agudo com clonazepam diminuiu as latências de esquiva inibitória e aumentou as latências de fuga do braço aberto, indicativo de efeito ansiolítico e panicolítico, respectivamente. Já a administração repetida deste mesmo benzodiazepínico, seja por 7 ou 14 dias, diminuiu as latências de esquiva inibitória, sem alterar as respostas de fuga. A administração intra-SCPD do antagonista de receptores benzodiazepínicos flumazenil não bloqueou o efeito da administração aguda de clonazepam sobre as respostas defensivas medidas no LTE. Os resultados do presente estudo mostram ainda que o efeito do clonazepam sobre a resposta de fuga é dependente da maneira pela qual a aquisição da resposta de esquiva inibitória é realizada, ou seja, o tratamento agudo com clonazepam foi capaz de alterar esta resposta somente quando a esquiva inibitória foi realizada com 6 tentativas. Em suma, nossos dados mostram que a administração aguda de clonazepam promove efeito panicolítico e ansiolítico no LTE. No entanto, deve ser ressaltado que o efeito panicolítico do clonazepam foi apenas observado após a introdução de uma mudança metodológica no teste do LTE. De uma maneira geral, os resultados obtidos sustentam a associação entre o comportamento de fuga e ataques de pânico.

Fisiologia

EFEITOS DO ESTRADIOL SOBRE AS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES E NEUROENDÓCRINAS INDUZIDAS POR HEMORRAGIA EM RATAS

André de Souza Mecawi

Orientador: Prof. Dr. José Antunes Rodrigues

Dissertação de Mestrado apresentada em 1º/04/2010

O estrógeno (E2) exerce um importante papel modulador sobre o controle da pressão arterial e frequência cardíaca, secreção de vasopressina (AVP), ocitocina (OT), peptídeo natriurético atrial (ANP) e sistema renina-angiotensina. Além disso, existem receptores para o E2 em importantes áreas cerebrais relacionadas ao controle integrado da homeostase cardiovascular e hidroeletrólítica, como o órgão subfornicial (SFO) e os núcleos supraóptico (SON) e paraventricular (PVN). Assim, nosso objetivo foi avaliar a influência exercida pelo E2 sobre as alterações cardiovasculares e neuroendócrinas induzidas pela hipovolemia hemorrágica em ratas ovariectomizadas (OVX). Para isso ratas Wistar (220-280g) foram ovariectomizadas bilateralmente e tratadas com óleo (OVX-Óleo) ou cipionato de estradiol nas doses de 10 (OVXE2 10) ou 40 (OVX-E2 40) µg/kg durante sete dias (s.c.). No sétimo dia, os animais tiveram a artéria femoral canulada e, após 24 horas de recuperação, foi realizada a hemorragia (1,5 ml de sangue/100g em um minuto). A hemorragia induziu uma queda da PAM (~20 mmHg) e FC (~50 bpm) no grupo OVX-Óleo no tempo de 5 minutos após a retirada de sangue, e o tratamento com E2 inibiu as respostas hipotensora e bradicárdica. Verificamos ainda que houve uma elevação da concentração plasmática de angiotensina II e queda da concentração de ANP nos tempos de 5, 15 e 30 minutos após hemorragia em todos os grupos, sem efeito do E2 sobre esses parâmetros. Houve também uma elevação da concentração plasmática de AVP e OT 5 minutos após a hemorragia em todos os grupos e, o tratamento com E2 na maior dose potencializou a secreção desses hormônios. Nós também avaliamos o padrão de ativação dos neurônios do SFO e dos neurônios AVP e OT do SON e PVN por imunistoquímica para c-Fos. Após a hemorragia, houve uma intensa ativação dos neurônios do SFO, e o tratamento com estrógeno potencializou essa resposta. Observamos ainda uma intensa ativação dos neurônios AVP e OT no SON após hemorragia, e mais uma vez, o tratamento com E2 levou a potencialização dessas respostas. Os neurônios AVP e OT das porções medial (MM) e lateral (LM) magnocelulares e medial (MP) e posterior (PP) parvocelulares também responderam com aumento da expressão da proteína c-Fos após hemorragia. O E2 aumentou a ativação de neurônios AVP das porções MM, LM e PP e dos neurônios OT das porções MM e LM do PVN. O conjunto desses dados mostra que o E2 tem a capacidade de modular as respostas cardiovasculares decorrentes da hemorragia e, possivelmente, os núcleos SON, PVN e SFO participam dessa resposta, uma vez que o E2 também potencializa a ativação de neurônios do SFO e neurônios produtores de AVP e OT do SON e PVN, e conseqüentemente a secreção desses hormônios após hemorragia.

EFEITOS DO SISTEMA CANABINÓIDE ENDÓGENO SOBRE A SECREÇÃO HORMONAL, ATIVAÇÃO NEURONAL E EXPRESSÃO DE RNA MENSAGEIRO EM RESPOSTA À EXPANSÃO ISOTÔNICA E HIPERTÔNICA DO VOLUME EXTRACELULAR

Silvia Graciela Ruginsk Leitão

Orientador: Prof. Dr. José Antunes Rodrigues

Tese de Doutorado apresentada em 13/05/2010

O sistema endocanabinóide é composto por mediadores que participam de inúmeras respostas homeostáticas e neuroendócrinas, dentre elas a modulação do sistema hipotalâmico magnocelular. Diversas evidências sugerem que a grande maioria dos efeitos centrais produzidos por estas substâncias sejam mediados pela ativação do receptor CB₁. Portanto, o presente estudo visou avaliar os efeitos da administração de anandamida (AEA, 100ng/4µl, i.c.v.), um dos principais agonistas endógenos do sistema canabinóide, ou de rimonabanto (10mg/kg, p.o.), um antagonista seletivo dos receptores CB₁, sobre diversos eventos relacionados à síntese e secreção de ocitocina (OT) e vasopressina (AVP) induzidas pelo estímulo de expansão do volume extracelular (EVEC). Nosso trabalho mostrou que a EVEC hipertônica (NaCl 0.3M, 2ml/100g p.c., e.v.) promoveu um aumento nas concentrações plasmáticas de AVP e OT, além de aumentar o número de neurônios magnocelulares duplamente marcados para c-Fos/OT e c-Fos/AVP, bem como a expressão de RNA mensageiro (RNAm) de AVP e OT nos núcleos supra-óptico (NSO) e paraventricular (NPV) do hipotálamo. Ao contrário disso, a EVEC isotônica (NaCl 0.15M, 2ml/100g p.c., e.v.) estimulou a secreção de OT e diminuiu as concentrações plasmáticas de AVP, produzindo efeitos correspondentes no número de neurônios ocitocinérgicos e vasopressinérgicos ativados e na expres-

são de RNAm para OT e AVP nestes núcleos. O pré-tratamento com AEA reduziu significativamente a secreção de OT induzida pela EVEC hipertônica, porém não alterou as concentrações plasmáticas de AVP, tampouco o número de neurônios magnocelulares ativados e a expressão de RNAm em resposta à EVEC. Por outro lado, a prévia administração de rimonabanto potencializou a secreção hormonal de ambos os peptídeos, assim como o número de duplas marcações para c-Fos/OT e c-Fos/AVP no NSO e NPV de animais submetidos à EVEC hipertônica. Contrariamente, a expressão de RNAm de AVP e OT foi inibida em animais pré-tratados com rimonabanto e submetidos à EVEC. Considerando a participação das vias glutamatérgicas na ativação dos neurônios magnocelulares hipotalâmicos em resposta ao aumento de volume e/ou osmolalidade do líquido extracelular, o presente estudo mostrou ainda que tanto a EVEC isotônica quanto hipertônica induziram um aumento no conteúdo total de glutamato no NPV e NSO, sendo que este efeito foi potencializado em animais pré-tratados com AEA e inibido nos grupos que receberam previamente rimonabanto.

Além disso, os estudos que utilizaram a administração central de AEA indicaram que o sistema canabinóide endógeno possa interagir, possivelmente de maneira independente à ativação do receptor CB1, com a via do óxido nítrico (NO) na modulação das respostas induzidas pela EVEC. Em conjunto, estes dados sugerem que o receptor CB1 participe do controle da secreção e síntese hormonal induzidas notadamente pelo estímulo hipertônico, e que a AEA não seja o principal canabinóide endógeno envolvido em tais respostas.

PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E PERIFÉRICO NO DESENVOLVIMENTO DA SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS INDUZIDA POR ESTRESSE EM RATAS

Marcelo Picinin Bernuci

Orientadora: Profa. Dra. Janete Aparecida Anselmo-Franci
Tese de Doutorado apresentada em 19/05/2010

O estresse crônico e intermitente por frio durante 8 semanas induz alterações morfofuncionais ovarianas em ratas semelhantes aquelas relatadas na síndrome dos ovários policísticos (SOP) humana. Aumento na secreção de hormônios esteróides induzido pela hiperativação dos nervos simpáticos ovarianos em resposta ao estresse tem sido sugerido como fator etiológico da SOP experimental. Como a lesão do *locus coeruleus* (LC) bloqueia o surgimento da SOP induzida por estresse, pretendemos neste estudo avaliar o papel do LC no controle da atividade simpática ovariana durante a instalação do quadro de SOP. Para isso foi avaliado: 1) o efeito da lesão do LC na atividade simpática e endócrina ovariana após 8 semanas de estresse por frio crônico e intermitente (4° C, 3 horas/dia), 2) alterações na atividade do LC, na atividade simpática e endócrina ovariana após o estresse por frio agudo (4° C, 3 horas) ou crônico intermitente por 4 ou 8 semanas. A lesão do LC reduziu a atividade simpática e secreção de estradiol no ovário de ratas submetidas a 8 semanas de estresse. O estresse por frio agudo e crônico de 4 semanas aumentou atividade do LC e do sistema nervoso simpático ovariano, enquanto 8 semanas de estresse diminuiu ambas atividades. Aumentos significativos nas concentrações plasmáticas de estradiol, testosterona e progesterona só foram encontrados após 8 semanas de estresse, quando os ovários apresentaram sinais morfológicos típicos da SOP. A inibição da atividade simpática no ovário das ratas estressadas com lesão do LC e o semelhante perfil de atividade do LC e do sistema nervoso simpático ovariano em resposta aos diferentes paradigmas de estresse sugerem um envolvimento do sistema nervoso central e periférico nas alterações morfofuncionais ovarianas relacionadas com o desenvolvimento da SOP. Assim, a atividade simpática ovariana sob o controle do LC parece desempenhar um importante papel na gênese da SOP induzida pelo estresse por alterar o desenvolvimento folicular e secreção de esteróides ovarianos.

A AÇÃO FISIOLÓGICA DA ADRENALINA NA REGULAÇÃO DO METABOLISMO DE PROTEÍNAS MUSCULARES NO JEJUM

Flávia Aparecida Graça

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes
Dissertação de Mestrado apresentada em 20/05/2010

Embora já esteja bem estabelecido que o Sistema Nervoso Simpático exerça efeitos anabólicos no metabolismo de proteínas musculares em condições basais, seu papel fisiológico no turnover de proteínas em situações de demanda energética ainda é desconhecido. Assim, o presente trabalho teve como objetivo principal investigar o efeito da adrenomedulação (após 10 dias da remoção cirúrgica da medula adrenal) no catabolismo protéico muscular induzido pelo jejum de 2 dias em ratos. Foram utilizados ratos machos Wistar, adultos (~230g) e jovens (~80g), os quais foram divididos em

quatro grupos: (1) Sham alimentado, (2) Sham jejuado por 48h, (3) Adrenodemedulado (ADMX) alimentado e (4) ADMX jejuado por 48h.

A eficácia da desnervação foi comprovada por meio da dosagem das catecolaminas plasmáticas por HPLC. O jejum não alterou as concentrações das catecolaminas circulantes, entretanto, a adrenodemedulação praticamente aboliu as concentrações de adrenalina e reduziu em 60% as de noradrenalina no plasma de animais alimentados e jejuados, sem alterar as concentrações plasmáticas de corticosterona. O metabolismo de proteínas *in vivo* foi monitorado indiretamente pela determinação da concentração intersticial de tirosina no músculo tibial anterior de ratos adultos pela microdiálise. A redução das catecolaminas circulantes aumentou o catabolismo protéico em músculos de ratos jejuados, sendo este aumento proveniente de uma maior liberação local de tirosina sem alteração arterial do aminoácido ou do fluxo sanguíneo muscular. Em seguida, músculos soleus e EDL de ratos jovens foram utilizados para os experimentos *in vitro*, onde se investigou a velocidade de síntese protéica, a degradação total de proteínas assim como as atividades dos diferentes sistemas proteolíticos e expressão dos atrogenes (genes relacionados com atrofia e autofagia). Como esperado, o jejum reduziu a síntese protéica em músculos de animais Sham e ADMX de forma semelhante. No entanto, a depleção da adrenalina em animais alimentados aumentou a velocidade de incorporação da tirosina marcada com ^{14}C em proteínas nos músculos EDL e soleus, sugerindo um aumento do turnover de noradrenalina muscular ou uma hipersensibilização à ação da insulina. A degradação total de proteínas musculares no músculo EDL foi extremamente aumentada no grupo ADMX jejum quando comparado ao grupo jejum. Entretanto, a degradação protéica em músculos soleus não foi alterada pelo jejum ou pela ADMX. O aumento adicional de proteólise total observado no músculo EDL de ratos jejuados induzido pela ADMX foi associado a uma hiperativação dos sistemas lisossomal e dependente de Ub-proteassoma. Em paralelo, observou-se um aumento da expressão gênica das E3 ligases (atrogina-1 e MurF1) e dos genes autofágicos (LC3 e GABARAP) no jejum, sendo esse aumento exacerbado com a depleção da adrenalina plasmática. Verificou-se também uma redução da fosforilação da Akt em músculos esquelético de ratos ADMX jejuados em relação ao grupo jejuado.

Os dados do presente estudo nos permitem concluir que a depleção das catecolaminas plasmáticas, principalmente a adrenalina, amplifica os efeitos catabólicos induzidos pelo jejum na ativação dos sistemas proteolíticos (lisossomal e Ub-proteassoma) e na expressão dos atrogenes em músculos EDL de ratos, sendo este efeito provavelmente devido à redução da fosforilação da Akt. Portanto, a secreção da adrenalina plasmática parece ter um importante papel protetor na perda de proteínas musculares durante o jejum.

EFEITO DA DESNERVAÇÃO SIMPÁTICA LOMBAR NA DEGRADAÇÃO DE PROTEÍNAS EM MÚSCULOS ESQUELÉTICOS DE RATOS

Wilian de Assis Silveira

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes

Dissertação de Mestrado apresentada em 24/05/2010

Em estudos anteriores de nosso laboratório demonstrou-se que o Sistema Nervoso Simpático exerce um controle inibitório da proteólise em músculos esqueléticos de roedores, sendo essas ações mediadas principalmente por meio da adrenalina e ativação da via de sinalização do AMPc. No entanto, o papel fisiológico da inervação simpática direta na musculatura esquelética ainda é pouco conhecido. Assim, o objetivo principal do presente trabalho foi investigar o efeito da desnervação simpática lombar (remoção dos gânglios da cadeia paravertebral) na degradação de proteínas em músculos esqueléticos ricos em fibras do tipo II (*extensor digitorum longus*, EDL) e músculos esqueléticos ricos em fibras do tipo I (soleus) de ratos, após 3, 7 e 15 dias.

A desnervação simpática foi eficiente em reduzir (85%) o conteúdo de noradrenalina em músculos soleus e EDL, sem alterar o conteúdo de proteínas, o tipo ou a área seccional transversa das fibras em ambos os músculos. Em EDL, a desnervação por 3 dias aumentou a atividade da adenilil ciclase (~111%) e o conteúdo de AMPc intracelular (~192%), mas não alterou o conteúdo da proteína G. Esses efeitos foram associados com uma menor degradação protéica (10%) e expressão gênica da MuRF-1 (~75%), uma E3-ligase, e LC3 (~65%), uma proteína marcador de autofagia. Após 7 dias, a desnervação reduziu a proteólise total (21%) e a expressão gênica das E3-ligases (atrogina-1 e MuRF-1) (~70%) e da LC3 (~65%). Além disso, a desnervação aboliu a hiperativação do sistema proteolítico dependente de Ub-proteassoma em animais jejuados por 48h. Embora a desnervação não tenha alterado o conteúdo de glicogênio, a velocidade de incorporação de [^{14}C]-glicose em glicogênio (~70%) e a oxidação de glicose estimulada pela insulina (~70%) foram aumentadas em músculos EDL desnervados por 3 dias.

Em *soleus*, a redução nas concentrações de noradrenalina por 3 dias resultou no aumento (~145%) da atividade máxima do sistema proteolítico dependente de Ca^{+2} avaliada *in vitro*. Em paralelo, o conteúdo da forma autolisada da

μ -calpaína aumentou (~140%) significativamente nestes músculos, embora o conteúdo protéico da calpastatina, o inibidor endógeno das calpaínas, não tenha sido alterado.

Esses resultados indicam que a desnervação simpática lombar exerce efeitos distintos de acordo com o tipo de músculo estudado. Em músculos tipicamente glicolíticos como o EDL, a depleção aguda de noradrenalina muscular causa hipersensibilidade adrenérgica, sendo muito provavelmente o aumento do AMPc intracelular o mecanismo responsável pela redução da atividade e expressão de componentes do sistema proteolítico dependente de Ub-proteassoma e da autofagia. Em músculos oxidativos como o *soleus*, a falta da ação simpática local parece ser a principal responsável pelo aumento da atividade máxima do sistema proteolítico dependente de Ca^{+2} e do aumento conteúdo da μ -calpaína.

Genética

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E/OU GENOTÓXICA DOS FITOTERÁPICOS *Echinodorus grandiflorus* MITCH. E *Cordia ecalyculata* VELL. E DOS FÁRMACOS FEMPROPorex, SIBUTRAMINA E DIETILPROPIONA USADOS PARA O TRATAMENTO DA OBESIDADE

Cristiano José da Silva

Orientador: Prof. Dr. Catarina Satie Takahashi

Tese de Doutorado apresentada em 08/04/2010

A *Cordia ecalyculata* Vell. e *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltdl.) Micheli são espécies amplamente utilizadas no Brasil como preparações terapêuticas por grupos indígenas e população em geral. Estas plantas têm sido utilizadas na medicina popular como tônico, diurético, antiinflamatórios supressores de apetite, para o tratamento de picadas de cobra, e perda de peso. Neste estudo, verificou-se os possíveis efeitos citotóxicos e genotóxicos dos extratos de *Cordia ecalyculata* e *Echinodorus grandiflorus*, bem como a sua eficácia no tratamento da obesidade. O Teste de Micronúcleos foi utilizado para a avaliação de possíveis efeitos clastogênicos/aneugênicos e o Ensaio Cometa foi utilizado para a avaliação de quebras na fita DNA. Os efeitos citotóxicos dos extratos brutos foram verificados pela razão PCE/NCE e camundongos Swiss (*Mus musculus*) foram utilizados como modelo experimental. Observou-se significativo aumento ($P < 0,05$), independente da dose, na frequência média de micronúcleos em eritrócitos do sangue periférico nos camundongos tratados com extrato de *C. ecalyculata* ou de *E. grandiflorus*, em comparação com o controle negativo. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) na frequência de micronúcleos de eritrócitos policromáticos, tratados com os extratos. Observamos que o tratamento com o extrato de *C. ecalyculata* nas concentrações de 1000 e 2000 mg / kgm.c resultou em uma proporção PCE / NCE maior ($P < 0,05$) que a do controle negativo. Após 15 dias de tratamento diário, com dose de 2000 mg / kg m.c de fitoterápicos não houve redução do ganho de massa corporal, nem na quantidade de alimento consumido por camundongos Swiss quando comparado com o controle negativo ($P > 0,05$). Os resultados deste estudo permitem inferir que os extratos de *Cordia ecalyculata* e *Echinodorus grandiflorus* não exibem atividade citotóxica ou genotóxica. Entretanto, eles possuem fraca atividade clastogênica/aneugênica (sem significância) em células do sangue periférico. Ao contrário de algumas crenças populares foi encontrado neste estudo que os extratos não são eficazes para o tratamento da obesidade. Medicamentos antiobesidade merecem considerações especiais no presente momento devido a um número crescente de pessoas com sobrepeso e obesos que necessitam destas terapêuticas alternativas. A obesidade está positivamente associada com várias doenças crônicas, incluindo câncer. Neste trabalho, também avaliamos possíveis ações genotóxico e / ou citotóxica de dois anorexígenos, a sibutramina e o femproporex, nas doses de 10, 20 e 40 mg / kg de m.c, administrados intraperitonealmente em camundongos Swiss machos. O efeito genotóxico foi analisado pelo Ensaio Cometa e Teste do Micronúcleo. Descobrimos que ambos os medicamentos aumentaram a frequência de danos genotóxico sem camundongos Swiss, mas não apresentaram atividade citotóxica para eritrócitos policromáticos da medula óssea destes animais. Nos tratamentos *in vitro* os fármacos sibutramina, femproporex e dietilpropiona induziram danos genotóxicos, enquanto os fitoterápicos *Cordia ecalyculata* e *Echinodorus grandiflorus* induziram apenas fraca atividade genotóxica. Verificamos também que a dietilpropiona interfere na viabilidade de células CHO, aumentando o índice de apoptose. O estudo comparativo para verificar a sensibilidade do equipamento de eletroforese (para Ensaio Cometa) desenvolvido em nosso laboratório, confirmou por meio da avaliação de três substâncias genotóxicas (doxorubicina, etoposido e cloridrato de epirrubicina), que o equipamento apresenta sensibilidade similar ao usado convencionalmente. Para avaliação dos dados deste trabalho usamos os testes estatísticos ANOVA e teste *t de Student*.

AVALIAÇÃO DOS DANOS NO DNA E DO GRAU DE RECUPERAÇÃO CELULAR EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA

Aline Poersch

Orientadora: Profa. Dra. Catarina Satie Takahashi

Tese de Doutorado apresentada em 09/04/2010

A resistência a drogas é considerada o maior impedimento ao sucesso da quimioterapia no tratamento do câncer, e a busca por um método que prediga a resposta individual à quimioterapia ou o resultado prévio do tratamento é muito intensa. Além disso, diferenças substanciais interindividuais são vistas em muitos tratamentos quimioterápicos de câncer, tanto na resposta clínica como na toxicidade. O maior conhecimento da estrutura e função dos genes humanos, dos efeitos das drogas usadas na quimioterapia e da resposta terapêutica a tal tratamento, certamente irá contribuir na quantificação do risco individual, diagnóstico, prognóstico e tratamento do câncer. Os objetivos deste estudo foram avaliar, *in vitro*, a indução de danos no DNA e a recuperação ou sensibilidade celular adquirida frente aos quimioterápicos docetaxel e epirubicina em pacientes com câncer de mama (CM) e em mulheres saudáveis pelo Teste do Micronúcleo (MN), Índice de Divisão Nuclear (IDN) e Ensaio Cometa; determinar a frequência dos polimorfismos gênicos *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3* e *GSTO1*A140D* pela técnica PCR-RFLP em todos os indivíduos coletados e verificar se existe associação destes polimorfismos com a suscetibilidade ao CM; correlacionar a indução de danos no DNA e a recuperação celular com os genomas individuais relacionados aos polimorfismos gênicos *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3* e *GSTO1*A140D* e relacionar os dados obtidos *in vitro* e os polimorfismos gênicos com a resposta patológica das pacientes com CM após o término do tratamento quimioterápico. Nos estudos citogenéticos *in vitro* foram realizados cinco tipos de tratamentos: controle negativo, controle de solvente, docetaxel, epirubicina e docetaxel + epirubicina. No Ensaio Cometa, três amostras celulares foram analisadas: imediatamente antes do início do tratamento (T0), imediatamente após o término do tratamento (T1) e quatro horas após o término do tratamento (T2). Foram coletadas 168 amostras de pacientes com CM para análise molecular, sendo que 20 destas amostras foram avaliadas também citogeneticamente, e 187 amostras de mulheres saudáveis, das quais 40 também foram avaliadas citogeneticamente. Em relação ao polimorfismo *CYP3A4*1B*, foi verificada a frequência de 100% do genótipo mais frequente (AA). Quanto ao polimorfismo *CYP3A5*3*, as frequências genotípicas e alélicas não diferiram significativamente entre pacientes e mulheres saudáveis. Para o polimorfismo *GSTO1*A140D*, foi observada diferença significativa entre pacientes e mulheres saudáveis somente para o genótipo homocigoto polimórfico (AA). Portanto, não foi verificada associação significativa dos polimorfismos *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3* e *GSTO1*A140D* com o risco de desenvolvimento de CM, assim como com a resposta patológica após a quimioterapia neoadjuvante. Além disso, os diferentes genótipos estudados não mostraram associação com os resultados obtidos nos testes citogenéticos utilizados. No Teste do MN, foi observado que pacientes com CM e mulheres saudáveis diferem significativamente quanto à frequência de MNs em todos os tipos de tratamentos utilizados, indicando diferenças quanto à frequência basal de MNs e quanto à indução de danos no DNA. Nas pacientes com CM, ocorreu um acúmulo significativo de danos no DNA durante o tratamento quimioterápico e a idade exerceu influência somente sobre mulheres saudáveis, onde mulheres acima de 45 anos possuem frequência basal de MNs significativamente maior do que mulheres com idade até 45 anos. De acordo com os resultados obtidos no Teste do MN, pacientes com CM fumantes mostraram-se mais suscetíveis aos danos induzidos pelo docetaxel e epirubicina. Não foi observada correlação entre frequência de MNs e a resposta patológica das pacientes com CM submetidas à quimioterapia neoadjuvante. Pacientes com CM apresentaram valores de IDN significativamente menores do que mulheres saudáveis em todos os tratamentos utilizados e ocorreu uma redução significativa dos valores de IDN durante o tratamento quimioterápico. A idade, o hábito tabagista, os diferentes genótipos analisados não apresentaram correlação com os valores de IDN observados, assim como com os valores de escore de dano (ED) no Ensaio Cometa. No Ensaio Cometa não foram observadas diferenças significativas entre pacientes com CM e mulheres saudáveis nos tratamentos realizados, assim como não foram observadas diferenças significativas entre as amostras coletadas durante a quimioterapia, embora tenha ocorrido um aumento gradual dos valores do ED. Além disso, não houve redução significativa do ED após quatro horas de incubação (T2) nos dois grupos de estudo, e pacientes com doença residual mínima e resposta patológica completa possuem valores de ED significativamente menores que pacientes com doença residual extensa antes de iniciar o tratamento quimioterápico.

ABORDAGEM COMPUTACIONAL PARA IDENTIFICAR VIAS METABÓLICAS AFETADAS POR MIRNAS

Alyne Oya e Chiromatz

Orientador: Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior

Tese de Doutorado apresentada em 09/04/2010

MiRNAs são pequenas moléculas de RNAs endógenos não codificantes com aproximadamente 23nt que atuam na regulação da expressão gênica. A sua função é inibir a tradução de genes transcritos através de um mecanismo que viabiliza a ligação do miRNA com o mRNA alvo levando à inibição da tradução ou a degradação do RNA mensageiro. Estudos evidenciam a relação dos miRNAs com diversos processos biológicos como proliferação celular, diferenciação, desenvolvimento e doenças. Uma vez que estão envolvidos na regulação gênica, também alteram as vias metabólicas. Atualmente, as ferramentas computacionais disponíveis para o estudo dos miRNAs são o miRBase, microCosm, o miRGen e o miRNAmmap. Elas possuem informações sobre as sequências dos miRNAs, genes alvos e sobre elementos que estão próximos à região dos miRNAs. Embora o avanço até o momento, não existia que relacionasse os miRNAs com as vias metabólicas, para isso foi construída a plataforma miRNApath que auxilia no estudo da função dos miRNAs por meio da análise do seus alvos dentro vias metabólicas. De modo semelhante, também não existia uma abordagem que relacione dados de expressão miRNAs e seus alvos dentro de um mesmo experimento. Para tanto, neste trabalho foi feita uma abordagem utilizando bibliotecas de SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) que será incorporada no miRNApath. O miRNApath encontra-se disponível em <http://lgbm.fmrp.usp.br/mirnapath>.

ALTERAÇÕES GENÉTICAS EM LINFÓCITOS DE PACIENTES IDOSOS PORTADORES DA SÍNDROME DA FRAGILIDADE

Danilo Lucas Alves Espósito

Orientadora: Profa. Dra. Elza Tiemi Sakamoto Hojo

Dissertação de Mestrado apresentada em 09/04/2010

A síndrome da fragilidade é geralmente definida como um quadro clínico de fraqueza e vulnerabilidade que atinge pessoas de idade acima de 65 anos, sendo que os principais sintomas são relacionados com a atividade motora, afetando tanto o sistema muscular quanto nervoso. Pouco se sabe acerca dos mecanismos fisiológicos e moleculares relacionados com a fragilidade em idosos, sendo que a hipótese mais provável é que o acúmulo de dano oxidativo nas células dos pacientes pode constituir um fator importante capaz de contribuir para o desenvolvimento da síndrome. Neste trabalho foram avaliadas as respostas celulares frente a um agente indutor de danos oxidativos, o peróxido de hidrogênio, em linfócitos de idosos frágeis e sadios, por meio do ensaio do cometa, abordando aspectos da dinâmica de reparo dessas lesões. Além disso, os danos no DNA foram também avaliados pelo ensaio do cometa na presença da enzima hOGG1, responsável pelo reparo de 8-oxo-Guanina. Para tanto, foram analisados os linfócitos provenientes de um total de 16 indivíduos, sendo oito controles e oito pacientes. Não foi encontrada nenhuma diferença significativa para o montante de danos basais entre os dois grupos estudados, mas sob tratamento com hOGG1, os indivíduos caracterizados frágeis apresentaram um valor significativamente maior do que os controles em relação aos danos acumulados, sugerindo uma possível ineficácia dos processos moleculares responsáveis pela remoção dessas lesões ou um retardo no reparo das mesmas. Para avaliar a cinética de reparo das lesões oxidativas pelo ensaio do cometa, os linfócitos dos grupos estudados foram tratados com um agente genotóxico, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). As culturas foram analisadas em três tempos diferentes, logo após a indução (T0), duas e quatro horas após a remoção da H₂O₂ (T1 e T2, respectivamente). Os indivíduos frágeis demonstraram uma maior sensibilidade ao peróxido de hidrogênio no parâmetro momento da cauda do cometa, mostrando uma diferença significativa comparativamente ao grupo controle. Em contrapartida, a eficiência de reparo dos linfócitos desses pacientes encontrou-se diminuída quando verificada a quantidade total de danos remanescentes no DNA após duas horas da remoção do agente genotóxico. Não houve diferença significativa entre os tempos de 2 e 4 horas. Os níveis de expressão gênica transcricional foram estudados para alguns genes participantes do mecanismo de defesa anti-oxidante e reparo de danos oxidativos no DNA, sendo que estes mostraram expressão diferencial na comparação pacientes frágeis versus sadios. SOD1(0,5) e FEN1 (0,18) foram encontrados induzidos, enquanto XRCC1 (-0,39), APEX1 (-0,65) e OGG1 (-0,95), reprimidos. Estes resultados refletem alterações na via de reparo BER que podem provavelmente ter contribuído para o quadro de fragilidade dos pacientes. Os resultados obtidos na análise de expressão gênica por microarrays revelaram uma lista de 571 genes diferencialmente expressos (análise pelo método SAM: *Significance Analysis of Microarray*), sendo 300 genes reprimidos e 271 induzidos, para valores de *False Discovery Rate* (FDR) ≤ 1%. O agrupamento hierárquico mostrou uma separação distinta entre os pacientes e controles. Os genes modulados partici-

pam de diversos processos celulares que podem contribuir para o fenótipo dos pacientes, como reparo do DNA (*BTG2*, *RAD51L3*, *ERCC5*, *ERCC1*, *SMC1L1*, *MHL3*, *XRCC3*, *PCBP4*, *RAD52*, *TRRAP*, *PRKDC*, *H2AFX*, *POL4*, *RFC5*, *REVL3* e *MLH1*), genes de resposta ao estresse (*SESNI*, *POLH*, *RFC5*, *CDH13*, *REV3L*, *WRNIP1*, *H2AFX*, *RAD52*, *GSTM3*, *MLH1*, *PRKDC*, *CAV1*, *HTRA2*, *CAT*) e do sistema Ubiquitina-Proteassoma (*HSPs*, *NEDD4L*, *WDSUB1*, *UBE3A*, *UBE2E1*, *TRAP1*, *RNF2*, *PSMA5*, *FBXO4*, *ANAPC7*, *RNF128*, *PSMD10*, *RNF138*, *RNF144*, *PIAS1*, *HERC1*, *FBXL11*, *FBXL3*, *RNF149* e *FBXL5*). Assim, uma lista de genes candidatos a marcadores biológicos foi obtida no presente trabalho, sendo que esses genes merecem uma investigação mais detalhada, visto que a elucidação dos papéis de cada um poderá contribuir para a compreensão dos mecanismos que desencadeiam a síndrome da fragilidade em indivíduos idosos.

SCII: (*Stigma/style Cell-cycle Inhibitor 1*): ANÁLISE *in silico* DA SEQUÊNCIA GENÔMICA DE *Nicotiana tabacum* E ESTUDO DE PARCEIROS DE INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA

Edward José Strini

Orientadora: Profa. Dra. Maria Helena de Souza Goldman

Dissertação de Mestrado apresentada em 23/04/2010

O sucesso reprodutivo das plantas é dependente do correto desenvolvimento dos órgãos sexuais, como o pistilo, o qual é coordenado por vias moleculares complexas que controlam a proliferação e a diferenciação celular. Em nosso laboratório foi caracterizado o gene SCII de *Nicotiana tabacum*, que codifica um inibidor de ciclo celular, importante no controle da proliferação/diferenciação celular nos tecidos do estigma e estilete, nos estádios iniciais do desenvolvimento floral. A sequência de aminoácidos revela que o gene codifica uma pequena proteína rica em lisina, com dois domínios putativos de interação com ciclinas e 15 sítios putativos de fosforilação. Experimentos com a proteína fusionada a GFP demonstraram que a proteína apresenta localização nuclear (De Paoli et al., submetido). Para compreender a estrutura gênica de SCII, sua sequência genômica foi estudada. A análise desta sequência revelou a presença de 4 *exons* e 3 *introns*, assim como seu homólogo em *Arabidopsis thaliana*. A comparação das sequências dos cDNAs disponíveis com as sequências genômicas permite concluir que existem 2 sequências muito similares, mas distintas, para o gene SCII em *N. tabacum*. Esta espécie é alotetraplóide e, provavelmente, estas 2 sequências correspondem a genes homeólogos originados das espécies ancestrais *N. sylvestris* e *N. tomentosiformis*. A presença de muitos elementos cis regulatórios, dispersos pela sequência genômica, sugere que SCII é regulado de forma complexa, incluindo as vias de controle do ciclo celular e de resposta à auxina. Com a finalidade de entender como SCII exerce suas funções no controle da proliferação/diferenciação celular, foram realizados ensaios de duplo-híbrido e *pull-down* para investigar proteínas-candidatas a interagirem com SCII. Em ensaios de duplo-híbrido, testes foram conduzidos utilizando-se SCII como isca e seus possíveis parceiros de interação como presas. Dentre estas, foram testadas: proteínas do ciclo celular, como MAPK, ciclinaA1;1, ciclinaA2;2, ciclinaA2;2 (com D-box deletado), ciclinaD3;2 e CDKA. Além destas, a proteína AGAMOUS também foi utilizada devido o seu importante papel na diferenciação do pistilo. Apesar de pouco conclusivos, os testes de duplo-híbrido, utilizando SCII como isca, indicaram uma interação fraca desta proteína com MAPK, sugerindo que SCII possa ser fosforilado por esta quinase. A interação da proteína recombinante SCI, sintetizada em células de *E. coli* BL31(DE)-Rosetta, com proteínas extraídas de estigmas e estiletos de plantas transgênicas de *N. tabacum* com SCII silenciado, foi investigada a partir de ensaios de *pull-down*. As proteínas que formaram complexos com SCII foram identificadas por espectrometria de massa, revelando resultados interessantes. A identificação de uma fosfatase ácida é mais um indicativo de que SCII possa ser regulado pela adição e subtração de grupamentos fosfato. Em suma, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a expressão do gene SCII é regulada pelas vias de controle do ciclo celular e de resposta à auxina, e que a proteína SCII sofra fosforilações e defosforilações para realizar suas funções no controle da proliferação/diferenciação celular nos tecidos do estigma e estilete, durante o desenvolvimento do pistilo.

PERFIL DE EXPRESSÃO DOS GENES DA CASCATA DE DETERMINAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO SEXUAL NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E LARVAL DE *Apis mellifera* (HYMENOPTERA: APIDAE)

Flávia Cristina de Paula Freitas

Orientadora: Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões

Dissertação de Mestrado apresentada em 30/04/2010

A determinação do sexo é um dos principais eventos do desenvolvimento em metazóários superiores. Após a decisão do destino sexual, inicia-se a diferenciação que determina características morfológicas, fisiológicas e comporta-

mentais. O sinal inicial varia entre os grupos, mas os sinais terminais são conservados entre os metazoários. doublesex está entre os genes mais conservados da cascata de determinação do sexo em insetos. Este gene codifica um fator de transcrição do tipo zinc-finger que regula a transcrição sexo-específica de vários genes-alvo. Em *Apis mellifera*, o sinal inicial da cascata de determinação do sexo é resultante da composição alélica do gene o *complementary sex determiner* (*csd*): se o embrião em desenvolvimento for heterozigoto, desenvolve-se em fêmea, se for hemizigoto ou homozigoto, desenvolve-se em macho. O produto do gene *csd* regula o processamento do pré-mRNA do gene *feminizer* (*fem*), que apresenta transcritos sexo-específicos. Acredita-se que o gene *fem* esteja envolvido na regulação do processamento dos transcritos do gene *amdsx*. Em insetos, o pré-mRNA de *dsx* sofre processamento alternativo nos sexos que determina variações na estrutura do fator de transcrição DSX e consequente regulação diferencial em machos e fêmeas. Faltam evidências, no entanto, para determinação da função do *dsx* em abelhas, em particular sobre a expressão desse gene e de outros genes envolvidos na cascata de determinação sexual. Assim, o objetivo deste trabalho foi a caracterização da expressão das variantes de *amdsx* e outros genes da cascata de determinação e diferenciação sexual (*csd*, *fem*, *dachshund* e *intersex*) no desenvolvimento embrionário e larval. De modo geral, os genes estudados apresentam perfis de expressão antagônicos nos sexos e castas. Nossos resultados se contrapõem à ideia da expressão sexo-específica das variantes do gene *amdsx*. É possível dizer que os genes aqui estudados, em especial no desenvolvimento embrionário, apresentam expressão sexualmente dimórfica. Nossos dados sugerem, portanto, que a diferenciação sexual em abelhas ocorre pela expressão diferencial dos genes.

CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DE NANOTUBOS DE CARBONO PURIFICADOS E NÃO PURIFICADOS, SINTETIZADOS POR DEPOSIÇÃO QUÍMICA DE VAPOR, EM LINHAGEM DE FIBROBLASTOS DE PULMÃO DE HAMSTER CHINÊS (V79)

Leonardo Pereira Franchi

Orientadora: Profa. Dra. Catarina Satie Takahashi

Dissertação de Mestrado apresentada em 30/04/2010

Muitas nanoestruturas vêm sendo desenvolvidas, e atualmente uma das áreas de maior atividade e o estudo de nanotubos de carbono (CNT). Os CNT consistem exclusivamente de átomos de carbono arranjados em uma série de anéis benzeno condensados em uma estrutura tubular, com diâmetro em escala nanométrica. Existem diferentes tipos de nanotubos, dentre eles podem-se destacar os: (i) nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) e, (ii) nanotubos de carbono "cup-stacked" (CSCNT), ainda pouco estudados, que consistem de múltiplas camadas de grafeno arranjados em forma de cone, as quais exibem pontas abertas em sua superfície externa e um canal central vazio. Muitas aplicações biológicas foram propostas para os CNT incluindo biosensores, veiculadores de drogas e vacinas entre outros biomateriais. Contudo, antes que estes materiais possam ser incorporados, há a necessidade de se conhecer seus efeitos citotóxicos e genotóxicos. No presente trabalho, avaliaram-se os efeitos de amostras purificadas (MWCNT e CSCNT_{pu}) e amostras não purificadas de CNT (CSCNT_{np} - contendo Co e Mn como resíduos metálicos e CSCNT_{Fe} contendo Ferro como resíduos), sintetizadas pelo método CVD, sob a viabilidade celular (kit XTT Roche), capacidade de formação de colônias e, indução de danos no DNA (ensaio Cometa e teste do Micronúcleo) em células V79. Após 24 h do tratamento, observou-se uma redução significativa ($p < 0,05$) da viabilidade celular para todos os CNT testados em concentrações maiores ou iguais a 25 $\mu\text{g/mL}$. Apesar desta citotoxicidade inicial, com o aumento do tempo pós-exposição as células V79 mostraram uma recuperação da viabilidade celular. Além disso, CSCNT_{pu} e CSCNT_{np} apresentaram o maior efeito sobre a viabilidade celular, que podem ser explicadas pelas características físico-químicas destes tubos e da presença dos catalisadores metálicos cobalto e manganês. A capacidade de formar colônias também foi afetada pelos CNT testados. Após 7 dias de exposição, o número de colônias foi reduzido ($p < 0,05$) em cerca de: 35 e 52% por 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ de MWCNT; 29% por 50 $\mu\text{g/mL}$ de CSCNT_{pu}; e 55, 66, 94 e 99% por 6,25, 12,5, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ de CSCNT_{np}, respectivamente. CSCNT_{Fe} não demonstrou reduções significativas no número de colônias. MWCNT e CSCNT_{np} avaliados pelo ensaio Cometa não induziram um aumento significativo de quebras no DNA. Já quando os danos oxidativos foram avaliados, por meio do emprego das enzimas hOGG1 e Endo III observamos um aumento significativo de danos no DNA. Em baixas concentrações (1.5 a 12.5 $\mu\text{g/mL}$) MWCNT, CSCNT_{pu}, CSCNT_{np} e CSCNT_{Fe} não afetaram o índice de divisão nuclear. MWCNT induziu ($p < 0,05$) uma frequência de 42 micronúcleos nas concentrações de 6.25 e 12.5 $\mu\text{g/mL}$. Levando-se em conta que não houve um aumento proeminente de quebras no DNA induzidas (detectadas pelo ensaio Cometa) por MWCNT, pode ser definido que uma atividade clastogênica/aneugênica caracteriza o mecanismo de ação de MWCNT. MWCNT também aumentou discretamente a frequência de pontes nucleoplasmáticas, e um aumento significativo foi observado na concentração de 3.125 $\mu\text{g/mL}$ de CSCNT_{pu}. Indicando que estes CNT estão envolvidos na indução de quebras e rearranjos cromossômicos em células V79. Em conjunto, os resultados apontam para uma resposta geral positiva na indução de danos no DNA.

DIVERSIDADE GENÉTICA EM AGREGAÇÕES DE *Nannotrigona testaceicornis* COCKERELL, 1922 (*Hymenoptera, Apidae, Meliponini*) ATRAVÉS DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

Aline Simoneti Fonseca

Orientador: Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares

Dissertação de Mestrado apresentada em 12/05/2010

As abelhas são insetos da ordem *Hymenoptera* e taxonomicamente estão reunidas na superfamília Apoidea. Os *Meliponini*, da subfamília Apinae, são popularmente chamados abelhas indígenas sem ferrão e algumas espécies são essenciais para a polinização de plantas selvagens e lavouras. As abelhas *Nannotrigona testaceicornis*, utilizadas neste trabalho, são pequenas, possuem o tórax marrom escuro e opaco e não são agressivas. No Brasil, elas são encontradas na Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo. Assim como muitas espécies de *Hymenoptera*, elas também podem nidificar em agregações e analisar a variabilidade genética dentro e entre os agregados foi um dos objetivos deste trabalho, além de avaliar os prováveis múltiplos acasalamentos que parecem ocorrer dentro dessa espécie de meliponíneos. Para tanto, foram coletados indivíduos de ninhos de *N. testaceicornis* no Campus da USP de Ribeirão Preto (SP), Campinas (SP), Bonfim Paulista (SP), Uberlândia (MG) e Caratinga (MG). 302 indivíduos (operárias) de um total de 32 ninhos foram macerados e tiveram seu DNA extraído. Foram utilizados oito *loci* microssatélites específicos para o estudo da variabilidade genética e múltiplos acasalamentos. Um total de 38 alelos foi observado. A diversidade genética média entre as agregações foi de 35,4%, a heterozigose média esperada foi de 41,4% e a observada foi de 28,3%. O coeficiente de endogamia (*Fis*) foi estatisticamente significativo para todas as agregações. Também foram observados desvios no equilíbrio de **Hardy-Weinberg** para todos os *loci* analisados. A análise do *Fst* mostrou diferenciação entre as agregações, porém, apesar da indicação pelo AMOVA de uma discreta estruturação entre as agregações, não foi possível agrupá-las. A partir dos dados obtidos foi possível observar que a diversidade genética nestas agregações está baixa, além disso, os desvios do equilíbrio, o valor significativo do *Fis*, e a heterozigose observada menor do que a esperada em todos os *loci* demonstrou a ocorrência de cruzamentos endogâmicos resultando em alto nível de homozigose nesta população. Com relação aos múltiplos acasalamentos, dos 32 ninhos estudados, somente 11 (34,4%) apresentaram uma patrilinea. A presença de alelos nulos, a inclusão acidental de machos na amostra, mudanças recentes de rainhas, operárias de outros ninhos e a contínua conexão entre ninho mãe-filho podem ser possibilidades para estes resultados, entretanto, a frequência de mais de uma patrilinea é muito alta para que a poliandria não seja considerada.

Loci DE SUSCETIBILIDADE GENÉTICA À ARTRITE REUMATOIDE ESTABELECEM REDES DE REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL COM OUTROS GENES

Guilherme da Silva Liberato

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Aleixo da Silva Passos Jr.

Dissertação de Mestrado apresentada em 19/05/2010

Estudos recentes de *linkage* permitiram identificar as regiões cromossômicas potencialmente associadas à ocorrência da artrite reumatoide (AR), tendo destaque o antígeno leucocitário humano (HLA)-DRB1, localizado no *locus* de suscetibilidade (LS) 6p21.3. No entanto, estima-se que sua contribuição seja parcial, de maneira que outros genes fora da região HLA desempenhem um importante papel na suscetibilidade à AR. Para testar esta hipótese, a tecnologia de cDNA *microarrays* foi utilizada para acessar o perfil transcricional de células mononucleares do sangue periférico de 15 pacientes com AR, os quais foram agrupados de acordo com seus padrões clínicos e moleculares, além do tipo de medicamento recebido. Por meio de programas de Bioinformática, foi possível identificar quais são os genes diferencialmente expressos, bem como reconstruir as interações regulatórias realizadas pelos respectivos mRNAs. Para cada grupo de pacientes, as redes de regulação transcricional resultantes demonstram *loci* de suscetibilidade interagindo com outros genes, como é o caso do FNDC3A (*fibronectin type III domain containing 3A*), cujos níveis de expressão gênica parecem depender da modulação de HLA-DRB1. Dado que fragmentos de fibronectina podem estimular mediadores da destruição de cartilagem e matriz extracelular, a evidência desta interação pode ajudar a elucidar a influência do HLA-DRB1 sobre a patogênese da AR.

COLINEARIDADE DE TRANSCRIPTOMAS DURANTE A DIFERENCIAÇÃO OSTEABLÁSTICA DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS ADULTAS HUMANAS E MURINAS

Janaina de Andréa Dernowsek

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Aleixo da Silva Passos Junior

Dissertação de Mestrado apresentada em 20/05/2010

As **células-tronco**, em termos funcionais, são definidas como células dotadas de capacidade de auto-renovação que estão no topo da hierarquia de uma linhagem e principalmente são capazes de gerar células diferenciadas de um dado tecido. Dentre as células-tronco adultas, as *mesenquimais* ocupam posição de destaque. São células multipotentes que podem originar células de origem mesodérmica, como osteoblastos, adipócitos e condrócitos. Além disso, essas células também podem se diferenciar em células de origem extra-mesenquimal, como neurônios e hepatócitos, fenômeno este denominado de *plasticidade*. O uso das células-tronco representa, no momento, grande esperança na medicina regenerativa devido a perspectiva de se reparar a perda de tecidos e/ou até mesmos órgãos nobres do corpo. Entretanto, o entendimento das bases genético-moleculares da diferenciação dessas células é ainda objeto de estudos. Precisamos de modelos experimentais adequados para estudarmos a expressão de genes que controlam a diferenciação celular. A medula óssea humana é fonte rica de células tronco mesenquimais e se prestam para esses estudos, mas por motivos óbvios, são de difícil obtenção. Como o camundongo *Mus musculus* representa um organismo modelo para estudos de genética molecular cujos resultados podem ser inferidos à espécie humana, decidimos realizar um estudo comparativo entre células tronco humanas e de camundongos na tentativa de melhor definirmos e adequar o sistema-modelo murino aos estudos moleculares de diferenciação celular. A evolução da expressão de genes conectada às suas mudanças evolutivas e de fenótipos é de fundamental importância para estimar a *taxa de evolução da expressão gênica*. Concebemos que comparando a expressão gênica de células tronco humanas e murinas poderemos melhor elucidar os mecanismos moleculares ainda obscuros responsáveis pela evolução do *transcriptoma*. No caso do presente trabalho da evolução do transcriptoma da diferenciação *osteoblástica* (diferenciação óssea) de células tronco mesenquimais. A sintenia compartilhada é um dos critérios mais confiáveis para o estabelecimento da ortologia de regiões genômicas entre espécies diferentes. Além disso, a conservação excepcional de sintenia pode refletir importantes relações funcionais entre os genes. Durante a concepção do presente trabalho, formulamos a hipótese que devido à colinearidade dos genomas humano e murino (*M. musculus*), é possível encontrar áreas cromossômicas conservadas que exibem um perfil transcricional próximo durante a diferenciação celular. Para isso, montamos o sistema-modelo experimental no qual células-tronco mesenquimais de medula óssea humana e murina foram cultivadas *in vitro* e induzidas quimicamente à diferenciação em osteoblastos (meio α -MEM acrescido de dexametasona, ácido ascórbico e β -glicerosfosfato). Análises morfológicas, bioquímicas e de expressão transcricional foram realizadas em tempos pré determinados. O RNA total foi extraído das culturas de células tronco indiferenciadas (0 hora) e durante o processo de diferenciação (24 horas a 21 dias em cultura). Todo o processo de diferenciação foi monitorado com ensaios bioquímicos e por imunocitoquímica para a detecção de marcadores funcionais de diferenciação osteoblástica, como por exemplo a fosfatase alcalina. Para avaliar a expressão gênica transcricional das células tronco e durante o processo de diferenciação utilizamos a tecnologia dos microarrays e PCR em tempo real. Os dados de *microarrays* foram analisados com o auxílio de programas de bioinformática especializados como SAM (*significance analysis of microarrays*), *Cluster-TreeView* e *GeneNetwork*. Observamos a existência de vários genes com perfil de expressão semelhante entre células humanas e murinas. Para termos acesso às possíveis interações entre os genes expressos e envolvidos com o processo de diferenciação re-analisamos os dados utilizando o programa *GeneNetwork*, o que permitiu a reconstrução de redes transcricionais a partir dos dados atuais de microarrays. As então chamadas "redes gênicas" permitiram identificar nós gênicos particulares e comuns entre as espécies estudadas. Dentre os nós gênicos comuns estão o hHDHD1A (humano) (cromossomo X), Hdhd1a (murino) (cromossomo 18) e o hSCUBE3 (humano) (cromossomo 6), cScube3 (murino) (cromossomo 17). O gene SCUBE3 que codifica uma proteína que possui o domínio CUB-EGF - peptídeo sinal altamente conservada e que exhibe alta expressão em osteoblastos primários e ossos longos. Além disso, observamos os nós gênicos COL1A2 (cromossomo 7) (Col1a2) (cromossomo 6), FN1 (cromossomo 2) (Fn1) (cromossomo 1), MYH9 (cromossomo 22) (Myh9) (cromossomo 15), PDXP (cromossomo 22) (Pdxp) (cromossomo 15) e TXNL2 (cromossomo 10) (Txnl2) (cromossomo 7), os quais estão relacionados à osteogênese. Nossas análises comparativas de dados do transcriptoma entre células tronco mesenquimais humanas e murinas, colhidas de medula óssea, permitiram evidenciar que eventos genético-moleculares essenciais à diferenciação osteoblástica são semelhantes entre as duas espécies. Portanto, para estudos básicos da biologia molecular da diferenciação óssea o sistema-modelo murino é adequado. Além disso, nossos resultados são importantes para evidenciar a colinearidade de transcriptomas, pelo menos nesse particular, de células tronco mesenquimais humanas e murinas.

ESTRUTURA POPULACIONAL E FILOGEOGRAFIA DE *Drosophila meridionalis* (DIPTERA, DROSOPHILIDAE)

Érica Cristina de carvalho Bernardi

Orientadora: Profa. Dra. Maura Helena Manfrim
Tese de Doutorado apresentada em 14/06/2010

Drosophila meridionalis (grupo *D. repleta*, subgrupo *D. mulleri*) é uma espécie cactófila, endêmica da América do Sul, cujas populações, geralmente, encontram-se geograficamente isoladas. Estudos citogenéticos revelaram a existência de variação cariotípica entre suas populações, sendo descritos cinco cariótipos distintos, que diferem em relação à quantidade e distribuição de heterocromatina constitutiva nos microcromossomos. Embora potencialmente adequada, *D. meridionalis*, até o momento, não foi utilizada como modelo em pesquisas sobre os processos de diferenciação populacional e especiação. Neste trabalho, foram analisados 226 indivíduos, provenientes de 27 populações de *D. meridionalis*. As análises populacionais, utilizando 188 sequências de 642 pares de base do gene mitocondrial COI, mostraram a existência de três linhagens evolutivas dentro da unidade taxonômica atualmente reconhecida como *D. meridionalis*. A linhagem A ocorre no interior dos estados de São Paulo e do Paraná, e no litoral de Santa Catarina e de São Paulo; a linhagem B ocorre no interior e litoral do estado do Rio Grande do Sul e litoral de Santa Catarina; e a linhagem C está distribuída desde o litoral do estado de Santa Catarina até o interior da Bahia. As relações filogenéticas estabelecidas para as populações analisadas sugerem que a linhagem B é um grupo parafilético em relação à linhagem C. As análises filogeográficas detectaram eventos de expansão populacional em todas as linhagens. Esses eventos são similares aos sugeridos em estudos anteriores para explicar a distribuição geográfica de espécies do "cluster" *D. buzzatii*, que ocorrem em simpatria com as linhagens de *D. meridionalis*. Devido às restrições ecológicas, pode-se esperar que tanto as populações das espécies do "cluster" *D. buzzatii*, quanto as populações da espécie nominal *D. meridionalis*, tenham sido influenciadas de maneira similar por eventos vicariantes e pelas alterações na distribuição dos cactos, devido a eventos paleoclimáticos, na América do Sul. A análise morfométrica de 208 asas mostrou que existe diferenciação morfológica entre as populações de *D. meridionalis*, corroborando a existência das linhagens A, B e C, assim como a maior proximidade evolutiva entre as linhagens B e C. Estudos adicionais das populações da espécie politípica *D. meridionalis*, como, por exemplo, o estudo do isolamento reprodutivo entre populações representativas de cada uma das três linhagens evolutivas, auxiliarão na definição taxonômica dessas linhagens dentro do complexo *D. meridiana* do subgrupo *D. mulleri*.

PADRÃO DE METILAÇÃO DA KVDMR E DA H19DMR EM MULHERES COM PRÉ-ECLÂPSIA

Karine Coleho

Orientadora: Profa. Dra. Ester Silveira Ramos
Dissertação de Mestrado apresentada em 18/06/2010

As síndromes hipertensivas gestacionais estão entre as maiores causas de morte materna e fetal. Entre elas destaca-se a pré-eclâmpsia (PE), caracterizada pelo aumento da pressão arterial e proteinúria, a partir da 20ª semana de gestação. Embora sua etiologia seja ainda discutida, o papel dos fatores genéticos é amplamente aceito. Foi sugerido que alterações no *imprinting* genômico poderiam estar envolvidas no desenvolvimento da doença. Na região cromossômica 11p15.5 encontram-se duas regiões diferencialmente metilada, a H19DMR e a KvDMR. Essas regiões regulam a expressão dos genes *IGF2*, *H19* e *CDKN1C*, importantes para o desenvolvimento fetal e placentário. O objetivo do presente trabalho foi verificar o perfil de metilação das regiões controladoras de *imprinting*, KvDMR1 e H19DMR, em pacientes com pré-eclâmpsia (PE) por metodologias qualitativas [Análise de restrição combinada com bissulfito (COBRA) e PCR específica para a metilação (MS-PCR)] e quantitativa (Digestão Enzimática Sensível à Metilação Associada à PCR em Tempo Real). Todas as pacientes do estudo foram atendidas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética deste hospital e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Foram selecionadas 23 placentas de pacientes com PE e 40 de mulheres sem história pessoal ou familiar de PE (grupo controle). A pesquisa resultou em um caso (4%) de hipermetilação da H19DMR em placentas de PE. Na KvDMR, quatro amostras (18%) apresentaram um perfil condizente com hipermetilação e uma (4%) apresentou um padrão de hipometilação. Os dados também foram analisados pelos testes de Qui-quadrado, Exato de Fisher e teste *t*, para verificar se os achados clínicos como o sexo do recém-nascidos (RNs) e a classificação do peso do RN em relação à idade gestacional (adequado, pequeno ou grande para a idade gestacional ou AIG, PIG ou GIG, respectivamente) influenciavam o resultado da metilação da KvDMR e da H19DMR. Neste estudo, não constatamos diferenças estatisticamente significa-

tivas na metilação que pudessem ser considerados como marcadores para a PE. Contudo, a metilação da KvDMR apresentou uma relação estatisticamente significativa com relação à classificação em PIG, AIG e GIG. As placentas de fetos GIG apresentavam médias de metilação mais próximas a valores de hipermetilação do que as dos dois outros grupos. Portanto, embora não tenhamos encontrado influência da metilação das duas regiões no desenvolvimento da PE, a metilação da KvDMR na placenta parece estar associada com o peso dos recém-nascidos, em especial dos macrossômicos, o que está de acordo com a literatura que mostra hipometilação dessa região em pacientes com a síndrome de Beckwith-Wiedemann. Os nossos resultados vêm acrescentar mais subsídios para a continuação de pesquisas envolvendo diferentes fenótipos e os processos epigenéticos, como o *imprinting* genômico.

FATORES GENÉTICOS NA ESPERMATOGÊNESE DE HOMENS INFÉRTEIS

Maria Silvana Juchniuk de Vozzi

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Regina Martelli

Tese de Doutorado apresentada em 18/06/2010

A infertilidade masculina é responsável por 50% dos casos de Fertilização *in vitro*, sendo a maioria classificada como idiopática. A análise do sêmen para avaliação do fator masculino constitui a primeira etapa de investigação de infertilidade. Adicionalmente, a análise genética do espermatozóide fornece informação sobre anormalidades cromossômicas numéricas e estruturais que conseguiram finalizar a meiose sem serem detectadas pelos *checkpoints* meióticos. A apoptose é um tipo de morte celular envolvida em diferentes passos da espermatogênese, primeiro na puberdade, no início da espermatogênese e posteriormente nas gônadas adultas, controlando a espermatogênese normal. Vários estudos demonstraram que a desregulamentação do processo de apoptose nas células germinativas pode resultar em infertilidade masculina. O objetivo principal do presente trabalho foi avaliar a segregação meiótica e a frequência de gametas apoptóticos em células germinativas de homens oligozoospermicos com diagnóstico de infertilidade. Foram avaliadas amostras de sêmen de quinze homens inférteis (grupo I) e de sete homens normais controles, com fertilidade comprovada (grupo II). Foi também realizado estudo citogenético de sangue periférico dos dois grupos. Para avaliar a segregação meiótica dos cromossomos 3, 13, 21, 22, X e Y foi utilizada a técnica de Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) em gametas descondensados e para avaliar a presença de apoptose foi detectada a externalização de fosfatidilserina utilizando anexina V marcada. O grupo de homens inférteis apresentou heteromorfismos do cromossomo 9 em 13,3 % dos cariótipos e um indivíduo apresentou cromossomo marcador. A frequência de aneuploidias totais dos cromossomos envolvidos foi de 6,88% nos espermatozóides de homens inférteis e 3,98% nos controles. As frequências de dissomias dos cromossomos 3, 13, 21, 22, XY, XX e YY foram respectivamente 0,34%, 0,51%, 0,77%, 0,65%, 0,68%, 0,19% e 0,20% nos pacientes inférteis. Homens inférteis e controles apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) nas frequências de aneuploidias dos cromossomos 13, 21, 22 e de dissomias XY. As diferenças entre os grupos estudados podem ser explicadas por falha na recombinação meiótica, interferindo no processo correto de segregação. Evidenciamos também diferença significativa entre a incidência de células apoptóticas em homens inférteis e controles ($p < 0,05$). O aumento das frequências de gametas apoptóticos em homens inférteis poderia ser justificado pelo processo denominado apoptose abortiva. A possível relação entre dissomias totais e morfologia espermática sugere que a seleção de gametas seja estritamente controlada na espermatogênese, sendo desregulada em homens oligozoospermicos.

Ginecologia e Obstetrícia

AValiação DE MARCADORES DE RISCO CARDIOVASCULAR EM PORTADORAS DE SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS: COMPARAÇÃO ENTRE USO DE CONTRACEPTIVO ORAL COMBINADO ISOLADO OU ASSOCIADO AO USO DE METFORMINA

Janáina Boldrini França Fernandes

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carolina Sales Vieira Macedo

Dissertação de Mestrado apresentada em 03/05/2010

Objetivo: A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é associada a disfunções metabólicas que podem contribuir para o aumento do risco de doença cardiovascular. O objetivo deste estudo é comparar o efeito de um contraceptivo oral

combinado (COC) isolado ou associado com metformina sobre os marcadores de risco cardiovascular nas portadoras desta síndrome. **Materiais e métodos:** Trata-se de um ensaio clínico randomizado, aberto e controlado. As pacientes estavam sem qualquer tratamento hormonal há pelo menos dois meses e nenhuma delas tinha qualquer doença sistêmica. Cinquenta portadoras de SOP foram randomizadas para uso de 30µg de etinilestradiol / 2mg de acetato de clormadinona por dia ou para 30µg de etinilestradiol / 2mg de acetato de clormadinona associado à metformina 875mg por dia e avaliadas por 12 meses. Foram avaliados pela ultrassonografia os marcadores da estrutura e função endotelial (medida da dilatação mediada por fluxo da artéria braquial, medida da espessura da íntima-média, índice de rigidez da carótida) e o volume ovariano. As medidas antropométricas avaliadas foram o peso, o índice de massa corpórea, a cintura, a pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD). Além disto, foram avaliados os marcadores séricos de risco cardiovascular: lipidograma (lipoproteína de alta densidade - HDL, triglicérides - TG, colesterol total - CT e lipoproteína de baixa densidade - LDL), insulina e glicemia basal, índice para resistência à insulina (Homeostasis model assessment - insulin resistance) - HOMA, proteína C reativa (PCR), leucograma, interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF α), testosterona total, globulina carreadora de hormônios sexuais (sex hormone binding globulin) - SHBG, índice de androgênios livre (FAI). **Resultados:** Em relação às variáveis clínicas, houve aumento de PAS nas usuárias de COC associado à metformina em relação às usuárias de COC isolado no período de zero a seis meses ($p=0,02$), porém em 12 meses, a PAS não se diferiu entre os grupos. Em relação aos marcadores ecográficos de risco cardiovascular, apenas o índice de rigidez da artéria carótida apresentou diferença entre os grupos. Este índice reduziu-se nas usuárias de COC isolado em relação às usuárias de COC associado à metformina na comparação de zero a seis meses e na de zero com 12 meses ($p=0,04$, de zero a seis meses e $p=0,02$, de zero a 12 meses). Em relação às variáveis séricas no período de zero a seis meses, obtivemos diferença significativa no nível de glóbulos brancos (reduziu no grupo com COC associado à metformina em comparação ao grupo de COC isolado, com $p=0,01$). Os níveis de LDL e TNF apresentaram redução nas usuárias de COC associado à metformina na comparação de zero a 12 meses ($p=0,02$ e $p<0,01$, respectivamente). Houve aumento no grupo de COC isolado nos níveis de colesterol total e de SHBG na comparação de zero a seis meses e de zero a 12 meses para o primeiro ($p=0,03$ e $p=0,01$) e na comparação de zero a seis meses para o segundo ($p=0,04$). O nível de testosterona total reduziu significativamente no grupo com COC isolado em comparação ao grupo COC associado à metformina no período de zero a seis meses e de zero a 12 meses ($p<0,01$ nos dois intervalos), e, na comparação de seis a 12 meses aumentou nas usuárias de COC associado à metformina em comparação às usuárias de COC isolado ($p=0,01$). As demais variáveis não se diferiram entre os grupos. **Conclusão:** O uso do COC contendo 30 µg de etinilestradiol e 2mg de acetato de clormadinona reduziu a rigidez arterial em portadoras de SOP. A adição da metformina em baixas doses ao COC não determinou benefícios sobre a função e estrutura arterial de mulheres com SOP. Em termos de marcadores séricos de risco cardiovascular a metformina foi relevante somente na diminuição dos níveis de LDL, de TNF e atenuação do incremento de TG produzido pelo COC.

O TEMPO DE CRIOPRESERVAÇÃO NÃO AUMENTA O DANO NO TECIDO OVARIANO CONGELADO PARA FINS DE PRESERVAÇÃO DE FERTILIDADE

Jacira Ribeiro Campos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva

Dissertação de Mestrado apresentada em 14/05/2010

Introdução: O câncer invasivo é diagnosticado em mais de 600.000 pessoas /ano nos Estados Unidos, 269.800 dos acometidos são mulheres e 8% apresentam idade abaixo de 40 anos, com taxas progressivamente maiores de sobrevivência. Estima-se que uma em cada 250 jovens adultas é sobrevivente do câncer infantil, mas com alguns efeitos colaterais. Um dos principais problemas, especialmente para as jovens pacientes, é que a terapia destrói uma proporção significativa da população folicular, o que pode resultar em infertilidade permanente. Sendo estas pacientes tão jovens, o tempo que o tecido permanecerá congelado é bastante longo e não está bem claro se o tempo de congelamento amostra interfere na qualidade do tecido preservado. O presente trabalho teve como objetivo avaliar se o tempo de congelamento da amostra interfere na população folicular, na viabilidade do tecido após o descongelamento e na capacidade funcional do tecido para a esteroidogênese. **Material e Métodos:** foram incluídas na casuística 17 pacientes, em idade reprodutiva, submetidas à laqueadura laparoscópica, durante a qual foi realizada uma biopsia ovariana de cerca de 2 x 2 cm, a qual foi subdividida em 3 fragmentos. Um foi processado à fresco e os outros dois embebidas em meio contendo crioprotetor e congelados para posterior descongelamento e análise. Foi utilizada a técnica de congelamento lento. Os fragmentos foram divididos em três para análise nas amostras a fresco (GF), e descongeladas após 30 (G30) e 180 (G180) dias. Cada fragmento foi subdividido em três: 1) para fixação com formaldeído e inclusão em parafina, seguido de cortes seriados com espessura de 4µ e a cada

3 cortes, o material foi corado com HE (hematoxilina/eosina) e analisado com microscópio com aumento de 400 vezes para contagem de folículos. O número total de folículos/mm³ foi calculado usando-se a seguinte fórmula: $Nt=(No \times St \times t)$, onde Nt é o número de folículos, No é a média de folículos observados em 1 mm², St é o total de cortes em 1 mm³ do ovário e t é a espessura do corte. 2) Digestão química com colagenase e aplicação técnica DEAD- LIVE (fluorescência por calceína AM e brometo de ethidium) para avaliação da viabilidade folicular, dada por % de folículos viáveis. 3) Cultivo de tecido ovariano em meio quimicamente definido para avaliação da capacidade esteroidogênica do tecido através da dosagem de estradiol e progesterona no meio de cultivo nos tempos 0, 48, 96 e 144h. **Resultados:** A idade média das pacientes incluídas foi de $29,0 \pm 2,78$ anos, com paridade média de $2,94 \pm 0,24$ filhos. A densidade folicular média foi $361,3 \pm 255,4$, $454,9 \pm 676,3$ e $296,8 \pm 269,0$ folículos/mm³, para os tecidos frescos e descongelados com 30 e 180 dias, respectivamente, não havendo diferença entre eles ($p=0,46$). A viabilidade folicular foi maior no tecido fresco (GF=93,4% de folículos viáveis) quando comparado com os tecidos criopreservados (G30=70,8%; $p<0,001$ e G180=78,4%; $p<0,001$), embora não tenha havido diferença na viabilidade entre as amostras descongeladas ($p>0,05$). Com relação à capacidade esteroidogênica do tecido não houve redução na produção de estradiol e progesterona após a criopreservação (Estradiol: GF= 2026 ± 1782 pg/ml, G30= 1272 ± 1081 pg/ml e G180= $849,6 \pm 366,2$ pg/ml, $p=0,19$; Progesterona: GF= $0,45 \pm 0,37$ ng/ml, G30= $0,26 \pm 0,08$ ng/ml e G180= $0,45 \pm 0,54$ ng/ml, $p=0,86$). **Conclusões:** O processo de congelamento lento de ovário, embora comprometa parcialmente o tecido, permite conservar cerca de 80% de viabilidade folicular e preserva a capacidade esteroidogênica tecidual similar ao tecido fresco. Ainda que a pequena casuística limite conclusões mais definitivas com relação à função do tecido, o fato de comprovar a produção hormonal no meio encoraja a implementação desta técnica na preservação da fertilidade feminina, já que ensaios clínicos para esta finalidade são eticamente complicados e os estudos atualmente apresentados com série de casos apresentam pequenas amostras ou relatos isolados de caso. Além disso, nos casos de reimplante, indícios de falência do enxerto provavelmente se devem mais à isquemia do que à criopreservação propriamente dita.

EMaD - USO E UM APLICATIVO MULTIMÍDIA INTERATIVO COMO SUPORTE PARA ENSINO DA SEMIOLOGIA MAMÁRIA

Geraldo Henrique Neto

Orientador: Prof. Dr. Hélio Humberto Angotti Carrara
Dissertação de Mestrado apresentada em 31/05/2010

As técnicas de ensino devem ser dinâmicas e, de fato, têm apresentado evolução constante. Mais recentemente, e de maneira bastante agressiva, novos recursos que implementam tecnologia da informação têm sido utilizados no ensino médico. Todavia, a escassez desses recursos e aplicabilidade no ensino da ginecologia é notória. Os objetivos do trabalho ora exposto foram: a) a criação de um aplicativo didático para o ensino da semiologia mamária utilizando recursos computacionais; b) disponibilizá-lo na rede mundial de computadores (Internet); c) mensurar o aprendizado dos alunos os quais interagiram com o aplicativo. O aplicativo desenvolvido foi segmentado em: 1) Anatomia Mamária, 2) Anamnese, 3) Exame Físico e 4) Exames Complementares. Cada tópico foi desenvolvido e apresentado em frames eletrônicos utilizando-se vídeos, imagens (estáticas e dinâmicas), animações e texto baseado na Linguagem de Marcação de Hipertexto (HTML) e linguagem de programação Action Script 2.0, os quais relatam informações acerca dos temas selecionados. Para realizar o teste do aplicativo e avaliar sua potencialidade na educação médica, foram convidados alunos de diferentes instituições de ensino médico. Foram feitos 313 acessos sendo que apenas 95 responderam de forma completa todo o questionário. O tema escolhido foi à semiologia mamária, apresentada de duas normas distintas. Os alunos, de maneira aleatória, poderiam fazer uso da aula expositiva convencional disponibilizada através de vídeo, permitindo a interatividade linear material, ou, interagir de forma não linear com o aplicativo multimídia. Havia também a possibilidade de acesso a ambas as formas de apresentação do tema, o que foi feito por 34 alunos/usuários. A avaliação foi composta por 20 (vinte) questões, e, paralelamente, foi constituída uma escala Likert cujo objetivo era avaliar a credibilidade do aplicativo. Os resultados mostraram que os alunos/usuários que utilizaram somente a aula expositiva convencional obtiveram desempenho pior quando comparados aos alunos/usuários que utilizaram o aplicativo multimídia, entretanto, de forma oportuna, os alunos/usuários que utilizaram ambos os recursos didáticos, ou seja, aula expositiva convencional e o aplicativo multimídia obtiveram notas superiores quando comparado ao grupo de alunos que utilizou somente o aplicativo multimídia respectivamente (E+M= 17,9; AM = 17,5; AE = 15,4; $p < 0,0001$). Diante das evidências apresentadas conclui-se que o aplicativo multimídia desenvolvido favoreceu o aprendizado e a retenção do conhecimento para os alunos, e que, o uso de tecnologias computacionais pode trazer facilitar o aprendizado da semiologia mamária.

EXPRESSION DO BMP15 E DO GDF9 EM OÓCITOS E DO RECEPTOR BMPR2 NAS CÉLULAS DO CUMULUS DE MULHERES NORMAIS E COM SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS

Luciana Ochuiuto Teixeira de Resende

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rosana Maria dos Reis

Dissertação de Mestrado apresentada em 24/06/2010

Objetivo: avaliar a expressão gênica do fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF9) e da proteína óssea morfogenética-15 (BMP15) em oócitos e receptores BMPR2 em células da granulosa (CG) de mulheres com síndrome dos ovários policísticos (SOP) submetidas à fertilização *in vitro* (FIV) e comparar com grupo controle; analisar a relação dos esteróides no fluido folicular (FF) de mulheres com SOP e controles; analisar a correlação dos níveis dos esteróides sexuais no FF com a expressão do GDF9 e BMP15 nos oócitos e do BMPR2 nas células do cumulus de mulheres com SOP e grupo controle submetidas à FIV. **DELINEAMENTO:** prospectivo, caso-controle. **Pacientes e métodos:** foram incluídas 18 pacientes com SOP e 35 pacientes controles sendo a causa da infertilidade fator masculino, submetidas à hiperestimulação ovariana controlada (HOC) para procedimento de FIV. A indução da ovulação foi realizado com FSH recombinante, na dose de 100 a 200 mg/dia, para o bloqueio hipofisário utilizou-se GnRH α , no esquema longo, e foi administrado hCG recombinante para a maturação folicular. No dia da aspiração dos oócitos foi colhido FF de um folículo pequeno (10-14mm) e um grande (>18mm) para dosagem dos esteróides sexuais, sendo divididos em 4 grupos: G1= folículo pequeno do grupo controle; G2 = folículo pequeno do grupo SOP; G3 = folículo grande do grupo controle e G4 = folículo grande do grupo SOP. Para dosagem no FF de estradiol e progesterona utilizou-se o método de quimioluminescência e para a testosterona e androstenediona o radioimunoensaio. Para análise da expressão dos genes BMP15 e GDF9, utilizamos os oócitos maduros de cada paciente. As CGs foram removidas através da técnica de microdissecção. Os oócitos e as CGs foram armazenados individualmente em criotubos contendo 1 μ l de meio de cultivo e mantidos em nitrogênio líquido. Para a extração de RNA dos oócitos e das GCs utilizou-se o RNeasy Micro Kit (Qiagen®). A quantificação dos genes foi realizada pela técnica de reação em cadeia polimerase em tempo real (PCR-RT). **Resultados:** observamos que a dosagem dos esteróides no FF mostrou que os níveis de progesterona de todos os folículos pequenos (8.435 ± 3.305 ng/mL) apresentaram valores menores do que os grandes (10.280 ± 3.475 ng/mL), $p < 0,01$. A concentração de progesterona dos folículos do grupo SOP (8.095 ± 4151 ng/mL) foi menor se comparada com o controle (9.824 ± 3128 ng/mL), $p = 0,03$. A testosterona apresentou diferença entre o G1 ($325,97 \pm 122,64$ ng/dL) e G3 ($207,47 \pm 97,905$ ng/dL) $p < 0,001$ e entre o G3 ($207,47 \pm 97,905$ ng/dL) e G4 ($336,57 \pm 120,30$ ng/dL) $p < 0,001$. Ao compararmos folículos pequenos e grandes, independente do grupo experimental, os pequenos ($508,9 \pm 266$ ng/dL) apresentam valores maiores de testosterona do que os grandes ($245,10 \pm 123$ ng/dL), $p < 0,0001$. A expressão do gene BMP15 nos oócitos foi significativamente maior nas mulheres com SOP quando comparada ao grupo controle (Mediana = 5,95 e 0,59, respectivamente) com $p = 0,0005$, assim como a expressão do GDF9, que também mostrou-se elevada nas mulheres com SOP quando comparadas ao grupo controle (Mediana = 2,70 e 0,63, respectivamente), com $p = 0,0006$. O BMP15 mostrou ter correlação positiva com as taxas de gravidez (dosagem de β -hCG) ($r = 0.36$, $p = 0,0060$). Ao correlacionar a expressão do gene com os grupos separadamente, observamos que no grupo SOP, quanto maior a expressão do BMP15 maior a taxa de gestação ($r = 0.60$, $p = 0,0062$) enquanto que no grupo controle não observamos esta correlação ($r = -0.04293$, $p = 0,7980$). A correlação entre a expressão do GDF9 e a testosterona no FF grande foi positiva quando analisamos ambos os grupos ($r = 0.26504$, $p = 0,0398$), porém ao analisarmos os grupos separadamente, não observamos correlação com o grupo SOP ($r = 0.32527$, $p = 0,7454$) nem com o grupo controle ($r = 0.11887$, $p = 0,1969$). A correlação da expressão do GDF9 com os demais esteróides não teve resultados significativos. A expressão do GDF9 também está relacionada com a taxa de gravidez. Quanto maior a expressão, maior a taxa de gestação em ambos os grupos ($r = 0.26504$, $p = 0.0463$). Ao analisarmos esta correlação com os grupos separadamente, não houve diferença significativa no grupo SOP ($r = 0.32527$, $p = 0,1742$) e também não houve diferença no grupo controle ($r = 0.11887$, $p = 0,4772$). Comparando a expressão do BMPR2 com os níveis de esteróides no FF grande, observamos que sua expressão teve uma correlação positiva com a testosterona ($r = 0.29293$, $p = 0,0433$). Na análise por grupo, esta correlação foi positiva apenas no grupo SOP ($r = 0.62756$, $p = 0,0163$). Com relação à androstenediona, a expressão do receptor BMPR2 foi positiva no grupo SOP ($r = 0.55966$, $p = 0,0374$). Observamos que a taxa de gravidez teve uma correlação positiva com o número de embriões formados ($r = 2,726$, $p = 0,050$) quando analisamos ambos os grupos. Separadamente, não houve diferenças entre eles. **Conclusão:** Nas mulheres com SOP a progesterona apresenta-se diminuída no FF e a testosterona aumentada no FF de folículos maduros comparadas ao grupo controle. A expressão do BMP15 e do GDF9 apresentou-se maior nas pacientes com SOP comparada ao grupo controle, sugerindo que o uso de FSH recombinante pode ter corrigido a expressão destes genes, resultando em melhores taxas de gravidez.

ANÁLISE DE VARIANTES DO GENE CDKN1C E PRÉ-ECLÂMPسيا

Murilo Racy Soares

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ester Silveira Ramos

Dissertação de Mestrado apresentada em 25/06/2010

A pré-eclâmpسيا (PE) caracteriza-se pelo aumento da pressão arterial e proteinúria, após 20 semanas de gestação, sendo comum em primigestas e nos extremos da vida reprodutiva feminina. A sua etiologia é desconhecida, mas há evidências da predisposição genética no desenvolvimento da PE e vários estudos que dizem respeito a genes candidatos têm sido realizados. O gene CDKN1C (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1C*), também denominado P57Kip2, sofre marcação (imprinting) genômica e está mapeado no cromossomo 11p15.5 em humanos. O CDKN1C possui um importante papel na inibição da proliferação do trofoblasto. Estudos em camundongos mostraram que alterações da PE talvez sejam induzidas por perda de expressão deste gene. O presente trabalho verificou a associação de PE com variantes do gene CDKN1C. Foram selecionadas 75 pacientes que apresentaram PE, quatro mulheres com diagnóstico de eclâmpسيا, 42 com hipertensão arterial crônica (HAC), 66 com diagnóstico de hipertensão gestacional (HG) e 162 gestantes como grupo controle. Também foram incluídos 302 indivíduos (204 mulheres não grávidas e 98 homens) da população geral. Após extração do DNA de sangue periférico, foram utilizadas técnicas de Biologia Molecular [Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Polimorfismo Conformacional de Fita Simples (SSCP) e sequenciamento automático] para o estudo do genótipo das pacientes e controles. Foram encontradas quatro novas variantes do gene CDKN1C humano (uma em uma mulher do grupo controle da população geral, duas em portadoras de HAC e uma no grupo controle). As variantes do gene CDKN1C não se mostraram bons marcadores para o desenvolvimento de pré-eclâmpسيا, mas os resultados sinalizam para um papel em casos de hipertensão arterial crônica. Este é o primeiro estudo populacional em larga escala do gene CDKN1C na população brasileira.

REGULAÇÃO DO ACESSO DOS USUÁRIOS DO SUS AO AMBULATÓRIO DE UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO

Maria Eulália Lessa do Valle Dallora

Orientador: Prof. Dr. Marcos Felipe Silva de Sá

Tese de Doutorado apresentada em 30/06/2010

A inserção dos hospitais na rede de atenção é fator preponderante na organização do SUS. A ordenação do fluxo de pacientes entre os hospitais e serviços de saúde, com a estruturação de uma rede regionalizada de atenção é um desafio a ser vencido. Foi esta a proposição do HCFMRP-USP quando, em 2000, descentralizou o agendamento das consultas eletivas para os novos pacientes e organizou Centrais de Regulação de Consultas Eletivas, junto aos Departamentos Regionais de Saúde (DRS) de sua área de abrangência. **Objetivo:** Avaliar o impacto da implantação das Centrais de Regulação na organização do fluxo de pacientes e na efetivação do HCFMRP-USP como instância terciária na rede de serviços regional. **Metodologia:** Para avaliar os resultados na organização do fluxo de pacientes verificou-se o grau de aproveitamento da agenda de consultas oferecida pelo HCFMRP-USP aos DRSs. Foi desenvolvido um estudo descritivo, quantitativo, com dados secundários no período 2000 a 2005. Para avaliar a efetivação do HCFMRP-USP como instância terciária foi analisada a coerência entre a complexidade dos casos encaminhados e a missão do Hospital. Foi realizada uma investigação do tipo transversal, em dois momentos, 2000 e 2005, com amostragem dos atendimentos de novas consultas agendadas via Centrais de Regulação. **Resultados:** Nenhum DRSs aproveitou a totalidade das vagas disponibilizadas. A taxa geral de agendamento foi 66,2%; a taxa de absenteísmo dos novos pacientes, 22,4%. A taxa de aproveitamento global foi 37,9%, representando que das 309.573 vagas disponibilizadas, apenas 117.328 pacientes foram absorvidos para seguimento no Hospital. A baixa complexidade representa parcela importante dos casos, 41,5% em 2000 e 39,3% em 2005; a coerência dos encaminhamentos com os protocolos de acesso foi 74,0% em 2000 e 75,5% em 2005; não foram absorvidos para seguimento 31,3% dos pacientes agendados via Centrais de Regulação. **Conclusões:** A implantação das Centrais de Agendamento de Consultas Eletivas, como aperfeiçoamento do sistema regional de saúde, foi parcialmente atingida, tendo elas se tornado mero instrumento administrativo de agendamento de consultas. A proposta implementada em 2000 teve o mérito de provocar a discussão entre os gestores, Hospital e a responsabilização dos municípios e regionais de saúde com o encaminhamento dos pacientes para o nível terciário do sistema de saúde. Foi também uma ação importante na humanização dos serviços de saúde visto que a partir de então, os novos pacientes agendados contam com a certeza da realização da consulta. A implantação de um sistema com esta abrangência, envolvendo municípios, DRSs e o Hospital, mesmo fundamentado em

questões lógicas de eficiência, demanda tempo. Mesmo com alguns avanços, ainda temos muitos desafios e um longo caminho a trilhar objetivando concretizar uma rede de serviços que propicie assistência integral, acesso universal com equidade e qualidade. O planejamento contínuo e integrado entre gestores e prestadores, em especial hospitais de ensino, é caminho certo nesta direção. Planejamento este que deve ser dinâmico, identificando e corrigindo os problemas de cada momento e estimulando os avanços contínuos de forma a melhorar a saúde e a qualidade de vida de todos.

Imunologia Básica e Aplicada

PAPEL DO CCR4 NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Trypanosoma cruzi*

Juliana Santiago da Silva

Orientador: Prof. Dr. Paulo Marcos da Matta Guedes

Dissertação de Mestrado apresentada em 09/04/2010

O receptor de quimiocina CCR4 participa na migração de células T CD4⁺CD25⁺ (Treg) para vários tecidos de camundongos e pacientes. A infecção por *Trypanosoma cruzi* resulta em miocardite e o perfil celular deste infiltrado inflamatório é determinante na evolução da doença em pacientes e na infecção em modelo experimental. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o papel do CCR4 na migração de células T CD4⁺CD25⁺ para o coração de camundongos durante a infecção experimental por *T. cruzi*. Camundongos selvagens C57BL/6 e geneticamente deficientes de CCR4 (CCR4^{-/-}) foram infectados com 1 10³ formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi* e os resultados mostraram que camundongos CCR4^{-/-} são mais susceptíveis a infecção, pois apesar de apresentarem menores níveis de parasitemia, apresentaram significativo aumento na miocardite e mortalidade. O infiltrado inflamatório cardíaco dos animais CCR4^{-/-} foi caracterizado por aumento de células T CD8⁺ e redução de células T CD4⁺CD25⁺. Entretanto, no baço houve aumento desta mesma subpopulação de células, provavelmente indicando falha em sua migração a partir desse órgão. De maneira conjunta, foi observado aumento da produção de IFN- γ e TNF- α e redução na produção de IL-10 no coração e no soro dos animais CCR4^{-/-}. Ademais, foi observado aumento da expressão de T-Bet (fator de transcrição Th1), quimiocinas e receptores de quimiocinas do perfil Th1 no coração dos camundongos CCR4^{-/-}. Posteriormente, verificamos por meio de ensaio de cocultura de células Treg e linfócitos T que não há diferença na atividade supressora de células Treg obtidas de animais selvagens C57BL/6 e deficientes de CCR4. Para confirmar a correlação entre a deficiência na migração de Treg para o coração dos animais CCR4^{-/-} e a maior susceptibilidade dos mesmos a infecção pelo *T. cruzi*, linfócitos T CD4⁺CD25⁺ de animais selvagens foram transferidos para animais deficientes de CCR4, quatro dias após a infecção, sendo observada parasitemia e mortalidade similares aos animais selvagens. Camundongos CCR4^{-/-} infectados apresentaram baixa frequência de células Tregs no coração quando comparado aos seus controles e provavelmente mostraram um mecanismo imunoregulatório deficiente no coração. Sendo assim, nossos resultados indicam que o CCR4 tem um papel importante no controle da miocardite durante a infecção pelo *T. cruzi*, principalmente devido ao controle do influxo de células Tregs para o coração.

PRODUÇÃO E USO DE PEPTÍDEOS RECOMBINANTES DERIVADOS DO DOMÍNIO III DA PROTEÍNA E DOS *Flavivirus* ROCIO, ENCEFALITE DE SAINT LOUIS E OESTE DO NILO

Juliana Helena Chávez

Orientador: Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo

Tese de Doutorado apresentada em 07/05/2010

Os vírus da família *Flaviridae* e pertencentes ao gênero *Flavivirus* são arbovírus de grande importância em saúde pública, com altas taxas de morbidade e mortalidade em países tropicais. No Brasil é descrita a ocorrência de 11 flavivirus, sendo que 6 destes estão filogeneticamente relacionados ao Complexo da Encefalite Japonesa, responsável por infecções que podem acometer o sistema nervoso central causando encefalite. Dentre eles, destacam-se o vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV), recentemente isolado no estado de São Paulo e o vírus Rocio (ROCV), que foi responsável por um importante surto epidêmico no Vale do Ribeira, na década de 70. Além disso, outro vírus deste complexo que merece atenção é o Oeste do Nilo (West Nile - WNV), introduzido nos Estados Unidos há 11 anos, tendo se espalhado por toda a América do Norte e migrado rumo sul, já ocorrendo evidências sorológicas da presença deste patógeno na Colômbia e na Argentina, o que

aumenta o risco de sua introdução no Brasil. A provável introdução do WNV e a re-emergência das infecções causadas pelo SLEV e ROCV sustentam a realização de estudos epidemiológicos e moleculares destes vírus visando à prevenção de futuras epidemias. Assim, o presente trabalho produziu polipeptídeos recombinantes contendo o domínio III, um dos principais sítios imunogênicos da proteína E destes vírus, através de técnicas de clonagem e expressão protéica procariótica. A amplificação do gene foi realizada por RT-PCR, resultando em amplicons de cerca de 400 pb. Em seguida, foi realizada a clonagem dessa região no vetor pCR 2.1 e subclonagem nos vetores de expressão PQE31 e PQE32. A expressão protéica foi realizada em sistema procariótico com o uso da cepa M15 de *E. coli*, resultando em polipeptídeos de aproximadamente 17kd para cada vírus. A purificação protéica foi realizada através da estratégia de níquel e cauda de histidina em condições desnaturantes, e foi possível obter polipeptídeos com alto grau de pureza. Em seguida, os polipeptídeos produzidos foram utilizados como antígenos para a padronização do IgG-ELISA. Após esta padronização, foi possível avaliar 96 amostras de soro humano para a detecção de anticorpos contra esses vírus. Observou-se, uma alta prevalência de anticorpos anti-vírus da encefalite de Saint Louis (29%) e anti-vírus Rocio (27%) nos soros de pacientes com doença febril aguda. Ainda, foi possível a produção do peptídeo solúvel de rDIII, o qual foi utilizado para imunização de camundongos. Observou-se que o rDIII de ROCV ao ser administrado com adjuvante, foi imunogênico e gerou anticorpos em altos títulos para o ELISA padronizado com rDIII. Também estes anticorpos, reagiram de forma cruzada em menor intensidade com rDIII de SLEV e WNV. Desta forma, o presente trabalho permitiu a criação de uma ferramenta diagnóstica de grande valia e com vasta aplicabilidade em estudos de soroprevalência e epidemiologia de flavivirus circulantes no Brasil.

CÉLULAS T REGULADORAS CD4⁺ CD25^{HIGH} FOXP3⁺ EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

Nadiele Fátima de Marco Fagundes

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Voltarelli

Dissertação de Mestrado apresentada em 20/05/2010

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é uma neoplasia hematológica caracterizada pelo gene de fusão BCR-ABL1 e é uma doença em que o sistema imunológico desempenha um papel importante no combate à célula tumoral, como evidenciado pelo sucesso obtido com infusões de linfócitos do doador, em pacientes que haviam recaído após transplante de medula óssea alogênico, bem como com as remissões hematológicas e citogenéticas alcançadas com o tratamento com IFN- α . Adicionalmente, número elevado de células T reguladoras tem sido encontrado em diversos tipos tumorais e em algumas neoplasias hematológicas promovendo a tolerância do sistema imunológico aos antígenos tumorais. Embora o aparecimento do oncogene, que leva à LMC, ocorra na célula tronco e raramente envolve a linhagem de células T, os dados da literatura, apesar de contraditórios, apontam para uma ação do mesilato de imatinibe (fármaco utilizado atualmente no tratamento da doença) sobre essas células. Devido à necessidade que o paciente tem de fazer uso desta droga por toda vida, visto que o tratamento não promove a cura da doença, o melhor entendimento da ação desta droga sobre o sistema imunológico é necessário. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar quantitativamente as subpopulações de células T, em especial as células T reguladoras, bem como o perfil de citocinas do padrão Th1 e Th2, ao diagnóstico e após três e seis meses tratamento com imatinibe por meio de imunofenotipagem e pela técnica do Cytometric Bead Array. Foram analisadas amostras de sangue periférico de pacientes com LMC antes, três meses e seis meses após o início da terapia. As populações e subpopulações de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, bem como as populações de células NK, NKT e células T reguladoras foram estudadas em amostras de sangue de dezessete pacientes e dezesseis indivíduos controles e os resultados foram apresentados em números absolutos baseado nas contagem de linfócitos obtidos no hemograma. A população de linfócitos totais e de células T, bem como as populações de células NK e NKT apresentava-se aumentada nos pacientes ao diagnóstico e se normalizava já aos três ou aos seis meses de tratamento, quando os pacientes se encontravam em remissão hematológica. De modo menos relevante, o mesmo foi encontrado para a população de células T CD8⁺. Diferentemente, o número de Treg ao diagnóstico encontrava-se diminuído e aumentava durante o período de tratamento, também aproximando-se do observado no grupo controle. As concentrações de todas as citocinas estudadas encontravam-se elevadas ao diagnóstico, e de modo mais relevante o TNF- α e IL-4. Em conclusão, observamos a capacidade da leucemia mielóide crônica em promover respostas imunológicas contra o tumor, por meio do número elevado de células T CD8, NK e NKT ao diagnóstico que diminuem com o uso da droga, correlacionando e inversamente com o número aumentado de células Treg observado durante tratamento. Diante disso, o uso de medicamentos que reduzem drasticamente a massa tumoral, como os inibidores de tirosina-quinase, utilizados em conjunto com estratégias terapêuticas que possam aproveitar a ação do sistema imunológico no combate à célula neoplásica, parece ser a melhor opção terapêutica para esses pacientes.

AVALIAÇÃO DE NOVAS FORMULAÇÕES PROFILÁTICAS OU TERAPÊUTICAS EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE TUBERCULOSE E FIBROSE PULMONAR

Rogério Silva Rosada

Orientador: Prof. Dr. Célio Lopes Silva

Tese de Doutorado apresentada em 21/05/2010

As vacinas de DNA têm sido amplamente exploradas nos últimos 10 anos como uma nova estratégia de vacinação para diferentes patologias. Abordagens que visem diminuir a dose administrada com a manutenção da resposta imune têm sido alvo de inúmeras pesquisas. Neste sentido, a vacina de DNAHsp65 de *Mycobacterium leprae* tem se mostrado eficiente na profilaxia e terapia contra a tuberculose (TB) experimental, sendo que diversas estratégias de otimização têm sido descritas. Dentre elas, os lipossomas são vesículas lipídicas que servem como carreadores de substâncias. Dessa forma, utilizamos lipossomas catiônicos complexados ao DNA plasmidial, o qual foi previamente unido eletrostaticamente a uma sequência direcionadora para núcleo (NLS), com intuito de otimizar a transfecção do DNAHsp65 (Lipo-DNAHsp65) administrado pela via intranasal. Esta rota também foi explorada através da utilização de uma construção lipossomal contendo ácido hialurônico (HA), que proporciona mucoadesividade à formulação. Camundongos imunizados com Lipo-DNAHsp65, apresentaram proteção contra posterior infecção por *M. tuberculosis* (Mtb), mantendo-se semelhante com a adição de NLS. Por outro lado, os ensaios em esquema terapêutico revelaram que a construção Lipo-DNAHsp65-NLS induziu maior redução de CFU quando comparada às demais construções analisadas. Foi detectado aumento da produção de citocinas essenciais no combate a TB, células mononucleares no lavado broncoalveolar e preservação da arquitetura pulmonar. Estes dados mostram a importância da utilização de NLS em lipossomas como uma nova estratégia para a veiculação da vacina DNAHsp65 em aplicações terapêuticas. Quando HA foi adicionado na superfície lipossomal, o efeito terapêutico foi perdido, mas surpreendentemente, o tratamento com HA livre diminuiu o CFU recuperado e manteve a preservação do parênquima pulmonar. Como a fibrose ocorre em consequência da infecção por Mtb, foram realizados estudos com modelo experimental de fibrose pulmonar e utilizando outro imunomodulador. Para tanto, camundongos foram injetados com bleomicina pela via intratraqueal e foi avaliado o efeito da terapia com IL13-PE, uma versão truncada da exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* acoplada a IL-13 humana recombinante, causando uma reação irreversível na célula alvo, levando-a a apoptose. Sendo assim, como no ambiente fibrótico há uma intensa população celular pró-fibrótica que expressa o receptor para IL-13, ocorre a morte dessas células e, conseqüentemente, diminuição da fibrose pulmonar após o tratamento. Esse efeito é mantido mesmo quando o camundongo é pré-exposto a *P. aeruginosa* ou a sua respectiva exotoxina. Estes resultados suportam a possibilidade da prospecção da IL13-PE como interessante ferramenta terapêutica no tratamento da fibrose pulmonar e como estratégia complementar no combate à TB.

POLIMORFISMO GÊNICO DE HLA-G, HLA-C, IL-18, INF- γ E TNF E EXPRESSÃO DE HLA-G NA TOLERÂNCIA AO ALOTRANSPLANTE RENAL

Daiani Cristina Cilião Alves

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Antonio Donadi

Dissertação de Mestrado apresentada em 31/05/2010

O transplante renal é o tratamento de escolha para pacientes com doença renal em estágio final. O sucesso para a aceitação de transplante alogênico é dependente da interação de diversos mecanismos imunológicos e genéticos. Dentre os mecanismos relacionados com indução de tolerância, a molécula HLA-G é relatada como moduladora da sinalização extracelular. Diversos sítios genéticos presentes no éxon 8 do gene HLA-G têm sido associados com a expressão do HLA-G, incluindo a inserção/deleção 14-pb e as variações nucleotídicas pontuais +3142 G/C e +3187 G/A. Além do HLA-G, a molécula HLA-C também pode influenciar o curso do transplante, modulando as células do sistema imune, particularmente as células natural killer, cujos receptores podem interagir com as moléculas HLA. Além dessas moléculas, as citocinas IL-18, INF- γ e TNF podem influenciar na modulação da resposta imune frente ao aloenxerto renal, algumas delas modulando a expressão de HLA-G. Neste estudo, foram analisados diversos sítios polimórficos (DNA amplificado hibridado com iniciadores sequência específicos ou sequenciamento de bases nucleotídicas) nos genes que codificam as moléculas HLA-G (14pb D/I, +3003 C/T, +3010 G/C, +3027 A/C, + 3035 C/T, +3142 G/C e +3187 G/A), HLA-C (éxons 2 e 3), IL-18 (-137 C/G e -607 A/G), INF- γ (+874 T/A) e TNF (-308 A/G) em 116 pacientes submetidos ao aloenxerto renal, estratificados segundo a presença de Rejeição aguda (RA; n=17), Rejeição crônica (RC; n=52), Rejeição total (R; n=69) e Sem rejeição (SR; n=47), e ainda, Controles sadios (C; n=202). Em adição, foi avaliada a expressão de HLA-G em biópsias renais, utilizando-se imunohistoquímica, correlacionando-se com os sítios polimórficos avaliados. A análise estatística foi realiza-

da utilizando os softwares *Genopop 3,4* e *GraphPad Instat*. Os resultados mostraram que apesar de ocorrer maior frequência de expressão de HLA-G em aloenxertos renais SR em relação aos com R, não houve diferença significativa. Nos polimorfismos do HLA-G, houve maior frequência do genótipo +3035 CC e menor do +3035 CT na RC e maior frequência do genótipo +3187 GA na R. Quanto à frequência alélica de HLA-Cw, encontramos que o alelo Cw2 é fator de risco para RA, os alelos Cw3 e Cw15 fatores de risco para RC, enquanto os alelos Cw7 e Cw12 fatores de proteção. De acordo com os polimorfismos das citocinas, encontramos que o genótipo -137 CC da IL-18 foi mais frequente na RC e o genótipo -137 GG (alto produtor) menos frequente na RA, enquanto que os genótipos +874 TT do INF- γ e -308 AG do TNF foram mais frequentes na rejeição. Com relação à influência desses fatores na expressão de HLA-G no enxerto renal, na rejeição os alelos Cw4 e Cw14 foram relacionados com ausência da expressão de HLA-G, enquanto que o Cw6 foi relacionado com maior expressão de HLA-G. No grupo SR o alelo Cw4 foi associado com aumento da expressão de HLA-G. Desta forma, diversos sítios polimórficos dos genes HLA-G, HLA-C, IL-18, INF- γ e TNF estiveram associados com a presença de rejeição, no entanto, somente os alelos de HLA-C foram associados com a expressão de HLA-G no aloenxerto renal. Por outro lado, a interação de moléculas tolerogênicas como HLA-G com as citocinas de padrão pró- ou antiinflamatórias precisam ser mais bem estudadas quanto aos perfis genéticos e imunológicos na tolerância ao aloenxerto.

ATIVIDADES *in vitro* E *in vivo* DE MICROESFERAS BIODEGRADÁVEIS CONTENDO LEUCOTRIENO B₄ E/OU ANTÍGENOS LIVRES DE CÉLULAS DE *Histoplasma capsulatum*

Daiane Fernanda dos Santos

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli

Dissertação de Mestrado apresentada em 14/06/2010

O *Histoplasma capsulatum* é um fungo dimórfico responsável por infecções pulmonares caracterizadas por reação granulomatosa. Sua incidência vem aumentando nos últimos anos devido principalmente às alterações imunológicas relacionadas ao comprometimento da imunidade celular. Anteriormente, nosso grupo de pesquisa demonstrou o envolvimento dos leucotrienos (LTs) nos mecanismos de defesa do hospedeiro durante a histoplasmose. Além disso, demonstrou que antígenos livres de células (CFAs, do inglês *cell-free antigens*), derivados de *H. capsulatum*, quando empregados na imunização de animais, conferem proteção eficiente aos mesmos e controle da infecção, uma vez que ativam a imunidade celular, e aumento da produção de LTs nos pulmões dos animais imunizados. Assim, nosso grupo desenvolveu microesferas (MS) biodegradáveis, constituídas de ésteres derivados dos ácidos láctico e glicólico (PLGA), contendo LTB₄. Estas MS foram avidamente fagocitadas por macrófagos *in vitro* e aumentaram o recrutamento de leucócitos para os pulmões, quando administradas intratraquealmente. Diante do papel dos LTs na histoplasmose e dos potenciais terapêutico e profilático dos CFAs, o objetivo deste estudo foi avaliar as atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* de MS contendo LTB₄ e/ou CFAs. Assim, foram desenvolvidas MS (PLGA) contendo LTB₄ e/ou CFAs através do processo de simples ou dupla emulsão seguido pela extração do solvente. Este método permitiu uma eficiente encapsulação tanto do mediador lipídico quanto dos antígenos protéicos e um perfil de liberação sustentada ao longo dos dias avaliados. O potencial zeta e a morfologia das MS não foram alterados com o processo de microencapsulação; da mesma forma, a integridade dos CFAs não foi interferida. Para estudos *in vitro*, empregamos macrófagos diferenciados de medula óssea murina (BMDM ϕ). O tamanho adequado das MS contribuiu para sua eficiente fagocitose pelos BMDM ϕ e as MS contendo LTB₄ e/ou CFAs modularam a produção de TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-12, quimiocinas (KC, MCP-1 e RANTES), e nitrito, sendo que as MS-CFAs mostraram-se mais potentes. O estímulo com as diferentes MS induziu discreto aumento na expressão de CD86 na superfície de BMDM ϕ . Neste contexto, verificamos o envolvimento do fator de transcrição NF- κ B durante a ativação de BMDM ϕ induzida pelas MS. Apesar da eficiente ativação dos BMDM ϕ induzida pelas MS, não foi possível evidenciar uma resposta imune celular em animais imunizados com as MS-LTB₄+CFAs ou MS-CFAs. Portanto, futuros experimentos deverão ser realizados a fim de investigar o potencial profilático das MS contendo LTB₄ e/ou CFAs na histoplasmose.

MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO PELA SALIVA DO CARRAPATO *Rhipicephalus microplus* E SEU EFEITO SOBRE A ADESÃO CELULAR

Wanessa Araújo Carvalho

Orientadora: Profa. Dra. Isabel Kinney Ferreira de Miranda Santos

Tese de Doutorado apresentada em 28/06/2010

No hospedeiro bovino o nível de resistência ao carrapato *Rhipicephalus microplus* varia de acordo com a raça sendo os fenótipos contrastantes herdáveis. O presente trabalho explora esses fenótipos a fim de estabelecer o efeito da

saliva do *R. microplus* sobre a expressão de moléculas de adesão e aderência de células à matriz extracelular e endotélio, correlacionando os dados com a resistência na raça zebuína (Nelore) e a susceptibilidade na raça taurina (HPB). Para tal, células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de bovinos resistentes e susceptíveis foram expostas a concentrações variadas de saliva do carrapato *R. microplus*, em diferentes tempos, e as moléculas de adesão ICAM-1, LFA-1, E-, L- e P-selectinas quantificadas por reação em cadeia da polimerase em tempo real. As mesmas moléculas, acrescidas da VCAM-1, foram analisadas em biópsias de pele infestada de ambos fenótipos de infestação em períodos de alta e baixa infestação. A adesão às matrizes de colágeno e fibronectina, ao fibrinogênio e ao endotélio foram avaliados em ensaios de adesão estáticos com células sanguíneas da linhagem branca e plaquetas (buffy coat), *in vitro*, frente à presença de saliva. Os resultados obtidos demonstram que a saliva do carrapato *R. microplus* modula a expressão de moléculas de adesão, *in vitro*, onde animais susceptíveis possuem uma maior expressão de todas as moléculas de adesão analisadas no tempo de 6 horas. Em 12 horas, animais resistentes expressam mais L-selectina. A pele infestada de animais susceptíveis apresenta uma maior expressão de ICAM-1, VCAM-1 e LFA-1, que são inibidas frente a uma infestação pesada com o ectoparasita. Infestações maciças também provocam um aumento da expressão de E- e L-selectina em animais resistentes, o que não ocorre em animais susceptíveis. Apesar das moléculas de adesão ser mais expressas em animais susceptíveis do que nos resistentes, a adesão celular, tanto nas matrizes extracelulares, quanto no fibrinogênio e endotélio, é menor no primeiro fenótipo frente à presença de saliva, demonstrando uma modulação da adesão mais severa nesses animais que em bovinos resistentes. Ensaios de adesão estáticos com a saliva contendo proteínas desnaturadas com tripsina demonstraram que esse efeito é mediado por proteínas em ambos os fenótipos. Essas discrepâncias contribuem para a expressão dos diferentes fenótipos de infestação, gerando dados para uma possível intervenção do parasitismo pelo carrapato em hospedeiros susceptíveis.

Neurologia

MODULAÇÃO COLINÉRGICA DA PLASTICIDADE SINÁPTICA CORTICAL: EFEITOS DA ATIVAÇÃO DE RECEPTORES MUSCARÍNICOS SOBRE A INDUÇÃO E MANUTENÇÃO DA DEPRESSÃO DE LONGA-DURAÇÃO (LTD) NA VIA HIPOCAMPO - CÓRTEX-PRÉ-FRONTAL MEDIAL DE RATOS *in vivo*

Cleiton Lopes Aguiar

Orientador: Prof. Dr. João Pereira Leite

Dissertação de Mestrado apresentada em 06/04/2010

O sistema colinérgico encefálico desempenha um papel central em processos de aprendizado e consolidação de memória. Particularmente, o córtex pré-frontal medial (mPFC) apresenta aumento nos níveis de acetilcolina (ACh) durante e após tarefas de memória. Além disso, a ativação colinérgica muscarínica facilita a potencialização de longa duração (LTP) e depressão de longa-duração (LTD) no hipocampo e córtex. Recentemente, demonstramos que o agonista muscarínico pilocarpina (PILO), promove prolongamento da fase tardia da LTP na via hipocampo (CA1)-mPFC *in vivo* associado a surgimento de oscilações rápidas no hipocampo e no córtex. Assim, no presente trabalho investigamos a dinâmica da modulação colinérgica muscarínica sobre a LTD na via CA1-mPFC *in vivo* e sua dependência da neurotransmissão glutamatérgica mediada por receptores do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA). Para isso, ratos anestesiados com uretana e mantidos a temperatura controlada de $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, foram submetidos a implante de microeletrodos para estimulação em CA1 e registro de potenciais pós-sinápticos de campo (fPSPs) no mPFC. Após 30min de registro de linha de base, a LTD foi induzida por meio de trens de pulsos elétricos de baixa frequência (LFS) e monitorada por 240min. Neste protocolo, os animais receberam PILO (40nmoles; $1\mu\text{L}$; i.c.v.) ou Veh (líquido cefalorraquidiano artificial, aCSF) imediatamente antes ou 20min após LFS. Além disso, com o objetivo de avaliar o papel dos receptores NMDA (NMDAR) na modulação muscarínica da LTD cortical, um grupo independente de animais recebeu microinjeção intra-mPFC do antagonista seletivo de NMDAR (AP7; 20nmoles; $0,4\mu\text{L}$) ou Veh (NaCl 0,15M) 10min antes de microinjeção de PILO. Nossos resultados mostram que a pré-ativação muscarínica por PILO facilita a LTD na via CA1-mPFC. Contudo, PILO sozinha ou aplicada 20min após LFS não é capaz de modular nem a neurotransmissão basal nem a manutenção da LTD na via CA1-mPFC. Além disso, o efeito da pré-ativação de PILO sobre a LTD é dependente da ativação de NMDARs, já que a aplicação de AP7 inibe a manutenção da LTD cortical. Portanto, em conjunto com os dados de LTP cortical, recentemente publicados pelo nosso laboratório, sugerimos que a atividade de receptores muscarínicos seja fundamental para modular a plasticidade sináptica de maneira bidirecional (LTP e LTD), dependendo dos padrões de disparos dos neurônios da região CA1 do hipocampo. Por ser uma

das principais saídas de informação do hipocampo para o córtex, estudos sobre a modulação da plasticidade sináptica na via CA1-mPFC podem fornecer novos dados sobre os mecanismos envolvidos na consolidação de memórias de longo prazo, no papel do sono sobre a consolidação de memórias, e sobre alterações cognitivas em epilepsias, psicoses e comorbidades psiquiátricas.

AVALIAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DA AUDIÇÃO EM CRIANÇAS COM TRANSTORNOS DE APRENDIZAGEM ESCOLAR

Ana Claudia Figueiredo Frizzo

Orientadora: Profa. Dra. Carolina Araujo Rodrigues Funayama

Tese de Doutorado apresentada em 20/04/2010

Pesquisas do Potencial Evocado Auditivo de Média Latência (PEAML) destacam o procedimento como uma ferramenta útil na prática clínica para avaliar a integridade do sistema de audição central. O objetivo deste estudo foi examinar os PEAML em crianças com inaptidão de leitura e escrita, o objetivo deste estudo foi examinar os componentes do PEAML em uma amostra de crianças, de acordo com seus níveis de Q.I. Este estudo de corte contemporâneo incluiu 25 crianças com transtorno de leitura e escrita, de 8 a 14 anos de idade (mediana, 10 anos). Estas crianças não mostraram nenhuma causa orgânica ou ambiental para suas inaptidões e foram emparelhadas por idade e gênero aos controles com boas habilidades acadêmicas. O PEAML do grupo pesquisa com Q.I. total (WISC-III) abaixo de 80 (N=15) foi comparado ao grupo com Q.I. acima de 80 (N=10), e ambos ao grupo de controle. Os dados foram analisados comparando intervalos de confiança para as latências das ondas Na, Pa e Nb e amplitude Na-Pa para as combinações de orelhas e hemisférios cerebrais. Os achados não caracterizaram nenhum marcador para o grupo com Q.I. <80. As latência de Nb e Pa (LatNb e LatPa) foi mais longa no hemisfério cerebral direito do grupo com Q.I. >80 em relação aos hemisférios direito (LatNb e LatPa) e esquerdo (LatPa) do grupo de controle. Estes achados relativos à medida do PEAML podem auxiliar na caracterização de crianças com transtorno de aprendizagem escolar, especialmente aquelas com transtornos específicos do tipo dislexia.

EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROPATOLÓGICOS DE CRISES DE CURTA DURAÇÃO NO STATUS EPILEPTICUS INDUZIDO POR PILOCARPINA EM RATOS

Ana Claudia Zanetti

Orientador: Prof. Dr. João Pereira Leite

Dissertação de Mestrado apresentada em 22/04/2010

A Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) é a forma mais comum de epilepsia em humanos e está relacionada a Esclerose Hipocampal e ao brotamento anormal das fibras musgosas em direção à camada molecular interna do giro denteado. Estudos sugerem que a esclerose hipocampal e o brotamento das fibras musgosas interferem na gênese e progressão da ELT. Vários estudos demonstram que estímulos de intensidade suficiente para provocar lesão celular, se aplicados em menor intensidade, menor duração e de forma intermitente, podem ativar mecanismos protetores endógenos e proteger as células contra os efeitos de um estímulo posterior, mais intenso. Este fenômeno é denominado tolerância ou condicionamento e pode ser desencadeado por hipóxia, isquemia, crises epiléticas de curta duração. Vários paradigmas de condicionamento têm sido utilizados no âmbito experimental na busca de identificar os mecanismos subjacentes a esta neuroproteção endógena. **Objetivos:** verificar se o condicionamento através de crises epiléticas de curta duração previnem a perda neuronal hipocampal, e sua interferência no desenvolvimento e progressão do status epilepticus (SE) e das crises espontâneas recorrentes (CERs). **Material e métodos:** Ratos Wistar machos (260-300g) foram submetidos a cirurgia para implantação de cânula no hipocampo posterior, após período de recuperação, foram submetidos a crises epiléticas de curta duração (12 min) induzidas com pentilenotetrazol (PTZ) (injeções i.p. a cada 10 min sendo a 1ª de 20mg/kg e as seguintes de 15mg/kg) por 2 dias consecutivos; depois de 48 horas foram submetidos ao SE através de injeção intrahipocampal de pilocarpina (Pilo) (2,4mg/µl). Depois de 2 horas, o SE foi interrompido com thionembital (20mg/kg). O grupo controle foi submetido somente ao SE. Os animais foram sacrificados 24 horas, 7 dias e 2 meses após o SE, os cérebros foram processados para coloração de Nissl, Fluoro-Jade B e Neo-Timm para detectar morte, degeneração neuronal e reorganização sináptica respectivamente. O grupo de 2 meses foi filmado para avaliação das CERs. **Resultados:** O condicionamento alterou significativamente a gênese e progressão do SE, 69% dos animais condicionados não evoluíram para SE e a severidade das crises durante o SE foi menor nos animais condicionados. As CERs não apresentaram diferenças quanto a latência, duração, número e severidade entre o grupo Precondicionado e o submetido somente

ao SE. A coloração de Nissl evidenciou menor perda neuronal hipocampal no grupo Precondicionado com sobrevida de 24 horas (CA3cD, CA3bD, média entre os dois lados de CA3a e tendência em CA2E); no grupo de 7 dias (hilo D, hilo E, média entre os dois lados do hilo, média de CA3b e tendência em CA2D) e no grupo de 2 meses (hilo D, média do hilo, CA3cD, CA1E, média de CA1). Comparando-se a perda neuronal entre os dois lados no mesmo grupo, observamos que nos três períodos de sobrevida, a perda celular foi predominante no lado ipsilateral à injeção de Pilo, tanto no Precondicionado quanto no grupo submetido somente ao SE (exceto no grupo SE de 2 meses, onde a perda predominou à D). Foi observada tendência a maior brotamento das fibras musgosas em direção à camada molecular interna no lado contralateral da injeção. Encontramos correlação entre perda neuronal e CERS, não foi encontrada correlação entre perda celular e brotamento das fibras musgosas nem entre o brotamento e CERS. Com isso, podemos concluir que a perda neuronal tem relação com o desenvolvimento das CERS, ao contrário do brotamento das fibras musgosas. **Conclusão:** O condicionamento através de crises de curta duração foi eficiente em reduzir a perda neuronal hipocampal; a perda neuronal tem relação com o desenvolvimento das CERS, mas não com o brotamento das fibras musgosas, nem o brotamento com as CERS.

SISTEMA DE GERENCIAMENTO DA INFORMAÇÃO: ALTERAÇÕES NEUROLÓGICAS EM CHAGÁSICOS CRÔNICOS NÃO-CARDÍACOS

Samuel Sullivan Carmo

Orientador: Prof. Dr. Amilton Antunes Barreira

Dissertação de Mestrado apresentada em 27/04/2010

Desenvolvimento de um sistema computacional de gerenciamento da informação para auxiliar os estudos científicos sobre o sistema nervoso de chagásicos crônicos não-cardíacos. O objetivo é desenvolver o sistema requerido, pelo pressuposto de praticidade nas análises decorrentes da investigação. O método utilizado para desenvolver este sistema computacional, dedicado ao gerenciamento das informações da pesquisa sobre as alterações neurológicas de seus sujeitos, foi: compor o arquétipo de metas e a matriz de levantamento de requisitos das variantes do sistema; listar os atributos, domínios e qualificações das suas variáveis; elaborar o quadro de escolha de equipamentos e aplicativos necessários para sua implantação física e lógica e; implantá-lo mediante uma modelagem de base de dados, um diagrama entidade-relacionamento adaptado e uma programação lógica de algoritmos. Como resultado o sistema foi desenvolvido. A discussão de análise é que a informatização torna o processamento de dados mais rápido, prático e seguro; a saber, citam-se as operações de cadastro, consulta e validação de campos, bem como, a busca humilde e avançada de registros, além da formatação e exportação de tabelas pré-tratadas para análises estatísticas. Ora, a argumentação lógica é que a confiabilidade das informações computacionalmente registradas é aumentada porque a ausência do viés de erro humano é assegurada na maioria das etapas, inclusive nos diversos tratamentos de dados. Como discussão de cerramento, estudos dotados de razoável volume de variáveis e sujeitos de pesquisa são mais bem geridos caso possuam um sistema dedicado ao gerenciamento de suas informações.

EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DA MIOSINA VA NO CEREBELO HUMANO NO PERÍODO PÓS-NATAL

Carolina Couto Rosa de Souza

Orientador: Prof. Dr. Antonio Roberto Martins

Dissertação de Mestrado apresentada em 03/05/2010

A Miosina V, integrante da classe de miosinas não-convencionais, é um motor molecular baseado em actina encontrada em células eucarióticas. Esta proteína está envolvida em processos importantes para a manutenção das células, como por exemplo: extensão dos cones de crescimento, transporte axonal, citocinese, contração muscular, transporte de organelas no citoplasma e fagocitose. Utilizando anticorpo policlonal mono específico purificado por afinidade, foi possível investigar a localização celular dessa proteína em cerebelo humano durante o período pós-natal, do dia do nascimento até o envelhecimento. Os tecidos obtidos de autópsias foram fixados em formalina tratados para inclusão em parafina, cortados com 5µm de espessura e incubadas com o anticorpo primário de coelho anti-M-Va. A detecção do anticorpo primário foi feita através de incubação com o anticorpo secundário de porco anti-coelho biotilado seguido por tratamento com Kit Elite ABC. A reação da peroxidase foi revelada utilizando-se como substrato água oxigenada e DAB. A expressão da M-Va foi detectada nas CM, CP e CG no cerebelo de crianças, adulto e idoso. Nos cerebelos adulto e idoso, a CM apresentou uma marcação com aspecto radiado. Além disso, foi observada na CM marcação de interneurônios (células em

cesto e estreladas). Uma expressão forte da M-Va foi observada em regiões perinuclear e subcortical do citoplasma das células de Purkinje em todas as idades estudadas. Foi observado também, nestas mesmas células, estruturas semelhantes à vesículas no citoplasma. Não detectamos marcação no núcleo das células de Purkinje. A expressão da M-Va nos dendritos das células de Purkinje foi conspícua, tanto em estruturas vesiculares como em microtúbulos dos dendritos e/ou fibras trepadeiras. O citoplasma das células granulares foi intensamente marcado em todas as idades. O anticorpo anti-M-Va marcou fibras na substância cinzenta, neurônios, fibras e varicosidades no núcleo denteado cerebelar. Alguns neurônios apresentaram marcação de nucléolo. Os citoplasmas de neurônios pequenos apresentaram marcação mais intensa do que os neurônios maiores, que exibiram uma marcação do tipo puntata e perinuclear. A M-Va exibiu uma expressão diferencial durante o primeiro ano pós-natal. A CGE está bem desenvolvida no início do primeiro ano pós-natal, porém sua marcação não foi observada no cerebelo de 12 meses pós-natal. As células granulares prospectivas na ZP da CGE apresentaram intensidade de marcação fraca ou imperceptível comparado com aquelas da ZPM, onde a marcação da M-Va foi bem definida. A M-Va foi fortemente e diferencialmente expressada pela CM, cuja porção pial, mais externa, apresentou marcação mais intensa do que a porção interna. As fibras gliais de Bergman também foram marcadas. Observamos células granulares com perfil migratório marcadas com anti-M-Va. Tomados em conjunto, estes resultados sugerem que a expressão da M-Va é aparentemente constitutiva e desenvolvimento-dependente e sua localização pode sugerir sua participação no transporte de vesículas, organelas e membranas celulares, bem como na função e/ou morfologia sináptica e na migração neuronal.

ESPECTROSCOPIA DE PRÓTONS NA ESCLEROSE TEMPORAL MESIAL

Luciana Maria Mijoler da Cunha

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos dos Santos

Dissertação de Mestrado apresentada em 11/05/2010

A epilepsia do lobo temporal (ELT) é o tipo mais comum de epilepsia em adultos e a esclerose temporal mesial (ETM) é a lesão estrutural mais frequentemente encontrada nestes pacientes. Caracterizada por atrofia e gliose do hipocampo e estruturas anatomicamente correlacionadas, a ETM é identificada na maioria dos exames estruturais de ressonância magnética (RM). Porém, em cerca de 10 a 20%, os exames de RM ou são normais ou apresentam alterações bilaterais e simétricas, dificultando a orientação da correção cirúrgica. Assim, métodos alternativos para lateralizar a região epileptogênica, são necessários. Dentre as alternativas, a espectroscopia por RM (ERM), uma técnica não invasiva que permite a análise metabólica de uma amostra *in vivo*, tem sido utilizada. Muitos estudos em pacientes com ELT têm mostrado uma redução focal do N-Acetyl Aspartato (NAA) em um ou ambos os lobos temporais indicando perda ou disfunção metabólica neuronal. No entanto, existe uma variedade grande de protocolos utilizados por diferentes autores, fazendo-se necessária uma padronização para a utilização clínica deste recurso. O objetivo deste estudo é quantificar concentrações metabólicas em pacientes com esclerose temporal mesial e controles sadios, comparando diferentes condições experimentais, a fim de otimizar o uso da ^1H -ERM para lateralizar o foco epileptogênico nas condições experimentais do nosso serviço. Para isto foram avaliados 74 pacientes portadores de ETM ($39,5 \pm 10,5$ anos) claramente definida tanto clínica como por avaliação completa por vídeo-EEG, comparados com 74 controles normais ($33,7 \pm 11,7$ anos). Os estudos foram realizados em equipamentos de ressonância magnética de 1.5 e 3.0T, instalados no HCRP e em regulares condições de funcionamento. Foram usadas as sequências STEAM (TE=20ms) e PRESS (270ms, 33ms e 55ms), um volume de interesse mais amplo ($3 \times 2 \times 2 \text{cm}^3$) e, um restrito ao hipocampo ($4 \times 1,5 \times 1 \text{cm}^3$), e por último fizemos um grupo multi-voxel posicionado em ambos lobos temporais. Todos os dados foram pós-processados pela própria máquina de RM (Siemens, 1.5T; Achieva, 3.0T) e, por softwares adquiridos, sendo o jMRUI usado no processamento dos grupos feitos no equipamento de RM de 1.5T e o LCModel foi usado no equipamento de 3.0T. A razão NAA/Cr foi o parâmetro mais adequado na lateralização do foco epileptogênico. A sequência PRESS mostrou melhores resultados que a sequência STEAM. O campo magnético de intensidade maior (3.0T) lateralizou melhor que o de intensidade menor (1.5T). O volume de interesse que resultou em uma diferença mais estatisticamente significativa ($p < 0.05$) foi de $3 \times 2 \times 2 \text{cm}^3$ posicionados em ambos os hipocampos. O Tempo ao eco longo apresentou melhores resultados e, em relação ao pós processamento, o software LCModel, obteve melhor performance em nossas condições experimentais. A maior lateralização (acima de 75 %) foi obtida nas seguintes condições: Campo magnético de maior intensidade (3T), sequência PRESS, TE longo, VOI com $3 \times 3 \times 2 \text{cm}^3$ restrito ao hipocampo, pós processamento com o pacote LCmodel. Concluímos que a ^1H -ERM é um método útil para a avaliação metabólica na ELT, podendo ser utilizada como complementação à imagem estrutural no processo de avaliação do paciente com ELT.

CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES COM DOENÇA CEREBROVASCULAR AGUDA ATENDIDOS NA UNIDADE DE EMERGÊNCIA DO HCFMRP ENTRE 2006 E 2008

Débora Cristina Mariano

Orientador: Prof. Dr. João Pereira Leite

Dissertação de Mestrado apresentada em 14/05/2010

O acidente vascular cerebral (AVC) é a principal causa de morte no Brasil e de invalidez no mundo. Apesar disso, ainda existem poucos dados sobre a vigilância e atendimento agudo das doenças cerebrovasculares no país e seus fatores de risco, sendo a maioria destes descontínuos e restritos a subgrupos de patologias. No presente estudo objetivamos descrever e caracterizar o perfil clínico e epidemiológico do doente com AVC agudo atendido na Unidade de Emergência do HCFMRP. Foi feita uma revisão de 901 prontuários médicos dos pacientes com doença cerebrovascular aguda atendidos na Unidade de Emergência do HCFMRP entre janeiro de 2006 e junho de 2008. A evolução dos pacientes foi acompanhada através da utilização de escalas clínicas de comprometimento neurológico na fase aguda e subaguda (Escala de Coma de Glasgow, Escala de AVC do NIHSS) e escalas de incapacidade na fase subaguda e crônica (índice de Barthel e escala de Rankin modificada). Os achados de neuroimagem e exames complementares foram avaliados para determinação da localização e classificação dos subtipos de AVC. Os resultados demonstram que o acidente vascular cerebral isquêmico foi diagnosticado em 61,48% dos pacientes; o acidente vascular cerebral hemorrágico em 20,2%; a hemorragia subaracnóide em 7,54%, o ataque isquêmico transitório em 4,1%, a trombose venosa cerebral em 0,99% e a isquemia retiniana em 0,55%. A idade média dos pacientes foi de 61,8 + 15,63 anos sendo a maioria do sexo masculino (53,5%). À admissão, o NIHSS mediano foi 9 (IQ: 4-18) e o Glasgow mediano de 14 (IQ: 11-15). A PAM na admissão foi de 113,67 + 25,85 mmHg. A intubação orotraqueal foi necessária em 37,5% dos pacientes e o tempo médio de internação foi de 14 + 20,98 dias. Infecções foram detectadas em 43,3% e a taxa de mortalidade intrahospitalar foi de 23,2%. Com relação aos fatores de risco encontramos hipertensão arterial sistêmica em 80,9%; tabagismo em 33,7%; dislipidemia em 31,7%; AVCI ou AIT prévio em 30%; consumo de álcool em 28,4% e diabetes mellitus em 27,3%. Em geral, observamos que as características clínicas, os subtipos de AVC e frequência dos fatores de risco em nossa casuística se assemelham ao que já foi descrito em outros estudos da literatura, porém o tempo de internação, as taxas de complicações e infecções parecem estar aumentados. Acreditamos que isso possa ser devido a um maior número de pacientes em estado grave admitidos nessa instituição. Os dados descritos neste estudo serão importantes despertar um maior interesse para as doenças cerebrovasculares na cidade de Ribeirão Preto e, auxiliar outros pesquisadores desta instituição no planejamento de condutas, implantação de melhorias nos atendimentos e criação de programas e estratégias de prevenção mais específica.

ESTUDO DO PADRÃO DE GLIOSE E DA EXPRESSÃO DAS METALOTIONEINAS I/II, DA AQUAPORINA-4 E DE COMPONENTES DA MATRIZ EXTRACELULAR NO HIPOCAMPO DE PACIENTES COM EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL

José Eduardo Peixoto Santos

Orientador: Prof. Dr. João Pereira Leite

Dissertação de Mestrado apresentada em 24/05/2010

A epilepsia do lobo temporal (ELT) é caracterizada por apresentar grande porcentagem de resistência ao tratamento farmacológico, perda neuronal progressiva, gliose e reorganização anormal de axônios que contêm zinco (Zn) vesicular, em estruturas límbicas como o hipocampo. As metalotioneínas I/II (MT-I/II) são proteínas envolvidas na modulação da concentração do Zn livre, metal que em concentrações na faixa de micromoles, induz morte celular em sistemas *in vitro*. Alguns estudos sugerem que as MT-I/II fazem parte de mecanismos endógenos de neuroproteção. Dados preliminares em nosso laboratório sugeriram que o volume hipocampal, avaliado pela ressonância magnética (RNM), pode não estar diretamente relacionado à intensidade de perda neuronal, constatada histologicamente. Alterações na densidade de outras populações celulares encontradas no tecido, bem como de proteínas ligadas à homeostase da água, como a aquaporina-4 e proteínas da matriz extracelular, podem ser fatores importantes para melhor definir a associação entre características do tecido e volumetria na RNM. **Objetivos:** Avaliar no hipocampo de pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico de ELT resistente ao tratamento farmacológico com diferentes intensidades de redução do volume hipocampal: populações neuronal e glial ativada; expressão das metalotioneínas I/II e da aquaporina-4 e suas co-localizações com astrócitos; expressão de condroitin sulfato (CSPG) e ácido hialurônico (AH); 5) correlacionar todos os achados com características morfométricas hipocampais medidas na RNM. **Metodologia:** Foram avaliadas formações hipocampais de casos de autópsia sem alterações neurológicas (Ctrl, n=20), pacientes com ELT fármaco-resistente com diagnóstico de

ELTM (n=69) e pacientes com ELT associada a tumor ou displasia cortical (TD, n=20). Os pacientes do grupo ELTM foram posteriormente subdivididos em grupos com volume hipocampal normal (VN, n=24), atrofia leve (AL, n=24) e atrofia grave (AG, n=21), de acordo com volumetria medida na RNM. Seções hipocampais de todos os grupos foram processadas por imunohistoquímicas de NeuN, GFAP, HLA-DR, MT-I/II, AQP4 e CS-56 e para a histoquímica de HAPB e foram avaliadas as densidades neuronais, áreas imunopositivas para NeuN, GFAP, HLA-DR, MT-I/II, AQP4 e CS-56 e nível de cinza de HAPB. **Resultados:** Observou-se, em comparação ao grupo Ctrl: perda neuronal em todas as regiões, exceto pelo subículo, em casos do grupo ELTM e em CA3 do grupo TD; redução da área de NeuN em várias regiões dos grupos ELTM; astrogliose em todas as regiões hipocampais do grupo ELTM e na fascia dentata, hilo e região CA4 do grupo TD; microgliose em praticamente todas as regiões do grupo ELTM e apenas no hilo do grupo TD; aumento da área de MT-I/II em várias regiões dos grupos ELTM, principalmente no subgrupo AG, e nas camadas moleculares e subgranular do grupo TD; redução na área de AQP4 em algumas regiões dos grupos ELTM e em CA4 do grupo TD; aumento da área de CS em algumas regiões do grupo ELTM, notadamente no subgrupo VN; inalteração no nível de HAPB, exceto por redução na camada subgranular do grupo AG. A volumetria hipocampal correlacionou-se, no grupo ELTM, com a população neuronal e as áreas de CS-56 e GFAP em CA1, levando à construção de modelos de regressão linear múltipla onde a população neuronal e a área de CS-56 explicam quase 40% do volume hipocampal. **Conclusões:** Independente do volume hipocampal, os grupos ELTM apresentaram homogeneidade nas alterações das populações celulares, bem como nas demais moléculas avaliadas. Ainda, mesmo regiões aparentemente protegidas da morte neuronal apresentam alterações morfológicas na população neuronal, bem como alterações em outras características teciduais avaliadas. Quanto às MT-I/II, houve correlações com a proteção neuronal no grupo com preservação da densidade neuronal (TD) e estas proteínas mostraram-se boas marcadoras de alterações em casos com perda neuronal grave (ELTM). Nos pacientes ELTM tanto a população neuronal como a expressão de CS possuem peso sobre a volumetria hipocampal medida na RNM.

ANÁLISE FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES PORTADORES DE NEUROPATIA CRÔNICA COM INÍCIO ANTES DOS 18 ANOS

Vinicius Horacio Stefgani Borghetti

Orientador: Prof. Dr. Wilson Marques Junior

Tese de Doutorado apresentada em 28/05/2010

São raros os estudos epidemiológicos sobre neuropatias periféricas crônicas em crianças e adolescentes. Nesse estudo realizamos análise clínica, eletrofisiológica e molecular de 149 pacientes portadores de neuropatia periférica crônica, com início antes dos 18 anos, todos pertencentes a diferentes famílias, encaminhados ao HCFMRP-USP nos últimos 15 anos. Um total de 77.2% dos casos foi classificado como de origem hereditária, incluindo 66% de CMT, 23% de complexas, 6% de HNPP e 5% de NHS; 12.1% dos casos como de origem adquirida, incluindo 61.1% de PDIC, 27.8% de mononeurite múltipla e 11.1% de neuropatia associada à diabete melitus; 9.4% dos casos como de origem indeterminada; e em 1.3% dos casos observou-se uma coexistência de CMT e PDIC. Os pacientes com CMT foram estratificados conforme a herança (dominante, recessivo, ligada ao sexo ou esporádico) e subestratificados conforme a velocidade de condução dos nervos nos membros superiores (desmielinizante se a velocidade de condução era ≤ 30 m/s, intermediário se a velocidade de condução era entre 30-45 m/s, e axonal se a velocidade de condução era ≥ 45 m/s). Realizaram-se testes moleculares de acordo com o grupo em que o paciente foi subestratificado (duplicação ou deleção da região 17p11.2-p12 por PCR, e/ou sequenciamento dos genes PMP22, MP0, LITAF, EGR2, GJB1 e MFN2). Assim, entre os 75 pacientes com CMT, 54.7% apresentavam CMT1, incluindo 34 com CMT1A (32 duplicação e 2 mutação ponto na Ser 72) e 2 CMT1B (mutação ponto no gene MPZ); 5.3% apresentavam CMT4; 1.3% apresentavam uma neuropatia desmielinizante esporádica; 8% apresentavam CMT2, incluindo 2 pacientes com CMT2A (mutação no gene MFN2); 9.4% apresentavam ARCMT2; 6.6% apresentavam CMT2 esporádica; 1,3% apresentavam uma neuropatia intermediária dominante, que apresentou uma mutação digênica, ou seja, mutação ponto na ser72 associado à duplicação na região 17p11.2-p12.; 2,7% apresentavam ARCMTI; 8% apresentavam CMTI esporádica, incluindo 1 paciente com mutação no LITAF; e 2.7% apresentavam CMTIX (ligada ao sexo), ambos com mutação no gene GJB1. Analisou-se a velocidade de progressão da neuropatia em cada grupo de CMT através do cálculo da média do CMTNS e da média da duração da neuropatia. Observou-se uma evolução mais lenta nos pacientes com CMT1A, CMT axonal (exceto CMT2A) e CMT intermediária, diferente dos pacientes com CMT1B, CMT4 e CMT2A, nos quais se observou um quadro mais agressivo. Entre os 7 pacientes com HNPP, 6 apresentaram a característica deleção na região 17p11.2-p12 do gene PMP22. Em um paciente não foi possível a realização do teste molecular. Entre os 27 pacientes com neuropatias complexas, inclusas entre as hereditárias, estabeleceu-se um diagnóstico definitivo em 7 pacientes (25,9%). Os diagnósticos definidos em pacientes com neuropatia axonal foram 2 casos de Ataxia de Friedreich e 1 caso de

Neurofibromatose tipo 1; nos pacientes com neuropatia intermediária foram 1 caso de Encefalopatia NeuroGastroIntestinal Mitocondrial e caso de 1 Ataxia com Apraxia Oculomotora tipo 1; nos pacientes com neuropatia desmielinizante foi 1 caso de Doença de Krabbe; e nos pacientes com neuropatia sensitiva foi 1 caso de Neuropatia, Ataxia e Retinite Pigmentar. Dos pacientes com mononeurite múltipla, 1 era portador de Lúpus Eritematoso Sistêmico, 1 de Hanseníase, 1 de Poliangiíte Microscópica e 2 da Síndrome de Lewis-Sumner. Concluindo, nesse estudo descrevemos os aspectos clínicos, eletrofisiológicos e moleculares de uma população de crianças e adolescentes com neuropatia periférica crônica que frequentam um centro de doenças neuromusculares terciário, e relatamos as características interessantes de cada caso.

ASPECTOS NEUROFISIOLÓGICOS DA HANSENÍASE

Gilberto Brown de Andrade

Orientador: Prof. Dr. Wilson Marques Junior

Dissertação de Mestrado apresentada em 01/06/2010

A hanseníase é uma moléstia infecto-contagiosa causada pelo *Mycobacterium leprae*, bacilo álcool-ácido resistente que infecta a pele e os nervos periféricos. O comprometimento neural está sempre presente e pode levar a sequelas neurológicas com graves prejuízos sociais, econômicos e psicológicos para os indivíduos acometidos. Estas complicações podem ser evitadas com tratamento adequado e iniciado o mais precocemente possível. A eletroneuromiografia (ENMG) é um valioso recurso para avaliar a função dos nervos periféricos, sendo capaz de detectar alterações subclínicas da doença. O propósito deste trabalho foi caracterizar quais as alterações comumente encontradas nos nervos periféricos, como: topografia, simetria e padrões neurofisiológicos baseados nos estudos de neurocondução, visando a detecção precoce das lesões nervosas para uma intervenção terapêutica eficaz. O estudo foi retrospectivo, sendo avaliados setenta e sete prontuários de pacientes com diagnóstico confirmado de hanseníase, quanto aos dados epidemiológicos, laboratoriais, clínicos e de estudos neurofisiológicos. Um total de 1219 nervos foram estudados, incluindo os nervos medianos, ulnares, fibulares profundos, tibiais, radiais, surais e fibulares superficiais. As formas neurais puras apresentaram um tempo maior de evolução da doença até o diagnóstico. O padrão neurofisiológico mais detectado foi de neuropatia sensitivo-motora assimétrica, com alentecimento focal de condução. Alterações assimétricas de latências, velocidades de condução ou amplitudes foram vistas em todos os pacientes, mesmo naqueles com comprometimento mais difuso dos nervos. Foram mais comuns os achados de mononeuropatia múltipla, tanto nas formas paucibacilares como nas multibacilares, não se encontrando padrão de polineuropatia simétrica comprimento-dependente. Os nervos mais acometidos pela hanseníase foram os nervos fibulares superficiais, ulnares sensitivos, surais e ulnares motores. No nervo ulnar motor, foi encontrado alentecimento da velocidade de condução no segmento do cotovelo em 55,97% dos nervos testados. Esses achados, em conjunto com latências prolongadas e dispersão temporal, sugerem importante componente desmielinizante nessas neuropatias. A hanseníase deve ser considerada em pacientes cujo estudo neurofisiológico revele essas anormalidades, sendo particularmente útil nas formas neurais puras e possibilitando o diagnóstico precoce que pode prevenir sequelas ao reduzir o tempo de evolução da doença.

AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA DA INFLUÊNCIA DE DROGAS ANTIÉPILEPTICAS INDUTORAS ENZIMÁTICAS NA DISPOSIÇÃO DO LEVETIRACETAM EM PACIENTES COM EPILEPSIA

Priscila de Freitas Lima

Orientador: Prof. Dr. Américo Cieki Sakamoto

Dissertação de Mestrado apresentada em 08/06/2010

Introdução: pacientes com epilepsia em tratamento com politerapia podem manifestar sinais de efeitos adversos e/ou ineficácia terapêutica decorrentes das possíveis interações entre as diferentes drogas antiepilépticas (DAEs) que compõem o esquema terapêutico. Para contornar esta situação, as DAEs desenvolvidas atualmente apresentam perfil farmacocinético com menor potencial para interações farmacológicas. O levetiracetam é uma nova DAE aprovada para utilização como terapia adjuntiva no tratamento de crises focais em adultos. Seu metabolismo, por não depender de forma significativa do sistema oxidativo microsossomal hepático, proporciona associações positivas com outras DAEs. Entretanto, observações clínicas de que a associação entre levetiracetam e DAEs indutoras enzimáticas (carbamazepina, fenitoína, fenobarbital e primidona) implicaria em menor disposição plasmática do levetiracetam têm sido confirmadas por alguns estudos e consideradas irrelevantes por outros. **Objetivo:** caracterizar e comparar o perfil farmacocinético do levetiracetam entre pacientes adultos com epilepsia em tratamento regular com DAEs indutoras enzimáticas e pacientes que estejam ou

em tratamento com DAEs que não alteram a atividade das enzimas de metabolismo ou sem tratamento farmacológico. **Casística e Métodos:** trinta pacientes foram selecionados, tendo sido alocados quinze em cada grupo, de acordo com o perfil das DAEs em uso regular (grupo indutor enzimático e grupo controle). A todos foi administrada dose única oral de levetiracetam 1000 mg. Ao longo de 24 horas foram coletadas sete amostras de sangue para determinação da concentração plasmática do levetiracetam e três amostras de urina para quantificação do levetiracetam eliminado inalterado e de seu principal metabólito inativo, o ucb L057. As amostras foram encaminhadas à Universidade de Pavia, Itália, e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). **Resultados:** foram calculados os seguintes parâmetros farmacocinéticos: concentração plasmática máxima de levetiracetam e o tempo decorrido até seu alcance; meia-vida de eliminação; constante de velocidade de eliminação; área sob a curva de concentração plasmática versus tempo; clearance oral aparente e clearance renal do levetiracetam; volume aparente de distribuição e quantidades excretadas na urina como fármaco inalterado e como ucb L057. Comparações entre os grupos foram feitas a partir dos testes *t de Student* ou *Mann-Whitney*, conforme apropriado. O grupo em tratamento com DAEs indutoras enzimáticas apresentou clearance oral aparente do levetiracetam significativamente maior e meia-vida de eliminação significativamente menor do que o grupo controle ($p < 0,05$). As quantidades tanto de levetiracetam quanto de ucb L057 eliminadas na urina não divergiram significativamente entre os dois grupos ($p > 0,05$). **Discussão e Conclusões:** estudos têm evidenciado o potencial das DAEs indutoras enzimáticas tanto para estimular a atividade de enzimas hidrolíticas, como as responsáveis pela conversão do levetiracetam a ucb L057, quanto para inibir e/ou competir pelos sítios de ligação dos transportadores presentes nos túbulos renais responsáveis pela secreção ativa do ucb L057. Embora o presente estudo não tenha objetivado identificar e caracterizar as vias de metabolismo e eliminação do levetiracetam, os dados encontrados evidenciam a diferença na disposição plasmática deste fármaco quando associado às DAEs indutoras enzimáticas. Considerando que o levetiracetam é majoritariamente prescrito em associações, as quais geralmente envolvem ao menos uma DAE indutora enzimática, o sucesso da terapêutica dos pacientes em que o levetiracetam for adicionado ao esquema medicamentoso prévio ou em que as DAEs indutoras enzimáticas tenham suas posologias modificadas pode ser prejudicado caso não haja o reconhecimento da possibilidade de ocorrência da alteração de perfil farmacocinético evidenciada.

Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço

RELAÇÃO ENTRE DIMENSÕES E PRESSÃO INTRALUMINAL DA TRANSIÇÃO FARINGOESOFÁGICA NO REPOUSO E DURANTE A FONAÇÃO E A PROFICIÊNCIA DA VOZ E DA FALA TRAQUEOESOFÁGICA

Telma Kioko Takeshita

Orientadora: Profa. Dra. Lilian Neto Aguiar Ricz

Dissertação de Mestrado apresentada em 12/04/2010

O propósito deste estudo foi relacionar as dimensões e a pressão intraluminal da transição faringoesofágica e a caracterização da proficiência de voz e de fala de laringectomizados totais com prótese traqueoesofágica. Participaram do estudo 20 laringectomizados totais com inserção secundária da prótese traqueoesofágica (Provox®, Atos Medical AB), sendo 17 homens e três mulheres, com idade média de 61 anos e sete meses, submetidos à laringectomia total clássica, com fechamento das camadas mucosa, submucosa e muscular para reconstrução da faringe. Todos os pacientes foram submetidos à coleta e registro do material de voz e de fala utilizando-se uma câmera de vídeo em sala silente. A avaliação da proficiência de voz e de fala foi realizada por quatro expertos, por meio de um protocolo de avaliação da comunicação traqueoesofágica. Em seguida, realizou-se a manometria esofágica para avaliação da pressão intraluminal da transição faringoesofágica no repouso e durante a emissão prolongada da vogal "a". Por fim, foi realizada a videofluoroscopia, sendo primeiramente orientado o paciente que deglutisse 20ml de sulfato de bário visando a identificação das estruturas anatômicas, para em seguida emitir por três vezes a vogal prolongada "a". Selecionaram-se dois quadros do exame videofluoroscópico, no repouso e durante a fonação, cujas dimensões foram avaliadas por três expertos, por meio de um programa computadorizado. Como resultados, 65% dos laringectomizados totais com prótese traqueoesofágica foram caracterizados como falantes moderados. Durante a fonação, a pressão intraluminal obtida foi de 38,1mmHg, e de 13,83mmHg no repouso. Dimensões de PTFE-PAF e de PTFE-PPF foram respectivamente, 4,73mm e 14,31mm (repouso) e 5,22mm e 18,56mm (fonação). No repouso, CLTFE foi de 12,55mm e 10,46mm durante a fonação. Durante a fonação, houve correlação positiva entre PTFE-PAF e amplitude de pressão intraluminal (0,41) da transição faringoesofágica. Correlações inversas

foram constatadas entre CLTFE e amplitude de pressão (-0,27) no repouso, e entre PTFE-PPF e amplitude de pressão, durante a fonação (-0,24). No repouso, os bons falantes apresentaram valor de pressão de 13,1mmHg, e durante a fonação de 25,5mmHg. Quanto às dimensões da transição faringoesofágica, os bons falantes apresentaram maior PTFE-PAF (5,39mm) e menor PTFE-PPF (13,07mm) no repouso. Já na fonação, PTFE-PAF tornou-se menor (3,86mm) e PTFE-PPF maior (24,3mm). CLTFE permaneceu com valor intermediário entre os moderados e ruins falantes com PTE no repouso (16,31mm) e durante a fonação (12,36mm). Concluiu-se que a proficiência de voz e de fala da maioria dos falantes traqueoesofágicos foi categorizada como moderada. As amplitudes de pressão e as dimensões PTFE-PPF e CLTFE da transição faringoesofágica apresentaram diferença significativa, considerando-se as condições de repouso e de fonação. Quando comparados aos falantes moderados e ruins, os bons falantes apresentaram valor intermediário de amplitude de pressão intraluminal na condição de repouso e menor valor durante a fonação; PTFE-PAF maior e PTFE-PPF menor, no repouso, e durante a fonação, a primeira dimensão tornou-se menor e a segunda maior. Apenas CLTFE se manteve com valores intermediários nas duas condições avaliadas para os bons falantes traqueoesofágicos.

ESTUDO DOS POTENCIAIS EVOCADOS MIOGÊNICOS VESTIBULARES DE ESTADO ESTÁVEL

Aline Cabral de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. José Fernando Colafêmina
Tese de Doutorado apresentada em 30/04/2010

A avaliação do potencial evocado miogênico vestibular é realizada por meio da captação de um potencial eletromiográfico, no domínio do tempo, decorrente da estimulação acústica da mácula sacular. Um método promissor, utilizado em outros tipos de potenciais evocados, possibilita a análise dos potenciais no domínio das frequências. A técnica de estado estável, como é conhecida, viabiliza a realização do exame com diferentes tipos de estímulos, simultaneamente, e a análise de cada uma das respostas em separado. O presente estudo teve como objetivo utilizar a técnica de estado estável para a obtenção de potenciais evocados miogênicos vestibulares, comparando a presença de respostas nos exames desses potenciais no domínio do tempo, com as obtidas nos exames, no domínio das frequências. Desse modo, captou-se o potencial evocado miogênico vestibular, no domínio do tempo, em 156 orelhas (78 adultos jovens com audição normal) nas frequências de 250, 500, 1000 e 2000 Hz e seguiu-se com a captação do potencial evocado miogênico de estado estável nessas mesmas frequências portadoras (escolhida uma frequência para cada indivíduo), moduladas em 20, 37, 40, 43, 70, 77 e 80 Hz. Na captação do exame no tempo, observou-se presença de onda em 150 dos 156 exames realizados (96,15%). As respostas encontradas, por frequência modulada, independente da portadora, registraram maiores presenças de picos e amplitudes médias para frequências menores que 43 Hz. A avaliação das respostas, por frequência portadora até 1.000 Hz, teve maior eficiência nas moduladoras de 37, 40 e 43 Hz, com *odds ratio* maior que 6,9. Para a portadora de 500 Hz, modulada a 20 Hz, entretanto, a resposta também esteve presente de maneira significativa e o valor do *odds ratio* igual a 11,5. Em 2.000 Hz, as respostas só foram observadas adequadamente em 37 e 40 Hz, porém com índices baixos de igualdade com as respostas do domínio do tempo (63,3 %). O potencial evocado miogênico vestibular de estado estável possui forte associação com o VEMP no domínio do tempo, sendo as respostas mais adequadas entre 37 e 43 Hz, independente da frequência portadora.

ESTUDO COMPARATIVO DE SUBSTÂNCIAS VISCOELÁSTICAS PARA PROMOÇÃO DA ESTABILIZAÇÃO DO EQUILÍBRIO OCULOMOTOR SEM IMPEDIR ROTAÇÕES OCULARES

Maria do Socorro Aguiar Ribeiro

Orientador: Prof. Dr. Harley E. A. Bicas
Tese de Doutorado apresentada em 14/05/2010

Objetivo: Estudar o efeito da injeção intraorbitária de substâncias viscoelásticas na dinâmica dos movimentos de rotação ocular de coelhos. **Métodos:** Trinta coelhos da raça Nova Zelândia foram divididos em três grupos experimentais de acordo com a substância introduzida na órbita por injeção peribulbar: gel Carboxivinílico (Grupo CARB; n=12), gel Polivinílico (Grupo POLI; n=13) e soro fisiológico (SF) 0,9% (CTRL; n=5) servindo como grupo controle. Foram avaliados: sinais oftalmológicos externos, medida da pressão intra-ocular (PIO) e medidas da força extrínseca necessária para promover deslocamentos tangenciais de adução ocular antes, imediatamente após a injeção das substâncias, e nos 7°, 30° e 60° dias após a injeção. Aos 60 dias, os animais foram mortos e o olho com os tecidos periorculares foram removidos para análise histológica. **Resultados:** Logo após a injeção das substâncias, o trabalho da força necessária para promover o deslocamento em adução aumentou de 2.77 ± 0.58 gf.mm para 5.43 ± 1.19 gf.mm ($p < 0.05$) no Grupo CARB e de 2.04 ± 0.29 gf.mm para 3.79

± 0.83 gf.mm ($p < 0.05$) no grupo POLI. No grupo controle, essa alteração não foi observada. Observou-se tendência de diminuição dos efeitos após 60 dias com as duas substâncias; no entanto, no Grupo CARB, o trabalho da força necessária para promover os deslocamentos, medido após 60 dias, permaneceu significativamente maior que os valores encontrados antes da injeção ($p < 0.05$). A análise histológica revelou processo inflamatório com formação de fibrose apenas em alguns animais do Grupo CARB, bem como a permanência do gel nos tecidos perioculares. **Conclusão:** Foi demonstrado que a injeção peribulbar do Gel CARB atua como contentor do sistema oculomotor de coelhos. Esse efeito persistiu, pelo menos por 60 dias, e não foi relacionado com alterações inflamatórias orbitárias. Assim, esse método pode ser considerado uma alternativa futura para tratamentos de alterações na estabilidade do sistema oculomotor, como o nistagmo.

REGISTRO DOS POTENCIAIS EVOCADOS AUDITIVOS DE TRONCO ENCEFÁLICO POR ESTÍMULOS *click* E *tone burst* EM RECÉM- NASCIDOS A TERMO E PRÉ-TERMO

Juliana Maria Soares Cavalcante

Orientadora: Profa. Dra. Myriam de Lima Isaac

Dissertação de Mestrado apresentada em 17/05/2010

O Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico (PEATE) tem se mostrado o método mais apropriado para registrar limiares auditivos em recém-nascidos. O objetivo deste trabalho foi caracterizar as respostas do PEATE com estímulos *click* e *tone burst* com 500, 2000 e 4000Hz, em recém-nascidos a termo e pré-termo, com função auditiva periférica íntegra. Foram examinados 61 recém-nascidos saudáveis, sendo 31 nascidos a termo e 30 nascidos pré-termo, até 28 dias de vida, sem fatores de risco para deficiência auditiva e com emissões otoacústicas evocadas transientes (EOAE-T) presentes em ambas as orelhas. Os PEATES, por *click* e *tone burst*, foram registrados nas intensidades de 80, 60, 40 e 30dBNA, bilateralmente, de forma ipsilateral. As respostas foram processadas pelo equipamento SMART-EP, com fones de inserção e eletrodos de prata fixados, após a limpeza da pele. Observou-se que as latências das ondas I, III e V e dos intervalos interpicos I-III, III-V e I-V a 80dBNA eram significativamente maiores em recém-nascidos prematuros do que nos nascidos a termo. As latências da onda V nas intensidades de 60, 40 e 30dBNA também foram maiores em recém-nascidos prematuros. Na análise do PEATE obtido com *tone burst*, a onda V mostrou latências maiores em recém-nascidos prematuros em todas as intensidades e frequências avaliadas. Foram encontradas latências menores para o estímulo *click* que para os *tone burst*, sendo que nestes houve diminuição da latência com o aumento da frequência. A diferença encontrada entre os gêneros foi aleatória e não foi considerada como relevante clinicamente. Há grande necessidade de averiguar a audição de recém-nascidos, de modo a registrar a configuração audiométrica em um menor espaço de tempo, sendo sugerido a utilização do *click* na determinação da sensibilidade auditiva de frequências altas e o *tone burst* nas frequências mais baixas.

AValiação ULTRAESTRUTURAL CILIAR EM DISCINESIAS PRIMÁRIAS E SECUNDÁRIAS: RELEVÂNCIA DAS ANORMALIDADES ULTRAESTRUTURAIS MICROTUBULARES

Ricardo Cassiano Demarco

Orientadora: Profa. Dra. Wilma T. Anselmo-Lima

Tese de Doutorado apresentada em 17/06/2010

Discinesia ciliar primária (DCP) é uma doença genética caracterizada por dismotilidade ciliar sistêmica irreversível. Certos defeitos axonômicos ciliares são patognomônicos nesta síndrome. As discinesias ciliares secundárias (DCS) são diferenciadas das primárias por serem alterações ultraestruturais reversíveis encontradas, por exemplo, após infecções respiratórias em mucosa previamente normal. Foram revisados 61 casos de DCP e DCS diagnosticadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Os achados mais frequentes das discinesias ciliares primárias foram ausência ou encurtamento dos braços de dineína, ausência do par de microtúbulos central e deslocamento de um dos pares de microtúbulos periféricos. As anormalidades nas discinesias ciliares secundárias foram cílios compostos e alterações dos microtúbulos periféricos. Distinguir as diferenciações ultraestruturais entre as DCP e DCS pode ser, muitas vezes, difícil, mas nas primárias, as alterações nos braços de dineína e nos microtúbulos centrais são fundamentais para a confirmação diagnóstica. As secundárias cursam, geralmente, com cílios compostos e desestruturação dos microtúbulos periféricos. Um fator importante na evolução das DCS é seu caráter localizado e reversível.

INFLAMAÇÃO CONJUNTIVAL SUBCLÍNICA EM PACIENTES COM GLAUCOMA PRIMÁRIO DE ÂNGULO ABERTO E RESULTADOS CIRÚRGICOS DE TRABECULECTOMIA

João Marcello Fortes Furtado

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Veronese Rodrigues

Tese de Doutorado apresentada em 25/06/2010

Introdução: Pacientes em uso de drogas antiglaucomatosas desenvolvem inflamação conjuntival clínica ou subclínica, mas não é claro se esta inflamação afeta os resultados cirúrgicos da trabeculectomia. **Objetivo:** O objetivo deste estudo é verificar se há correlação entre expressão conjuntival do marcador imunogenético HLA-DR (*Human Leukocyte Antigen-DR*) e pela presença de neutrófilos em lâminas coradas por Hematoxilina-Eosina (HE) e resultados da trabeculectomia em pacientes com glaucoma primário de ângulo aberto. **Pacientes e Métodos:** O estudo foi conduzido em 28 pacientes (34 olhos) portadores de glaucoma primário de ângulo aberto submetidos à trabeculectomia. Biópsias de conjuntiva bulbar inferior foram coletadas no momento da cirurgia e preparadas para análise imunohistoquímica e também coradas com HE. A expressão de HLA-DR no epitélio conjuntival foi determinada por microscopia óptica, e submetida à análise quantitativa e qualitativa. Nas lâminas coradas com HE foi avaliada a presença de neutrófilos indicando atividade inflamatória. **Resultados:** Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de sucesso e o de falha cirúrgica. **Conclusão:** Não há correlação entre inflamação conjuntival e falência de trabeculectomias em análises da expressão de HLA-DR e também pela verificação de neutrófilos em lâminas coradas por HE.

ATIVIDADE ELETROMIOGRÁFICA DO ESTERNOCLEIDOMASTOIDEO E POSTURA DE CABEÇA NA DEFORMIDADE DENTOFACIAL

Marcela Ralin de Carvalho Deda

Orientadora: Profa. Dra. Luciana V. Voi Trawitzki

Dissertação de Mestrado apresentada em 29/06/2010

A deformidade dentofacial pode levar a alterações na postura de cabeça e na atividade eletromiográfica do músculo esternocleidomastoideo. O objetivo do presente estudo foi verificar diferença entre as deformidades dentofaciais classe II e classe III em relação à postura de cabeça, dor muscular, amplitude de movimento cervical e atividade eletromiográfica do esternocleidomastoideo, comparativamente a um grupo controle. Participaram deste estudo 25 pacientes do Ambulatório de Cirurgia Craniomaxilofacial de um hospital público, formando o grupo com deformidade dentofacial. Dez pacientes apresentaram o diagnóstico de deformidade dentofacial classe II e compuseram o GD-II (idade média de 24,4 anos). Quinze pacientes apresentaram o diagnóstico de deformidade dentofacial classe III e compuseram o GD-III (idade média de 24,1 anos). Participaram do grupo controle quinze voluntários (idade média de 22,5 anos) sem alterações oclusais e evidências clínicas de deformidades esqueléticas. Todos os participantes responderam a um "*Protocolo para Centros Multiprofissionais para a determinação dos sinais e sintomas da DTM*". Em seguida, foi realizado um exame clínico do voluntário, no qual constaram de inspeção clínica da postura de cabeça, palpação digital de alguns músculos mastigatórios, cervicais e de tronco e avaliação da amplitude de movimento cervical através da goniometria. Posteriormente, a avaliação fotográfica da postura de cabeça do participante foi realizada através da análise do ângulo cabeça-pescoço. A atividade muscular foi avaliada através do exame eletromiográfico. Através da inspeção clínica, os indivíduos com a deformidade dentofacial classe II apresentaram uma anteriorização de cabeça, já os indivíduos com a deformidade dentofacial classe III apresentaram uma postura normal de cabeça, como os indivíduos controle. Em relação à inclinação e rotação de cabeça, não foi encontrada diferença entre os grupos. Pela fotogrametria, não houve diferença significativa entre os grupos na avaliação do ângulo cabeça-pescoço. Não se notou dor na musculatura mastigatória e sim em apenas alguns músculos cervicais e de tronco. Quanto à amplitude dos movimentos cervicais, os indivíduos com deformidade apresentaram restrição nos movimentos de rotação de cabeça. Não houve correlação entre a severidade dos sinais e sintomas de DTM e o ângulo cabeça-pescoço. Somente a deformidade dentofacial classe III influenciou na atividade eletromiográfica do músculo esternocleidomastoideo direito, na situação de rotação direita de cabeça. A presença de dor influenciou somente a atividade eletromiográfica do esternocleidomastoideo direito na rotação direita de cabeça. Quanto à postura de cabeça, a presença da deformidade dentofacial classe II influenciou na anteriorização de cabeça, apenas pela inspeção clínica. Não houve prevalência de dor nos indivíduos com deformidade na musculatura mastigatória, houve somente em alguns músculos cervicais e de tronco. A deformidade classe II e III influenciou na restrição de movimento de rotação cervical. A severidade dos sinais e sintomas de DTM não influenciou no ângulo cabeça-pescoço. A presença da deformidade não levou a uma modificação da atividade eletromiográfica do esternocleidomastoideo. A presença de dor implicou no aumento da atividade eletromiográfica apenas no músculo esternocleidomastoideo direito na rotação de cabeça para o lado direito.

Ortopedia, Traumatologia e Reabilitação

INFLUÊNCIA DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE ALTA VOLTAGEM NA REGENERAÇÃO DOS NERVOS CIÁTICOS DE RATOS - ESTUDO ATRAVÉS DO IFC

Anita Sofia Leite Leoni

Orientador: Prof. Dr. Nilton Mazzer

Dissertação de Mestrado apresentada em 19/04/2010

As lesões nervosas periféricas englobam técnicas para reproduzi-las experimentalmente e intervenções que busquem acelerar sua regeneração. A estimulação elétrica de alta voltagem (EEAV) é empregada em várias pesquisas, com diversos fins, porém, na regeneração nervosa periférica ainda não se sabe qual o seu papel. O objetivo do presente estudo foi analisar a eficiência do tratamento com a estimulação elétrica de alta voltagem (EEAV) em 3 diferentes locais, sendo aplicada precocemente na regeneração do nervo ciático de ratos, submetido à lesão por esmagamento. Para avaliar a recuperação funcional do nervo ciático, utilizamos o índice funcional do ciático (IFC), por ser uma avaliação confiável e que tem relação direta com a morfologia. Para produzir a lesão por esmagamento, utilizamos um dispositivo de peso morto com carga de 5kg durante 10 minutos, que produziu uma lesão nervosa grave. Em seguida, os animais foram submetidos à EEAV catódica nos parâmetros: frequência de 50Hz, 100V de tensão, 20 minutos diários, 5 dias por semana, durante 3 semanas, a partir do 1º dia pós-operatório. Os grupos foram assim divididos: grupo 1 (lesão sem estimulação); grupo 2 (lesão + estimulação na região da medula e do gânglio da raiz do ciático e na região da lombar contralateral); grupo 3 (lesão + estimulação na região da medula e do gânglio da raiz do ciático e no músculo gastrocnêmio); grupo 4 (lesão + estimulação no gastrocnêmio e na coxa contralateral); grupo 5 (lesão + estimulação simulada). O IFC foi avaliado semanalmente durante 7 semanas, partindo do pré-operatório até a 6ª semana pós-operatória. Os resultados mostraram desempenho significativamente superior do grupo 2 em relação ao grupo 1 nas 3 primeiras semanas, enquanto que o grupo 3 teve desempenho significativo na 3ª semana e o grupo 4 teve desempenho significativamente negativo na 4ª e 6ª semanas. O grupo 5 teve desempenho semelhante ao grupo 1. Então, podemos concluir que a EEAV aplicada precocemente, foi positiva no tratamento da região da medula e gânglio da raiz nervosa do ciático com o eletrodo dispersivo na região lombar contralateral ou no músculo gastrocnêmio. Porém, proporcionou efeitos negativos no tratamento com eletrodo ativo no músculo gastrocnêmio e dispersivo na coxa contralateral.

AVALIAÇÃO DO CONTROLE POSTURAL E DOS ASPECTOS BIOMECÂNICOS EM MULHERES PÓS-MENOPAUSAIS

Gustavo de Carvalho da Costa

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Cristina Carvalho de Abreu

Dissertação de Mestrado apresentada em 29/04/2010

Estudos mostraram que mulheres na pós-menopausa apresentam diminuições na força muscular e amplitude de movimento, alterações posturais e déficits de equilíbrio. Entretanto, há uma carência de estudos na literatura que avaliaram dados biomecânicos e de controle postural em mulheres nos primeiros anos após a menopausa. O objetivo do estudo foi avaliar a influência de variáveis biomecânicas como força muscular, amplitude de movimento, alinhamento postural sobre o equilíbrio estático e o teste de levantar e sentar em mulheres com até 5 anos após a menopausa. O estudo foi dividido em dois grupos: Grupo 1 (n=34), que incluiu mulheres no período da pós-menopausa com média de idade de $53,09 \pm 3,94$ anos, peso de $70,72 \pm 12,63$ kg e altura de $157 \pm 0,07$ cm e um grupo controle (Grupo 2, n=23) que incluiu mulheres na menacme, com média de idade de $23,04 \pm 2,87$ anos, peso de $55,73 \pm 6,96$ kg e altura de $163 \pm 0,05$ cm. Foram avaliados o equilíbrio estático e a atividade dinâmica (por meio do teste de levantar e sentar 5 vezes) usando o sistema Polhemus; o grau de cifose torácica pelo método flexicurva; a amplitude de movimento dos membros inferiores por meio da goniometria; a força muscular dos membros inferiores utilizando o conceito de 1 repetição máxima e o grau de perda de massa muscular (sarcopenia) através do cálculo do índice muscular esquelético (apenas no grupo 1). No equilíbrio estático foi avaliado o deslocamento máximo ântero-posterior do tronco em 4 diferentes condições nos grupos 1 e 2 (plataforma fixa com olhos abertos $1,29 \pm 0,51$ cm x $1,42 \pm 0,42$ cm e fechados $1,40 \pm 0,49$ cm x $1,57 \pm 0,42$ cm, e plataforma instável com olhos abertos $1,77 \pm 0,46$ cm x $2,09 \pm 0,88$ cm e fechados $2,28 \pm 0,56$ cm x $2,45 \pm 0,79$ cm), respectivamente. No teste de levantar e sentar foi avaliado o tempo total gasto pelas voluntárias para realizá-lo ($10,76 \pm 1,41$ segundos x $9,22 \pm 0,89$ segundos), além do deslocamento máximo ântero-posterior de tronco ao levantar (subida $9,96 \pm 3,88$ cm x $10,21 \pm 6,91$ cm) e sentar (descida $10,24 \pm 3,61$ cm x $10,71 \pm 6,67$ cm) nos

grupos 1 e 2, respectivamente. Os resultados mostraram que houve diferença significativa ($p < 0,01$) entre os grupos apenas no tempo utilizado para levantar e sentar da cadeira. Os dados referentes ao grau de cifose torácica mostraram que o grupo 1 apresentou valores significativamente maiores comparado ao grupo 2 ($43,76 \pm 11,04^\circ$ x $31,72 \pm 10,89^\circ$, $p < 0,01$). Houve diferença significativa na amplitude de movimento do membro inferior direito entre os grupos ($p < 0,01$), exceto na dorsiflexão do tornozelo. Observou-se também uma diferença significativa ($p < 0,01$) entre os grupos 1 e 2 ao comparar tanto a força muscular de extensores ($9,32 \pm 4,24$ x $11,83 \pm 3,98$) quanto de flexores do joelho ($6,38 \pm 2,20$ x $8,56 \pm 2,19$). O valor do índice muscular esquelético no grupo pós-menopausa foi $6,74 \pm 0,65$ Kg/m² (sarcopenia moderada). Conclui-se que as mulheres com até 5 anos após a menopausa já apresentam alterações dos aspectos biomecânicos e menor tempo para realizar o teste de levantar e sentar, comparadas ao grupo controle, o que nos alerta para a necessidade de intervenções precoces, as quais, possivelmente repercutirão positivamente na qualidade de vida destas mulheres com o avançar da idade.

AValiação DO DESLOCAMENTO DO CENTRO DE PRESSÃO E DA ATIVIDADE ELETROMIOGRÁFICA DOS MÚSCULOS ESTABILIZADORES DA PATELA E DO QUADRIL DURANTE EXERCÍCIOS DE STEP

Marcelo Camargo Saad

Orientadora: Profa. Dra. Débora Bevilacqua Grossi

Dissertação de Mestrado apresentada em 21/05/2010

O objetivo deste trabalho foi avaliar a área do deslocamento do centro de pressão, a força de reação do solo (FRS) e a atividade eletromiográfica dos músculos estabilizadores da patela e glúteo médio durante o apoio unipodal nos exercícios de *step-up* e *step-down* em indivíduos saudáveis e com Dor Anterior no Joelho (DAJ) do gênero feminino. Participaram deste estudo 15 voluntários saudáveis (grupo controle) e 15 voluntários com DAJ (grupo DAJ), todos foram submetidos ao exame de eletromiografia dos músculos Vasto Medial Oblíquo (VMO), Vasto Lateral Oblíquo (VLO), Vasto Lateral Longo (VLL) e glúteo médio (Gmed) juntamente com a avaliação da plataforma de força durante às atividade de *step-up* e *step-down*, os equipamentos foram sincronizados durante a coleta dos dados. O grupo DAJ apresentou maior área de deslocamento do centro de pressão para todas as situações avaliadas bem como uma menor magnitude da FRS durante a descida do *step* realizado com o membro inferior dominante e mais doloroso (perna direita). A avaliação eletromiográfica mostrou que a atividade de *step-up* apresenta maior atividade muscular comparada ao *step-down*, quando comparadas, o grupo DAJ apresentou menor atividade muscular em relação ao grupo controle para todos os músculos avaliados nas duas situações de exercícios (subida ou descida do *step*). **Conclusão:** Os indivíduos do grupo DAJ apresentam maior área de deslocamento do centro de pressão, ou seja, são menos estáveis na realização das atividades de *step*; atividades de *step-down* apresentam menor área de deslocamento do centro de pressão; Os indivíduos com DAJ descarregam menos peso no membro inferior acometido; As atividades de *step-down* apresentam maiores picos de FRS; indivíduos do grupo DAJ apresentam menor atividade muscular.

EFEITO DA HEMODILUIÇÃO NORMOVOLEMICA AGUDA NA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA: COMPARAÇÃO ENTRE OS TESTES COLHIDOS DE UM MODELO *in vivo* E DE UM MODELO *in vitro*

Marco Aurélio Beloto de Souza

Orientador: Prof. Dr. Luis Vicente Garcia

Tese de Doutorado apresentada em 26/05/2010

O objetivo desse estudo foi avaliar o comportamento da coagulação sanguínea em dois graus de profundidade de hemodiluição – superficial com Ht de 30% e profunda com Ht de 20%, nas situações *in vivo* e *in vitro*, tendo como grupo controle os próprios pacientes não hemodiluídos. Para isso foram selecionados 13 pacientes ASA I ou II, submetidos à cirurgia de grande porte. A hemodiluição *in vivo* foi realizada segundo a fórmula de Gross até a obtenção dos hematócritos pretendidos. O sangue retirado foi repostado com solução de ringer com lactato na proporção de 3 ml para cada ml de sangue retirado e foi devolvido ao paciente ao final do procedimento anestésico. Avaliação hemodinâmica foi realizada continuamente e registrada a cada 15 minutos. Foram colhidos exames para os testes de coagulação nos momentos M1 – antes da hemodiluição, M2 – hemodiluição até hematócrito de 30% e M3 – hemodiluição até hematócrito de 20%. A hemodiluição *in vitro* foi realizada com a adição de ringer lactato a volume de sangue previamente colhido. O volume de ringer lactato acrescentado obedeceu à fórmula $C1V1 = C2V2$, onde C1 é o hematócrito inicial, o V1 é o volume de sangue no tubo de ensaio, C2 é o hematócrito pretendido e V2 o volume final do tubo de ensaio. Amostras de sangue para os testes de coagulação foram colhidas em M2 e M3. A média de idade foi de $39,85 \pm 18,39$. O volume de sangue retirado para a obtenção dos hematócritos de 30% e 20% foi de $1158,5 \pm 425,79$ ml e $2211,31 \pm 726,22$ ml, respectivamente. Não houve

diferença entre a pressão arterial média e a frequência cardíaca nos 3 momentos. Houve diminuição da temperatura em M2. A contagem de plaquetas diminuiu em M2 e M3. Os testes de coagulação *in vivo* mostraram aumento do TP, INR, TTPA, TT tanto em M2 quanto em M3. Houve diminuição da concentração de fibrinogênio em M2 e M3. Os testes de coagulação *in vitro* apresentaram comportamento semelhante. Quando se comparou o TP *in vivo* com o TP *in vitro* houve diferença estatística em M3. Nos demais testes *in vivo* comparados com os *in vitro* não houve diferença estatística em todos os momentos analisados. Conclui-se que a hemodiluição afeta os testes de coagulação e que a hemodiluição *in vivo* ou *in vitro* apresenta o mesmo comportamento no tocante aos testes de coagulação.

ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO POPULACIONAL BRASILEIRO SOBRE DISFUNÇÃO TEMPOROMANDIBULAR UTILIZANDO O RDC/TMD

Letícia Mêlo de Souza

Orientadora: Profa. Dra. Anamaria Siriani de Oliveira

Dissertação de Mestrado apresentada em 10/06/2010

O objetivo do estudo foi estimar a prevalência de disfunção temporomandibular e aspectos psicossociais associados a partir da população residente no Distrito de Saúde Oeste de Ribeirão Preto. Adotou-se como critério para a definição do tamanho amostral o tempo disponível para o levantamento dos dados e a disponibilidade de recursos por unidade amostrada, sendo prevista a visitação de 137 domicílios, selecionados por amostragem casual simples. Foram incluídos, indivíduos que aceitaram participar formalmente da pesquisa, com idades entre 20 e 60 anos, selecionados aleatoriamente a partir dos domicílios sorteados. As avaliações dos subtipos diagnósticos mais comuns de DTM e aspectos psicossociais associados foram realizadas nas residências dos indivíduos, segundo os critérios do RDC/TMD (Eixo I e Eixo II) por um examinador treinado. As prevalências foram calculadas analisando a proporção de casos encontrados na amostra de domicílio avaliada. explorações adicionais sobre as possíveis associações entre os subtipos diagnósticos de DTM e as variáveis pertencentes ao Eixo II foram realizadas por meio do teste estatístico exato de Fisher, com nível de significância de 5%. Os dados foram trabalhados no pacote estatístico STATA. Durante os meses de abril a novembro de 2009, os 137 domicílios amostrados contabilizaram 50 perdas amostrais e 87 avaliações. Destas, 58 indivíduos (66,67%) eram do sexo feminino e 29 (33,33%) do sexo masculino, com idade média de 40,2 anos (dp=13,8 anos) e 39,5 anos (dp=12,5 anos), respectivamente. A prevalência estimada do subtipo diagnóstico do Grupo I (dor miofascial) foi de 37,9% (IC 95%: 5 70); do Grupo II (deslocamentos do disco) de 4,6% (IC 95%: 1 11) e 3,5% (IC 95%: 1 8) para as articulações direitas e esquerdas respectivamente; do Grupo III (artralgia, osteoartrite e osteoartrose) de 16% (IC 95%: 3 35) e 24,2% (IC 95%: 1 49) para as articulações direitas e esquerdas respectivamente. Deste modo, a prevalência estimada de casos classificados com algum subtipo diagnóstico de DTM foi de 46% (IC 95%: 12 80). Não houve associação entre a presença do diagnóstico de DTM ($p>0,05$) e as variáveis sócio-demográficas idade, raça, nível educacional, estado civil, situação de trabalho e renda econômica mensal. No entanto, houve associação ($p<0,05$) entre a presença do diagnóstico de DTM e as variáveis sexo, relato de cefaléia, grau de incapacidade relacionada à dor e os níveis de depressão e sintomas físicos inespecíficos.

ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS DO EXERCÍCIO AERÓBIO E RESISTIDO SOBRE AS ADAPTAÇÕES AUTÔNOMICAS CARDÍACAS EM RATAS OVARIECTOMIZADAS

Larissa Christina Rossit silveira

Orientador: Prof. Dr. Hugo Celso Dutra de Souza

Dissertação de Mestrado apresentada em 29/06/2010

Nós comparamos os efeitos dos exercícios físicos, aeróbio e resistido, sobre as adaptações autonômicas cardíacas em ratas ovariectomizadas por meio de diferentes abordagens; duplo bloqueio farmacológico autonômico (DBFA); sensibilidade barorreflexa (SBR) e variabilidade da frequência cardíaca (VFC). Ratas Wistar (@250 g) foram divididas em seis grupos: sham sedentário (SS), sham submetido ao exercício aeróbio (SA), sham submetido ao exercício resistido (SR), ovariectomizado sedentário (OS), ovariectomizado submetido ao exercício aeróbio (OA) e ovariectomizado submetido ao exercício resistido (OR). A ovariectomia não alterou a pressão arterial, a frequência cardíaca basal e a SBR, entretanto promoveu redução nas oscilações de baixa frequência (LF=0.25-0.75Hz) e aumento nas oscilações de alta frequência (HF=0.75-2.5Hz). O DBAF mostrou que os exercícios, aeróbio e resistido, aumentaram a predominância vagal nos animais sham, entretanto a variação da FC à metilatropina estava atenuada nos animais submetidos ao exercício resistido. A avaliação da SBR mostrou que o exercício resistido reduziu as respostas taquicárdicas nos animais sham e ovariectomizados.

A análise da VFC nos animais sham mostrou que o exercício físico aeróbio reduziu as oscilações de LF e aumentou as oscilações de HF. Por sua vez, o exercício físico resistido teve efeito inverso. Os resultados da VFC também mostraram que os dois tipos de exercícios, aeróbio e resistido, tiveram pouco efeito sobre a modulação autonômica nos animais ovariectomizados. Nós concluímos que somente o exercício aeróbio melhora o controle autonômico cardíaco em ratas sham. Adicionalmente, nossos achados mostraram que o controle autonômico cardíaco em ratas ovariectomizadas sofre pouco efeito dos dois tipos de treinamento avaliados.

Patologia Experimental

ESTUDO DAS VIAS INTRÍNSECA E EXTRÍNSECA DA APOPTOSE EM GLIOBLASTOMAS ATRAVÉS DE ARRANJOS DE MATRIZES TECIDUAIS

Fabiano Pinto Saggioro

Orientador: Prof. Dr. Luciano Neder Serafini

Tese de Doutorado apresentada em 09/04/2010

Glioblastomas (GBMs) são neoplasias das células da glia altamente letais, cujas funções dos genes TP53 e/ou PTEN estão frequentemente alterados ocasionando a ativação do ciclo celular e perda da regulação da apoptose. Inexistem estudos na literatura que tenham realizado uma avaliação sistemática de ambas as vias da apoptose numa grande série de casos, sendo este o principal objetivo do presente trabalho. Para tanto foram analisadas as expressões das principais proteínas das vias extrínseca (Fas, FasL, caspase-8 clivada e caspase-3 clivada) e intrínseca da apoptose (Pten, EGFR, ILK, p53, Bcl-2, BAK, BAD, Rb e mdm2) em 97 casos de GBMs do Projeto Genoma Clínico do Câncer da FAPESP. As amostras (1mm) foram dispostas em arranjos de matrizes teciduais (TMA), com representação de pelo menos 2 áreas distintas da neoplasia. Os pacientes foram operados no Hospital São Paulo (UNIFESP/EPM) e no Hospital das Clínicas (FMRP/USP) num período de 15 anos (1992 a 2006). A idade média de 55,1 anos \pm 13,9 DP (mediana de 56 anos e variação de 18 anos a 78 anos) e a razão masc./fem. de 1,2. A quantificação das expressões das reações imuno-histoquímicas foi realizada em densidade óptica integrada (D.O.I.) com auxílio de microscópio de luz acoplado ao programa de análise de imagens ACIS III. O índice de proliferação celular foi avaliado pelo MIB-1 (IPC-MIB-1), cujos resultados foram correlacionados com as expressões das proteínas de ambas as vias da apoptose, sobrevida e estadiamento clínico. Como tecidos-controles (n = 116) foram utilizadas amostras de tecido nervoso não-neoplásico (grupo controle SNC, n = 36) e de fígado, pulmão, cólon e pâncreas não-neoplásicos (grupo Miscelânea, n = 80). A hiperexpressão foi definida como o aumento da expressão em relação à mediana (P50) da expressão observada nos tecidos-controles do SNC. Em relação às proteínas da via extrínseca da apoptose, observou-se que a maioria dos GBMs mostrou aumento da expressão de Fas e FasL (membrana: 61,05% e 64,21%; citoplasma: 58,95% e 63,16%, respectivamente) e caspase-8 (59,79%) em relação ao grupo-controle SNC. O aumento da expressão da caspase-3 foi observado em 43,16% dos casos. Em relação às proteínas da via intrínseca, o aumento de expressão da Pten foi observado na totalidade dos casos. A maioria absoluta dos casos mostrou hiperexpressão da mdm2 (83,51%), p53 (82,42%), Bcl-2 (81,44%), Bad (79,57%), ILK (68,42%) e Rb (63,54%). O aumento da expressão de Bak e EGFR foram observados em 49,47% e 46,87% dos casos. Todos os GBMs mostraram positividade nuclear da p53 (valor de corte > 3%). O IPC-MIB-1 médio foi de 10,46% \pm 7,7 (mediana de 9,5%). Ao se correlacionar os níveis de expressão das proteínas analisadas, observou-se correlação inversamente proporcional (negativa) entre FasL vs caspase-3; Pten vs caspase-3; Pten vs ILK; EGFR vs ILK e EGFR vs caspase-3. Uma correlação diretamente proporcional (positiva) foi observada entre Pten vs p53; Pten vs IPC-MIB-1; Pten vs Bad vs p53; Bak vs caspase-3. Em relação ao tempo de sobrevida, os pacientes cujos GBMs com aumento da expressão de BAK e/ou caspase-3 apresentaram sobrevida significativamente maior em relação aos que apresentaram hipoexpressão dessas duas proteínas pró-apoptóticas [BAK: sobrevida de 273 dias vs 162,5 dias; caspase-3: sobrevida de 294 dias vs 109 dias (medianas)]. De acordo com os resultados, podemos concluir que ambas as vias da apoptose apresentam-se comprometidas nos GBMs; a via extrínseca da apoptose mediada por Fas/Fas-L apresenta-se provavelmente inibida nestes tumores; a Pten parece exercer uma importante ação moduladora da atividade proliferativa e da apoptose; a via do p53 apresenta-se muito provavelmente bloqueada em grande parte dos casos; o bloqueio da apoptose pela bcl-2 parece exercer um evento importante na maioria absoluta dos GBMs e a hiperexpressão da Bak parece ser um evento importante para neutralizar a ação anti-apoptótica da Bcl-2 sobre a caspase-3 clivada. Embora o tempo de

sobrevida global tenha sido pequeno, a hiperexpressão de Bak e caspase-3 clivada correlacionou-se com maior tempo de sobrevida. Embora o estadiamento da neoplasia seja de valor prognóstico, os casos com estadiamento mais avançado apresentaram expressão significativamente maior tanto de FAS-L como de Bad. Estudos funcionais serão ainda necessários a fim de se avaliar melhor o complexo inter-relacionamento das moléculas pró- e anti-apoptóticas nestes tumores.

EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO ASSOCIADO À LUZ CONTÍNUA NA CARCINOGENESE COLÔNICA EM RATOS

Fernando Tadeu Trevisan Frajacomio

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia

Dissertação de Mestrado apresentada em 30/04/2010

O exercício físico tem sido proposto como uma terapia não farmacológica efetiva para a prevenção e o tratamento de neoplasias, especialmente no trato gastrointestinal, com destaque ao câncer de cólon. A Glândula Pineal é considerada um órgão importante na carcinogênese, especialmente por modular o ritmo circadiano e por secretar o hormônio melatonina. O presente estudo visou investigar o papel da glândula pineal sobre a carcinogênese colônica experimental de ratos submetidos ao exercício físico. Dessa forma, propusemos investigar biomarcadores colônicos de câncer, focos de criptas aberrante (FCAs), antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), ciclooxigenase 2 (COX-2) e a Caspase-3; além de parâmetros oxidativos hepáticos de peroxidação lipídica e a glutatona reduzida (GSH) e da atividade da glândula pineal por meio da expressão dos receptores colônicos de melatonina. O estudo foi conduzido através dos grupos experimentais com ratos machos *Wistar* sendo o grupo controle (C), luz contínua (L), exercício (E) e luz contínua associada ao exercício (LE). De forma similar, os grupos foram repetidos e expostos ao carcinógeno químico 1,2-dimetilhidrazina (DMH), tendo recebido quatro doses de 40 mg/kg por via intraperitoneal. O treinamento físico experimental foi realizado pelo modelo de natação progressivo, 5 dias por semana, durante 10 semanas. Após o período de treinamento, os animais foram sacrificados, sendo coletadas amostras de fígado e colón para análise. O estudo do fígado revelou uma significativa influência do DMH na modulação dos parâmetros oxidativos. As análises colônicas dos FCAs, PCNA e da COX-2 mostraram-se moduladas pelo exercício físico bem como aumento do índice de apoptose quando o mesmo foi realizado em condições normais do ritmo circadiano. Em contrapartida, a inibição fisiológica da glândula pineal pela exposição à luz contínua foi determinante para reverter os efeitos do exercício físico sobre o controle desses biomarcadores colônicos. Em suma, nossos dados apontam para a forte influência da atividade da glândula pineal sobre o complexo de adaptações do exercício físico no tecido colônico de ratos *Wistar* expostos a um carcinógeno químico.

Saúde da Criança e do Adolescente

INFECÇÃO CONGÊNITA PELO HERPESVÍRUS HUMANO TIPO 6 (HHV-6): DETERMINAÇÃO DA PREVALÊNCIA PELA DETECÇÃO DO DNA VIRAL

Carla Bertolini Frigori

Orientadora: Profa. Dra. Aparecida Yulie Yamamoto

Dissertação de Mestrado apresentada em 05/04/2010

O Herpesvírus humano tipo 6 (HHV-6) pertence à subfamília *Betaherpesvirinae*, a mesma do citomegalovirus (CMV), que é considerado o agente causal mais frequente de infecção congênita no homem. Pouco é conhecido sobre a prevalência da infecção congênita pelo HHV-6, especialmente no Brasil. Também ainda não está bem estabelecido se a infecção congênita por este vírus é causa de doença no período neonatal e se cursa com alguma seqüela futura como a surdez neurosensorial, a exemplo do CMV. Ainda, dados sobre excreção do HHV-6 na saliva e na urina de crianças com infecção congênita permitiria conhecer se a replicação deste vírus é prolongada como ocorre em crianças infectadas congenitamente pelo CMV. Os objetivos deste estudo consistiram em estimar a prevalência da infecção congênita pelo HHV-6 em recém-nascidos (RN) atendidos no HCFMRP-USP, descrever as características clínicas ao nascimento das crianças identificadas como infectadas e verificar a persistência da excreção do HHV-6 na saliva e na urina durante o

seguimento. Delineou-se um estudo descritivo de prevalência através de uma triagem neonatal desta infecção. Foram incluídos recém-nascidos atendidos no HCFMRP-USP, a termos ou pretermos, nascidos consecutivamente e com quaisquer características clínicas ao nascer, após a obtenção do consentimento informado materno. A infecção congênita pelo HHV-6 foi definida pela detecção do DNA viral na saliva e no sangue capilar pela reação em cadeia da polimerase (PCR) na primeira semana de vida. Amostras sequenciais de urina e saliva foram coletadas das crianças infectadas congenitamente pelo HHV-6 durante o seguimento para verificação da persistência da excreção viral nestes sítios. Dos 1127 recém-nascidos incluídos no estudo, foram processadas 2254 amostras de saliva, sendo obtidas duas amostras de saliva de cada RN ao nascimento. Do total dos 1127 RN, 927 (82,25%) tiveram também uma amostra de sangue capilar processada para detecção do DNA do HHV-6. A detecção do DNA do HHV-6 foi observada na saliva e no sangue capilar em 6 recém-nascidos; portanto, a prevalência da infecção congênita pelo HHV-6 foi de 0,53% (IC de 95%: 0,21-1,10). Com exceção de uma criança, todas as crianças identificadas como portadoras da infecção congênita pelo HHV-6 eram assintomáticas ao nascimento. A virúria não foi observada em 33% destas crianças. A persistência da excreção do HHV-6 na urina e na saliva destas crianças ocorreu até a mediana da idade de seguimento de 5,5 meses (com variação de 5 a 9 meses). A prevalência de infecção congênita pelo HHV-6 não diferiu das relatadas em estudos prévios em diferentes populações de outros países e é similar à taxa de prevalência de 1% de infecção congênita pelo CMV em nosso meio. A maioria destas crianças infectadas congenitamente não apresentou sinais clínicos ao nascer. A replicação deste vírus nestas crianças é prolongada, a exemplo do que ocorre com as crianças infectadas congenitamente pelo CMV.

SOROPREVALÊNCIA AO CMV EM GESTANTES NA CIDADE DE RIBEIRÃO PRETO, SÃO PAULO

Regina Aparecida Castellucci Camossatto

Orientadora: Profa. Dra. Aparecida Yulie Yamamoto

Dissertação de Mestrado apresentada em 09/04/2010

A incidência da infecção e da doença congênita pelo citomegalovírus depende das características epidemiológicas populacionais e imunológicas das mulheres em idade fértil. Apesar de estudos realizados na população brasileira demonstrarem a alta incidência da infecção congênita por este vírus, ainda não é conhecido a real soroprevalência materna ao CMV nesta população. As características epidemiológicas regionais da infecção por este vírus são importantes na tomada de medidas de prevenção. Foi objetivo deste estudo a determinação da soroprevalência ao CMV estratificada pela idade, em uma população representativa de gestantes atendidas em um programa público de pré-natal na cidade de Ribeirão Preto. Para o cumprimento deste objetivo, foram incluídas retrospectivamente 4615 gestantes que realizaram o pré-natal nas 36 unidades básicas de saúde responsáveis pelo serviço de assistência primária pública I na cidade de Ribeirão Preto, no período de setembro de 2005 a setembro de 2006. O plano amostral constituiu na seleção de forma aleatória, proporcionada e estratificada por faixa etária nas cinco principais distritais de saúde do município de Ribeirão Preto. Encontrou-se uma soroprevalência ao CMV nesta população de gestantes de 96,7%, (IC= 95%: 95,4 ; 97,7 %). A soroprevalência estratificada pela idade e os respectivos intervalos de confiança nas diferentes faixas etárias foram de 95,8%, (92,1- 97,9) na faixa etária de 12 a 19 anos, 97,1% (94,4 -98,6%) na idade de 20 a 24 anos; 97,1% (93,9-98,7) na faixa etária de 25 a 29 anos e de 96,7%, (93,1 - 98,5). , e na faixa etária de 30 a 46 anos Uma alta soroprevalência ao CMV foi encontrada nesta população de A soroprevalência estratificada pela idade mostrou que não houve aumento da soropositividade ao CMV, com o aumento da idade, sugerindo que a infecção pelo CMV ocorre precocemente nesta população. A alta soroprevalência materna ao CMV sugere que a infecção materna não primária é responsável pela grande maioria dos casos de infecção congênita pelo CMV nesta população.

FATORES ASSOCIADOS AO CATCH - UP E *Catch-down* DE CRESCIMENTO ESTATURAL EM ESCOLARES

Rosângela Fernandes Lucena Batista

Orientadora: Profa. Dra. Heloisa Bettiol

Tese de Doutorado apresentada em 14/04/2010

Introdução: A restrição de crescimento intra-uterino (RCIU) e o nascimento pré-termo (PT) são considerados problemas de saúde pública nos países em desenvolvimento. A ocorrência de *catch-up* propicia que estes consigam equiparar seu crescimento ao das crianças nascidas sem RCIU e a termo. **Objetivo:** Avaliar a influência da restrição do crescimento intra-uterino e do nascimento pré-termo na ocorrência de *catch-up* e *catch-down* da altura em escolares de

duas coortes de nascimentos de cidades com condições sócio-econômicas contrastantes, no Nordeste e no Sudeste do Brasil. **Método:** Foram estudadas 1.463 crianças, cujas informações foram coletadas ao nascer e na idade escolar em 1994 e 2004/2005 em Ribeirão Preto, SP (RP) e em 1997/1998 e 2005/2006 em São Luís, MA (SL). A variável resposta foi definida pela diferença da altura entre o escore z do escolar e escore z do nascimento. Considerou-se como *catch-up* uma mudança de escore $z \geq 0,67$ e como *catch-down* mudança no escore $z \leq -0,67$. A variável explanatória foi dividida em quatro categorias: sem RCIU e a termo (NRCIU-T), só RCIU (RCIU-T), só PT (NRCIU-PT) e PT com RCIU (RCIU-PT). Estimativas do risco relativo para *catch-up* e *catch-down* foram obtidas por regressão logística multinomial em modelos separados por cidade. **Resultados:** As crianças de RP apresentaram maior proporção de *catch-up* (32,7%) e menor de *catch-down* (19,3%) de altura, do que as de SL (21,9% e 41,8% respectivamente) ($P < 0,001$). Em Ribeirão Preto, na análise ajustada, as crianças NRCIU-PT (RR=4,17; IC=2,35;6,38) e do sexo feminino (RR=1,54; IC=1,10;2,65) apresentaram maior risco de *catch-down*; os maiores riscos de apresentar *catch-up* ocorreram entre as crianças RCIU-T (RR=5,50; IC=3,40;9,94), RCIU-PT (RR=5,38; IC=3,03;12,57) e naquelas cujas mães eram primíparas (RR=1,82; IC=1,33;3,08). Em São Luís, o maior risco de *catch-down* foi observado entre as crianças que eram NRCIU-PT (RR=5,08; IC=2,34;11,0), do sexo feminino (RR=1,51; IC=1,01;2,26) e com renda ≤ 5 salários mínimos (RR=2,79; IC=1,51;5,14); o menor risco de *catch-down* (RR=0,31; IC=0,15;0,65) e maior de *catch-up* (RR=3,36; IC=1,95;5,79) foi observado entre as crianças com RCIU-T. Nas duas cidades as crianças que nasceram com RCIU apresentaram as menores médias do z-escore ao nascer e na idade escolar. As maiores médias foram observadas para os NRCIU-PT ao nascer e para os RCIU-T na idade escolar nas duas cidades. Apenas as crianças NRCIU-PT apresentaram redução na média do z-escore entre o nascimento e a idade escolar (de 0,25 (IC=0,08;0,41) para -0,47 (IC = -0,61;-0,33) em RP e de 0,73 (IC=0,50;0,97) para -0,97 (IC = -1,15;-0,78) em SL), enquanto os demais grupos mostraram aumento nessa média ($P < 0,001$). **Conclusão:** Nas duas cidades, crianças nascidas com RCIU tiveram maior proporção de *catch-up* e as nascidas PT, maior proporção de *catch-down*. Somente em SL as crianças com RCIU nascidas a termo tiveram a maior proporção de *catch-up* e estiveram protegidas de fazer *catch-down* de altura.

REINFECÇÃO COM DIFERENTES CEPAS VIRAIS EM CRIANÇAS COM INFECÇÃO CONGENITAS PELO CITAMEGALOVIRUS(CMV)

Virginia Mara de Deus Wagatsuma

Orientadora: Profa. Dra. Aparecida Yulie Yamamoto

Tese de Doutorado apresentada em 14/04/2010

O *Citomegalovirus* (CMV) é o agente causal mais frequente de infecção congênita no homem, constituindo importante problema de saúde pública em decorrência da gravidade das sequelas em longo prazo na infância. É conhecido que crianças congenitamente infectadas pelo CMV apresentam excreção viral prolongada com grande contribuição no ciclo natural da infecção pelo CMV. Entretanto, não é conhecido se estas crianças albergam uma única cepa do CMV ou se a reinfecção com novas cepas contribui para manutenção da excreção viral prolongada. Para determinar a frequência de reinfecção e da mistura de genótipos (excreção simultânea de duas ou mais cepas do CMV no mesmo sítio de excreção), amostras seriadas de urina e saliva de 85 crianças com infecção congênita pelo CMV foram coletadas prospectivamente até pelo menos quatro anos de vida. As diferentes cepas foram classificadas por meio da análise do tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP) em uma das quatro principais variantes genótípicas da glicoproteína B (gB) e, a confirmação da mistura de cepas foi realizada pela PCR *primer*-específica para as quatro variantes da glicoproteína N (gN). A caracterização genotípica da glicoproteína B (gB) em amostras de urina e saliva de crianças com infecção congênita no presente estudo demonstrou que 44% das crianças haviam adquirido uma nova cepa ao final do quarto ano de vida. Entretanto, uma parcela destas crianças apresentou evidências moleculares de reinfecção por uma nova variante genotípica, sendo a de maior incidência de reinfecção por uma nova cepa do CMV (20%), a faixa etária dos dois anos de vida. A mistura de cepas na mesma amostra foi confirmada em 19% das crianças que adquiriram uma nova cepa do CMV. Corroborando com este achado, após períodos de intermitência da excreção viral observou-se que a maioria das crianças permanece excretando uma cepa com as mesmas características daquela adquirida intraútero, ou seja, a reativação da cepa latente é mais frequente quando comparada à reinfecção por uma nova cepa do CMV [4/30 (13%) vs. 26/30 (87%); $p < 0,0001$]. Ainda com relação à ocorrência de reinfecção, com exceção da idade de início do convívio em creches (média de 2 anos \pm 1 ano; OR = 11,92; IC95% 1,21-285,72) e do número de pessoas na mesma casa no período do nascimento (média de 4 pessoas; OR = 4,33; IC95% 1,24 - 15,21), nenhum dos fatores de risco avaliados mostrou associação com a aquisição de uma nova cepa do CMV. A elevada frequência de reinfecção associada à média da idade de início do convívio em creche e/ou instituição e o número de pessoas na mesma casa ao nascimento implicam que a reinfecção está associada à frequente exposição a um grande número de cepas circulantes. Entretanto, a prevalência de um maior número de crianças que apresentaram reativação da cepa endógena sugere que a excreção viral por longos períodos em crianças congenitamente infectadas pelo CMV pode

estar associada persistência da infecção da cepa adquirida no período intraútero.

PREVALÊNCIA E FATORES ASSOCIADOS À CESARIANA NA CIDADE DE ARACAJU, SERGIPE, BRASIL

Maria Cláudia Tavares de Mattos

Orientadora: Profa. Dra. Heloisa Bettiol

Tese de Doutorado apresentada em 22/04/2010

Objetivo: analisar a prevalência e os fatores associados ao parto cesáreo em uma coorte de nascidos vivos na região metropolitana de Aracaju, SE, Nordeste do Brasil. **Método:** estudo de caráter observacional, analítico, de corte transversal, realizado na região metropolitana de Aracaju, constituída de quatro municípios: Aracaju, Barra dos Coqueiros, Nossa Senhora do Socorro e São Cristóvão. Foram aplicados questionários a uma amostra de 4746 puérperas de feto único nos hospitais de Aracaju, onde ocorre praticamente a totalidade dos partos da região metropolitana. Foram obtidas informações sobre município de procedência, idade, escolaridade e situação conjugal materna, renda familiar, tipo de internação para o parto, tipo de maternidade, número de gestações, cesárea e aborto prévios, adequação do pré-natal, hipertensão na gestação atual, dia da semana e hora de nascimento. A associação dessas variáveis com o tipo de parto foi avaliada por meio de regressão logística múltipla. **Resultados:** 31,6% dos partos foram cesáreos. Os fatores que mais influenciaram para a decisão por cesárea foi a mulher já haver realizado duas ou mais cesáreas em parto anterior (OR: 83,35), uma cesárea anterior (OR: 24,85) e o aborto anterior relatado (OR: 1,33), excluídas as primíparas. A categoria de internação no sistema privado e a hipertensão na gravidez atual foram importantes fatores de risco (OR: 7,28; OR: 2,00, respectivamente) para cesariana. Foram fatores associados com menor frequência de cesáreas: a escolaridade materna até 4 anos de estudo (OR:0,62) e de 5 a 8 anos de estudo (OR:0,77), a idade materna jovem (OR: 0,50 para < 20 anos), a renda familiar de 1 d" 3 SM (OR:0,81), mães que não fizeram pré-natal (OR:0,46) ou fizeram pré-natal inadequado (OR:0,65), partos ocorridos aos sábados (OR:0,70) e entre 00:00 e 05:59 (OR:0,65) e mães com quatro gestações ou mais (OR:0,57). **Conclusões:** Conclui-se que fatores não médicos ofereceram risco para a ocorrência de cesáreas nesta população. Duas ou mais cesáreas prévias, aborto anterior e hipertensão arterial representaram os fatores médicos associados com a cesariana, além de serem os de maior prevalência.

DOENÇAS INVASIVAS CAUSADAS PELO *Streptococcus pneumoniae* EM CRIANÇAS: SOROTIPOS, RESISTÊNCIA À PENICILINA *in vitro* E INFLUÊNCIA DESSA RESISTÊNCIA SOBRE O PROGNÓSTICO DE CRIANÇAS TRATADAS COM PENICILINA

Bento Vidal De Moura Negrini

Orientadora: Profa. Dra. Marisa Marcia Mussi Pinhata

Tese de Doutorado apresentada em 27/04/2010

O *Streptococcus pneumoniae* (Spn) constitui agente frequente e relevante das infecções respiratórias bacterianas, principalmente em crianças e idosos. Desde 1970, tem sido relatada frequência crescente de isolados resistentes à penicilina *in vitro*. No entanto, também tem sido notada discordância entre a resistência à penicilina *in vitro* e a evolução clínica, mesmo quando o tratamento é feito com penicilina. Este estudo visou: 1-descrever as características demográficas e clínicas de crianças acometidas por doença causada por Spn; 2) estimar as proporções dos sorotipos de Spn encontrados e a frequência da resistência à penicilina; 3) comparar a evolução clínica de crianças com doença invasiva por Spn (DIP) não susceptíveis à penicilina com aquela de crianças com DIP causada por isolados susceptíveis *in vitro* e tratadas com antibióticos penicilínicos. Trata-se de estudo de coorte retrospectivo, que incluiu crianças com DIP entre junho de 1998 e dezembro de 2005. Revisaram-se os registros médicos para obter informações concernentes a antecedentes pessoais e morbidos, dados clínicos e laboratoriais e evolução clínica, além do sorotipo e da classificação quanto à sensibilidade à penicilina, segundo dois diferentes critérios. Inicialmente, foram estudadas 164 crianças com idade mediana de 15,5 meses e portadoras de pneumonia (123; 75%), meningite (33; 20%) ou outras formas clínicas (8; 5%). Sinais de gravidade à internação estiveram presentes em 24,3% das crianças. Crianças < 12 meses e as portadoras de meningite tiveram maior chance de ter sinais de gravidade do que as demais (OR = 2,27 e OR = 9,17, respectivamente). Também, a taxa de letalidade foi maior entre os casos de meningite (51,3% vs. 2,4%). Os sorotipos mais encontrados foram: 14 (38,3%); 1 (14,1%); 6A (8,6%); 19A (5,5%); 9V (4,7%) e 23F (4,7%), sendo esses responsáveis por 75% das infecções. Em 141 isolados testados, 61% eram sensíveis, 27% possuíam resistência intermediária e 12% resistência total à penicilina, segundo os critérios do

CLSI-2007. De acordo com os critérios CLSI-2008, 21,4% dos 28 isolados do SNC foram classificados como resistentes e 78,6% como sensíveis. Para infecções fora do SNC, 96,5% dos 113 isolados foram classificados como sensíveis, 3,5% com resistência intermediária, desaparecendo a resistência total à penicilina. Constituíram-se dois grupos de crianças tratadas com penicilina: 1-com isolados sensíveis à penicilina (n = 66), 2-com isolados resistentes à penicilina (n = 42). A evolução clínica nas 72 horas iniciais e a duração da hospitalização não diferiram entre os grupos. Também a distribuição dos desfechos, 7 e 21 dias após a hospitalização, foi semelhante entre os grupos, mesmo após ajuste da análise por regressão logística para as variáveis forma clínica, sinais de gravidade na admissão e presença de anemia (OR para insucesso tardio = 0,61 [0,20; 1,87]). Em conclusão, as evoluções precoce e tardia desfavoráveis de crianças com DIP e tratadas com antibióticos do grupo das penicilinas independem da sensibilidade do isolado pneumocócico à penicilina no teste *in vitro*.

AUTOPERCEÇÃO CORPORAL: ESTUDO DO PESO RELATADO E DO PESO AFERIDO EM UMA COORTE DE NASCIDOS VIVOS EM 1978-79 NA CIDADE DE RIBEIRÃO PRETO (SP)

Dalma Maria Silva Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Del Ciampo

Dissertação de Mestrado apresentada em 27/04/2010

A autopercepção corporal pode ser entendida como a representação mental de si mesmo, que envolve aspectos físicos, emocionais, sociais, culturais e pode ser influenciada por vários fatores como sexo, idade, expectativa dos pais e amigos, dentre outros. Esta percepção do próprio corpo se inicia desde a primeira infância, e pode ser distorcida da realidade gerando angústia e risco para transtornos de comportamento.

Este trabalho descreve e compara as relações entre peso relatado e peso aferido em uma população de 2035 adultos jovens (23-25 anos) em Ribeirão Preto - SP. Encontrou-se 68% de acerto entre peso referido e aferido, subestimaram seu peso 14% e 18% superestimaram seu peso corporal.

Dentre as variáveis estudadas, as que contribuíram para uma melhor avaliação do próprio peso foram maior valor IMC e maior nível de atividade física. Contribuíram para a distorção da autopercepção, com tendência a superestimar o próprio peso, ser do sexo feminino e ter maior grau de escolaridade. Homens mais frequentemente subestimavam o próprio peso. Não foram encontradas diferenças de etnia, estado civil ou renda.

AVALIAÇÃO DO USO DO PRÉ-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO REMOTO NO DIA PRECEDENTE À CIRURGIA EM CRIANÇAS SUBMETIDAS À CIRCULAÇÃO EXTRACORPÓREA (EFEITOS NA SEGUNDA JANELA) RIBEIRÃO PRETO 2010

Marcos Alves Pavione

Orientadora: Profa. Dr.a Ana Paula de Carvalho Panzeri Carlotti

Dissertação de Mestrado apresentada em 05/05/2010

Objetivos: Avaliar a resposta inflamatória, a disjunção miocárdica e a morbimortalidade pós-operatória em crianças submetidas ao pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR) no dia anterior à cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea (CEC), comparadas com um grupo controle. **Métodos:** Trata-se de estudo intervencionista e controlado, de alocação aleatória de lactentes de 1 mês a 2 anos de idade submetidos à cirurgia cardíaca com CEC. As crianças alocadas aleatoriamente ao PCIR foram submetidas a quatro períodos de cinco minutos de isquemia do membro inferior pelo uso de esfigmomanômetro, intercalados por períodos de cinco minutos de reperfusão; no dia prévio à cirurgia cardíaca. No pós-operatório, foram colhidas amostras de sangue 4, 12, 24 e 48 horas após o fim da CEC para mensurar a resposta inflamatória por meio da avaliação da ativação do fator nuclear kappa-B (NF- κ B) em leucócitos pela quantificação do RNAm de sua proteína inibitória, a I kappa B-alfa (I κ -B α) por PCR em tempo real, e pelas concentrações plasmáticas de interleucina (IL)-8 e IL-10 avaliadas por ELISA. O comprometimento miocárdico foi avaliado pelas concentrações da fração aminoterminal do peptídeo natriurético tipo B (NT-pro BNP) e de troponina I cardíaca (cTnI), mensuradas por técnica de quimioluminescência. Também foram avaliados parâmetros clínicos da síndrome de baixo débito cardíaco e a necessidade de drogas vasoativas no pós-operatório. **Resultados:** Foram estudados 22 pacientes: 12 alocados no grupo PCIR e 10 no grupo controle. Os grupos eram homogêneos e não foram encontradas diferenças significativas quando comparamos as variáveis: idade, sexo, etnia, peso, estatura, saturação em ar ambiente no período pré-operatório, tempo de cirurgia, tempo de CEC, tempo de parada anóxica, escore de gravidade PRISM e classificação de risco cirúrgico cardíaco RACHS-1. Entre as variáveis clínicas, a única que apresentou diferença estatisticamente significativa foi a frequência respiratória, no período

de 48 horas após a cirurgia, com menores valores no grupo PCIr ($p=0,004$). Das variáveis que mensuram de forma indireta o débito cardíaco e a oferta de oxigênio aos tecidos, a saturação venosa de oxigênio se mostrou com valores significativamente mais baixos com 12 horas ($p=0,042$) e 48 horas ($p=0,018$) após a saída de CEC no grupo pré-condicionado. Isso se confirma na medida da extração de oxigênio, que se mostrou mais alta neste grupo nos mesmos períodos de 12 horas ($p=0,021$) e 48 horas ($p=0,008$). Dentre os marcadores de dano miocárdico, apenas o NT-pro BNP, um marcador de disfunção miocárdica, apresentou diferença significativa, com menores valores no grupo précondicionado nos tempos 12 horas ($p=0,035$) e 24 horas ($p=0,035$). Os valores da cTnl estiveram maiores em todos os tempos no grupo PCIr, mas sem diferença Dignificante. Dentre os marcadores da função inflamatória, tanto a liberação da IL-8, da IL-10 e a expressão do gene I- κ B α foram semelhantes nos dois grupos. A morbidade pós-operatória foi semelhante nos dois grupos e não houve óbito até a alta hospitalar em nenhum dos grupos. **Conclusão:** Os pacientes que receberam o PCIr antes da cirurgia cardíaca com uso de CEC apresentaram menor liberação do hormônio NT-pro BNP, que indica uma menor disfunção celular cardíaca, e um papel protetor do comprometimento miocárdico.

EXPRESSÃO DOS GENES DAS METALOPROTEINASES NA MEDULA ÓSSEA DE PACIENTES COM LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA

Tatiana Silveira Santiago

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone

Dissertação de Mestrado apresentada em 06/05/2010

As leucemias linfóides correspondem ao cancer mais frequente na infância, com sobrevida em torno de 70 a 80%, apesar dos avanços diagnósticos e terapêuticas. Os mecanismos envolvidos na propagação dos blastos leucêmicos e na infiltração de órgãos extramedulares são de fundamental importancia para melhor compreensão da leucemogênese. Estudos com tumores sólidos e suas metástases mostraram relação das metaloproteinases com a liberação de células cancerígenas para outros sítios do organismo. As metaloproteinases são endopeptidases que atuam na degradação e renovação da matriz extracelular. A relação das MMPs com blastos leucêmicos é pouco conhecida. **Objetivo:** analisar a expressão gênica das metaloproteinases: MMP1, MMP2, MMP3, MMP14, TIMP2, TIMP3 e TIMP4, em medulas ósseas de pacientes com leucemia linfóide aguda ao diagnóstico, correlacionando com características clínicas das LLAs T e B. **Metodologia:** Foram analisadas 29 amostras de medulas ósseas de pacientes pediátricos com LLA armazenadas no banco de medulas do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto para expressão gênica dos referidos genes por técnica de RQ-PCR. Análise estatística foi feita com o software SPSS 16.0. A expressão dos genes nas amostras de medula óssea de LLA-T e B foram comparadas usando os valores da mediana através do teste exato de Fisher, e os valores absolutos através do teste de Mann-Whitney. **Resultados:** A expressão aumentada do gene da TIMP2 apresentou correlação com glóbulos brancos acima de 50.000 ao diagnóstico e LLA-T, a MMP14 e razão MMP14/TIMP2 com Calla + ($p=0,001$), TIMP3 com má resposta ao tratamento de indução quimioterápica, e a razão MMP2/TIMP2 com fatores de mau prognóstico e menor sobrevida livre de doença. **Conclusão:** A MMP14 parece estar relacionada à LLA-B e o desbalanço entre MMP2/TIMP2 sugere ser mais importante como valor prognóstico para LLA da infância que a avaliação isolada de um único gene.

EXPRESSÃO DOS GENES RELACIONADOS A APOPTOSE CELULAR EM TUMORES ADRENOCORTICAIS DE CRIANÇAS

Cecília Fernandes Lorea

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Scrideli

Dissertação de Mestrado apresentada em 07/05/2010

Introdução: Tumores adrenocorticais são neoplasias raras, os quais correspondem a apenas 0,2% de todos os cânceres pediátricos. Tem-se sugerido que o processo apoptótico possa ser a chave para o desenvolvimento desses tumores. O objetivo deste estudo foi analisar, em tumores adrenocortical pediátricos, a expressão dos genes responsáveis pela apoptose. Os níveis de expressão dos genes *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *FAS*, *FADD*, *BCL2*, *BAX*, *APAF1*, *TNFA* e *NFKB*, da cadeia apoptótica foram analisados por meio de PCR, em tempo real quantitativo, em 22 amostras consecutivas de tumor obtidas de crianças com diagnóstico de tumor adrenocortical (11 classificadas como estadio I, 3 como estadio II, 1 como estadio III e 7 como estadio IV). Testes de Mann-Whitney e regressão logística foram usados para acessar a correlação entre os genes analisados e as variáveis clínicas e biológicas. As curvas de Kaplan Meier e o teste log rank foram usados para estimar a sobrevida geral em 5 anos. Valores de expressão gênica maiores que mediana foram consideradas hiperexpressos.

A sobrevida geral em 5 anos foi de 64% no grupo de pacientes analisados. Hiperexpressão do *NFKB* foi associada a crianças de idade > 5 anos ($p=0,02$) e à presença da mutação *TP53- R337H* ($p=0,007$), hiperexpressão do *FAS* foi associada a crianças de idade > 5 anos ($p=0,05$). Hipoexpressão do *BCL2* foi associada à presença de óbito ($p=0,04$) e hipoexpressão do *TNFA* ao estágio IV ($p=0,008$). Os pacientes que apresentaram hiperexpressão do gene *BCL2* tiveram melhor sobrevida geral em 5 anos (0,91 versus 0,53; $p=0,03$). Nossos resultados sugerem que os genes relacionados com apoptose podem estar relacionados com as variáveis clínicas, biológicas e sobrevida em tumores adrenocorticais de pacientes pediátricos. Estudos funcionais e análise de um maior número de casos são necessários para confirmar esses achados.

ASSOCIAÇÃO ENTRE O PESO AO NASCER E PRESSÃO ARTERIAL EM ESCOLARES DE DUAS COORTES BRASILEIRAS

Letícia Helena Januário

Orientadora: Profa. Dra. Heloisa Bettiol

Tese de Doutorado apresentada em 14/05/2010

Objetivo: comparar os resultados do efeito das categorias de peso ao nascer e de variáveis sociais e biológicas ao nascimento e atuais sobre a Pressão Arterial (PA) das crianças de 8 a 11 anos entre as duas coortes de nascidos vivos de Ribeirão Preto (RP), São Paulo, e de São Luís (SL), Maranhão. **Método:** trata-se de um estudo epidemiológico de coorte prospectiva no qual foram avaliadas crianças ao nascimento e na idade de 8 a 11 anos em duas cidades brasileiras contrastantes sob aspectos culturais e sócio-demográficos. Foram constituídos cinco grupos de peso ao nascimento: Muito Baixo Peso ao Nascer (MBPN): peso menor que 1500g; Baixo Peso ao Nascer (BPN): peso igual ou maior que 1500g e menor que 2500g; Peso Insuficiente ao Nascer (PIN): peso igual ou maior que 2500g e menor que 3000g; Peso Normal ao Nascer (PNN): peso igual ou maior que 3000g e menor que 4250g e Alto Peso ao Nascer (APN): 4250g ou mais. Variáveis socioeconômicas foram consideradas como fatores de confusão. Os dados foram analisados por regressão simples e ajustada. **Resultados:** foram avaliadas 1670 crianças. Em SL na regressão simples, crianças com MBPN tiveram aumento de 4,2mmHg na PAS ($p=0,024$) e nas BPN o aumento foi de 2,0mmHg na PAS ($p=0,054$) e 1,9mmHg na PAD ($p=0,052$), ambos no limite da significância. Em RP crianças com PIN tiveram redução de 2,81mmHg na PAS ($p=0,023$), e as APN tiveram aumento na PAS de 5,96mmHg ($p=0,004$) e 3,11mmHg ($p=0,016$) na PAD. Após ajuste, estes efeitos foram mantidos apenas em SL. O IMC baixo significou redução da PA nas duas cidades em ambas as análises. Na análise ajustada, houve interação entre sexo e PN na associação com a PAD nas duas cidades porém, em direções opostas. Em RP os meninos com APN tiveram um aumento de 5,4mmHg na PAD em relação às meninas dessa mesma faixa de peso. Em SL o aumento foi entre os meninos com MBPN: 6,7mmHg em relação às meninas também com MBPN. Tanto em RP quanto em SL, as meninas com APN tiveram a PAD mais baixa que as meninas com PNN: 3,9mmHg em RP e 5,9mmHg em SL. Em SL os meninos de MBPN e os de BPN tiveram respectivamente, 7,2 e 3,9mmHg a mais na PAD em relação aos que nasceram com o PNN, o que não ocorreu em RP. Em RP sobrepeso e obesidade significaram aumento da PA nas duas análises, mas em SL somente na análise não ajustada. O tabagismo materno durante a gestação foi associado aos menores valores da PAS em RP. Menor peso ao nascer associou-se a maiores valores de PA em SL, cidade com condições de vida mais precárias e excesso de peso associou-se a maiores valores de PA em RP cidade com melhores condições de vida. Entretanto as variáveis sociais estudadas não foram associadas a PA em nenhuma das duas cidades. **Conclusões:** os resultados não foram homogêneos entre RP e SL. MBPN e BPN foram associados aos maiores valores PAS apenas em SL. O IMC apresentou associação positiva com PA apenas em RP. Variáveis culturais e sócio-demográficas não foram associadas a PA. Sugerem-se novas avaliações em fases posteriores da vida destas crianças para explorar a evolução destas associações.

Saúde Mental

ESTUDO PILOTO DUPLO-CEGO RANDOMIZADO DA ADIÇÃO DE MINOCICLINA OU PLACEBO AO TRATAMENTO USUAL DE ESQUIZOFRENIA DE INÍCIO RECENTE

Cristiano Chaves

Orientador: Prof. Dr. Antonio Waldo Zuardi

Dissertação de Mestrado apresentada em 06/04/2010

A eficácia limitada dos atuais antipsicóticos sobre os diversos sintomas da esquizofrenia tem levado à busca de novos medicamentos para este transtorno. A minociclina é um antibiótico do grupo das tetraciclina com evidências crescentes de neuroproteção em várias doenças neurológicas e pode potencialmente otimizar o tratamento antipsicótico da esquizofrenia. O objetivo deste estudo é determinar se a adição de minociclina ao tratamento usual irá prevenir o acúmulo de sintomas negativos e declínio cognitivo em pacientes com esquizofrenia de início recente e se irá estabilizar ou potencializar a eficácia dos antipsicóticos. Participaram do estudo 30 pacientes com esquizofrenia do Serviço de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, diagnosticados pelos critérios do Manual Diagnóstico e Estatístico da Associação Psiquiátrica Americana - 4a edição (DSM-IV), de início recente (<5 anos), em dose estável do antipsicótico há pelo menos 4 semanas, com idade entre 18 e 65 anos e sem condições médicas relevantes. O seguimento foi de 12 meses, com consultas mensais. Para avaliação de resultados primários, foram utilizadas as escalas PANSS (Positive and Negative Syndrome Scale) e CGI (Clinical Global Impression scale). Testes neuropsicológicos foram realizados no início e após 12 meses. Os efeitos colaterais foram avaliados pela escala de movimentos involuntários anormais (Abnormal Involuntary Movement Scale-AIMS) e a escala de efeitos colaterais para drogas psicoterapêuticas UKU (UKU *Side Effect Rating Scale for psychotherapeutic drugs*). Os pacientes, familiares e pesquisadores assistentes eram cegos quanto à droga administrada. Os sujeitos (n=30) foram randomizados para receber minociclina 200mg/d (n=16) ou placebo (n=14). Seis pacientes abandonaram o estudo, observando-se que houve mais pacientes que não completaram o estudo no grupo placebo (n=4) do que no grupo minociclina (n=2). Houve cuidadoso emparelhamento de parâmetros de confusão que podem interferir no curso da esquizofrenia, tais como idade, tempo de educação, tempo de doença, tempo de psicose sem tratamento, gênero, subtipo diagnóstico e tipos de antipsicótico em uso. Não houve efeitos colaterais significativos. A análise estatística foi feita com 24 pacientes (14 no grupo minociclina e 10 no grupo placebo). Para a PANSS e suas subescalas, realizou-se análise de variância de medidas repetidas (RANOVA) para o fator tempo, droga e interação entre os dois fatores, seguido de RANOVA para cada grupo individualmente. Para a CGI, que é uma variável ordinal, foi realizado teste de Friedman. Para os testes neuropsicológicos, utilizou-se teste t pareado para cada grupo independentemente. Os pacientes em uso de minociclina tiveram melhora significativa na pontuação da CGI e uma redução significativa das pontuações da PANSS e de suas subescalas a partir de 15 a 30 dias de tratamento com minociclina. Não houve diferenças significativas ao longo do tempo no grupo placebo. Não houve diferenças significativas em ambos os grupos no desempenho nos testes neuropsicológicos. Assim, o tratamento adjuvante com minociclina levou à melhora em sintomas positivos e negativos da esquizofrenia, sendo uma medicação segura e promissora na terapêutica adjuvante da esquizofrenia.

EFEITO DO ESCITALOPRAM SOBRE O PROCESSAMENTO DE EXPRESSÕES EMOCIONAIS, AVALIADO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA FUNCIONAL

Alcion Sponholz Junior

Orientador: Prof. Dr. Frederico Guilherme Graeff
Tese de Doutorado apresentada em 19/05/2010

A impulsividade e a instabilidade afetiva são elementos centrais em vários transtornos psiquiátricos. No entanto, poucos estudos procuraram avaliar a correlação entre estes dois aspectos e a função serotoninérgica. Neste estudo associou-se o desafio farmacológico com a administração de dose única de escitalopram (20mg) para a avaliação da modulação das respostas hemodinâmicas provocadas pela tarefa *go/no go* e pela tarefa de reconhecimento implícito de expressões faciais em voluntárias saudáveis e sua correlação com os níveis de impulsividade, usando a técnica BOLD (*Blood Oxygen Level Dependent*) de ressonância magnética funcional. Também foi avaliado o efeito do escitalopram sobre o reconhecimento explícito de expressões faciais. Observou-se que, em função do nível de impulsividade da voluntária, o escitalopram modulou o aumento da resposta hemodinâmica em duas condições: 1) frente a faces de raiva em regiões envolvidas na tomada de decisão e controle emocional e motor (BA 11, putâmen e caudato) e 2) frente a faces de alegria em regiões envolvidas no processamento de emoções e controle da impulsividade (BA 47 e complexo amígdala-hipocampo). Em direção inversa, observou-se que o escitalopram, em função do nível de impulsividade, modulou a redução da resposta hemodinâmica em duas condições: 1) frente a faces de medo em regiões envolvidas no processamento emocional e no sistema de ansiedade/defesa (BA 47, BA 32 e complexo amígdala-hipocampal) e 2) frente à apresentação de faces de tristeza em região de processamento do sentimento de tristeza (BA 24). Não foram encontrados efeitos de modulação farmacológica da resposta hemodinâmica na tarefa *go/ no go*. Observou-se na tarefa de reconhecimento explícito de expressões faciais que o escitalopram prejudicou o reconhecimento de faces de medo. Os resultados deste estudo apontam para uma modulação por traços de personalidade das respostas hemodinâmicas a expressões faciais. Além disso, observou-se uma atenuação da resposta hemodinâmica a faces de medo e de tristeza e aumento da resposta

hemodinâmica a faces de alegria em regiões cerebrais previamente implicadas, respectivamente, na neurobiologia da ansiedade, da depressão e do controle de impulso e contribuem para uma melhor compreensão dos substratos neurais envolvidos nos efeitos farmacológicos de inibidores seletivos de recaptção de serotonina observados na prática clínica.

DEPRESSÃO, ÁLCOOL E GÊNERO : LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO NO MUNICÍPIO E REGIÃO METROPOLITANA DE SÃO PAULO

Juliana de Almeida Prado

Orientador: Prof. Dr. Jair Lício Ferreira Santos

Dissertação de Mestrado apresentada em 29/06/2010

Na maioria das culturas, o álcool é a substância de abuso mais frequentemente usada e responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade. No campo da saúde mental, a associação entre o uso problemático de álcool e transtornos mentais é bastante relatada tanto em amostras clínicas como em comunitárias e a depressão é, sem dúvida, a condição mais associada. Tanto a depressão quanto o uso de álcool são bastante prevalentes e a associação entre ambos é complexa, sofrendo influência de determinantes biológicos, sociais e culturais. Dentre os determinantes biológicos, o gênero tem se revelado fator importante e, devido à sua relevância, vem permeando cada vez mais as diversas áreas dos estudos populacionais. O objetivo deste estudo foi estudar como se dá a associação entre depressão e consumo de álcool numa amostra populacional brasileira e compará-la entre os gêneros. O presente estudo é um inquérito epidemiológico transversal em amostra estratificada e representativa. É um recorte do projeto GENACIS, realizado na região metropolitana de São Paulo, cuja amostra totalizou 2083 pessoas maiores de 18 anos. A coleta de dados foi feita por meio de aplicação do questionário GENACIS em entrevistas individuais nos domicílios sorteados. A amostra foi caracterizada e foram identificados os padrões de consumo de álcool a partir da quantidade média de drinques consumidos num dia típico, a prevalência de depressão pelo instrumento de rastreamento CIDI Short Form e outras informações consideradas importantes na qualificação da associação entre consumo de álcool e depressão como cenários do beber e consumo de álcool em familiares. A associação entre o padrão de consumo de álcool e cada uma das variáveis socioeconômicas selecionadas foi investigada pelo teste de Rao-Scott. As análises foram feitas no programa Stata 10.0 e consideradas significativas para p values com IC 95%. Para a análise conjunta da atuação de variáveis independentes foi utilizada a análise multivariada através da regressão logística. Foram analisados separadamente para homens e mulheres os fatores de risco presentes bem como padrões de uso de bebidas alcoólicas e presença de depressão. A importância relativa de fatores socioeconômicos, por gênero, foi avaliada pela Razão de Chances (Odds Ratio). A taxa de resposta foi de 74,9%. Houve predominância de mulheres (58,4%), indivíduos casados (60,8%), renda per capita inferior a 150 Reais (37,9%), mulheres abstinentes (69,7%) e homens com consumo pesado de álcool (24,2%). Os abstinentes aumentaram conforme a idade e o consumo pesado apresentou-se maior entre os mais jovens. A prevalência de depressão pelo CIDI Short Form foi de 21,8% (28,3% para as mulheres; 12,7% para os homens). Entre as mulheres, depressão se associou à idade (OR 0,91) e à convivência com cônjuge com problemas decorrentes do álcool (OR 88,33). Entre os homens, depressão também se associou à idade (OR 1,06), às rendas per capita (OR 6,16: R\$ 301 a 600 reais; OR 6,34: R\$ 600 ou mais), ao padrão de consumo de álcool pesado (OR 6,43) e à presença de problemas pessoais decorrentes do álcool (OR 7,34). Os resultados ressaltam que a associação entre depressão e consumo de álcool é distinta os gêneros e que o conhecimento desta associação é fundamental, para auxiliar na compreensão e elaboração de estratégias de intervenção na população brasileira.

Saúde na Comunidade

TABAGISMO, ALCOOLISMO EM PACIENTES QUE FREQUENTAM FISIOTERAPIA DO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE, ITAPIRA – SP – 2010

Dalila Bertanha

Orientador: Prof. Dr. Antônio Ruffino Netto

Dissertação de Mestrado apresentada em 10/06/2010

O uso indevido de drogas tem sido objeto de diversos estudos no Brasil, devido à crescente preocupação com os hábitos de consumo de drogas lícitas e ilícitas e seus impactos sociais, econômicos e, sobretudo, suas implicações na

saúde da população. O **objetivo** desta pesquisa é estimar a prevalência do tabagismo e o uso de outras drogas e descrever o perfil epidemiológico, dos pacientes que frequentam o Centro de Fisioterapia Oscar Pires de Andrade do SUS de Itapira-SP. Trata-se de um estudo epidemiológico, descritivo, modelo inquérito, com uma abordagem metodológica quantitativa. Dos 399 pacientes agendados, foram entrevistados 217 (54,38%) pacientes, nos meses de julho e agosto de 2010. Os pacientes foram entrevistados pelo pesquisador deste trabalho conforme o Questionário Sócio – Demográfico e sobre Prevalência do Tabagismo no Centro de Fisioterapia de Itapira - SP (SUS) e Teste de Fagerstrom para a Dependência a Nicotina (FTND) e Questionário ASSIST V. 3.0. A média de idade, dos pacientes entrevistados foi 50 anos, maioria é do sexo feminino (63, 13%), a moda de anos de escolaridade foi 11 anos e a mediana foi cinco. Lombalgia, cervicalgia e tendinite representaram juntos 50% dos encaminhamentos para fisioterapia com diagnóstico médico por explicitos. Mais da metade dos pacientes relataram ter outras doenças além daquela que foi motivo do encaminhamento para a fisioterapia, as doenças mais citadas pelos pacientes foi hipertensão e diabetes. Mais da metade dos pacientes relataram apenas uma queixa principal sendo a dor a queixa mais frequente. A prevalência de fumantes foi 17%, a média de idade dos pacientes fumantes foi 48 anos e 51% eram do sexo feminino, a maioria (89%) relatou fumar apenas cigarros comercializados, a mediana do número de cigarros fumados por dia foi 10 e a mediana de tempo que o indivíduo usou o tabaco foi 30 anos. A metade dos tabagistas foram classificados, de acordo com o FTND, como muito baixa e baixa dependência à nicotina, a média do escore de Fagerström foi de 4,1. Sobre o uso de substâncias psicoativas na vida, 70% dos pacientes relataram ter usado tabaco na vida; 91% bebidas alcoólicas; 14% maconha; 6% cocaína, crack; 11% inalantes; 10% hipnóticos, sedativos; somente um indivíduo relatou ter usado em sua vida inalante, e nenhum experimentou alucinógenos, opióides e outras drogas a especificar. Em relação à classificação do Questionário ASSIST, o tabaco (31%) e o álcool (31%) foram as drogas mais citadas para receber intervenção breve, seguido da maconha (3%), cocaína, crack (1%), anfetaminas (1%). As drogas legais como o álcool e o tabaco são os problemas de saúde pública mais proeminente no Brasil. Essa é uma situação preocupante e aponta a importância de trabalhar a prevenção de drogas psicoativas, nos serviços de atenção primária.

APLICAÇÃO DE MODELOS DE VOLATILIDADE ESTOCÁSTICA EM DADOS DE POLUIÇÃO DO AR DE DUAS GRANDES CIDADES: CIDADE DO MÉXICO E SÃO PAULO

Henrique Ceretta Zozolotto

Orientador: Prof. Dr. Jorge Alberto Achcar

Dissertação de Mestrado apresentada em 25/06/2010

Estudos recentes relacionados ao meio ambiente vêm ganhando grande destaque em todo o mundo devido ao fato dos níveis de poluição e a destruição das reservas naturais terem aumentado de maneira alarmante nos últimos anos. As grandes cidades são as que mais sofrem com a poluição e aqui serão estudados os níveis de poluição do ar em duas cidades em particular, a Cidade do México e São Paulo. A Cidade do México apresenta sérios problemas com os níveis de ozônio e São Paulo é a cidade brasileira com os maiores problemas relacionados à poluição. Entre os diferentes modelos considerados para analisar dados de poluição do ar, pode-se considerar o uso de modelos de séries temporais para modelar as médias diárias ou semanais de poluição. Nessa direção pode-se usar modelos de volatilidade estocástica. Essa família de modelos estatísticos tem sido extensivamente usada para analisar séries temporais financeiras, porém não se observa muitas aplicações em dados ambientais e de saúde. Modelos de volatilidade estocástica bivariados e multivariados, sob a aproximação Bayesiana, foram considerados para analisar os dados, especialmente usando métodos MCMC (Monte Carlo em Cadeias de Markov) para obter os sumários a posteriori de interesse, pois pode-se ter muitas dificuldades usando métodos clássicos de inferência estatística.