

Resumos de Dissertações de Mestrado e Teses de Doutorado apresentadas na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP de julho a setembro de 2009

Biologia Celular e Molecular

PARACOCCINA, UMA N-ACETIL- β -D-GLICOSAMINIDASE PRODUZIDA POR *Paracoccidioides brasiliensis* ENVOLVIDA NO CRESCIMENTO FÚNGICO

Fausto Bruno dos Reis Almeida

Orientador: Prof. Dr. Ebert Seixas Hanna

Dissertação de Mestrado apresentada em 31/07/2009

Paracoccina, uma glicoproteína de 70 kDa produzida por *Paracoccidioides brasiliensis*, é dotada de propriedades lectínicas. Através do reconhecimento de GlcNAc, paracoccina promove adesão fúngica à componentes da matriz extracelular e induz macrófagos a produzirem TNF- α e óxido nítrico. Paracoccina reconhece quitina e colocaliza-se com beta-1,4-homopolímero de GlcNAc nos sítios de brotamento de células leveduriformes de *P. brasiliensis*. Neste trabalho, a propriedade de ligação à quitina foi utilizada para padronizar um novo processo de purificação de paracoccina, o qual proporcionou maior rendimento que o procedimento padrão, de purificação por afinidade a GlcNAc. Similaridades físicas entre as duas preparações foram demonstradas por análises eletroforéticas e MALDI-TOF-MS de peptídeos tripsínicos. Através da reação com anticorpo específico, paracoccina foi detectada como um único spot de 70 kDa (pI= 5.63) em gel de eletroforese bidimensional de extrato leveduriforme de *P. brasiliensis*. As propriedades biológicas de paracoccina foram reproduzidas pela preparação purificada por afinidade à quitina, quais sejam a de ligar-se à laminina e induzir macrófagos a produzir TNF- α e óxido nítrico. Além disso, demonstramos neste estudo a atividade de N-acetil- β -D-glucosaminidase de paracoccina, sugerindo tratar-se de uma proteína com domínios multi-funcionais. A propriedade enzimática da paracoccina pode contribuir para o papel por ela exercido no crescimento e brotamento de leveduras de *P. brasiliensis*.

O PAPEL DE CASPASE-11 NO CONTROLE DA INFECÇÃO POR *LEGIONELLA PNEUMOPHILA*

Jonilson Berlink Lima

Orientador: Prof. Dr. Dario Simões Zamboni

Dissertação de Mestrado apresentada em 21/08/2009

Legionella pneumophila é uma bactéria gram-negativa, intracelular facultativa, responsável por causar uma pneumonia severa em humanos denominada Doença dos Legionários. A bactéria possui um sistema de secreção do tipo IV (Dot/Icm) capaz de translocar proteínas bacterianas diretamente para o citoplasma das células hospedeiras. As células alvo durante a infecção por *L. pneumophila* são os macrófagos, que dispõem de receptores intracelulares capazes de reconhecer produtos bacterianos presentes no citoplasma celular. Entre eles destacam-se Naip5 e Ipaf, que são membros dos receptores Nod-like (NLRs) capazes de induzir ativação de caspase-1 em resposta à infecção por *L. pneumophila*, processo que culmina em bloqueio da multiplicação bacteriana. Embora o controle da infecção por *L. pneumophila* esteja diretamente relacionado à ativação de caspase-1 por Naip5, a interação molecular entre Naip5 e caspase-1 nunca foi detectada, o que sugere que outras moléculas estejam presentes nesse complexo. Caspase-11 é uma proteína candidata a participar dessa via de ativação, visto que dados da literatura sugerem a importância desta proteína na ativação de caspase-1 em condições patológicas, no entanto outras caspases poderiam estar envolvidas visto que essas proteínas geralmente se ativam por meio de clivagem em cascatas. Para identificar a participação de diferentes caspases em resposta a ativação por Naip5, foi realizado um *screening* em células HEK293 transfectadas com diversas caspases e foi evidenci-

ado que a caspase-11 foi diferencialmente ativada em resposta a superexpressão do receptor Naip5 funcional. Ensaio de imunoprecipitação demonstraram que caspase-11 é capaz de interagir com Naip5 funcional, mas não com formas truncadas ou mutantes deste receptor. Estudos bioquímicos comprovaram a ativação de caspase-11 em resposta a Naip5 e por de citometria de fluxo foi demonstrado que o receptor Naip5 selvagem é capaz de ativar caspase-11 em resposta a infecção por *L. pneumophila* selvagem, mas não por mutantes para o sistema de secreção Dot/Icm. Experimentos realizados com macrófagos derivados de medula óssea evidenciaram a participação de caspase-11 no modelo de infecção *in vitro* por *L. pneumophila*. Finalmente, foi demonstrado que macrófagos de camundongos caspase-11^{-/-} falham em ativar caspase-1 e apresentam reduzida capacidade em processar e secretar IL-1 β . Os dados nos permite concluir que caspase-11 participa da via de ativação do receptor Naip5, que opera em resposta a infecção por bactérias patogênicas como *L. pneumophila*.

O PAPEL DA LECTINA ARTINM NA PROLIFERAÇÃO DE MASTÓCITOS

Patrícia Andressa de Almeida Buranello

Orientador: Prof. Dr. Constance Oliver

Tese de Doutorado apresentada em 27/08/2009

Os mastócitos são células residentes do tecido conjuntivo e suas características morfológicas e funcionais contribuem para sua participação em processos alérgicos e inflamatórios, na defesa contra parasitas e em mecanismos gerais de homeostase tecidual. Todas as funções desempenhadas pelos mastócitos são consequência da liberação de mediadores pro-inflamatórios após sua ativação. A lectina ArtinM, extraída de *Artocarpus integrifolia* e ligante de D-manose, é capaz de induzir a desgranulação de mastócitos. Estudos prévios mostraram que essa lectina induz uma resposta TH1 e confere resistência a *Leishmania major* e *amazonensis* e a *Paracoccidioides brasiliensis*. Os efeitos biológicos de ArtinM mediados por sua ligação a carboidratos incluem também, estimulação de mitose em células do baço de camundongo, ativação de células do sistema imune e aceleração do processo de regeneração do tecido epitelial. O presente estudo tem por objetivo investigar os mecanismos de ação de ArtinM em mastócitos que possam justificar o seu papel no reparo tecidual e resposta imune. Nossos resultados mostram que baixas concentrações de ArtinM são capazes de ativar mastócitos e induzir a liberação de mediadores pró-inflamatórios, sem desgranular estas células. A lectina ArtinM também acelera o ciclo celular resultando num aumento da taxa de proliferação de mastócitos da linhagem RBL-2H3. Estes achados podem explicar a participação da lectina ArtinM nos processos de reparo tecidual e resposta imune. Também mostram que esta lectina pode ter uso terapêutico, uma vez que, em baixas concentrações não liberam mediadores pré-formados de mastócitos que podem desencadear alergia.

O PAPEL ESTRUTURAL E FUNCIONAL DA FAK EM MASTÓCITOS

Celiane Cardoso Carvalho

Orientadora: Profª. Drª. Maria Célia Jamur

Dissertação de Mestrado apresentada em 29/09/2009

Os mastócitos exercem um papel crítico em processos inflamatórios e alérgicos através da liberação de mediadores presentes em seus grânulos. Neste estudo, foi investigado o papel da quinase de adesão focal (FAK) nos processos de proliferação, adesão e migração de mastócitos da linhagem RBL-2H3. Células C5 deficientes em FAK, derivadas das RBL-2H3, e células 2C1 que foram reconstituídas com o gene da FAK e passaram a super expressar esta proteína, foram analisadas em comparação com as células RBL-2H3. As células RBL-2H3 e células 2C1 são fusiformes, enquanto as células C5 são heterogêneas, porém na sua maioria arredondadas. Para se obter uma população de células morfolologicamente mais homogênea, as células C5 foram subclonadas. Como resultado foi obtido o clone G5, com uma população mais homogênea com muitas células arredondadas. A distribuição do citoesqueleto de actina confirmou as diferenças morfológicas entre células C5 e G5, em comparação com células RBL-2H3 e 2C1. As células C5 e G5 também possuem poucos grânulos quando comparadas com RBL-2H3 e 2C1. Entretanto, os ensaios para a liberação de α -hexosaminidase mostraram que as células G5 e C5 são semelhantes funcionalmente entre si, apesar das diferenças morfológicas. A maioria das células C5 cresce em suspensão e proliferam muito mais em comparação com as células RBL-2H3 e 2C1. As células RBL-2H3 e 2C1 quando cultivadas em nanofibras de matriz extracelular adquirem forma arredondada enquanto, as células C5 permanecem arredondadas. As células C5 aderem menos em todos os componentes da matriz extracelular quando comparadas com as células

RBL-2H3 e com as células 2C1. A deficiência na expressão da FAK diminui a adesão de mastócitos aos componentes da matriz extracelular, mas a super expressão da FAK não altera significativamente a adesão destas células, com exceção do colágeno tipo I. A adesão celular está relacionada com o processo de migração celular. A análise da migração celular mostrou que as células C5 migraram menos que as células RBL-2H3 e 2C1 em superfícies cobertas com fibronectina, colágeno do tipo IV e laminina e migraram mais nas superfícies cobertas com colágeno do tipo I quando comparadas com as células RBL-2H3 e 2C1. Os resultados deste trabalho mostram que a deficiência em FAK altera a morfologia celular, a distribuição de grânulos, e a proliferação de mastócitos. Por outro lado, a super expressão da FAK leva a um aumento da adesão celular e modula a migração destas células em diferentes componentes da matriz extracelular.

CARACTERIZAÇÃO DA INTER-RELAÇÃO ENTRE GALECTINA-3 E A VIA DE SINALIZAÇÃO NOTCH

Nerry Tatiana Cecílio

Orientador: Prof. Dr. Emerson Soares Bernardes

Dissertação de Mestrado apresentada em 30/09/2009

Diversos dados da literatura demonstram que galectina-3 e a via de sinalização Notch exercem importante papel na regulação das funções dos macrófagos. Baseado nisso, o presente trabalho propôs investigar uma possível inter-relação entre galectina-3 e componentes da via de sinalização Notch. Inicialmente, macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) de animais selvagens (Lgals3^{+/+}) e deficientes de galectina-3 (Lgals3^{-/-}) foram estimulados *in vitro* e, analisados quanto à expressão de receptores, ligantes e enzimas reguladoras da ativação da via de sinalização Notch. Em comparação com BMDMs Lgals3^{+/+}, observou-se que BMDMs Lgals3^{-/-} apresentaram maior expressão basal do RNA mensageiro para receptores, ligantes e enzimas envolvidos na via de Notch. Após estímulo com LPS+IFN- γ , BMDMs Lgals3^{-/-} também apresentaram uma maior expressão proteica do receptor Notch-1, bem como do ligante Delta-4. Além disso, observou-se que BMDMs Lgals3^{+/+} produziram menores níveis de citocinas IL-12 e IL-6 e óxido nítrico, quando o estímulo foi realizado na presença de DAPT (inibidor da via notch). Ainda, demonstrou-se que BMDMs Lgals3^{-/-} são mais sensíveis a ativação direta por Delta-4 e Jagged-1 e, conseqüentemente produziram níveis mais elevados de IL-6 após estímulo.

Com a finalidade de investigar a interação entre galectina-3 e Notch em outros modelos celulares, demonstrou-se ainda que galectina-3 é capaz de interagir diretamente com receptores Notch de macrófagos J774 e de duas linhagens de células de carcinoma gástrico (AGS e MKN45). Após imunoprecipitação com anticorpo monoclonal anti-galectina-3 e revelação com anticorpo anti-Notch-1, observaram-se bandas de aproximadamente 300 kDa, compatível com a massa molecular do receptor Notch-1 inteiro, em todas as linhagens testadas. Além disso, após silenciamento do gene da galectina-3 através do uso de RNA de interferência, foi possível demonstrar que células AGS apresentaram maior expressão de RNA mensageiro para o receptor Notch-1, tanto na ausência quanto na presença de estímulo com Jagged-1. E, o silenciamento da expressão de galectina-3 levou ao aumento da clivagem de Notch (aumento da expressão de NICD) em células AGS estimuladas por Jagged-1 e Delta-4.

Finalmente, os dados obtidos nesse trabalho sugerem que galectina-3 exerce um papel na ativação/expressão de componentes da via de sinalização Notch e, conseqüentemente, na regulação da função de macrófagos.

Bioquímica

EXPRESSÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO RAX- PKR- EIF-2 α ATF4 E microRNAS NA RETINOPATIA DIABÉTICA EXPERIMENTAL

Viviane Aline Oliveira Silva

Orientador: Prof. Dr. Fernando Luiz De Lucca

Tese de Doutorado apresentada em 23/07/2009

A retinopatia diabética (RD) é uma das complicações mais frequentes de diabetes mellitus. Estudos recentes mostraram que a apoptose de neurônios da retina desempenha um papel crucial na patogênese da RD. Entretanto, os

mecanismos moleculares envolvidos neste fenômeno não foram ainda totalmente elucidados. É fato conhecido que a via de sinalização da PKR (proteína quinase dependente de RNA) desempenha um papel fundamental na apoptose de neurônios, especialmente nas doenças neurodegenerativas. O objetivo principal deste trabalho foi investigar a expressão da via de sinalização RAX-PKR-eIF-2 α -ATF4, bem como identificar os micro-RNAs (miRNAs) que tenham como alvos os RNA mensageiros dos genes que codificam o RAX (PKR associated protein X) a PKR na retina de ratos tratados com estreptozotocina (STZ). Este modelo experimental de diabetes induz RD em ratos, a qual exhibe todas as características bioquímicas, patofisiológicas e histofisiológicas da RD humana. A primeira etapa deste estudo foi avaliar a expressão de RNAm e de proteínas codificadas pelos genes RAX, PKR, ATF4 (Activating transcription factor 4) e eIF-2 α (Fator de iniciação de transcrição-2 subunidade α) fosforilado na retina de ratos normais e diabéticos através de RT-PCR em tempo real e Western blot, respectivamente. A seguir, os seguintes tópicos foram investigados: 1) Localização celular do RAX, PKR e eIF-2 α na retina de ratos normais e diabéticos por imunofluorescência; 2) Identificação de miRNAs que possuam como alvos os genes RAX e PKR através de análise computacional; 3) Perfil de expressão dos miRNAs preditos na retina de ratos normais e diabéticos por RT-PCR em tempo real; 4) Localização celular de miRNAs na retina de ratos normais e diabéticos através de hibridização in situ; 5) Validação dos genes RAX e PKR como alvos dos miRNAs preditos através dos ensaios de luciferase e da inibição da proteína endógena e degradação do RNAm em células transfectadas com miRNAs sintéticos. Os resultados obtidos neste estudo revelaram que a expressão de RAX e eIF-2 α fosforilado foi induzida nas células da retina de ratos nos estágios iniciais da indução de diabetes com STZ. Por outro lado, a expressão da proteína PKR não foi alterada na fase inicial de diabetes, verificando-se uma diminuição significativa 5^o dia após o tratamento com STZ. Com relação ao ATF4, a indução da sua expressão ocorreu somente após um mês de diabetes. Verificou-se ainda que o RAX, PKR e eIF-2 α são co-expressos nos neurônios da camada ganglionar e na camada nuclear interna da retina de ratos normais e diabéticos. O RAX apresentou uma distribuição citoplasmática, enquanto a PKR e eIF-2 α foram detectados no núcleo. Além disso, demonstrou-se que o tratamento de ratos com STZ alterou o perfil de expressão dos miRNAs, miR-29b e miR-92, na retina. Os dados obtidos neste trabalho sugerem que o RAX seria um alvo indireto do miR-29b. Foi ainda possível demonstrar que o miR-29b é co-expresso com a proteína RAX nos neurônios da camada ganglionar da retina e apresenta um perfil de expressão temporal inverso ao encontrado para esta proteína. Estes resultados são relevantes, pois sugerem a participação do RAX e miR-29b na indução da apoptose de neurônios na retina de ratos diabéticos. Os resultados deste estudo poderão contribuir para o desenvolvimento de uma nova estratégia para o tratamento da RD a partir de injeção intravítrea do miR-29b. O uso recente de pequenos RNAs não-codificadores tais como miRNAs e RNA interferência para o tratamento de doenças humanas representa uma promissora e excitante área na pesquisa biomédica.

EFEITO DO ESTRESSE PSICOLÓGICO SOBRE AS FUNÇÕES DE NEUTRÓFILOS HUMANOS EM UM MODELO IN VITRO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS DOENÇAS DE IMUNOCOMPLEXO

Mariana Drummond Costa Ignacchiti

Orientador: Prof. Dr. Bernardo Mantovani

Tese de Doutorado apresentada em 13/08/2009

Evidências experimentais e clínicas indicam um importante papel dos neutrófilos, através da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e da liberação de enzimas lisossomais, nos mecanismos causadores de lesão tecidual nas doenças de imunocomplexo. Estas normalmente se iniciam a partir da deposição de imunocomplexo no tecido, o que acarreta a migração de neutrófilos ao sítio de deposição e a lesão tecidual devido à liberação de seus grânulos citotóxicos e ROS. Diversos estudos mostram uma íntima relação entre o estresse psicológico e variações na resposta imune tanto em modelos animais quanto em humanos. Neste estudo, investigamos o efeito do estresse psicológico sobre as principais funções imunes de neutrófilos responsáveis pela lesão tecidual nas doenças de imunocomplexo. O modelo de estresse psicológico utilizado foi a avaliação acadêmica final dos cursos de pós-graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. Os estudantes que estavam em período de apresentação de dissertação ou defesa de tese foram classificados como grupo estresse e os que não estavam sendo submetidos a nenhum tipo de avaliação didática foram classificados como controle. Neste estudo, não foi verificada nenhuma alteração na liberação de enzimas lisossomais na condição de estresse. Entretanto, observamos que o estresse causou uma redução na liberação de ROS. Com exceção do ânion superóxido, esta redução foi observada somente após a estimulação mediada pelo receptor Fc'gama'. O estresse psicológico também promoveu uma redução na expressão do Fc'gama'RIII e do transcrito para a subunidade p47phox p47phox do complexo NADPH oxidase. Um aumento no nível plasmático da quimiocina CXCL8/IL8 foi observado no grupo estresse sugerindo que indivíduos estressados possam apresentar uma maior suscetibilidade à inflamação. No entanto, na presen-

ça do imunocomplexo não fagocitável, a liberação in vitro de CXCL/IL8 por neutrófilos foi reduzida. A ocorrência do estresse psicológico foi associada a um aumento no nível de cortisol plasmático, indicando a ativação do eixo HPA. Experimentos in vitro com hidrocortisona 10⁻⁷M causou uma redução na liberação de superóxido, assim como diminuiu a expressão do RNAm para a subunidade p47phox. Por outro lado, o pré-tratamento in vitro de neutrófilos com o antagonista do receptor citoplasmático de glicocorticóide, RU486, nessas condições suprimiu esta redução. Estes resultados sugerem um possível papel modulador dos glicocorticóides, liberados durante o estresse, sobre a liberação de ROS por neutrófilos. Considerando as possíveis implicações fisiológicas, podemos concluir que nas condições de estresse psicológico, a diminuição na liberação de ROS e da quimiocina CXCL8/IL8 pelos neutrófilos estimulados por imunocomplexo na forma não fagocitável poderia resultar em uma atenuação do quadro inflamatório e nos mecanismos promotores de lesão tecidual nas doenças de imunocomplexo.

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO ESTRESSE OXIDATIVO EM SCHISTOSOMA MANSONI

Sergio Henrique da Silva

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Rodrigues

Tese de Doutorado apresentada em 28/08/2009

O parasita *Schistosoma mansoni*, agente etiológico da esquistossomose mansônica, apresenta um complexo ciclo de vida, que envolve fases no interior do organismo de dois hospedeiros, além de fases de vida livre. Os hospedeiros reagem à infecção por diferentes mecanismos, porém, a liberação de espécies reativas de oxigênio aparentemente é o principal fator de estresse para o parasita. O objetivo deste trabalho foi, portanto, caracterizar a adaptação do parasita frente ao estresse oxidativo e determinar os efeitos resultantes da exposição a esta condição. Os resultados apresentados neste trabalho mostram que os vermes adultos de *S. mansoni* possuem uma grande tolerância ao estresse oxidativo, permanecendo viáveis mesmo em concentrações elevadas. As espécies reativas de oxigênio produzem diversos danos às biomoléculas presentes nas células do parasita, como pôde ser estimado pela quantificação dos danos oxidativos na estrutura do DNA. Para evitar consequências negativas desta exposição, as células de *S. mansoni* possuem um sistema antioxidante, responsável pela eliminação dos agentes oxidantes, como foi observado nos resultados apresentados. A análise da expressão diferencial de proteínas mostrou diversas proteínas induzidas ou reprimidas durante os tratamentos. A análise por espectrometria de massa de alguns dessas proteínas identificou dois spots referentes à proteína actina, com massas moleculares diferentes. Isto sugere que a proteína actina de *S. mansoni* sofre modificações pós-traducionais mediante o estresse oxidativo com alteração de massa consistente com a adição de uma molécula de ubiquitina. Como o estresse oxidativo pode produzir inúmeros efeitos deletérios sobre as células atingidas, propomos a aplicação da fotossensibilização, com formação de espécies reativas de oxigênio, para a eliminação de vermes adultos do parasita. Esse estudo preliminar mostrou que a metodologia pode ser eficaz para o controle do parasita em diferentes ambientes. Os resultados apresentados neste estudo descrevem os eventos gerais envolvidos no parasita durante o estresse oxidativo e permitem o melhor entendimento acerca dos processos utilizados para a sobrevivência no interior do organismo hospedeiro.

DESENHO RACIONAL, CONTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA ENZIMA BIFUNCIONAL LACASE- β -1,3-1,4-GLUCANASE DE BACILLUS SUBTILIS

Gilvan Pessoa Furtado

Orientador: Prof. Dr. Richard John Ward

Dissertação de Mestrado apresentada em 11/09/2009

A aplicação de enzimas em processos industriais tem crescido consideravelmente nas últimas décadas. Os benefícios do uso de enzimas incluem a eliminação de temperaturas altas, solventes orgânicos e extremos de pH e, ao mesmo tempo, oferecem um aumento na especificidade e pureza do produto gerado. Técnicas de engenharia de proteínas têm permitido a criação de novas enzimas com características favoráveis a sua aplicação. Neste contexto, as enzimas híbridas, criadas pela união de duas ou mais enzimas que possuem atividades separadas, tem ganhado destaque. Suas vantagens incluem expressão e purificação de múltiplos domínios catalíticos em um único passo, gerando economia de tempo e dinheiro, e, além disso, quando duas enzimas estão presentes em um mesmo complexo, a proximidade física delas, catalisando reações subsequentes, pode aumentar a taxa de reação. Duas enzimas de importância industrial foram alvos neste trabalho, a β -1,3-

1,4- glucanase e a lacase, ambas clonadas a partir do DNA genômico de *Bacillus subtilis*. A β -1,3- 1,4-glucanase (EC 3.2.1.73) hidrolisa β -glucanos, polissacarídeos abundantes na parede celular do endosperma de uma ampla variedade de biomassa vegetal. A lacase (EC 1.10.3.2) é uma fenol oxidase, cobre dependente, que catalisa a oxidação de várias substâncias aromáticas e inorgânicas, particularmente fenóis, com a simultânea redução de oxigênio para água. Buscou-se criar e caracterizar uma enzima quimérica lacase- β -1,3-1,4-glucanase, através da fusão dos genes *bg1S* e *cotA* que codificam a glucanase e lacase, respectivamente. O gene híbrido foi clonado em vetor pET28a(+) e expresso em *Escherichia coli*. A enzima recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade, e a caracterização bioquímica mostrou que a enzima híbrida possuía tanto atividade lacásica quanto glucanásica. A atividade lacásica foi máxima em pH 4,5 e temperatura de 75°C, e a $V_{máx}$ da enzima foi cerca de 30% maior do que a obtida para lacase parental. Já a atividade glucanásica foi máxima em pH 6,0 e temperatura de 50°C, com uma redução de aproximadamente 10% de atividade em relação à glucanase parental, contudo houve um aumento na eficiência catalítica da enzima. Testes de simulação computacional demonstraram que os domínios catalíticos da quimera tendem a se aproximar em solução e maiores estudos serão necessários para compreendermos as mudanças catalíticas e estruturais ocorridas na enzima bifuncional.

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA ENZIMA QUIMÉRICA BIFUNCIONAL XILANASE-LACASE ATRAVÉS DE DESENHO RACIONAL

Lucas Ferreira Ribeiro

Orientador: Prof. Dr. Richard John Ward

Dissertação de Mestrado apresentada em 21/09/2009

Existem evidências de que xilana e resíduos fenólicos de lignina estejam unidos por ligações covalentes (Ferreira Filho, 1994). A degradação destes polímeros consiste, geralmente, em um processo multienzimático e sinérgico, o que pode ser obtido pela ação coordenada de uma série de enzimas do grupo das oxidoredutases e hidrolases, representadas principalmente pelas lacases (EC 1.10.3.2) e xilanases (EC 3.2.1.8), respectivamente (You, Meng et al., 2008; Cristina Valls e Roncero, 2009). Neste contexto, o presente trabalho visou à construção de uma enzima bifuncional, que tenha tanto atividade xilanásica, quanto atividade lacásica, buscando, desta forma, criar uma nova enzima com uma atuação mais abrangente para tais processos biotecnológicos, além de fornecer importantes ferramentas para compreensão das relações de estrutura-função destas proteínas. Para estas finalidades, foi criado um modelo da enzima bifuncional, via modelagem molecular, onde foi feito um desenho racional visando à máxima estabilidade conformacional das enzimas em questão. Após isto, o DNA genômico de *Bacillus subtilis* foi extraído e usado: como molde para a amplificação dos genes *cotA*, que codifica a enzima lacase (CotA, 65 kDa) e *xynA*, que codifica a endo- β -1,4 xilanase A (XynA, 21.2 kDa). Tal amplificação foi feita através da reação em cadeia da polimerase (PCR) e os resultados obtidos, foram como esperados. Posteriormente, os genes foram clonados no vetor pT7T3 18U, usando sítios de HindIII e BamHI e subclonados no vetor de expressão pET28a(+), usando sítios de NheI e BamHI. Os genes *cotA* e *xynA* foram expressos, de forma heteróloga, em *Escherichia coli*. A purificação da lacase e da endo- β -1,4 xilanase A foi realizada através de cromatografia por afinidade, pela interação entre a cauda de poli-histidina (inserida nas proteínas por sua expressão em pET28a(+)) e a resina NTA-Ni. Após a purificação, um ensaio de atividade enzimática foi realizado, o que demonstrou a funcionalidade das enzimas em questão. A fusão gênica foi realizada através de técnicas de engenharia genética, utilizando como DNA molde as enzimas clonadas em pT7T3 18U, os oligonucleotídeos (primers) específicos e as enzimas de restrição necessárias a este fim. O resultado da fusão, o gene quimera, foi clonado em pT7T3 18U e subclonado em pET28a(+), este foi expresso e purificado de maneira semelhante às enzimas separadas. O resultado da purificação da enzima híbrida foi confirmado por SDS-PAGE. Uma amostra do gene quimera clonado em pET28a(+), (pET28a/cotA-xynA) teve sua xilanase retirada, por enzimas de restrição, e substituída por uma variante termofílica da xilanase (xilanase G3), dando origem a uma nova construção. Após a expressão e purificação da enzima bifuncional, foram feitos ensaios de caracterização cinética, que demonstraram que para a atividade lacásica, o pH de máxima atividade foi 4,5 para ambas as enzimas, a temperatura foi 80°C para a lacase parental e 75°C para a quimera. A enzima bifuncional apresentou uma eficiência catalítica ($K_{cat}/K_0,5$) aproximadamente duas vezes maior que a lacase sozinha (345,6 mM⁻¹ S⁻¹ para a fusão e 166,7 mM⁻¹ S⁻¹ para a lacase). Para atividade xilanásica a pH de máxima atividade foi 6,5 para xilanase nativa e sua quimera equivalente e 7,0 para a xilanase mutante (G3) e quimera com xilanase mutante. A temperatura foi 55°C para as atividades referentes à xilanase nativa e 70 °C para as mutantes. Os parâmetros cinéticos medidos para as atividades xilanásicas demonstraram que não houve diferenças consideráveis entre as xilanases parentais e as fusões equivalentes. Sendo assim, nossos resultados demonstraram que a abordagem feita no presente trabalho mostrou-se eficiente para a construção de enzimas híbridas ou multifuncionais.

Clínica Cirúrgica

PAPÉL DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR CCR2 EM NEUTRÓFILOS DURANTE A SEPSE GRAVE

Fabrcio Oliveira Souto

Orientador: Prof. Dr. Anfbal Basile Filho

Dissertação de Mestrado apresentada em 30/07/2009

Durante a sepse observa-se uma falência na migração de neutrófilos para o foco infeccioso, além disso, há um processo progressivo de injúria tecidual e disfunção múltipla de órgãos. Neste contexto, dados da literatura têm sugerido que o infiltrado neutrofilico em órgãos secundários a infecção pode participar deste processo. Adicionalmente, sabe-se que as quimiocinas possuem um papel central em mediar a migração de neutrófilos, através dos receptores quimiotáticos (principalmente o CXCR2, mas não CCR2). Contudo, a capacidade quimiotática destas células pode ser modulada sob condições inflamatórias e infecciosas. Recentemente, esta modulação tem sido relacionada com a ativação de receptores do tipo Toll-Like (TLRs). Assim, nosso estudo abordou o papel da expressão do receptor CCR2 em neutrófilos durante a sepse grave, murina e humana, bem como a participação dos TLRs nesta expressão, especificamente TLR2 e TLR4. Observamos que a ativação da via TLRs-MyD88-NFκB foi crucial para indução do receptor CCR2 em neutrófilos, que passaram a apresentar resposta às quimiocinas MCP-1/CCL2 e MCP-3/CCL7. Posteriormente, verificamos que neutrófilos circulantes de animais que receberam sistemicamente agonistas dos TLRs ou foram submetidos à sepse grave polimicrobiana (ligadura e perfuração do ceco -CLP), passaram a responder a estas quimiocinas. Camundongos deficientes para o receptor CCR2 (CCR2^{-/-}), submetidos à CLP, apresentaram aumento da sobrevivência, redução do infiltrado neutrofilico no pulmão, coração e rim, além de reduzidos níveis de marcadores de lesão para estes órgãos, quando comparados aos animais controles (WT). Notavelmente, estendendo para a sepse humana, observamos que neutrófilos circulantes dos pacientes sépticos, sepse grave ou choque séptico, apresentaram uma significativa expressão do receptor CCR2, a qual foi relacionada com a responsividade quimiotática à quimiocina CCL2. Além disso, esta (continua) (continuação) responsividade foi positivamente correlacionada com o escore APACHE 11 e com a diminuição da razão PaO₂/FiO₂ (r² = 0,82, P = 0,001 e r² = 0,60, P = 0,001, respectivamente), sugerindo uma forte relação entre a expressão do CCR2 com a gravidade da sepse. Em conjunto, nossos resultados demonstram que este perfil de expressão nos neutrófilos está relacionado com o infiltrado lesivo dessas células em órgãos distantes do local da infecção durante a sepse. Portanto, podemos sugerir que o bloqueio do CCR2 pode vir a ser um alvo farmacológico relevante na terapêutica de pacientes com sepse.

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA VENTILAÇÃO NÃO-INVASIVA COM DOIS NÍVEIS DE PRESSÃO POSITIVA NAS VIAS AÉREAS, EM NÍVEL PROFILÁTICO, NO PÓS-OPERATÓRIO DE CIRURGIA CARDÍACA

Aline Marques Franco

Orientador: Prof. Dr. Alfredo José Rodrigues

Dissertação de Mestrado apresentada em 10/09/2009

Introdução: A aplicação de Ventilação por Dois Níveis de Pressão Positiva (BiPAP) associada à Fisioterapia Respiratória Convencional (FRC) no pós-operatório (PO) de cirurgia cardíaca pode contribuir para a diminuição das complicações pulmonares no PO. O objetivo deste estudo foi comparar a eficácia da BiPAP associada à FRC (Grupo BiPAP-GB) com a FRC isolada (Grupo Controle -GC). **Pacientes e Métodos:** Vinte e seis pacientes submetidos à revascularização do miocárdio foram aleatoriamente alocados. O GC foi tratado apenas com FRC, o GB foi submetido a 30 minutos de ventilação por dois níveis de pressão positiva utilizando-se o aparato BiPAP®, duas vezes ao dia, associado à FRC. A FRC foi realizada de modo idêntico em ambos os grupos, duas vezes ao dia, no período da manhã e no período da tarde. Todos os pacientes foram avaliados quanto: Capacidade Vital (CV), Permeabilidade das Vias aéreas (PF), Pressões Respiratórias Máximas (PE_{máx} e P_{lmáx}), Saturação de Oxigênio (SaO₂), Frequência Cardíaca (FC), Frequência Respiratória (FR), Volume Minuto (VM), Volume Corrente (VC), Pressão Arterial Sistólica (PAS) e Pressão Arterial Diastólica (PAD). As avaliações foram realizadas durante a internação no período pré-operatório, imediatamente após a extubação e nas 24^a e 48^a horas após extubação no período da noite. **Resultados:** Nenhum paciente foi a óbito e não ocorreu nenhuma complicação infecciosa, cardiovascular, renal, respiratória ou abdominal. No GC, 61.5% dos pacientes tiveram algum grau de atelectasias e no GB, 54% (p = 0.691). A CV foi estatisticamente maior no GB no pós-operatório (p < 0,015). Todos os outros parâmetros de ventilometria, gasometria, manovacuometria e parâmetros hemodinâmicos foram semelhantes entre os grupos. **Conclusão:** a aplicação de BiPAP associada à FRC no PO precoce de pacientes submetidos à revascularização cirúrgica do miocárdio melhorou a CV, mas não houve diferença significativa na (continua) (continuação) evolução hospitalar dos grupos.

FUNÇÃO ENDOTELIAL DE ARTÉRIAS VISCERAIS DE CÃES SUBMETIDOS À ISQUEMIA PARCIAL POR CLAMPEAMENTO DA AORTA SUPRACELÍACA SEGUIDA DE REPERFUSÃO

José Geraldo Ciscato Junior

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eli Piccinato

Dissertação de Mestrado apresentada em 11/09/2009

O clampeamento aórtico supracelíaco é um procedimento de exceção na cirurgia vascular. Entretanto, tem se mostrado como alternativa muito útil nas intervenções cirúrgicas abdominais secundárias a trauma abdominal, seja ele fechado ou penetrante, e em aneurismas acometendo ramos viscerais. Esse clampeamento causa isquemia parcial transitória em todos os órgãos abdominais e membros inferiores. Muitos estudos têm mostrado que a lesão tecidual, em determinados órgãos, ocorre não somente no período de isquemia, mas é exacerbada também no período de reperfusão. O presente estudo teve como objetivo: 1) definir modelo experimental em cães para estudo das alterações da função endotelial nas artérias viscerais sob condições de isquemia e reperfusão através do clampeamento aórtico supra celíaco; 2) estudar as alterações da função endotelial dependentes do óxido nítrico em artérias viscerais (renal, mesentérica e tronco celíaco) de cães, submetidas à isquemia parcial transitória por clampeamento supracelíaco da aorta de 60 minutos de duração, e após 60 minutos de isquemia seguida de reperfusão de 30 min; 3) estudar a expressão de espécies reativas de oxigênio através da medida da peroxidação lipídica pela dosagem do malondialdeído (MDA) e óxido nítrico (NO) no tecido renal no plasma dos três grupos experimentais: 1) controle; 2) isquemia de 60 minutos; 3) isquemia de 60 minutos e reperfusão de 30 min. A reatividade endotelial das artérias viscerais foi estudada “in vitro” em sistemas de banhos orgânicos (“organ chambers”), onde segmentos de 4 a 5 mm com ou sem endotélio foram suspensos e conectados a transdutores de força. Os experimentos foram realizados na presença de indometacina para bloqueio da via ciclooxigenase, de modo que os relaxamentos estudados eram função da liberação de NO. Foram utilizadas as drogas: acetilcolina (dependente de endotélio e receptores), ionóforo do cálcio (dependente de endotélio e não de (continua) (continuação) receptores do endotélio), e nitroprussiato de sódio (independente de endotélio). A expressão de espécies reativas de oxigênio foi avaliada pela medida de MDA e de NO tissular renal ao final do protocolo experimental de cada grupo e por meio medida de MDA e NO plasmáticos nos tempos 0 e 60 minutos de isquemia para o grupo 2 (isquemia) e tempo 0 e 90 minutos, para o grupo 3 (isquemia/reperfusão). Os achados deste estudo foram: 1) o modelo experimental testado se mostrou adequado e de fácil padronização; 2) o estudo da função endotelial das artérias viscerais nos grupos controle, isquemia e isquemia/reperfusão, mostrou não haver alterações entre os grupos estudados; 3) o estudo da expressão de espécies reativas de oxigênio através da medida de MDA e NO plasmático e tissular renal não mostrou alterações significativas após os períodos de isquemia e isquemia/reperfusão. Conclui-se que o modelo de clampeamento aórtico supracelíaco em cães é reproduzível e adequado. para a investigação da disfunção endotelial.

Clínica Médica

UTILIZAÇÃO DE DIETA RESTRITA EM CARBOIDRAUM AMBIENTE DE APRENDIZADO ATIVO E COLABORATIVO UTILIZANDO RECUPERAÇÃO DE IMAGEM POR CONTEÚDO NO ENSINO DE RADIOLOGIA

Luis Ricardo de Figueiredo

Orientador: Prof. Dr. Paulo Mazzoncini de Azevedo Marques

Tese de Doutorado apresentada em 01/07/2009

A utilização de ferramentas computacionais como apoio no ensino e aprendizado da Medicina, mais especificamente de Radiologia, tem vários indicadores a seu favor: visualização, simulações, facilidade de consulta a diagnósticos pré-existentes, multimídia, interatividade, padrões, entre outros pontos. A formação de médicos está mudando, de uma cultura tradicional onde os anos pré-clínica eram de leitura, com a crença que os estudantes lendo, no futuro, teriam a oportunidade de tratar “pacientes reais”, para uma realidade onde estas técnicas ainda persistem, mas os estudantes atuais estão em uma profissão onde cada avanço da tecnologia disponibiliza mais informações e recursos. Muitas escolas de medicina têm adotado a tecnologia disponível para aumentar e aprimorar seus meios de ensino. O uso de métodos de recuperação de imagem por conteúdo (CBIR- Content-based image retrieval) apresenta excelente potencial como ferramenta de auxílio à aprendizagem médica, em particular na radiologia. Assim, além da discussão do uso de ambientes de Ae (Aprendizado

Eletrônico), a proposta é discutir também o uso do CBIR como ferramenta de apoio ao ensino. Este trabalho propõe que, além de ferramenta de auxílio ao diagnóstico, o que já vem sendo discutido e pesquisado mais intensamente na área médica e na ciência da computação, as técnicas de CBIR também possam ser utilizadas como ferramenta de ensino dentro de um ambiente de Ae direcionado para o diagnóstico por imagem. A escola de Medicina da USP- Ribeirão Preto (FMRP- USP) está investigando e buscando aprimorar o seu ferramental de ensino; este trabalho contribui para este quadro de pesquisa e propõe um ambiente que pretende ser amigável e de utilização ampla pelos docentes e alunos da faculdade. Esta tese integra a linha de pesquisa para a implementação de um ambiente de ensino computacional de apoio ao treinamento de médicos residentes em radiologia.

UTILIZAÇÃO DE DIETA RESTRITA EM CARBOIDRATOS PARA PERDA DE PESO A CURTO PRAZO, EM MULHERES OBESAS

Andresa de Toledo Triffoni Melo

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosa Wanda Diez Garcia

Dissertação de Mestrado apresentada em 24/07/2009

O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia de uma dieta hipocalórica restrita em carboidratos para a perda de peso em curto prazo em mulheres obesas grau III, e os seus efeitos metabólicos, comparando-os com uma dieta hipocalórica convencional. Participaram do estudo dezenove mulheres com índice de massa corporal (IMC) maior que 40 kg/m² e idade entre 20 e 50 anos, sem diabetes mellitus. As participantes permaneceram internadas na Unidade Metabólica (Divisão de Nutrologia) do Departamento de Clínica Médica do HCFMRP-USP por um período de 7 dias. As pacientes foram divididas em dois grupos: o experimental (n=10), submetido à dieta hipocalórica restrita em carboidratos (1200 kcal com 45g de carboidrato, 105g de proteína e 67g de lipídeo) e o controle (n=9), que recebeu a dieta hipocalórica convencional (padrão do hospital com 1200 kcal, 171g de carboidrato, 74g de proteína e 32g de lipídeo). No início e no final do estudo foram avaliados os seguintes parâmetros: medidas antropométricas (peso, IMC, circunferências de braço, abdominal e quadril), bioimpedância (massa gorda e massa magra), calorimetria indireta (gasto energético de repouso), oxidação de substratos e exames bioquímicos (glicemia de jejum, acetona plasmática, insulina basal e índice HOMA-IR, gasometria venosa, colesterol total e frações, albumina, proteínas totais e nitrogênio e acetona urinários, pela urina de 24 horas). A dieta hipocalórica restrita em carboidrato apresentou perda de peso média significativamente maior do que a dieta hipocalórica convencional (4,4 kg e 2,6 kg, respectivamente; p=0,01), além de maior redução nas circunferências abdominais (p<0,01). As medidas de circunferência do braço, do quadril, o gasto energético de repouso, a massa gorda e a massa magra não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Dos indicadores bioquímicos apenas a acetona, plasmática e urinária, mostrou diferença entre os grupos (p<0,01), sendo maior com a dieta hipocalórica restrita em carboidratos. No grupo experimental houve redução significativa nos níveis de triglicérides e na oxidação de carboidratos e, aumento significativo na oxidação de lipídeos. Os resultados encontrados neste estudo permitem afirmar que a dieta hipocalórica restrita em carboidratos é mais eficaz que a dieta hipocalórica convencional, quando usada por curto prazo, para a perda de peso e redução das medidas de circunferências abdominais, sem apresentar risco metabólico.

INDEXAÇÃO E RECUPERAÇÃO POR CONTEÚDO EM IMAGENS DE ÚLCERAS CUTÂNEAS

Éderson Antonio Gomes Dorileo

Orientador: Prof. Dr. Paulo Mazzoncini de Azevedo Marques

Dissertação de Mestrado apresentada em 28/08/2009

Lesões ulceradas cutâneas de membros inferiores caracterizam-se em um problema mundialmente grave. São responsáveis por morbidades e mortalidades significativas, além de provocarem considerável impacto econômico. O presente trabalho teve por objetivo a caracterização de lesões ulceradas de membros inferiores, através da investigação de métodos computacionais com perspectiva de auxiliar o diagnóstico e a definição de conduta na prática clínica. Por meio do estudo de técnicas de reconhecimento de padrões para indexação e recuperação de imagens similares com base em seu conteúdo intrínseco (do Inglês, Content-Based Image Retrieval - CBIR), foi possível fornecer ao Dermatologista e à sua equipe médica um conjunto de imagens recuperadas de um banco de imagens previamente classificadas, visualmente similares a uma imagem de busca em análise. Para tanto, foram realizados testes de classificação dos tecidos predominantes das lesões em termos de tecido necrótico (preto), tecido com presença de fibrina (amarelo), de granulação (vermelho), tecido hiperqueratótico (branco). A indexação e recuperação das imagens foram realizadas baseando-se em campos de cores e textura, obtidos dos componentes RGB (Red, Green and Blue) e HSI (Hue, Saturation and Intensity) de regiões contendo

as lesões dermatológicas. O desempenho do sistema CBIR foi medido em termos de precisão e revocação, tendo como referência a classificação visual feita por um médico especialista com relação à predominância do tipo de tecido nas lesões. Os resultados obtidos demonstram o potencial da metodologia proposta para recuperação de imagens similares, com o melhor resultado de precisão de 72,5% obtido na caracterização de tecidos de composição mista.

LINFOCITOSE B MONOCLONAL EM FAMILIARES DE PRIMEIRO GRAU DE PACIENTES COM O DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA ESPORÁDICA (NÃO-FAMILIAR)

Daniel Mazza Matos

Orientador: Prof. Dr. Roberto Passeto falcão

Tese de Doutorado apresentada em 11/09/2009

Não obstante similaridades biológicas tenham sido descritas entre a Linfocitose B Monoclonal (LBM) e a Leucemia Linfocítica Crônica (LLC), as relações entre essas duas condições clínicas não são plenamente conhecidas. O objetivo deste estudo foi estimar a frequência, as características biológicas e a evolução da LBM em familiares de primeiro grau (irmãos, irmãs, filhos e filhas) pertencentes a famílias com apenas um único indivíduo acometido pela LLC (LLC esporádica). Foram avaliados 167 indivíduos, provenientes de 42 famílias, por meio de um ensaio de citometria de fluxo com 4-cores. Células CD19+ purificadas do sangue periférico foram selecionadas por meio de separação imunomagnética e utilizadas para as reações de PCR (gene da cadeia pesada da imunoglobulina - IGHV, e receptor de células T) e para os experimentos de FISH (deleção 17p, deleção 13q, deleção 11q e trissomia do 12) nos casos de LBM. A LBM foi encontrada em sete indivíduos, provenientes de cinco famílias, de um total de 167 indivíduos (4,1%). A frequência de acordo com a faixa etária foi de zero (0/54) em indivíduos com menos de 40 anos, 2,5% (2/81) entre 40 e 60 anos e 15,6% (5/32) em indivíduos acima de 60 anos. Com um tempo mediano de seguimento de 23 meses, nenhum dos indivíduos progrediu para LLC. Dos sete indivíduos identificados com LBM, seis foram analisados por PCR e FISH. Rearranjo clonal para o IGHV foi detectado em quatro indivíduos. Em dois, foi também encontrado rearranjo clonal para o gene TRG do receptor de célula T na população de células da LBM. Monoclonalidade foi detectada em todos os casos, seja pela presença de uma relação anormal entre as cadeias leve ? e ?, ou por PCR, ou por ambos. Os experimentos de FISH não revelaram nenhuma anormalidade cromossômica. Os resultados de FISH não significativos constatados neste trabalho estão provavelmente relacionados ao pequeno número de indivíduos com LBM avaliados. A frequência global encontrada, de 4,1%, é similar à da LBM em indivíduos da população geral, que varia de 3,5% a 5,5%. Entretanto, com relação à frequência por grupos etários, foi encontrado o valor de 15,6% (5/32) em indivíduos acima de 60 anos, que é mais alto do que os valores determinados para a mesma faixa etária da população geral, mas muito similar à frequência de 16,7% (3/18) referida em publicações prévias, nos indivíduos sadios com mais de 60 anos, pertencentes a famílias com LLC familiar. Assim, dado que o alto risco para o aparecimento da LLC clínica, em familiares sadios de famílias com LLC familiar, está provavelmente vinculado à elevada frequência da LBM nesses indivíduos, os resultados aqui apresentados fortemente sugerem que em familiares de primeiro grau, idosos, de pacientes com LLC esporádica, a chance para a detecção da LBM é tão elevada quanto aquela presente em familiares de primeiro grau, também idosos, advindos de famílias com LLC familiar, o que, em última análise, poderia tornar esses indivíduos pertencentes à "famílias com LLC esporádica" tão susceptíveis quanto aqueles integrantes de "famílias com LLC familiar" para o desenvolvimento de LLC clínica.

NÍVEIS SÉRICOS DE MINERAIS E VITAMINAS EM PACIENTES COM SÍNDROME DO INTESTINO CURTO SUBMETIDOS À TERAPIA NUTRICIONAL

Camila Bitu Moreno Braga

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Selma Freire de Carvalho da Cunha

Dissertação de Mestrado apresentada em 18/09/2009

Introdução: A Síndrome do Intestino Curto (SIC) ocorre após ressecção intestinal. maciça e mesmo após período de adaptação, pode ser necessária a nutrição parenteral (NP). **Objetivo:** Determinar os níveis séricos de minerais e vitaminas em indivíduos portadores de SIC sob Terapia Nutricional Parenteral ou orientação dietoterápica. **Casística e métodos:** Participaram do estudo 26 adultos, alocados em três grupos e pareados para a idade, gênero e condição sócio-econômica. No Grupo NP (n=8), foram incluídos pacientes com SIC que recebiam NP periódica contendo a quantidade recomendada de minerais e vitaminas. O estudo incluiu também portadores de SIC que recebiam orientação dietoterápica em acompanhamento ambulatorial (Grupo VO, n=9) e um grupo controle com voluntários saudáveis (Grupo C, n=9). Foi feita a avaliação da ingestão alimentar, antropometria, impedância bioelétrica, exames bioquímicos da avaliação clínica e nutricional, dosagens

séricas dos minerais ferro, zinco, cobre e cálcio e das vitaminas A, D, E, K, C, B₁₂ e ácido fólico. O tratamento estatístico foi feito com auxílio do programa STATISTICS 6.0. Após testar a normalidade das variáveis (teste de Shapiro-Wilk), os dados foram analisados pelo teste de ANOVA-F e Tukey (para variáveis com distribuição normal) ou pelo teste de Kruskal-Wallis e Dunn (para variáveis sem distribuição normal). Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. **Resultados:** Comparados com o Grupo VO, os indivíduos do Grupo NP apresentaram menor comprimento do intestino delgado remanescente [22,5 (10,0-180,0 vs. 90,0 (40,0-130,0) cm]. Embora o padrão de ingestão alimentar fosse semelhante entre os grupos, quando comparados com o Grupo VO e controles, os indivíduos com SIC dependentes de NP apresentaram maior comprometimento nutricional, expresso pelos menores valores de IMC (18,2±2,5 vs. 25,4±3,4 vs. 28,4±3 (38,2±4,2 vs. 46,0±13,6 vs. 52,3±10,3kg) e gorda (7,8±4,1 vs. 21,8±17,8 vs. 24,3±8,5kg). Nos indivíduos do Grupo NP, foram documentados menores níveis séricos de proteínas totais (6,2±0,6 vs. 6,7±0,5 vs. 6,9±0,3g/dL), albumina [3,6(3,0-4,3) vs. 4,4(3,6-4,7) vs. 4,3(4,2-4,6)g/dL], hemoglobina (11,3±1,6 vs. 13,3±1,4 vs. 14,3±0,9g/dL), cobre (56,7±9,5 vs. 65,5±25,5 vs. 112,2±17,7µg/dL), potássio (3,4±0,3 vs. 4,3±0,4 vs. 4,3±0,4mmol/L), magnésio (1,1±0,3 vs. 1,4±0,3 vs. 1,8±0,1mg/dL), vitamina C (0,9±0,4 vs. 1,4±0,4 vs. 1,2±0,3mg/dL), vitamina E (16,3±3,4 vs. 26,2±9,9 vs. 24,1±2,8µmol/L) e vitamina K (0,6±0,2 vs. 1,0±0,4 vs. 1,0±0,5nmol/L). O Grupo VO apresentou comprometimento nos níveis séricos de cobre e magnésio. Conclusão: Devido à extensa ressecção intestinal e diminuição da capacidade absorptiva, os pacientes com SIC dependentes de NP apresentaram menor massa corporal magra e gorda, redução nos níveis séricos de proteínas circulantes, eletrólitos e minerais (potássio, magnésio e cobre) e das vitaminas C, E e K. Nos pacientes com SIC não dependentes de NP, ocorreu hipomagnesemia e hipocupremia, enquanto que os demais parâmetros avaliados encontraram-se semelhantes aos de controles saudáveis.

SOBREVIDA DE PACIENTES COM CARCINOMA HEPATOCELULAR: AVALIAÇÃO DE OITO SISTEMAS DE ESTADIAMENTO

Fernando Every Belo Xavier

Orientador: Prof. Dr. Alex Vianey Callado França

Dissertação de Mestrado apresentada em 21/09/2009

Introdução. O carcinoma hepatocelular (CHC) é o câncer primário de fígado mais comum. Vários sistemas de estadiamento têm sido propostos para prognosticar a sobrevida dos pacientes com carcinoma hepatocelular. Estudos comparativos entre os sistemas apresentam resultados discordantes, provavelmente devido às características peculiares de cada população estudada. No Brasil, não há informações sobre as classificações prognósticas para pacientes com CHC. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade que as classificações prognósticas Okuda, BCLC, TNM, CLIP, CUPI, Francesa, Tokyo e JIS têm para prever a sobrevida e determinar o sistema que melhor se adapta aos pacientes brasileiros com CHC. **Casuística e métodos.** Análise retrospectiva de oitenta pacientes com CHC, diagnosticados em um centro de referência brasileiro entre janeiro de 2000 e dezembro de 2004. Os métodos para análise usados foram: Kaplan-Meier com o teste log-rank, o teste da razão de verossimilhança, modelo de Cox e o c-index de Harrells. **Resultados.** A média de idade foi de 56 anos (14-77), 88,7% dos pacientes eram do sexo masculino, 52,7% portadores do vírus da hepatite C, 44,6% eram Child-Pugh A, 26,7% com invasão tumoral da veia porta. Trinta e oito pacientes (47,5%) foram submetidos a tratamento do tumor: treze com intenção curativa e vinte e cinco por métodos paliativos. Quarenta e dois pacientes (52,5%) não receberam tratamento específico para o tumor. A sobrevida mediana foi de 11,8 meses. A taxa de sobrevida geral foi de 47,4, 25,4 e 19,5% em 12,24 e 36 meses, respectivamente. Houve significativa correlação entre a sobrevida e o estágio do tumor, ao se utilizar todos os oito sistemas de estadiamento (Okuda $p < 0,001$; BCLC $p < 0,001$; TNM $p < 0,005$; CLIP $p < 0,001$; CUPI $p < 0,001$; Francesa $p = 0,03$; Tokyo $p < 0,002$; JIS $p < 0,001$). Quando comparadas as curvas em cada classificação, o teste da razão de verossimilhança e o c-index de Harrell e Okuda tiveram maior capacidade em prever o prognóstico dos pacientes. **Conclusão.** A sobrevida dos pacientes foi predita com acurácia por todos os modelos prognósticos. Os sistemas de estadiamento BCLC e Okuda apresentaram melhor desempenho para prever a sobrevida dessa coorte de pacientes brasileiros com CHC.

LINHAÇA E LIGNANAS: EFEITO DO CONSUMO SOBRE INDICADORES NUTRICIONAIS E INFLAMATÓRIOS

Roberta Soares Lara Cassani

Orientador: Prof. Dr. Júlio Sérgio Marchini

Tese de Doutorado apresentada em 25/09/2009

Dislipidemia e aumento de depósito de gordura visceral encontram-se associados à ocorrência do processo inflamatório subclínico. A prevenção e o controle destes fatores de risco nutricionais (FR) tornam-se fundamentais para a redução

da morbi-mortalidade a eles relacionada. Indicadores nutricionais, inflamatórios e metabólicos parecem estar associados com o estilo de vida. A utilização do β -3 é amplamente reconhecida por seu papel na redução destes FR. A semente de linhaça tem sido reconhecida como um alimento rico em fibras e β -3, entretanto, um novo constituinte de sua composição nutricional tem merecido atenção, pelo seu papel antiinflamatório e antioxidante. Este componente é chamado de lignanas, um polímero complexo e o principal constituinte não-carboidrato de plantas vasculares. Está ligado a fibras de celulose, e é responsável por reforçar a estrutura das paredes celulares, o que previne o colapso das mesmas. Lignanas, em contato com a microflora intestinal humana transformam-se em enterolignanas, especialmente, enterodiol e enterolactona. O presente trabalho tem por hipótese que o teor de lignanas dietético pode interferir no perfil metabólico, e alterar fatores de riscos envolvidos no estado nutricional, e conseqüentemente na saúde. O conhecimento de que diferentes características na composição nutricional de macronutrientes da dieta poderiam modificar o perfil inflamatório, independentemente, da presença das enterolignanas provenientes da semente de linhaça também constituíram o objetivo deste estudo. Por 42 dias, foram avaliados 52 funcionários, pertencentes ao sexo masculino, com idade média de 37 ± 9 anos, de uma indústria de grande porte, na cidade de Itu-SP. Os voluntários foram divididos em 4 grupos de pesquisa, sendo, um grupo controle, e três grupos com dietas isocalóricas e diferentes proporções no % de carboidratos (CH), e acréscimo de semente de linhaça em pó ou (protocolo simples cego). Foi preenchida ficha de coleta de informações sobre dados pessoais e conhecimento de fatores de risco (hipertensão, dislipidemia e diabetes), comportamentos de risco (tabagismo e sedentarismo) e antecedentes familiares. Foi também realizada avaliação clínico-laboratorial, no qual se obteve o registro de medidas antropométricas, medida da pressão arterial e coleta de sangue venoso em jejum de 12 h para avaliação de indicadores bioquímicos referentes à FR cardiovascular, tais como, colesterol total e frações (LDL-c e HDL-c), triglicérides, glicemia, insulina, Homa-beta e Homa-IR, ácido úrico, bem como, para avaliação de indicadores inflamatórios (Proteína C Reativa (PCR), Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) e Isoprostane Sérico), hormonais (Leptina e Adiponectina) e nutricionais (Enterodiol e Enterolactona séricas e urinárias). Observou-se que para redução significativa das medidas antropométricas estudadas e indicador de estresse oxidativo não houve diferenças entre os grupos que receberam intervenção dietética. Entretanto, para a melhora do perfil bioquímico, inflamatório, hormonal e nutricional, diferentes respostas foram encontradas. Os grupos que receberam dietas com redução de CH total (32% e 35%) mostraram benefícios, no que se refere ao perfil bioquímico, especialmente, colesterol total, LDL-c e ácido úrico, como também, para o perfil hormonal, referente aos níveis de adiponectina ($p < 0,05$). Com relação aos níveis de PCR e TNF- α , apenas os grupos que tiveram acréscimo de semente de linhaça na dieta apresentaram redução significativa ($p < 0,05$). Para os níveis de triglicérides, somente o grupo com adição de semente de linhaça e 32 % de CH total apresentou diminuição significativa ($p < 0,05$). Foi observado que com 32 % de CH total ingerido e adição de um alimento rico em lignanas constituiu-se uma estratégia nutricional rele fatores de risco metabólicos e controle da inflamação subclínica, o que pode contribuir na redução da morbi-mortalidade a eles associada.

FARMACOLOGIA

NEUROTRANSMISSORES ESPINAIS DO SISTEMA DESCENDENTE DE CONTROLE DA NOCICEPÇÃO ENVOLVIDOS NA ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA POR ELETROACUPUNTURA COM 2HZ E 100HZ EM RATOS

Josie Resende Torres da Silva

Orientador: Prof. Dr. Wiliam Alves do Prado

Dissertação de Mestrado apresentada em 13/07/2009

Várias áreas cerebrais modulam a transmissão nociceptiva por projeções para a medula espinal e usa neurotransmissores tanto diretamente em neurônios de projeção quanto em interneurônios. A analgesia induzida pela eletroacupuntura (AIA) tem sido confirmada por experimentos clínicos e experimentais, sendo uma alternativa para o tratamento de síndromes dolorosas. Os mecanismos pelo qual a AIA ocorre, entretanto, ainda não estão completamente elucidados. Esse estudo examina a importância dos neurotransmissores espinais na mediação da AIA. A latência no teste de retirada da cauda (LRC) foi utilizado para avaliar as mudanças produzidas pela injeção intratecal de metisergida (antagonista 5-HT, 30 μ g/10 μ l), atropina (antagonista muscarínico, 20 μ g/10 μ l) naloxona (antagonista opióide, 20 μ g/10 μ l) bicuculina (antagonist aGABA_A, 0,3 μ g/10 μ l), faclofeno (antagonista GABA_B, 20 μ g/10 μ l), WB4101 (antagonista α_{1A} , 20 μ g/10 μ l) ou idazoxan (antagonista α_2 , 20 μ g/10 μ l) na AIA induzida pela eletroacupuntura (EA) a 2 ou 100 Hz dos acupontos Zusanli (E36) e

Sanyinjiao (BP6) bilateral em ratos levemente anestesiados. A LRC foi aumentada significativamente pela EA, sendo que o efeito de 2Hz foi de maior duração que o produzido por 100Hz. Metisergida intratecal diminui o efeito da EA de 2 e de 100Hz. Naloxona ou idazoxan bloqueiam o efeito da EA de 2Hz, mas não de 100Hz. A atropina bloqueou o efeito da EA de 2Hz e reduziu a duração do efeito de 100Hz. A bicuculina ou faclofeno diminui a AIA de 2 ou 100 Hz. Em contraste, WB4101 não alterou o efeito de ambas frequências. Estes resultados nos levam a concluir que os mecanismos da AIA envolvem a ativação de receptores espinhais serotoninérgicos, colinérgicos e opioidérgicos. Receptores GABA_A e GABA_B estão envolvidos na modulação da AIA e os receptores α_2 -adrenérgicos são necessários para a AIA de 2, mas não de 100Hz, enquanto que receptores α_{1A} -adrenérgicos não parecem estar envolvidos na AIA.

PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES TRPV1 NAS REAÇÕES DEFENSIVAS MEDIADAS PELA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSOLATERAL

Ana Luisa Bernardes Terzian

Orientador: Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães

Dissertação de Mestrado apresentada em 20/07/2009

O Receptor de Potencial Transitório Vanilóide do Tipo 1 (TRPV1) é um canal permeável ao cálcio que pode ser ativado pelo endocanabinóide anandamida, além de seu agonista exógeno, a capsaicina. Na porção dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal (SCPdl) do mesencéfalo, uma estrutura envolvida com comportamento defensivo, resultados prévios demonstraram que a ativação de CB1 promove efeitos do tipo ansiolítico em curva com forma de sino, de modo dose-dependente. Entretanto, o papel dos receptores TRPV1 ainda não é totalmente conhecido. Desta maneira, no presente estudo foi testada a hipótese de que esse canal contribuiria para a modulação de comportamentos de ansiedade na SCPdl. Ratos Wistar machos receberam injeção local do antagonista de receptores TRPV1 capsazepina (10-60 nmol) e foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado (LCE) e ao modelo do lambert punido de Vogel (VCT). Ainda, os animais receberam injeções de capsaicina (0,01 - 1 nmol), agonista TRPV1, e foram submetidos aos mesmos modelos. Corroborando com a hipótese proposta, a capsazepina produziu um efeito do tipo ansiolítico em ambos modelos. A capsaicina mimetizou os resultados obtidos com o antagonista, o que pode ser atribuído a sua capacidade de dessensibilizar canal iônico. Deste modo, tais resultados sugerem que enquanto receptores CB1 inibem o comportamento aversivo na SCPdl, os receptores TRPV1 o facilitaria. Assim, receptores CB1 e TRPV1 possuiriam ação oposta na modulação de comportamentos do tipo ansiedade nessa estrutura.

EFEITOS DO TAMOXIFENO E SEUS METABÓLITOS NA REATIVIDADE VASCULAR

Marcelo Freitas Montenegro

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

Tese de Doutorado apresentada em 22/07/2009

O tamoxifeno é um antiestrogênico largamente utilizado no tratamento e prevenção do câncer de mama. Entretanto, vários estudos epidemiológicos têm demonstrado sua capacidade de reduzir significativamente o risco de doenças cardiovasculares, ao mesmo tempo em que aumenta os riscos de trombose. As causas desses efeitos ambíguos do tamoxifeno permanecem desconhecidas. Neste trabalho, objetivamos testar a hipótese de que esses diferentes efeitos cardiovasculares do tamoxifeno poderiam ser resultantes da ação de seus diferentes metabólitos: 4-hidroxi-tamoxifeno n-desmetil-tamoxifeno e o recém caracterizado endoxifeno. Esta hipótese baseou-se no conhecimento de que o tamoxifeno é extensamente metabolizado por enzimas do sistema citocromo P450, as quais produzem os referidos metabólitos, que possuem atividade farmacológica superior ao próprio tamoxifeno. Para testar esta hipótese, estudamos os efeitos do tratamento com tamoxifeno ou seus metabólitos na reatividade vascular do trem posterior de ratos, além de diferentes parâmetros bioquímicos, que poderiam indicar ação benéfica ou deletéria destes metabólitos na função endotelial, tais como os níveis de nitratos e nitritos e o estresse oxidativo, além da atividade de enzimas envolvidas no controle e produção de espécies reativas do oxigênio, como a atividade da superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase e NADPH oxidase. Adicionalmente, avaliamos os possíveis efeitos agudos induzidos pelo tamoxifeno e seus metabólitos em anéis de aorta, utilizando técnicas de órgão isolado, bem como os possíveis mecanismos envolvidos em tais efeitos. Os resultados mostraram que enquanto o tratamento com tamoxifeno promoveu uma redução no vasorelaxamento dependente do endotélio, o tratamento com seus metabólitos n-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno e endoxifeno promoveu melhoras significativas no mesmo parâmetro, avaliado em um importante leito vascular de resistência, o trem posterior de ratos. O

tratamento com tamoxifeno aumentou o estresse oxidativo e diminuiu os níveis de metabólitos do NO, enquanto seus metabólitos mostraram-se antioxidantes sem afetar significativamente os níveis de metabólitos do NO. Por fim, assim como o tamoxifeno, os metabólitos n-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno e endoxifeno induziram vasorelaxamento agudo de anéis de aorta contraídos, sendo que a amplitude do vasorelaxamento foi superior para os metabólitos n-desmetil-tamoxifeno e endoxifeno. Os resultados obtidos nesse estudo sugerem que os metabólitos do tamoxifeno exercem efeitos diferenciados aos do tamoxifeno, o que poderia explicar, ao menos em parte, os diferentes achados descritos para o uso do tamoxifeno.

EFEITO VASODILATADOR DO NOVO COMPOSTO DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO "RU-4-MERCAPTO-NO (GOLD) (AUNPS-{RU-4PYSH}_n)" EM AORTA DE RATOS

Bruno Rodrigues Silva

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lusiane Maria Bendhack

Dissertação de Mestrado apresentada em 25/08/2009

O óxido nítrico (NO) tem importante papel no controle do tônus vascular. O NO ativa as enzimas guanilato-ciclase solúvel (GCs) e Proteína quinase-G (PKG), promovendo redução da concentração citoplasmática de cálcio ($[Ca^{2+}]_c$) nas células do músculo liso vascular (CMLV). AuNPs (Nanopartículas de Ouro) tem sido sintetizadas e funcionalizadas pelo composto de rutênio doador de NO para modificar a liberação de NO. Esse estudo teve o objetivo de investigar se a funcionalização das AuNPs pelo composto Cis-[Ru(bpy)₂(NO)(4PySH)].(PF₆)₃-(Ru-4PySH)- formando AuNPs-{Ru-4PySH}_n potencializa o relaxamento induzido pelo doador de NO Ru-4PySH, além de estudar seus efeitos sobre a ativação da GCs, $[Ca^{2+}]_c$ e contribuição das células endoteliais para o relaxamento vascular. Curvas concentração-efeito para AuNPs, Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}_n foram construídas para aortas desprovidas de endotélio e pré-contraídas com fenilefrina na ausência ou presença do inibidor seletivo da GCs (ODQ). Curvas concentração-efeito também foram construídas para anéis aórticos com endotélio intacto na ausência ou presença do inibidor da NO-Sintase (L-NAME) ou antagonista muscarínico (Atropina). A $[Ca^{2+}]_c$ foi medida em CMLV com FLUO-3AM usando microscopia de fluorescência. A liberação de NO pelos compostos Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}_n foi quantificada por amperometria com sensor seletivo para NO. Ambos os compostos induziram relaxamento vascular de forma concentração-dependente em anéis aórticos desprovidos de endotélio: Ru-4PySH teve efeito semelhante ao AuNPs-{Ru-4PySH}_n, enquanto AuNPs não induziram relaxamento vascular. ODQ reduziu o relaxamento induzido por ambos os compostos Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}_n. O composto AuNPs-{Ru-4PySH}_n teve o relaxamento vascular potencializado em anéis aórticos com endotélio intacto, porém essa resposta foi abolida por L-NAME ou Atropina. O composto AuNPs-{Ru-4PySH}_n reduziu mais a $[Ca^{2+}]_c$ em CMLV do que Ru-4PySH. Em conclusão, esse trabalho demonstra que o relaxamento vascular induzido pelos compostos Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}_n envolve a ativação de GCs e redução de $[Ca^{2+}]_c$. O composto AuNPs-{Ru-4PySH}_n tem o relaxamento vascular potencializado em anéis aórticos com endotélio intacto. Esse mecanismo parece envolver ativação de receptores muscarínicos e NO-sintase endoteliais, com consequente produção de NO.

FISIOLOGIA

EXPRESSÃO DE RECEPTORES PARA GLICOCORTICÓIDES EM NEURÔNIOS AVP, CRH E GABA NO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO

Leandro Marques de Souza

Orientador: Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci

Tese de Doutorado apresentada em 17/07/2009

Os neurônios que expressam arginina-vasopressina (AVP) e hormônio liberador de corticotropina (CRH), localizados nas porções anterior (PVHap) e medial (PVHmp) parvocelular do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH) participam do controle do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). A atividade desses neurônios pode ser modulada por aferências gabaérgicas (GABA) para neurônios do PVH de um circuito local localizado em áreas periventriculares. Neste estudo,

analisamos a expressão de neurônios CRH, AVP e receptores para glicocorticóides (GR) na PVHap e PVHmp do PVH, bem como, a expressão de neurônios GABA nas principais fontes de projeções gabaérgicas para a porção parvocelular do PVH após manipulações do eixo HPA. Ratos normais, adrenalectomizados e sham foram submetidos à injeção intraperitoneal de salina ou dexametasona. Amostras de sangue foram coletadas para dosagem de corticosterona por radioimunoensaio e os cérebros foram removidos e processados para imunofluorescência para CRH, AVP, GABA e GR. Os resultados demonstraram a diferença na expressão de neurônios CRH e AVP entre PVHap e PVHmp nos animais submetidos à adrenalectomia (ADX) e tratados com dexametasona. Em animais normais e sham o tratamento com dexametasona induziu a expressão de neurônios gabaérgicos na Área Peri-Ventricular Anterior (PVa) coincidente com a região da PVHmp. Este efeito não foi observado em animais ADX tratados com dexametasona. A expressão de GR aumentou na PVHap e na PVHmp de todos os animais tratados com dexametasona porém, este aumento foi mais pronunciado na PVHmp. A co-expressão de GR em neurônios CRH e AVP foi observada somente na PVHmp, enquanto a co-expressão de GR em neurônios gabaérgicos somente na PVa coincidente com a região da PVHmp. Estes achados confirmam a ação direta dos glicocorticóides na expressão de neurônios CRH, AVP e GABA através de GR. Verificou-se uma ação diferenciada de neurônios CRH, AVP, GABA e de GR entre PVHap e PVHmp. Por fim, observou-se a co-expressão de GR em neurônios CRH e AVP somente na PVHmp e de GR em neurônios gabaérgicos apenas na PVa coincidente com a região da PVHmp demonstrando assim que a PVHmp e a PVa são fundamentais para o controle do eixo HPA e mediação pelo sistema gabaérgico.

EXPRESSÃO DA PROTEÍNA C-FOS NA VIA BARORREFLEXA NO MODELO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL INDUZIDA PELO L-NAME

Ricardo Motta Pereira

Orientador: Prof. Dr. Hélio C. Salgado

Dissertação de Mestrado apresentada em 12/08/2009

A função baroreflexa na hipertensão arterial induzida pelo L-NAME ainda é assunto controvertido. Possivelmente devido aos efeitos de anestésicos e/ou drogas vasoativas, usualmente empregadas para o estudo do barorreflexo. O nosso laboratório desenvolveu a técnica da estimulação elétrica do nervo depressor aórtico (NDA), em ratos acordados, para estudar, o controle barorreflexo cardiocirculatório. **Objetivo:** Estudar a atividade neuronal na via barorreflexa e no PVN, por meio da expressão da proteína c-Fos, em ratos hipertensos L-NAME, acordados, submetidos à estimulação elétrica do NDA, a fim de se detectar possíveis alterações do barorreflexo nesse modelo de hipertensão arterial. **Métodos e Resultados:** Os animais foram tratados durante 14 dias com L-NAME (70 mg/kg, n = 13) ou D-NAME (70 mg/kg, n=10) dissolvidos na água de beber, ou, somente, com água de beber (controles, n=13). Os ratos hipertensos L-NAME apresentaram pressão arterial média (163 ± 4 mmHg) e frequência cardíaca (404 ± 8 bpm) basais maiores que os normotensos D-NAME (108 ± 1 mmHg e 366 ± 8 bpm) e controles (100 ± 2 mmHg e 355 ± 7 bpm). Na véspera do experimento os animais foram anestesiados com tiopental para cateterização da artéria e veia femorais, e implantação dos eletrodos para estimulação elétrica (1mA, 2ms e 60Hz) do NDA, intermitente com ciclos de 5s de estimulação seguidos de 10s sem estimulação, durante 20 minutos. Duas horas após esse procedimento foi realizada a imunohistoquímica para c-Fos. As respostas hipotensora e bradicárdica devido à estimulação do NDA não diferiram entre os grupos, entretanto, a densidade de c-Fos nos animais estimulados foi maior nos ratos hipertensos L-NAME no núcleo do trato solitário (NTS) intermediário (108 ± 6 vs. 47 ± 5 N°Fos/mm²) e no NTS comissural caudal (107 ± 10 vs. 43 ± 1 vs. 44 ± 8 N°Fos/mm²), em relação aos normotensos D-NAME e controles estimulados. O protocolo de estimulação do NDA foi eficaz em aumentar, de forma semelhante, a expressão da proteína c-Fos na região caudal ventrolateral do bulbo (CVLM) dos animais estimulados. A estimulação do NDA levou ao aumento na densidade da proteína c-Fos nas porções magnocelulares anterior (PaMA) e medial (PaMM) do PVN. Nos neurônios parvocelulares do PVN a estimulação do NDA aumentou a expressão de c-Fos, somente, na região posterior (PaPO) dos ratos hipertensos L-NAME. **Conclusões:** 14 dias de tratamento com L-NAME induziu hipertensão arterial e taquicardia; a estimulação elétrica do NDA foi eficaz em ativar o barorreflexo; a maior densidade de c-Fos no NTS dos ratos hipertensos L-NAME estimulados sugere uma maior desinibição dos neurônios barorreceptores neste modelo de hipertensão arterial; a estimulação do NDA ativou neurônios do PVN magnocelular, responsáveis pela síntese de ocitocina e vasopressina; nos neurônios parvocelulares do PVN, a ativação do barorreflexo pela estimulação do NDA aumentou a expressão da proteína c-Fos somente nos ratos hipertensos L-NAME, o que sugere uma maior participação do PVN na modulação autômica simpática nesse modelo de hipertensão arterial.

ESTUDO ANATOMOFUNCIONAL DO COLÍCULO SUPERIOR NA INTEGRAÇÃO DE INFORMAÇÃO SENSORIAL DAS VIBRISSAS DURANTE O COMPORTAMENTO PREDATÓRIO EM RATOS

Thiago Santos Gouvea

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Eliane Comoli

Dissertação de Mestrado apresentada em 28/08/2009

Em estudo de mapeamento funcional dos sítios encefálicos envolvidos com o comportamento predatório em ratos, através de imunodeteção da proteína Fos, Comoli e Canteras (2000) encontraram ativação das porções laterais das camadas intermediárias do Colículo Superior (CSI), não observada em outras situações comportamentais, tais como confronto com um predador natural, nado forçado, choque nas patas, ou após consumo de ração (Comoli e Canteras, 2000; Comoli et al., 2005). Os autores também relataram que a lesão bilateral na região do CSI com ácido N-metil-D-aspartico (NMDA) comprometeu o desempenho do comportamento predatório. Os animais lesados apresentaram movimentos apráxicos da musculatura orofacial e patas dianteiras, e consequente dificuldade na captura, imobilização e manuseio das presas. Tais animais se mostraram menos responsivos aos movimentos de deslocamento das presas, estímulo este muito eficiente em eliciar uma resposta de orientação e ataque imediata e muito acurada em ratos normais (Comoli e Canteras, 2000). Estudos com traçadores neuronais e estimulação elétrica sugerem que o CSI origina uma via descendente envolvida com movimentos de orientação e perseguição (Redgrave et al., 1986, Dean et al., 1989). Comoli e Canteras sugeriram que tanto o deslocamento da presa como o contacto das vibrissas são estímulos fundamentais para desencadear a predação, e que esses estímulos podem estar envolvidos com o aumento da marcação de Fos no CSI na predação, uma vez que o CSI recebe aferências sensoriais de estruturas relacionadas à sensibilidade da face e das vibrissas através dos núcleos espinhal (SpV) e principal (PrV) do complexo trigeminal (Comoli e Canteras, 2000; Hemelt e Keller, 2007; Huerta et al., 1983, Killackey e Erzurumlu, 1981), Zona Incerta (ZI) (Kolmac et al., 1998; Comoli e Canteras, 2000), núcleo reticular parvicelular (PARN) e córtex somatossensorial primário (SSp) (Cohen et al., 2008; Comoli e Canteras, 2000). No intuito de melhor compreender o papel do CSI no comportamento predatório, nós avaliamos a influência das vibrissas na predação no contexto da circuitaria colicular. Para tal, os ratos foram habituados às condições experimentais e então expostos a baratas vivas e íntegras da espécie *Leurolestes circumvagans*. Após a predação, as vibrissas foram removidas e depois de 48 horas os animais foram expostos novamente às presas. Os animais sem vibrissas predaram satisfatoriamente. Entretanto, observamos um menor número de ataques certos sobre as presas. Tal déficit comportamental foi revertido após reconstituição das vibrissas ao tamanho original (30 dias após a remoção). Avaliamos o padrão de marcação de Fos no CSI durante o comportamento predatório, tanto de ratos com vibrissas intactas como daqueles sem vibrissas, e verificamos que houve uma diminuição da marcação de Fos na extremidade lateral da camada branca intermediária, enquanto na extremidade lateral da camada cinzenta intermediária a marcação se manteve. Em conjunto, os dados anatômicos e comportamentais sugerem que as vibrissas não são fundamentais para desencadear a predação, mas são importantes para uma melhor acuidade de ataques. Sugerimos que a marcação de Fos observada no CSI possa estar mais relacionada aos componentes motores da predação, e que os animais lesados bilateralmente no CSI não predaram eficientemente por terem sofrido principalmente uma perda motora. A morte de células na camada branca do CSI decorrente da lesão poderia estar relacionada com os possíveis déficits de orientação observados nesses animais. Diferentemente, os animais sem vibrissas ficam menos providos de informações sensoriais espaciais que poderiam levar à localização espacial mais precisa das presas e gerar ataques mais certos.

GENÉTICA

HISTÓRIA EVOLUTIVA DO "CLUSTER" *DROSOPHILA BUZZATII* (GRUPO *D. REPLETA*): EVENTOS HISTÓRICOS E DIVERSIFICAÇÃO DE ESPÉCIES NO BRASIL

Fernando de Faria Franco

Orientadora: Profa.Dra. Maura Helena Manfrin

Tese de Doutorado apresentada em 05/08/2009

O "cluster" *Drosophila buzzatii* é um grupo composto por sete espécies crípticas e cactofílicas, naturalmente endêmicas das florestas secas do leste da América do Sul. No presente trabalho, foram isolados fragmentos do domínio CCID do gene nuclear *period* das sete espécies que compõe o "cluster" *D. buzzatii* com o objetivo de elaborar uma hipótese filogenética para essas espécies. Foi detectado que seleção purificadora é a principal força dirigindo a evolução

do gene *period*, em concordância com o importante papel do CCID na maquinaria do relógio circadiano. Foi estabelecida a relação filogenética entre *D. gouveai*, *D. borborema* and *D. seriema*, que compõem um clado politômico em estudos anteriores. A análise do padrão de variação intraespecífica indicou que *D. koepferae* apresenta duas linhagens evolutivas do gene *period*, tendo sido discutido que isso é provavelmente devido à introgressão de haplótipos do *period* de *D. buzzatii*. Além da análise filogenética com o gene *period*, análises populacionais e filogeográficas com as espécies *D. serido*, *D. gouveai*, *D. seriema* e *D. borborema*, que compõe o clado AB, foram conduzidas com dados dos genes mitocondrial COI e nuclear *period*. Essa análise permitiu: 1. testar hipóteses filogeográficas estabelecidas em trabalhos anteriores; 2. o estabelecimento da história demográfica para cada uma dessas espécies, que envolveu expansões e contrações populacionais, provavelmente relacionadas às flutuações demográficas das vegetações secas da América do Sul durante o Pleistoceno; 3. estabelecimento da estrutura populacional para cada espécie; 4. entendimento do contexto geográfico dos eventos de diversificação no clado AB; 5. estabelecimento de uma hipótese de origem peripátrica da espécie *D. borborema*; 6. identificação de haplótipos do gene COI, indicativos de hibridação entre as espécies do clado AB.

ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DE DERMATÓFITOS DOS GÊNEROS *Microsporium* E *Trichophyton* E AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS

Luciene Melo Coelho

Orientadora: Profa.Dra. Nilce Maria Martinez Rossi
Tese de Doutorado apresentada em 21/08/2009

Dermatofitoses são micoses superficiais causadas por fungos denominados dermatófitos, que colonizam tecidos ricos em queratina como pele, pêlos e unhas. Infecções por dermatófitos em indivíduos imunodeprimidos são mais graves, pois estes fungos colonizam rapidamente a epiderme, podendo causar infecções subcutâneas e profundas. Linhagens resistentes a alguns antifúngicos têm sido relatadas com frequência, o que sugere a necessidade de ampliar o conhecimento sobre a biologia desses patógenos. Os dermatófitos que mais frequentemente afetam o homem e os animais são *Trichophyton* e *Microsporium*, e esses gêneros podem ser classificados em geofílico, zoofílico ou antropofílico, dependendo de seu habitat natural. No presente trabalho, estudamos cinco espécies de dermatófitos, *T. rubrum*, *T. tonsurans*, *T. equinum*, *M. canis* e *M. gypseum*, utilizando eletroforese em campo pulsado (CHEF) para estimar o número e o tamanho de seus cromossomos. A estimativa do número de cromossomos foi validada com a análise telomérica após digestão do DNA total de cada espécie. Além disto, foi feito o mapeamento físico por hibridação molecular de alguns genes envolvidos em patogenicidade e na resistência a antifúngicos, utilizando-se ESTs de *T. rubrum* como sonda molecular. O grau de conservação destes genes entre esses dermatófitos foi estabelecido através da análise comparativa *in silico*, realizada com os programas BlastN e BlastX do GenBank e do *Dermatophyte Comparative Database (Broad Institute)*. Também foi avaliada a concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos terbinafina, griseofulvina, fluconazol, itraconazol, anfotericina-B para microconídios e arthroconídios. Os resultados mostram que em geral os arthroconídios são mais resistentes às drogas ensaiadas que os microconídios. No entanto, a diferença na susceptibilidade entre conídios e arthroconídios depende da droga, da linhagem e da espécie, podendo se constituir em uma das causas de falha terapêutica. A susceptibilidade à higromicina também foi analisada considerando a possibilidade de usar este antibiótico para selecionar células transformadas com o gene de resistência a higromicina, presente em plasmídeos a serem utilizados em experimentos de inativação gênica. Portanto, os resultados desse estudo contribuem para o conhecimento da organização genômica das cinco espécies de dermatófitos que estão em processo de sequenciamento pelo *Fungal Genome Initiative (The Broad Institute of Harvard and MIT/National Institute of Health)*, para o entendimento de mecanismos que levam a resistência aos antimicóticos e estabelecem parâmetros para futuros estudos de funcionalidade gênica.

ABORDAGEM COMPUTACIONAL PARA A PREDIÇÃO DO SECRETOMA HUMANO

Gislaine da Silva Pimentel Pereira

Orientador: Prof. Dr. Wilson Araujo da Silva Júnior
Tese de Doutorado apresentada em 10/09/2009

As proteínas sintetizadas podem permanecer no citosol ou ter outros destinos diversos, como mitocôndrias, lisossomos, núcleo, tornar-se constituintes da membrana plasmática ou serem secretadas. Este direcionamento das proteínas, existe tanto em eucariotos quanto em procariotos e pode ser feito por meio de sequências sinalizadoras, pela própria estrutura da proteína ou por modificações pós-traducionais. As proteínas que possuem como destino final lisossomos, membrana celular ou meio extracelular, normalmente possuem em sua região amino-terminal, um peptídeo sinal: N-região,

H-região, e um segmento de quebra de hélice, C-região. Além destas características, proteínas secretadas passam por um processo de formação chamado glicosilação: nitrogênio-glicosilação, que ocorre no nitrogênio e oxigênio-glicosilação, que ocorre no hidróxi-oxigênio de serina, treonina e cisteína. Um melhor entendimento destas regiões fornecem informações para desenvolvimento de sistemas computacionais para busca de proteínas com características de secretadas da célula. Neste trabalho associamos 38432 proteínas (banco de dados Ref-Seq H. sapiens september 2008 NCBI) procurando peptídeo sinal, N-região, H-região, C-região, com os softwares SignalP 3.0 (baseado em redes neurais e modelos escondidos de Markov) e Phobius (baseados em modelos escondidos de Markov). Para encontrar a característica de glicosilação, importante em proteínas secretadas, um programa em PERL, foi implementado para localizar os motivos de N-glicosilação Asn-Xaa-Ser, Asn-Xaa-Thr ou Asn-Xaa-Cys. Com base nestes critérios de seleção obtivemos 2944 proteínas (sem isoformas) com características de secretadas pela via secretora que foram utilizadas para validação *in silico*, que consistiu de uma busca na literatura, onde encontramos 695 (25%) proteínas secretadas já descritas. Aos resultados, foi adicionado dados de experimentos de SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) tag do tecido Osteoblasto em tempos de expressão nos tecidos: Mesenquimal T0hs, Mesenquimal T2hs, Mesenquimal T12hs e Osteoblasto T21hs e encontramos 1128 proteínas com peptídeo sinal e sequon, e destas, 49 proteínas faziam parte das 695 validadas *in silico*. Para validação experimental desta análise de predição *in silico* das 2944, foram feitos estudos experimentais SDS-PAGE e espectrometria de massa MALDI TOF-TOF utilizando a linhagem celular HCC1954, onde obtivemos o resultado experimental de 116 proteínas e dentre elas algumas já descritas na literatura como secretadas. Encontramos das 116 proteínas desta linhagem, 11 proteínas buscando nas 2944, que apresentam peptídeo sinal e sequon e destas, 9 fazem parte da validação *in silico* com os dados da literatura. As 105 proteínas, que não foram identificadas nesta abordagem, verificamos que não possuem peptídeo sinal e sequon. A estratégia de combinação computacional utilizando softwares para predição de peptídeo sinal, tornou possível a construção de um catálogo de proteínas secretadas (H. sapiens), com o objetivo de fornecer alvos ou fontes terapêuticas em processos apoptóticos associados a anomalias, na perspectiva farmacêutica e busca a dados experimentais.

INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA EXPRESSÃO DO GENE PACC DE *ASPERGILLUS NIDULANS*

Ernna Hérica Domingues de Oliveira

Orientador: Prof.Dr. Antonio Rossi Filho

Dissertação de Mestrado apresentada em 17/09/2009

O fungo *Aspergillus nidulans*, assim como a maioria dos micro-organismos, possuem uma via transdutora de sinal mediada pelo fator de transcrição PacC que atua em muitos eventos metabólicos envolvidos na resposta adaptativa ao pH ambiente. O gene *pacC* codifica um fator de transcrição *zinc-finger* e os seis genes *pal* (*A, B, C, F, H e I*), que são membros putativos de uma cascata sinalizadora, que promovem a ativação proteolítica de PacC. Com a finalidade de caracterizar a expressão gênica de *pacC* de *A. nidulans*, em resposta a diferentes condições de cultivo e pHs, ensaios de RT-PCR e qRT-PCR foram realizados a partir dos RNAs totais das linhagens *pabaA1* e *pabaA1 palB7* cultivadas por 16 horas, em meio mínimo e YAG (*yeast extract*) sob fosfato limitante e suficiente, nos pHs ácido e alcalino. Os ensaios de RT-PCR, mostraram que o gene *pacC* é expresso em todas as condições de cultivo cujo pH é alcalino. Em pH ácido os níveis de expressão do gene *pacC* foram significativos somente em meio mínimo, sob fosfato limitante em ambas as linhagens. Porém, os resultados quantitativos da expressão do gene *pacC* obtidos por qRT-PCR, mostraram que o gene *pacC* é expresso em todas as condições de cultivo nos pHs ácido e alcalino. O sequenciamento do gene *palB* de *A. nidulans* revelou na linhagem mutante *palB7* a existência de 5 substituições de nucleotídeos distribuídas nas regiões de íntron e éxon. As mutações nas regiões de íntrons evidenciaram 10 mudanças na estrutura secundária do Pré-mRNA da linhagem mutante em relação à linhagem controle. Portanto, nossos resultados mostraram que a transcrição do gene *pacC* não é dependente do pH ambiente, pois ela também ocorre em pH ácido, dependendo dos componentes nutricionais do meio de cultivo.

REDES DE REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL EVIDENCIAM VIAS DE CARCINOGENESE DURANTE A DIFERENCIAÇÃO OSTEOLÁSTICA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Adriane Feijó Evangelista

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

Dissertação de Mestrado apresentada em 29/09/2009

Estudos têm mostrado a possibilidade da ocorrência de plasticidade carcinogênica em células tronco, nas quais certo número de genes ativados no processo de diferenciação normal poderia estar envolvidos com a carcinogênese. A

participação de elementos genéticos envolvidos com renovação tecidual e/ou diferenciação de células-tronco poderia ser uma das causas da origem do cancer a partir de células tronco adultas. Para testar essa hipótese, primeiramente padronizamos um sistema-modelo no qual células-tronco mesenquimais humanas (MSC) de duas fontes diferentes (medula óssea ou cordão umbilical) foram isoladas, cultivadas e diferenciadas *in vitro* sobre estímulos químicos com betaglicerofosfato, dexametazona e ácido ascórbico. Em segundo lugar, estudamos os perfis de expressão gênica em grande escala durante o processo de diferenciação (24 h a 21 dias) dessas células utilizando o método de cDNA microarrays. Análise de dados utilizando programas de bioinformática dedicados a microarrays como o Cluster-Tree View permitiu identificar assinaturas de expressão gênica particulares de células MSC controle e daquelas em diferenciação. Para termos acesso às possíveis interações entre os genes expressos e envolvidos com o processo carcinogênico, reanalisamos os dados utilizando o programa GeneNetwork, o que permitiu a reconstrução de redes transcricionais a partir dos dados atuais de microarrays. Foram comparadas células MSC indiferenciadas com aquelas em diferenciação *in vitro* durante os tempos de 24h, 48h e 7 dias. Com esses dados, reconstruímos redes de regulação transcricionais. As então chamadas "redes gênicas" permitiram identificar aqueles nós gênicos particulares e comuns, dependendo da origem das células tronco (medula óssea ou cordão umbilical), todos envolvidos com carcinogênese. Dentre os nós gênicos comuns, foi possível identificar aqueles que mostraram grande número de interações como PRKDC e GNG12. Dentre os nós exclusivos de MSC de medula óssea foram identificados os genes ALCAM e TP53. Aqueles que identificaram as células MSC de cordão umbilical foram NRCAM e PI3K1. Todos esses nós gênicos são considerados como elementos importantes no controle da carcinogênese. Além disso, a identificação de sequências que interagem com fatores de transcrição que participam das redes gênicas obtidas reforça a possibilidade da ocorrência das interações propostas. Esses resultados permitem uma idéia panorâmica do mecanismo de controle observado nas MSC os quais estão envolvidos com a diferenciação normal e com a carcinogênese em dois níveis: 1) mecanismo de interação transcricional entre mRNAs e 2) seus elementos genéticos reguladores (fatores de transcrição). Essas observações mostram a participação de elementos genéticos (mRNAs e fatores de transcrição) os quais dependendo do controle fino da cascata de interações poderão decidir o destino das células tronco à diferenciação normal ou ao câncer.

GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA

EXPRESSÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO NEURONAL (FCN), DO SEU RECEPTOR (TRK A) E DOS RECEPTORES DE ESTROGÊNIO E PROGESTERONA NO PERITÔNIO PÉLVICO EM MULHERES COM DOR PÉLVICA CRÔNICA

Débora Cristiane da Silva Andrade

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Cândido dos Reis

Dissertação de Mestrado apresentada em 01/07/2009

Dor pélvica crônica (DPC) afeta grande número de mulheres e seu manejo ainda permanece complexo e insatisfatório. Estudos têm demonstrado um envolvimento do fator de crescimento neuronal (FCN) no processo de cronificação da dor. Participação hormonal neste processo também tem sido aventada, visto autores terem demonstrado influência estro/progestacional sobre nociceptores tanto direta quanto indiretamente através da influência exercida sobre os fatores neurotróficos. Foi objetivo deste estudo, verificar a associação entre a expressão do fator de crescimento neuronal (FCN), seu receptor (trk A) e os receptores de estrogênio e progesterona no peritônio pélvico com a presença de dor pélvica crônica. Para tal foi realizado um estudo transversal incluindo um grupo de 22 mulheres com DPC, 8 com DPC e usuárias de anticoncepcional oral (DPC/ACO) e 7 sem dor. A dor foi analisada pela escala analógica visual (EAV) e questionário de McGill. Foi realizado imunohistoquímica para avaliar FCN e seu receptor trk A, receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP). A expressão de FCN teve média de 5, variando de 0 a 8, no grupo DPC, 5,5 no grupo DPC/ACO variando 3 a 8, e no grupo sem dor de 5 variando de 3 a 8 ($p > 0,05$). A expressão de trk A apresentou média de 6, variando de 3 a 8, no grupo DPC, 6 no grupo DPC/ACO, variando de 4 a 8, e 6 no grupo sem dor variando de 4 a 6 ($p > 0,05$). A expressão do RE apresentou média 4 no grupo DPC, variando de 0 a 8, 3,5 no grupo DPC/ACO variando de 0 a 8, e 7 no grupo sem dor, variando de 6 a 8 ($p < 0,05$). A expressão do RP teve média 6,5 no grupo DPC, variando de 0 a 8, 5 no grupo DPC/ACO, variando de 0 a 7, e 7 no grupo sem dor, variando de 5 a 8 ($p > 0,05$). Nossos resultados sugerem um papel anti-nociceptivo do estrogênio no peritônio pélvico de mulheres no menacme, não mediado por expressão de FCN ou trk A. Palavras-Chave: dor pélvica crônica, peritônio pélvico, fator de crescimento neuronal (FCN), receptor trk A, receptor de estrogênio (RE), e receptor de progesterona (RP).

EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS REGULADORAS DO SISTEMA COMPLEMENTO, DAF E CD59, NO ENDOMÉTRIO DE MULHERES COM ABORTOS ESPONTÂNEOS RECORRENTES

Mayra Beraldo Andozia

Orientador: Prof. Dr. Rui Alberto Nogueira

Dissertação de Mestrado apresentada em 01/07/2009

Durante o ciclo menstrual, o endométrio se torna receptivo à chegada do “futuro embrião”. Estes eventos são regulados pela liberação de progesterona durante a fase secretória do ciclo, que aumenta a secreção do componente C3 do Sistema Complemento (SC). Neste período, também foi observado o aumento fisiológico da expressão de algumas proteínas reguladoras do SC (CRPs) como: C1Inh, C4bp, DAF, CD59 e clusterina, o que sugere uma forte regulação da atividade deste sistema, favorável à implantação e ao desenvolvimento embrionário. Modificações na expressão destas proteínas poderiam resultar em aborto espontâneo recorrente (AER). Neste trabalho estudou-se a expressão endometrial de DAF e CD59 no endométrio de pacientes com AER, durante a fase secretória do ciclo. Adicionalmente, verificou-se a ativação do SC através da presença do neoantígeno de C9 neste mesmo material. A casuística foi composta de nove mulheres férteis normais (Grupo Controle) e doze mulheres com AER (Grupo Aborto), todas analisadas durante a fase secretória do ciclo. A técnica utilizada para detecção destas proteínas foi a imunohistoquímica. O neoantígeno de C9 não foi detectado em nenhum dos grupos, tanto nas glândulas quanto no estroma endometrial. DAF e CD59 foram detectados tanto no Grupo Controle quanto no Grupo Aborto. Houve expressão nitidamente mais acentuada de ambas as CRPs, DAF e CD59, durante a fase secretória intermediária do Grupo Aborto, embora sem diferença estatística. Houve expressão para DAF e CD59 no estroma endometrial de ambos os grupos. Assim, os resultados deste trabalho apontam para a ausência do neoantígeno de C9 no endométrio humano normal e no endométrio humano de patologias como o AER. As CRPs, DAF e CD59, se mostraram presentes tanto no endométrio humano normal quanto no endométrio humano patológico por AER, com destaque para o aumento da expressão de DAF e CD59 na sub-fase intermediária secretória do ciclo menstrual, período crítico para a implantação, sugerindo que alguma alteração neste período possa resultar na posterior perda gestacional.

AVALIAÇÃO ULTRA-SONOGRÁFICA DA FUNÇÃO ENDOTELIAL EM USUÁRIAS DE LETROZOL E TAMOXIFENO

Carolina Oliveira Nastri

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Candido dos Reis

Dissertação de Mestrado apresentada em 16/09/2009

Entre as mulheres brasileiras, a principal causa de mortalidade são as doenças cardiovasculares, seguida em frequência pelo câncer, sendo o mais comum o de mama. É bastante conhecida a associação de câncer com eventos tromboembólicos, mas pouco estabelecida sua relação com os demais eventos cardiovasculares. Para estudar estes eventos desde suas alterações primordiais, como a lesão e disfunção endotelial e a formação da placa aterosclerótica, vários métodos têm sido utilizados. É clara a associação entre câncer, em especial o de mama, com lesão endotelial e risco cardiovascular. A terapia endócrina para tumores de mama com receptores hormonais positivos é amplamente usada tanto de forma paliativa no câncer de mama metastático, quanto na adjuvância, para tumores iniciais. O tamoxifeno (TMX) tem sido usado como droga de escolha com este propósito há cerca de 30 anos com boa eficácia e perfil razoavelmente seguro. O desenvolvimento dos inibidores de aromatase (IAs) de terceira geração promoveu estudos comparativos que têm demonstrado superioridade dos IAs em relação ao TMX na adjuvância, favorecendo seu uso tanto em substituição, quanto de forma sequencial. Em geral, os IAs são tão bem tolerados quanto o TMX, preocupando ainda questões como aumento de risco cardiovascular, de osteoporose e alterações no perfil lipídico. Neste cenário temos alguns estudos demonstrando um menor número de eventos cardiovasculares em mulheres previamente tratadas de câncer de mama, o que indica um possível efeito protetor do tratamento com tamoxifeno. O efeito cardiovascular dos inibidores da aromatase permanece controverso. O objetivo deste estudo foi comparar alguns marcadores de risco cardiovascular entre mulheres sobreviventes do câncer de mama após tratamento com tamoxifeno, letrozol ou sem tratamento endócrino. Para isso, avaliamos o total de 103 sobreviventes de câncer de mama: 35 em uso de tamoxifeno (TMXg), 34 em uso de letrozol (LTZg) e 34 sem tratamento endócrino (STEG). Os parâmetros estudados foram: a dilatação da artéria braquial mediada por fluxo (DMF), a espessura da íntima-média (EIM) e o índice de rigidez (?) da artéria carótida, colesterol total, HDL e triglicérides.

Observamos que os três grupos apresentaram valores semelhantes de HDL e EIM. No TMXg foi encontrado o menor valor de colesterol total (219,29±36,31mg/dL vs. 250,59±38,37mg/dL vs. 245,09±35,35mg/dL; TMXg vs. LTZg vs. STEG respectivamente; p<0,01 - ANOVA), o maior valor de triglicérides (139,34±41,82mg/dL vs. 111,35±28,22mg/dL vs. 122,09±33,42mg/dL; p<0,01), o maior valor de DMF (6,32±2,33% vs. 4,10±2,06% vs. 4,66±2,52%; p<0,01) e o valor mais

baixo do índice de rigidez (?) ($5,08 \pm 1,68$ vs. $6,28 \pm 1,75$ vs. $5,99 \pm 1,86$; $p=0,01$). O LTZg não diferiu significativamente do STEg em nenhum dos parâmetros estudados.

Nós não observamos nenhuma diferença entre o LTZg e o STEg em nenhum dos parâmetros de risco cardiovascular avaliados. Desta forma, a diferença observada nos valores dos lipídios séricos, no índice de rigidez (?) e na DMF entre as mulheres em tratamento com tamoxifeno e letrozol pode ser mais bem atribuída a um efeito benéfico do tamoxifeno do que a um efeito prejudicial do letrozol.

IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

PAPEL DO CO-RECEPTOR PD-1 ("PROGRAMMED CELL RECEPTOR 1") NA INFEÇÃO EXPERIMENTAL POR *Trypanosoma cruzi*

Fredy Roberto Salazar Gutierrez

Orientador: Prof. Dr. João Santana da Silva

Tese de Doutorado apresentada em 22/07/2009

Durante a apresentação antigênica, a ativação eficiente dos linfócitos T depende de dois sinais: o primeiro é mediado pelo reconhecimento do antígeno através da interação TCR/MHC/peptídeo e o segundo pela Interação dos co-receptores com os seus respectivos ligantes. CD28 e ICOS são co- receptores estimuladores, enquanto CTLA-4 e PD-1 inibem a ativação dos linfócitos. A sinalização através de CTLA-4 e PD-1 está envolvida na manutenção da tolerância periférica e pode ser indiretamente favorecedora de mecanismos de escape da resposta imune a parasitas. De fato, *T. cruzi* induz CTLA-4 e é eliminado quando esta é inibida. Por outro lado, o envolvimento de PD-1 como um mecanismo de controle da resposta imune a *T. cruzi* não é conhecido. No entanto, existem evidências que mostram o desenvolvimento de cardiopatia e o surgimento de anticorpos contra componentes dos cardiomiócitos na deficiência de PD-1, eventos que também acontecem na infecção pelo *T. cruzi*. No presente trabalho foi avaliada a hipótese de que PD-1 e seus ligantes participam do sistema de regulação da resposta imune durante a infecção por *T. cruzi*. Primeiramente, foi mostrado que este parasito induz a expressão de PD-1 e de seus ligantes PD-L1 e PD-L2 em células apresentadoras de antígeno, em células do baço e em linfócitos circulantes e teciduais de camundongos infectados. Experimentos envolvendo o bloqueio desta via de sinalização com anticorpos, bem como o uso de camundongos geneticamente deficientes para PD-1 mostrou que esses camundongos apresentam uma resistência aumentada frente à proliferação do parasito, tanto in vitro quanto in vivo. Confirmou-se ainda, a exacerbação da resposta inflamatória no tecido cardíaco após a inibição de PD-1 e PD-L1. Esta resistência envolve mecanismos dependentes da imunidade inata e adaptativa. Especificamente, os macrófagos deficientes de PD-1 apresentam uma maior produção de óxido nítrico e maior capacidade tripanocida quando comparados às células provenientes de animais selvagens. Ainda, foi mostrado que a deficiência de PD-1 leva à diminuição da população de células com fenótipo regulador, bem como diminuição da taxa de apoptose em linfócitos TCD4⁺ e CD8⁺. Esses dados permitem afirmar que o co-receptor PD-1 participa no controle do processo inflamatório induzido após a infecção *T. cruzi* no coração. Os possíveis alcances do novo conhecimento gerado neste trabalho sobre os conceitos fisiopatológicos da infecção são discutidos.

PERFIL TRANSCRICIONAL DO FUNGO PATOGENICO *Trichophyton rubrum* DURANTE A INTERAÇÃO COM CÉLULAS DA EPIDERME E O EFEITO DE ANTIFÚNGICOS QUE INTERFEREM COM A RESPOSTA OSMÓTICA

Nalu Teixeira de Aguiar Peres

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nilce Maria Martinez Rossi

Tese de Doutorado apresentada em 24/07/2009

As interações patógeno-hospedeiro envolvem modificações metabólicas específicas que permitem aos patógenos aderirem e penetrarem no tecido, remodelando seu metabolismo para obter nutrientes e responder ao estresse provocado pelos mecanismos de defesa do hospedeiro. A identificação dos mecanismos envolvidos na adaptação ao micro-ambiente hospedeiro e na resposta ao estresse é essencial para se compreender o processo patogênico das infecções fúngicas, e permitir o estabelecimento de novas normas terapêuticas. A utilização de dados genômicos, em particular as análises de transcriptoma definindo o perfil de expressão gênica durante a infecção, pode levar à identificação das estratégias utiliza-

das pelos patógenos durante a interação com o ambiente hospedeiro. Embora o dermatófito antropofílico e cosmopolita *Trichophyton rubrum* seja um dos fungos mais frequentemente isolados de infecções cutâneas, o conhecimento sobre os processos moleculares que governam sua patogenicidade ainda é escasso. Além disto, os antifúngicos utilizados no tratamento das infecções fúngicas agem sobre um limitado número de alvos celulares, apresentando vários efeitos colaterais. Neste trabalho, foi utilizado um modelo de infecção *ex vivo* de pele humana para identificar genes expressos durante a interação *T. rubrum*-células epidérmicas, avaliando-se também o efeito de antifúngicos que supostamente atuam sobre componentes da via de regulação osmótica, como o fludioxonil e a ambruticina. Os resultados obtidos demonstraram que estas novas drogas apresentam atividade antifúngica contra *T. rubrum*, levando a um inchaço das hifas e consequente morte celular, modulando também a expressão de vários genes. O modelo de infecção *ex vivo* de pele seguido de hibridação subtrativa supressiva permitiu a identificação de 110 genes possivelmente envolvidos na permanência de *T. rubrum* no tecido hospedeiro, e 116 na resposta à ambruticina, envolvidos principalmente nos processos de transporte celular e biogênese de componentes celulares. A ativação dos genes que codificam para subtilisina protease 5 e para uma proteína mitocondrial de função desconhecida, homóloga a Tar1p de *Saccharomyces cerevisiae*, durante a infecção *ex vivo* de pele e sua maior expressão durante o tratamento com ambruticina sugerem que elas sejam importantes para a permanência deste dermatófito no tecido hospedeiro, principalmente na presença de um agente inibitório. A identificação dos genes regulados durante a interação *T. rubrum*-células epidérmicas contribuem para uma melhor compreensão das adaptações metabólicas durante a infecção. Os genes identificados neste trabalho são interessantes para estudos futuros sobre a patogênese das dermatofitoses e resposta aos antifúngicos ativadores da resposta osmótica, auxiliando também na busca por novos alvos moleculares para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

CÉLULAS B SÃO IMPORTANTES NA GERAÇÃO DE MEMÓRIA EM MODELO DE VACINAÇÃO COM DNA-Hsp65

Isabela Cardoso Fontoura

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Arlete Aparecida Marins Coelho-Castelo
Dissertação de Mestrado apresentada em 07/08/2009

O campo da vacinologia gênica abriu perspectivas de desenvolvimento de vacinas e terapias contra diferentes patógenos. Um exemplo disso é a vacina DNA-Hsp65 que se mostrou protetora contra a tuberculose experimental. Embora vários aspectos desse novo tipo de vacina tenham sido estudados, o desenvolvimento de células de memória é muito pouco explorado. O conhecimento dos mecanismos envolvidos para gerar memória nesse tipo de estratégia pode favorecer a escolha de vetores e de *booster* para atingir a proteção necessária. Nesse trabalho foi avaliado o papel de células B na modulação da resposta de células T e indução de memória, após a imunização com antígeno protéico e de DNA (pcDNA3-Hsp65). Os resultados mostraram que as células B foram importantes na geração de células TCD4⁺/CD44^{high}/CD62L^{low} (memória efetora), em todos os períodos de tempo analisados para ambos os grupos de imunização, e, na geração de células TCD8⁺ CD44^{high}/CD62L^{low}/CD127⁺, aos 15 e 30 dias após as imunizações, mas não para TCD8⁺/CD44^{high}/CD62L^{low}. Além disso, estas células foram mais importantes para produção de citocinas inflamatórias aos 15 dias após imunização, ou seja, nos estágios mais iniciais da resposta imune. Também foi detectada por PCR em tempo real, a expressão de IL-10 por células B no baço dos animais. Estas células foram melhor caracterizadas por citometria de fluxo. Interessantemente, a população de células B que mais produziu IL-10 apresentou um fenótipo CD19⁺/CD5⁺/CD43⁻. Enquanto a população CD19⁺/CD5⁻/CD43⁻ mostrou pouca produção de IL-10. Esses dados sugerem que essa subpopulação seja importante no esquema de vacinação para geração de células de memória. Além disso, as células B purificadas expressaram o fator de transcrição Foxp3 que é característico de células T reguladoras. Essa é a primeira detecção de Foxp3 em células B, mas novos ensaios devem ser conduzidos para caracterizar essa subpopulação. No entanto, os dados apresentados nos permitem sugerir que diferentes subpopulações de células B possam contribuir para o desenvolvimento de células T de memória, e que seus efeitos devem ser considerados em modelos de vacinação.

ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DE β_2 -INTEGRINA NAS ATIVIDADES FAGOCÍTICA E MICROBICIDA DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES E PERITONEAIS NA HISTOPLASMOSE

Elyara Maria Soares

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Lúcia Helena Faccioli
Dissertação de Mestrado apresentada em 10/08/2009

O *Histoplasma capsulatum* (*H. capsulatum*) é um fungo dimórfico patogênico e responsável por graves lesões pulmonares, as quais se caracterizam pelo acúmulo de leucócitos ao redor do fungo, resultando na formação de granulomas.

A infecção ocorre principalmente pela inalação de conídios ou pequenos fragmentos de micélio que alcançam os alvéolos, onde se transformam em leveduras, que é a forma patogênica do fungo. Na resposta imune do hospedeiro, as integrinas participam nos mecanismos fagocíticos, essenciais na resposta à histoplasmose. As β_2 -integrinas contêm uma cadeia β_2 , também conhecida como CD18, comum a várias moléculas de adesão, e uma cadeia α variável. Até o momento foram identificadas quatro cadeias α distintas: α_L , a qual forma o dímero $\alpha_L\beta_2$, também conhecido como LFA-1 (do inglês “leukocyte function antigen-1”) ou CD11aCD18; α_M , formando $\alpha_M\beta_2$, chamado Mac-1 (do inglês “macrophage differentiation antigen 1”) ou CR3 (do inglês “complement receptor 3”) ou CD11bCD18; α_X , formando $\alpha_X\beta_2$, CD11cCD18, gp150, 95 ou CR4 (do inglês “complement receptor 4”) e a cadeia α_D , formando $\alpha_D\beta_2$, CD11dCD18. Neste trabalho, investigamos o papel da molécula CD18 em macrófagos alveolares (MAs) e macrófagos peritoneais (MPs) nas funções efetoras contra *H. capsulatum* e a relação do leucotrieno B_4 (LTB_4) nestas respostas. Inicialmente confirmamos que MAs e MPs provenientes dos animais CD18^{low}, expressam baixa porcentagem de CD11bCD18 (CR3). Demonstramos que, como esperado, MAs e MPs de ambos os grupos fagocitam mais leveduras opsonizadas com complemento do que não opsonizadas. Surpreendentemente, MAs de animais CD18^{low} fagocitam 136% mais leveduras opsonizadas do que MAs de C57BL/6. Também, MPs destes animais fagocitam aproximadamente 240% mais leveduras quando infectados com *H. capsulatum* e opsonizados, quando comparados aos MPs de C57BL/6. A adição de LTB_4 aumenta a atividade fagocítica em 520% por MAs de animais C57BL/6 e 200% por MAs de CD18^{low}, enquanto que a adição de LTB_4 aumentou a fagocitose dos MPs de animais C57BL/6 em 600% vezes quando comparado aos MPs de CD18^{low}. Este fenômeno foi inibido pela pré-incubação destas células com antagonista específico do receptor BLT1 apenas em animais C57BL/6. A adição de LTB_4 na cultura de MPs reduziu a porcentagem de morte das leveduras apenas nos animais C57BL/6. Os animais CD18^{low} produzem espontaneamente mais LTB_4 e apresentaram um grande aumento na produção de óxido nítrico quando comparados aos animais C57BL/6. Pacientes acometidos pela Doença Granulomatosa Crônica (DGC) possuem deficiência congênita da molécula CD18. Células fagocíticas isoladas do sangue periférico de pacientes com DGC foram incubadas com leveduras opsonizadas e assim como macrófagos de animais deficientes de CD18, fagocitam mais leveduras opsonizadas (900%) ou não (300%), quando comparado com células de indivíduos saudáveis. Sugerimos que a molécula CD18 tem importante participação nos mecanismos efetores da imunidade inata, por mecanismo dependente de mediadores lipídicos, como o LTB_4 , no controle dos mecanismos de defesa contra *H. capsulatum*.

PAPEL DOS LEUCOTRIENOS NA PROTEÇÃO CONFERIDA PELA IMUNIZAÇÃO HETERÓLOGA BCG / DNA-HSP65 CONTRA TUBERCULOSE

Luís Henrique Franco

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vânia Luiza Deperon Bonato
Tese de Doutorado apresentada em 12/08/2009

A tuberculose é responsável por mais de 2 milhões de mortes ao ano. A imunidade protetora contra a tuberculose está relacionada com a ativação de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ produtores de IFN- γ , citocina que potencializa os mecanismos microbicidas dos macrófagos para eliminação dos bacilos. Nos últimos anos, o leucotrieno B_4 (LTB_4) destacou-se como mediador lipídico que participa da imunidade protetora contra diversas infecções, incluindo a tuberculose. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar o papel dos leucotrienos na proteção induzida pela imunização homóloga com DNA-HSP65 ou heteróloga com BCG/DNA-HSP65. Para isso, inicialmente, nós confirmamos a participação dos leucotrienos no controle da infecção por *M. tuberculosis* ao mostrar que animais C57BL/6, que controlam a replicação dos bacilos, secretam mais LTB_4 ; e ao bloquear a síntese de leucotrienos com a droga MK-886, estes animais ficaram suscetíveis à infecção. Em seguida, nós passamos a avaliar se os leucotrienos participavam da proteção conferida pela imunização homóloga com DNA-HSP65 ou heteróloga (*prime-boost*) com BCG/DNA-HSP65. Nossos resultados mostraram que animais deficientes para a síntese de LT (5-LO KO) infectados foram mais suscetíveis à infecção em relação aos animais WT. A maior suscetibilidade dos animais 5-LO KO foi associada à redução na secreção de IFN- γ , nitrito e IL-17, aumento na secreção de PGE₂, defeitos no recrutamento de células inflamatórias e aumento no influxo de células Foxp3⁺ para os pulmões. A imunização homóloga perdeu completamente seu efeito protetor na ausência de leucotrienos, enquanto a imunização heteróloga induziu proteção parcial. Animais 5-LO KO imunizados pelo esquema *prime-boost* secretaram concentrações mais elevadas de IL-17 e tiveram menor influxo de células Foxp3⁺ para os pulmões quando comparados aos animais 5-LO KO não imunizados e infectados. A inibição da síntese de prostaglandinas durante o protocolo de imunização pela estratégia *prime-boost* reduziu a capacidade protetora da vacina tanto em animais WT como nos 5-LO KO, sugerindo que as prostaglandinas podem desempenhar papel no processo de imunização. Em conjunto, nossos resultados reforçam a importância dos leucotrienos na imunidade protetora contra tuberculose, sugerindo sua atuação indireta, uma vez que, além de contribuir para síntese de IFN- γ e nitrito, também parecem colaborar na síntese de IL-17.

PAPEL DAS PROSTAGLANDINAS NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Histoplasma capsulatum*

Priscilla Aparecida Tartari Pereira

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Lucia Helena Faccioli

Dissertação de Mestrado apresentada em 13/08/2009

A histoplasmose é uma doença granulomatosa crônica, cujo agente etiológico é o fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum*. A infecção ocorre pela inalação de conídios ou pequenos fragmentos de micélio que alcançam os alvéolos, onde se transformam em leveduras que é responsável pela patogenia da doença. A imunidade celular do hospedeiro determina o grau das manifestações clínicas na histoplasmose, sendo a interação entre células T e macrófagos, fundamental para o controle da infecção e erradicação do *H. capsulatum*. Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou a participação de leucotrienos nos mecanismos de defesa do hospedeiro durante a histoplasmose. Neste trabalho descrevemos o papel das prostaglandinas, demonstramos que este mediador lipídico contribui para a patogênese da doença, pois sua inibição, com celecoxibe, resultou na sobrevivência de até 80% dos animais infectados com o inóculo letal de *H. capsulatum*, em contraste com 100% de mortalidade dos animais somente infectados. Além disso, a inibição das prostaglandinas resultou na diminuição (i) da síntese de citocinas pró-inflamatórias e da resposta imune celular e (ii) do recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o espaço bronco-alveolar. Por outro lado, resultou no aumento (iii) de células TCD4⁺ no pulmão, (iv) na síntese de óxido nítrico por células do parênquima pulmonar, (v) na fagocitose de leveduras de *H. capsulatum* por macrófagos alveolares e (vi) da síntese de LTB₄. Nossos resultados sugerem que prostaglandinas têm papel importante na patogênese na infecção por *H. capsulatum*, modulando a resposta imune do hospedeiro.

O PAPEL DO INFLAMASSOMA DE NLR4/IPAF E ASC NO CONTROLE DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Djalma de Souza Lima Júnior

Orientador: Prof. Dr. João Santana da Silva

Dissertação de Mestrado apresentada em 17/08/2009

A leishmaniose constitui um espectro de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que compreende várias espécies, responsáveis por diferentes formas da doença. Dentre as diversas espécies de *Leishmania* descritas causadoras da leishmaniose humana e animal, a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* é um importante agente etiológico da leishmaniose tegumentar humana e apresenta um amplo espectro de doenças clínicas. Descobertas recentes indicam que a *Leishmania (L.) amazonensis* está aumentando a sua distribuição geográfica no Brasil, sendo responsável por apresentações clínicas pouco usuais em novas áreas de transmissão. A capacidade de montar uma resposta Th1 é descrito como um fenótipo resistente à infecção e depende das células do sistema imune inato, não só permitindo o hospedeiro a desenvolver uma imunidade específica, mas também determinando o tipo de resposta imune. Receptores de reconhecimento padrão presentes em células da imunidade inata possuem grande importância na ativação de células T. Dentre esses receptores, destaca-se o Nlr4 que ativa caspase-1, de forma dependente ou independente de ASC, após a detecção de patógenos intracelulares. Caspase-1 ativa, está presente em complexos multiprotéicos denominados Inflamassoma. A ativação de caspase-1 é um elemento chave da imunidade inata induzida por uma variedade de agentes patogênicos e toxinas. Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o papel dos inflamassomas de Nlr4/Ipaf e ASC durante a infecção experimental por *L. amazonensis*. Nossos resultados mostram que macrófagos de camundongos selvagens infectados com *L. amazonensis* ativaram caspase-1 endógena. BMMΦ de camundongos ASC^{-/-}, caspase-1^{-/-} e Nlr4^{-/-} apresentaram menor atividade leishmanicida e produção de NO quando comparados com BMMΦ de camundongos selvagens. Surpreendentemente, resultados semelhantes foram observados em macrófagos ativados com IFN-γ ou IFN-γ + TNF-α. Além disso, BMMΦ de camundongos ASC^{-/-}, caspase-1^{-/-} e Nlr4^{-/-} exibiram uma menor expressão de CD80, CD86, MHC-II e CD1d e maior expressão de PD-L1 que BMMΦ selvagens. BMMΦ ASC^{-/-}, caspase-1^{-/-} e Nlr4^{-/-} infectados com *L. amazonensis* produziram níveis significativamente mais baixos de citocinas pró-inflamatórias. Por outro lado, a produção de TGF-β, IL-10, IL-5 e IL-6 foram maiores do que o observado em BMMΦ selvagens. Avaliação da expressão de NOS2 por PCR em tempo real detectou uma maior expressão dessa enzima em culturas de BMMΦ de camundongos selvagens comparado com macrófagos de camundongos ASC^{-/-}, caspase-1^{-/-} e Nlr4^{-/-}. Experimentos *in vivo* mostraram que camundongos deficientes para ASC, caspase-1 e Nlr4, infectados com *L. amazonensis* possuíam um maior desenvolvimento de lesão e parasitismo na lesão, linfonodo e baço. Produção de IL-12p40, IFN-γ, TNF-α e IL-1β por células do baço e linfonodo estava diminuída em camundongos ASC^{-/-}, caspase-1^{-/-} e Nlr4^{-/-}. Ao contrário, células do baço e linfonodo de camundongos ASC^{-/-}, caspase-1^{-/-} e Nlr4^{-/-} demonstraram uma maior produção de IL-10. O perfil de expressão de NOS2 e arginase I

na lesão e linfonodo foi caracterizado por elevados níveis de arginase I e menores níveis de expressão de NOS2 em camundongos ASC^{-/-}, caspase-1^{-/-} e Nlrc4^{-/-}, comparado com os controles. Nossos resultados demonstram que os inflamassomas de Nlrc4/Ipaf e ASC contribuem para funções efetoras de macrófagos em resposta ao parasitismo, uma característica que é necessária para o controle da infecção *in vivo* por *L. amazonensis*.

AVALIAÇÃO DE UMA NOVA METODOLOGIA VACINAL BASEADA NO USO DE RNA MENSAGEIRO NA TUBERCULOSE EXPERIMENTAL

Carolina Damas Rocha

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Arlete Aparecida Martins Coelho-Castelo
Tese de Doutorado apresentada em 19/08/2009

Com o intuito de avaliar uma nova metodologia vacinal baseada no uso do RNA mensageiro na tuberculose (TB) experimental esse projeto se propôs a investigar a imunogenicidade, a proteção e o efeito terapêutico gerado pela imunização de camundongos com linfócitos B (LBs), células dendríticas (CDs) ou macrófagos (Mfs) transfectados com mRNA-Hsp65 ou pulsados com a proteína recombinante Hsp65 de *Mycobacterium leprae*. A avaliação da integridade do mRNA-Hsp65 e da ocorrência de tradução da proteína em células transfectadas foram confirmadas por RT-PCR e WB e nos permitiu comprovar a ocorrência do processo de tradução e concluir que este se trata de um evento rápido e de curta duração nas células transfectadas. A análise fenotípica das APCs submetidas aos diferentes estímulos: células não tratadas, estimuladas por contato com mRNA-Hsp65, eletroporadas com mRNA-Hsp65, somente eletroporadas (mock), ou pulsadas com proteína recombinante Hsp65; revela que de forma geral os Mfs e CDs quando estimulados apresentaram maior expressão de moléculas co-estimuladoras quando comparados aos LBs submetidos às mesmas condições, além de sugerirem fortemente que tanto o mRNA-Hsp65 quanto a proteína apresentam propriedades imuno-estimuladoras. Os ensaios de imunogenicidade mostraram que a capacidade proliferativa de células recuperadas dos animais vacinados e re-estimuladas *in vitro* com Hsp65 foi significativamente maior do que a observada nos animais imunizados com salina, nos grupos: LBs eletroporados com mRNA-Hsp65, CDs eletroporadas com mRNA-Hsp65. Notamos que nos grupos imunizados com APCs ocorreu proliferação celular mesmo na ausência do re-estímulo *in vitro* com a proteína Hsp65. Acreditamos que isso possa ter ocorrido em virtude da capacidade das APCs de induzirem uma ativação de células T específicas contra proteínas do Soro Bovino Fetal (SBF). Ou seja, quando em cultura as APCs capturaram proteínas do meio apresentando-as em contexto de MHC e ativando, *in vivo*, linfócitos T específicos contra proteínas do soro. Quando houve re-estímulo *in vitro* as proteínas do soro agiram como antígenos e “mascararam” a ativação de linfócitos T específicos contra a Hsp65. Na dosagem de citocinas vimos que células provenientes do baço de animais imunizados com CDs mock ou CDs eletroporadas com mRNA-Hsp65 foram capazes de induzir um perfil misto de resposta com produção de IFN- γ mas também de IL-5 e IL-10. Por outro lado, as células recuperadas de LBs e M ϕ eletroporados com mRNA-Hsp65 apenas produziram citocinas de perfil Th2. Nesses resultados de dosagem de citocinas de células re-estimuladas *in vitro* também não pode ser descartado o efeito induzido pelo SBF. A dosagem de anticorpos revelou que nenhuma das imunizações com APCs transfectadas com mRNA-Hsp65 foi capaz de induzir uma resposta humoral específica. A avaliação da capacidade profilática e terapêutica da transferência de uma ou duas doses das diferentes formulações de APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 ou pulsadas com a proteína Hsp65 não revelou alterações significativas nos níveis de citocinas no pulmão, não foi capaz de reduzir a carga bacilar no pulmão dos animais infectados e não preservou o tecido pulmonar. Quando optamos pela administração de 2 doses de Mfs ou CDs pulsadas com mRNA-Hsp65 ou com a proteína Hsp65 administradas por via subcutânea também não obtivemos redução do número de bactérias no pulmão. A partir desses dados concluímos que esse novo modelo vacinal baseado no uso de mRNA ou da proteína Hsp65 carreadas por APCs é incapaz de gerar efeito profilático e/ou terapêutico na tuberculose experimental.

IMUNOBIOLOGIA DAS INFESTAÇÕES DE BOVINOS PELO CARRAPATO RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS: ESTUDO DOS CORRELATOS IMUNES DE RESISTÊNCIA E DE SUSCEPTIBILIDADE

Alessandra Mara Franzin

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Isabel K. F. De Miranda Santos
Tese de Doutorado apresentada em 31/08/2009

A pele dos vertebrados é alvo da maioria das 15.000 espécies de artrópodes hematófagos existentes e pouco se sabe sobre as estratégias imunológicas utilizadas pelos hospedeiros para expulsar esse tipo de ectoparasitos. É fato que carrapatos, como artrópodes hematófagos, são capazes também de induzi-las. Entre a grande variedade de hospedeiros, os bovi-

nos, que apresentam fenótipos variáveis de resistência ao *Ripicephalus (Boophilus) microplus*, constituem o único modelo no qual é possível correlacionar as respostas imunológicas entre os fenótipos contrastantes na mesma espécie hospedeira. Para tal, as populações celulares do infiltrado induzido na pele pelo carrapato foram quantificadas nos bovinos resistentes, *Bos taurus indicus* e nos suscetíveis, *Bos taurus taurus*. Como esperado, o carrapato induziu inflamação cutânea local nos bovinos estudados e a composição celular do infiltrado apresentou diferenças que variaram entre os fenótipos contrastantes de infestação. A pele resistente apresentou maior número de basófilos em comparação a pele suscetível infestada pelo carrapato adulto ($P < 0,05$) o que sugere a participação desse tipo de granulócito na resposta imune, prejudicando a hematofagia do carrapato. Eosinófilos não foram observados na pele naïve, mas sim na pele normal e infestada, apresentando maiores quantidades ($P < 0,05$) na pele resistente infestada por ninfa e por adulto. Esse granulócito também se mostrou importante para a aquisição de resistência a carrapatos, a cinética observada na pele dos animais sugere um efeito sistêmico de eosinófilos na infestação. Já mastócitos se mostraram reduzidos de forma semelhante na pele resistente e suscetível infestada por ninfa e adulto em comparação a pele não infestada das mesmas ($P < 0,05$), sugerindo desgranulação induzida pela saliva do carrapato. As citocinas e mediadores inflamatórios liberados por mastócitos poderiam desencadear e até modular as respostas imunes de contra o carrapato. Neutrófilos estavam em quantidades semelhantes na pele infestada de ambas as raças, apresentando maior quantidade na fase de adulto em relação à fase de ninfa ($P < 0,05$). Esse fato sugere que a saliva da ninfa expressa desintegrinas contendo RGD, que possivelmente são específicas para esse granulócito. Em contrapartida, as células mononucleares foram mais abundantes na pele resistente e suscetível infestadas por ninfa em relação às infestadas por adulto ($P = 0,001$). Entre as populações mononucleares fenotipadas, as células T CD3⁺ foram recrutadas em maior número na pele resistente infestada por ninfa e adulto que na pele suscetível nas mesmas fases ($P < 0,05$), indicando sua importância na regulação da resposta imune de resistência ao ectoparasito. Células CD4⁺ foram mais numerosas na pele resistente infestada por adulto que a pele suscetível infestada pela mesma fase ($P < 0,05$); já as células CD8⁺ estavam em maior número na pele resistente infestada por ninfa do que na pele suscetível na mesma fase de infestação ($P < 0,05$). Células T gd/WC1⁺ foram mais abundantes ($P < 0,05$) na pele resistente infestada por adulto que a mesma não infestada, indicando que esses linfócitos podem desempenhar papel importante na aquisição de resistência. Já os linfócitos B estiveram em número reduzido na pele suscetível infestada por ninfa e por adulto em comparação à mesma não infestada ($P < 0,05$). Entretanto, na pele resistente infestada por adulto, o número desses linfócitos foi maior ($P < 0,05$) em comparado ao encontrado na pele suscetível infestada pela mesma fase, sugerindo a participação de anticorpos na aquisição de resistência a carrapatos. Embora não significativa, o maior número de células Natural Killers na pele resistente, sugere seu envolvimento na proteção contra doenças transmitidas por carrapatos. Em suma, os resultados obtidos sugerem que a resposta imune local envolve células residentes e recrutam outras que, em conjunto, atuam na imunorregulação e na elaboração de respostas imunes efetoras e de memória eficazes contra carrapatos.

IDENTIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES ANTIINFLAMATÓRIOS NA SALIVA DE FLEBOTOMÍNEOS DO VELHO MUNDO E SEU EMPREGO NA ARTRITE REUMATÓIDE EXPERIMENTAL

Vanessa Carregaro Pereira

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha

Tese de doutorado apresentada em 31/08/2009

No presente estudo, investigamos a atividade antiinflamatória da saliva de flebotomíneos do Velho Mundo, *Plebotomus papatasi* e *Phlebotomus duboscqi*, em modelos de inflamação imune induzidos por antígenos. O pré-tratamento de animais imunizados com ambos os extratos de glândulas salivares (EGSs) inibiu a migração de leucócitos induzida por OVA através da liberação sequencial dos mediadores PGE₂ e IL-10 e também a resposta proliferativa de esplenócitos estimulada pelo antígeno. O comprometimento da resposta imune foi decorrente do efeito do EGS sobre células dendríticas (BM-DCs). A incubação *in vitro* das BM-DCs com o EGS de *P. papatasi* inibiu a proliferação de linfócitos TCD4⁺ provenientes de animais imunizados, a qual foi prevenida pela administração do inibidor inespecífico da COX (Indometacina) ou do anticorpo antagonista de IL-10. Esses efeitos foram associados com a redução da expressão de MHC-II e CD86 nas DCs. Avaliando o potencial terapêutico, o EGS de *P. papatasi* atenuou a gravidade da artrite experimental, apresentando redução da resposta inflamatória local e preservação do tecido articular. Ademais, os níveis de citocinas pró-inflamatórias presentes no foco inflamatório apresentaram-se reduzidos, ao passo que a produção de IL-10 esteve aumentada nos animais tratados. As células TCD4⁺ isoladas de animais artríticos cultivadas *in vitro* com as BM-DCs tratadas com a saliva apresentaram uma significativa redução da resposta proliferativa e da produção de IL-17 induzidas pelo antígeno. Utilizando-se centrifugações em membranas centricon (YM-3) e purificação em micro-HPLC, identificamos a adenosina e 5' AMP como as moléculas ativas presentes na saliva de *P. papatasi*. Confirmando a identificação dos nucleosídeos na saliva, o tratamento do filtrado com adenosina deaminase inibiu os efeitos imunossupressores da saliva sobre a ativação das BM-DCs. Ainda, a produção de PGE₂ induzida pela marutação de BM-DCs com LPS foi

potencializada por adenosina comercial. Seus efeitos sobre a produção de PGE₂ foram mimetizados pelo análogo sintético de ADO. Tanto a saliva quanto a adenosina suprimiram a capacidade das BM-DCs estimular a proliferação de linfócitos TCD4⁺ e produzir IL-17 frente o estímulo específico. Estes resultados foram prevenidos pelo tratamento das BM-DCs com o antagonista seletivo do receptor A2a de adenosina. Em conclusão, nossos dados demonstram que a adenosina e a 5' AMP presentes na saliva de *P. papatasi* inibem o processo de apresentação de antígenos, interferindo na ativação de linfócitos T e, conseqüentemente suprime a resposta inflamatória tecidual, sugerindo que estes constituintes poderão abrir novas perspectivas para o desenvolvimento de drogas para o tratamento de doenças inflamatórias autoimunes.

ESTUDO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DURANTE A INFECÇÃO POR *Paracoccidioides brasiliensis* - O PAPEL DE GALECTINA-3

Luciana Pereira Ruas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Roque Antunes Barreira

Tese de doutorado apresentada em 17/09/2009

Demonstramos anteriormente que, na ausência de galectina-3, camundongos C57BL/6 substituem a sua resistência intermediária à infecção por *P. brasiliensis* por susceptibilidade, decorrente do desvio da resposta imunológica para o padrão T helper (Th) 2. Considerando o importante papel exercido por células dendríticas no balanço Th1/Th2, investigamos, durante a infecção por *P. brasiliensis*, o comportamento biológico de células dendríticas derivadas de camundongos C57BL/6, nocauteados, ou não, para o gene da galectina-3. Células dendríticas maduras, obtidas do baço de camundongos infectados com *P. brasiliensis*, tiveram a expressão de receptores do tipo Toll e a produção de citocinas reguladas por galectina-3. Por outro lado, galectina-3 não interferiu no número ou na expressão de marcadores fenotípicos dessas células.

Células dendríticas derivadas de precursores da medula óssea de camundongos C57BL/6 selvagens expressaram galectina-3 precocemente, expressão essa que se manteve, ou mesmo aumentou, durante todo o processo de diferenciação celular, ocorrido in vitro. Galectina-3 exerceu efeito regulatório sobre a diferenciação celular, especialmente em presença de antígeno fúngico, condição sob a qual a diferenciação de BM-DCs de camundongos ga13^{+/+} foi até 70% menor do que a de ga13^{+/+}, a julgar pela expressão dos marcadores CD11c CD1b. Quanto à expressão de RNAm para os receptores que reconhecem padrões moleculares associados à patógenos (PRRs) por células 520 |a dendríticas imaturas, verificou-se que, sob estímulo de antígeno fúngico, a expressão de TLR2 e TLR4 é regulada por galectina-3. Já a expressão de dectina-1 foi quase completamente bloqueada em presença do antígeno fúngico (mas não de LPS), sendo que a galectina-3 não exerceu qualquer efeito sobre tal inibição. Algumas repercussões funcionais da expressão de galectina-3 por células dendríticas foram verificadas. A internalização de leveduras de (continua) (continuação) *P. brasiliensis* foi feita com eficiência cinco vezes superior por células dendríticas de camundongos ga13^{+/+} do que de ga13^{+/+}. A ativação in vitro de linfócitos T CD4⁺ naives por células dendríticas imaturas ga13^{+/+} pulsadas com antígeno fúngico foi, a julgar pelos níveis de IFN-^γ produzidos, pelo menos três vezes superior do que a verificada com células ga13^{+/+}. A eficiência foi máxima quando tanto as células dendríticas quanto as células T CD4⁺ ensaiadas foram obtidas de camundongos ga13^{+/+}. Os fenômenos funcionais acima descritos podem ser atribuídos a ligações estabelecidas por galectina-3. Foi constatada sua ligação a componentes de leveduras de *P. brasiliensis*, com destaque para os derivados da parede celular. Isso poderia favorecer a internalização das leveduras pelas células dendríticas, já que estas expressam galectina-3 em sua superfície. Verificou-se também a interação de galectina-3 com TLR2, seguida de ativação de NFκB que, 520 |a sabidamente, é requeri da para a cascata de sinalização que conduz à produção de citocinas. Os resultados aqui obtidos contribuem para uma melhor compreensão do papel exercido pela galectina-3 no balanço da resposta imunitária durante infecções.

Neurologia

ANÁLISE SENSÓRIO MOTORA DE CAMUNDONGOS APÓS LESÃO DA VIA NIGRO-ESTRIATAL POR 6-HIDROXIDOPAMINA

Marcio Lazzarini

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elaine AP. Del Bel B. Guimarães

Tese de Doutorado apresentada em 17/08/2009

A doença de Parkinson é caracterizada por deficiências motoras, sendo acompanhada por severa degeneração na via dopaminérgica nigro-estriatal. Relatos recentes demonstram que pacientes com doença de Parkinson também apresen-

tam diminuição na atividade sensório-motora, semelhante à reação de inibição ao pré-pulso. Lesão na via nigro-estriatal acompanhada com a manipulação farmacológica pode influenciar a sensibilidade sensório-motora ou revelar formas de desregulação. Não está claro se o prejuízo da atividade sensório motora observado em pacientes parkinsonianos pode ser atribuído à perda da dopamina na via nigro-estriatal. O objetivo geral do presente estudo foi investigar se a lesão dopaminérgica por micro-injeção da neurotoxina 6-hidroxi-dopamina no estriado induz deficiências sensório motoras que podem ser avaliadas por meio do teste de inibição ao pré-pulso sob a reação de sobressalto acústico em camundongos. Foram utilizadas duas formas de lesão, procurando determinar a especificidade e a magnitude do efeito sobre o teste de inibição ao pré-pulso e atividade motora. Nos animais controle e lesados foram analisadas a influência dos sistemas dopaminérgico e do óxido nítrico. As consequências celulares da lesão foram analisadas por meio da imunocitoquímica para tirosina hidroxilase (extensão da lesão), da sintase do óxido nítrico e para a colino-acetiltransferase (ChAT) utilizando-se anticorpos específicos. Os resultados revelaram que: a lesão unilateral e bilateral de terminais dopaminérgicos estriatais não induziu alteração no teste de inibição pré-pulso e na resposta de sobressalto. No entanto, a lesão do estriado unilateral, revelou modificações na resposta motora dos animais lesados. Os camundongos submetidos à injeção unilateral da 6-OHDA apresentaram diminuição da densidade óptica para a tirosina hidroxilase no estriado (anterior e posterior), no núcleo acumbens core e na substância negra compacta, quando comparado ao lado contralateral a injeção da neurotoxina e, também, em relação ao grupo falso operado (Sham). Adicionalmente, o lado contralateral a lesão revelou que para tirosina hidroxilase o grupo lesão apresentou maior densidade óptica em relação ao grupo Sham no estriado-anterior e na substância negra compacta. Para NOS e NADPHd o grupo lesão apresentou menor densidade óptica na substância negra compacta e maior densidade óptica no estriado anterior e posterior ipsilateral à lesão. Foi observado aumento da densidade de NOS na substância negra compacta contra-lateral à lesão. Para a ChAT o grupo lesão apresentou maior densidade óptica no estriado posterior ipsilateral à lesão. Em conclusão, os resultados mostram que camundongos lesados na via nigro-estriatal não apresentam modificações sensório motoras mas apresentam mudanças na resposta motora que envolve a participação de receptores D2 (unilateral ou bilateralmente), D3, NO e calmodulina (unilateral). Estas mudanças foram acompanhadas por modificações celulares do sistema dopaminérgico e nitrérgico.

INFLUÊNCIA DO ÓXIDO NÍTRICO NAS COMPLICAÇÕES MOTORAS INDUZIDAS PELA L-DOPA EM ANIMAIS COM PARKINSON EXPERIMENTAL

Fernando Eduardo Padovan Neto

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elaine A. Del Bel B. Guimarães

Dissertação de Mestrado apresentada em 25/08/08

O tratamento sintomático da doença de Parkinson com a L-3,4-dihidroxi-fenilalanina (L-DOPA) é geralmente acompanhado de complicações motoras, sendo as mais comuns as discinesias. Ratos com lesões dos neurônios dopaminérgicos induzido pela neurotoxina 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) exibem movimentos involuntários anormais semelhantes às discinesias quando tratados cronicamente com a L-DOPA. Apesar dos mecanismos que induzem as discinesias não estarem completamente esclarecidos, pode haver participação do sistema do óxido nítrico (NO). Nesse trabalho utilizamos o modelo de Parkinson experimental em ratos induzido pela microinjeção unilateral de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial para estudar as relações do sistema do NO com as complicações motoras induzidas pela L-DOPA. Na primeira parte do estudo avaliamos os efeitos da aplicação aguda e crônica de L-DOPA (100 mg/kg; gavagem) e avaliamos os efeitos do inibidor das isoformas neuronal e endotelial das sintases de NO (NOS), o L-NOARG (50 mg/kg; i.p.) nas discinesias induzidas pela L-DOPA e no teste de teste da caminhada. Mostramos que a administração de uma dose aguda de L-DOPA restaura a acinesia induzida pela microinjeção de 6-OHDA, mas produz movimentos discinéticos. O pré-tratamento com o L-NOARG apresentou efeito antidiscinético causando, no entanto, prejuízos motores no teste de caminhada. A aplicação crônica de L-DOPA aumentou rapidamente a intensidade das discinesias ao longo do tempo. A administração do L-NOARG após o tratamento crônico com L-DOPA apresentou efeito antidiscinético sem causar prejuízos motores. Em um segundo experimento, utilizamos doses mais baixas e escalonadas de L-DOPA (10-30 mg/kg; gavagem) para induzir as discinesias e avaliamos os efeitos antidiscinéticos e motores (teste do rotarod) do inibidor preferencial da nNOS, o 7-nitroindazol (1-30 mg/kg; i.p.). Mostramos que os movimentos discinéticos aumentam gradativamente ao longo do tempo de tratamento e que o 7-NI apresenta efeito antidiscinético de maneira dose-dependente sem causar prejuízos motores. Os resultados mostram que inibidores das sintases do óxido nítrico atenuam as discinesias induzidas pelo tratamento crônico com a L-DOPA no modelo de Parkinson experimental em ratos induzido pela 6-OHDA.

UM ESTUDO SOBRE FÁRMACO-RESISTÊNCIA E A POTENCIAL UTILIDADE DE UMA INTERVENÇÃO PARA REDUZIR OS EFEITOS ADVERSOS EM PACIENTES COM EPILEPSIA REFRATÁRIA

Veriano Alexandre Junior

Orientador: Prof. Dr. Américo Ceiki Sakamoto

Tese de Doutorado apresentada em 22/09/09

Pacientes com epilepsia refratária podem apresentar baixa qualidade de vida em consequência não apenas das crises, mas, também, dos efeitos adversos do tratamento e das comorbidades psiquiátricas, principalmente a depressão. O estudo avaliou a utilidade de um instrumento estruturado com o objetivo de reduzir os efeitos adversos do tratamento. Foram incluídos 102 pacientes adultos com epilepsia fármaco-resistente em um estudo prospectivo, observacional e randomizado. Os questionários *Adverse Events Profile* (AEP), *Beck Depression Inventory* (BDI) e *Quality Of Life In Epilepsy* (QOLIE-31) foram completados pelos pacientes nas duas visitas do estudo. Pacientes com escore AEP \geq 45 foram randomizados no grupo intervenção (21 pacientes) ou no grupo controle (22 pacientes). No grupo intervenção, os escores AEP foram disponibilizados para o médico atendente durante as visitas. A qualidade de vida se correlacionou inversamente aos efeitos adversos, depressão e frequência de crises. Não houve diferença significativa no escore AEP, entre as visitas, nos dois grupos randomizados. Em outras palavras, a intervenção não reduziu significativamente os efeitos adversos apresentados pelos pacientes em nosso estudo.

PADRÃO DE ACOMETIMENTO DOS DIFERENTES TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS NA MIOPATIA MITOCONDRIAL COM OFTALMOPARESIA EXTERNA PROGRESSIVA

Anelize Gimenez de Souza

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Claudia Sobreira

Dissertação de Mestrado apresentada em 28/09/09

As mitocôndrias são organelas intracelulares de crucial importância para os processos metabólicos celulares, especialmente a produção de ATP. Elas possuem DNA próprio, responsável pela codificação de algumas subunidades proteicas da cadeia respiratória. Alterações envolvendo o DNA nuclear ou o mitocondrial podem resultar no desenvolvimento das encefalomiopatias mitocondriais, que constituem um grupo heterogêneo de doenças do metabolismo celular. A oftalmoparesia externa progressiva (PEO) é uma manifestação comum das doenças mitocondriais, podendo estar relacionada a mutações primárias do DNAm, ou a deleções múltiplas do DNAm secundárias a mutações do DNAn. Neste trabalho verificamos o padrão de acometimento dos diferentes tipos de fibras musculares esqueléticas na miopatia mitocondrial com PEO (MM com PEO) avaliando: o trofismo das fibras musculares; a ocorrência de fibras com proliferação mitocondrial anormal e fibras com atividade da enzima citocromo c oxidase (COX) ausente e a distribuição das mesmas de acordo com o tipo de fibra muscular (tipos 1, 2A e 2B); e os valores relativos das atividades das enzimas succinato desidrogenase (SDH) e COX em fibras dos tipos 1, 2A e 2B, com o intuito de comparar o envolvimento desses diferentes tipos de fibra no contexto de uma doença mitocondrial. Foram constituídos dois grupos de 10 pacientes com MM com PEO e 10 pacientes controles. Para avaliar o trofismo, fibras musculares classificadas como tipo 1, 2A e 2B pela técnica histoenzimológica da ATPase foram analisadas morfometricamente com a mensuração do diâmetro mínimo. A quantificação da disfunção mitocondrial foi realizada através da análise das reações da SDH e da COX, com a quantificação da proporção de fibras com proliferação mitocondrial e de fibras COX negativas de acordo com o tipo de fibra. A análise quantitativa da atividade das enzimas SDH e COX foi realizada por meio da quantificação da densidade óptica das fibras nas respectivas reações histoenzimológicas. Todos os métodos de mensuração utilizados no presente trabalho mostraram elevado grau de confiabilidade e reprodutibilidade quando realizados por um mesmo examinador (confiabilidade intraobservador). A análise estatística demonstrou coeficientes de correlação de Spearman e intraclasses maiores que 0,70 para todas as análises e não demonstrou diferenças no trofismo muscular das fibras dos pacientes com MM com PEO em relação aos controles, porém observou-se uma tendência à atrofia das fibras do tipo 2B no grupo MM com PEO, quando analisamos a faixa de variação dos valores mínimos e máximos das médias utilizadas para as comparações. A quantificação do número de fibras com disfunção mitocondrial demonstrou que a resposta com redução da atividade da COX é mais frequente do que a de proliferação mitocondrial, mesmo quando consideramos as menores intensidades de proliferação mitocondrial, como é o caso das fibras com aumento discreto da atividade da SDH na porção subsarcolemal. A avaliação do padrão de acometimento, de acordo com o tipo de fibra muscular, determinou que a resposta de proliferação mitocondrial intensa (fibras vermelhas rasgadas-RRF) ocorre principalmente nas fibras do tipo 1. Entretanto, a proliferação mitocondrial anormal também ocorre nas fibras do tipo 2, já que do total de fibras com discreto aumento subsarcolemal da atividade, 40% eram do tipo 2A e 34% do tipo 2B. Perda da atividade da COX sem sinais de proliferação mitocondrial ocorreu predominantemente

te nas fibras do tipo 2. A análise dos valores relativos da densidade óptica das reações da SDH nas fibras do tipo 1, 2A e 2B nos grupos MM com PEO não demonstrou diferenças significativas das medianas das atividades enzimáticas em relação aos controles. Entretanto, observou-se alargamento da faixa de atividade no grupo de pacientes com MM com PEO, indicativas de aumento da atividade da SDH nos três tipos de fibras musculares. A análise dos valores relativos da densidade óptica da reação da COX mostrou redução significativa das medianas das atividades enzimáticas das fibras do tipo 2A. Embora nos demais tipos de fibras não tenha sido observada diferença significativa em relação aos controles, observou-se alargamento da faixa de atividade no grupo de pacientes com MM com PEO, indicativo de redução da atividade da COX nos demais tipos de fibras musculares. Os resultados do presente trabalho indicam que, embora aparentemente a resposta dos diferentes tipos de fibras à disfunção mitocondrial seja diversa, tanto as fibras do tipo 1 quanto as dos tipos 2A e 2B são capazes de responder à disfunção mitocondrial com a proliferação da organela. Da mesma forma, todos os três tipos de fibras respondem com redução da atividade da COX, embora ausência total da atividade na ausência de proliferação mitocondrial seja observada predominantemente nas fibras do tipo 2B.

Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço

MODELO MATEMÁTICO DA DINÂMICA DA PÁLPEBRA SUPERIOR DURANTE O PISCAR

Sheila Andrade de Paula

Orientador: Prof. Dr. Antonio Augusto Velasco e Cruz

Tese de Doutorado apresentada em 20/07/2009

Os movimentos palpebrais de piscar espontâneo, reflexo e voluntário em 21 olhos de 21 sujeitos normais foram medidos com uma técnica computadorizada de processamento de imagem que registrava a localização espacial, no meridiano vertical de um estímulo cromático de comprimento de onda na forma do azul. Para o estudo quantitativo dos parâmetros dos movimentos empregou-se o modelo matemático acelerado/oscilatório harmônico amortecido e foram testadas as três soluções possíveis de amortecimento, crítico, subcrítico e supercrítico.

Todos os movimentos espontâneos e reflexos foram extremamente bem ajustados pela solução criticamente amortecida com coeficientes de determinação variando de 0,94 a 1,00 (média 0,98) para os movimentos espontâneos e 0,96 a 1,00 (média 0,99) para os movimentos reflexos. Apenas 50% dos movimentos espontâneos e 58% dos reflexos foram ajustados pela solução de amortecimento subcrítica. Os movimentos voluntários de piscar não foram ajustados pelo modelo proposto. A solução de amortecimento supercrítico não ajustou nenhum movimento. Foi possível calcular com base no modelo proposto, a velocidade máxima da fase descendente do piscar, amplitude máxima atingida pela pálpebra e duração do movimento descendente. O piscar reflexo teve maior amplitude e maior velocidade que o piscar espontâneo. Foi encontrada uma boa correlação linear entre amplitude e velocidade tanto no piscar espontâneo ($r=0,85$) como no reflexo ($r=0,80$).

Pela primeira vez é citado na literatura um parâmetro teórico que representa a força contrátil do músculo orbicular do olho e reflete o momento em que esse músculo cessa sua atividade. Ele ocorreu quando a pálpebra já tinha percorrido em torno de 70% do tempo gasto para a pálpebra atingir sua amplitude máxima, tanto nos movimentos espontâneos como nos reflexos.

Os resultados indicam que os movimentos de piscar espontâneos e reflexos são muito bem ajustados pelo modelo acelerado/oscilatório harmônico amortecido.

Ortopedia, Traumatologia e Reabilitação

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE MÉTODOS DE MENSURAÇÃO DA CURVATURA ESCOLIÓTICA: RADIOGRÁFICO, FOTOGRAFÉTRICO E ESCOLIOMÉTRICO

Daniel Martins Coelho

Orientadora: Prof^a Dr^a Anamaria Siriani de Oliveira

Dissertação de Mestrado apresentada em 24/07/2009

Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar as confiabilidades intra e inter-examinadores, correlacionar os valores obtidos na avaliação escoliométrica e da avaliação fotogramétrica com os valores do ângulo de Cobb obtidos

radiograficamente e avaliar a sensibilidade, especificidade com diferentes valores de referência para o diagnóstico da escoliose idiopática usando o escoliómetro e a fotogrametria. **Materiais e Métodos:** Foram selecionados 32 pacientes com escoliose idiopática e 32 pacientes com curvas menores que 10° Cobb. Por meio de palpação foram localizados os processos espinhos de T1 a L5. Com flexão anterior de tronco foi realizada a avaliação escoliométrica dos 17 níveis de cada voluntário. Em 42 dos voluntários, esta avaliação foi realizada três vezes por dois examinadores para prover os dados do cálculo das confiabilidades. O ângulo de desvio lateral da coluna foi obtido pela análise da imagem fotográfica obtida com o paciente em posição ortostática. Um segundo registro fotográfico foi realizado após o paciente sair da posição do primeiro registro e ser reposicionado. Foram obtidas dos voluntários radiografias ântero-posteriores para a mensuração do ângulo de Cobb. Foi correlacionado o valor do ângulo de Cobb com o maior valor de rotação do tronco e com o desvio lateral da coluna. A análise de sensibilidade e especificidade foi realizada utilizando como valor de referência radiográfica 10° Cobb e valores entre 5° e 10° de rotação axial do tronco para a avaliação escoliométrica e valores de 7°, 8°, 9°, 10° e 15° de desvio lateral da coluna na avaliação fotogramétrica. **Resultados:** Foi encontrado excelente confiabilidade intra-examinador e valores muito bons de confiabilidade inter-examinadores (0,92 e 0,89) das medidas da escoliometria e excelente valor de confiabilidade intra-examinador (0,97) das medidas da fotogrametria. A correlação entre a análise escoliométrica e radiográfica foi considerada boa ($r=0,7$) assim como a correlação entre a fotogrametria e a radiografia ($r=0,75$). O maior valor de sensibilidade foi para 5° de rotação de dorso sendo de 87% da avaliação escoliométrica enquanto que para avaliação radiográfica foi de 7° de desvio lateral da coluna sendo a sensibilidade de 84%. **Conclusões:** A avaliação escoliométrica e a avaliação fotogramétrica mostraram boa correlação com a avaliação padrão-ouro, além de serem um método confiável intra e inter-avaliadores e sensíveis para detecção de curvaturas maiores que 10° Cobb considerando valor de referência de 5° na avaliação escoliométrica e 7° para a avaliação fotogramétrica.

ADAPTAÇÕES AUTÔNOMICAS CARDÍACAS NÃO LINEARES EM RELAÇÃO AO VOLUME DIÁRIO DE TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO

Janaina Espigares Sant'Ana

Orientador: Prof. Dr. Hugo Celso Dutra de Souza

Dissertação de Mestrado apresentada em 07/08/2009

Objetivo: O presente estudo investigou em ratos a influência de específicos volumes diários de exercício físico aeróbico sobre as adaptações autonômicas cardiovasculares avaliadas sob diferentes enfoques. **Material e Métodos:** Os animais foram divididos em quatro grupos: Grupo Sedentário e grupos treinados por meio da natação durante 15 (T15'), 30 (T30') e 60 (T60') min/dia durante 10 semanas. **Resultados:** Todos os grupos treinados apresentaram redução similar na frequência cardíaca (FC) intrínseca. Somente os grupos T30' e T60' apresentaram aumento do componente autonômico vagal na determinação da FC basal. A análise espectral da FC mostrou que os grupos, T30' e T60', tinham similares reduções nas oscilações de baixa-frequência (0.20-0.75Hz) e similares aumentos nas oscilações de alta-frequência (0.75-2.5Hz), entretanto somente em unidades normalizadas. Os grupos T30' e T60' tiveram aumentos na sensibilidade barorreflexa somente para as respostas taquicárdicas, e quando comparados, o grupo T30' apresentou o maior ganho. Somente o grupo T30' apresentou aumento na expressão do RNA mensageiro (RNAm) dos receptores cardíacos beta₁-adrenérgicos em relação ao grupo Sedentário. Por sua vez, todos os grupos treinados apresentaram aumento na expressão do RNAm dos receptores beta₂-adrenérgicos em relação ao grupo Sedentário, entretanto, quando comparados, o grupo T30' apresentou a maior expressão. **Conclusão:** Somente os maiores volumes de treinamento físico promoveram adaptações autonômicas cardíacas sob todos os parâmetros avaliados, entretanto essas adaptações não foram lineares. Por fim, as razões pelas quais o grupo Treinado 30' apresentou as maiores respostas adaptativas autonômicas não são conhecidas. Nesse sentido, serão necessários estudos adicionais para identificar os mecanismos responsáveis por esses achados.

AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA DA REPARAÇÃO DO TENDÃO CALCÂNEO APÓS SECÇÃO PERCUTÂNEA PARA A CORREÇÃO DO EQUINO RESIDUAL DO PÉ TORTO CONGÊNITO IDIOPÁTICO

Daniel Augusto Carvalho Maranhão

Orientador: Prof. Dr. José Batista Volpon

Dissertação de Mestrado apresentada em 14/08/2009

A maioria dos casos de pé torto congênito tratados pelo método de Ponseti requer a secção do tendão calcâneo para correção do equino residual. Evidências clínicas sugerem que há completa cicatrização entre os cotos tendíneos, mas este processo reparativo ainda não foi suficientemente estudado. Esta investigação teve como objetivo avaliar o processo

de reparação que ocorre após a secção percutânea do tendão calcâneo para a correção do equino residual no pé torto congênito idiopático tratado pelo método de Ponseti. Por meio de estudo prospectivo, foram analisadas 37 tenotomias em 26 pacientes com pé torto congênito idiopático tratados pelo método de Ponseti, com seguimento mínimo de um ano após a secção. A tenotomia foi realizada percutaneamente com agulha biselada de grosso calibre, sob sedação e anestesia local. O exame ultrassonográfico foi feito logo após a secção tendínea para assegurar que ela tenha sido completa e mensurar o afastamento entre os cotos. A reparação foi estudada por meio da ultrassonografia realizada três semanas, seis meses e um ano após a tenotomia. A ultrassonografia, realizada imediatamente após o procedimento, mostrou que, em alguns casos, feixes tendíneos residuais persistiam entre os cotos, mas foram completamente seccionados, em seguida, sob controle ultrassonográfico. Houve afastamento médio de $5,65 \text{ mm} \pm 2,26$ (2,3 a 11,0 mm) entre os cotos tendíneos logo após a secção. Em um caso ocorreu sangramento maior que o habitual, que foi controlado com pressão local e não provocou interferência no tratamento. Após três semanas, a ultrassonografia mostrou regeneração tendínea com preenchimento do espaçamento entre os cotos por tecido hipocóico com ecotextura irregular e com restituição da continuidade entre os cotos demonstrada dinamicamente pela transmissão de movimentos do músculo tríceps sural para o calcânar. Seis meses após a tenotomia, o exame ultrassonográfico evidenciou que o tecido de reparação apresentava ecotextura de aspecto fibrilar e, quando comparado ao tendão normal, havia leve ou moderada hipocogenicidade e espessamento cicatricial. Um ano após a tenotomia, o exame ultrassonográfico mostrou estrutura fibrilar na região de reparação, com ecogenicidade semelhante ao tendão normal, mas ainda apresentando espessamento tendíneo cicatricial. Em termos gerais, ocorreu rápida cicatrização após a secção percutânea do tendão calcâneo, que restabeleceu a continuidade entre os cotos. Ao final do período de observação, o tecido de reparação tendínea apresentou aspecto ultrassonográfico semelhante ao lado normal, exceto por leve espessamento, o que sugere um mecanismo de reparação predominantemente intrínseco.

TERAPIA A LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA REGENERAÇÃO DE NERVO ISQUIÁTICO DE RATOS APÓS ESMAGAMENTO

Alexandre Marcio Marcolino

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Marisa de Cássia Registro Fonseca
Dissertação de Mestrado apresentada em 11/09/2009

As lesões nervosas periféricas ocasionam grandes disfunções nos segmentos acometidos, resultando em déficits sensitivos e motores do trajeto inervado. Este estudo teve por objetivo avaliar o efeito do laser de baixa intensidade na melhora funcional da marcha de ratos após esmagamento do nervo isquiático. Foram utilizados 36 ratos divididos aleatoriamente em quatro grupos: Grupo 1 sham, grupo 2 irradiado com fluência de 10 J/cm^2 , o grupo 3 com fluência de 40 J/cm^2 e grupo 4 fluência de 80 J/cm^2 , por 21 dias consecutivos, utilizando o laser 830 nm (AsGaAl). A lesão por esmagamento do nervo isquiático foi obtida pela aplicação de uma carga de 5000g por dez minutos, com o dispositivo portátil de peso morto. Os quatro grupos foram avaliados pelo “Índice Funcional do Ciático” (IFC). Para análise do IFC as pegadas foram coletadas no pré-operatório, 7°, 14° e 21° dias pós-operatório, sendo que, os resultados obtidos foram avaliados pelo modelo linear de efeitos mistos. Os resultados do IFC foram significantes quando comparados o grupo sham com os grupos 3 (40 J/cm^2) e o grupo 4 (80 J/cm^2) no 14° dia, $p < 0,01$. No 7° e 21° dia pós-operatório não houve diferença entre os grupos, exceto quando comparado o grupo irradiado com 40 J/cm^2 e o grupo sham. Na avaliação intra-grupos houve diferença estatística entre todas as semanas avaliadas ($p < 0,01$). Os animais irradiados apresentaram melhora no padrão da marcha, demonstrada pelos valores do IFC nos períodos iniciais, porém, ao final das três semanas, houve uma recuperação similar entre os grupos. A laserterapia de baixa intensidade mostrou ser eficaz no estímulo da aceleração do processo de regeneração nervosa após esmagamento do nervo isquiático de ratos. Quando comparadas às fluências utilizadas, os grupos irradiados com 40 J/cm^2 e 80 J/cm^2 mostraram ser mais eficazes na recuperação funcional da marcha dos ratos, do que o grupo irradiado com 10 J/cm^2 .

EFEITO COMPARATIVO DO COMPRIMENTO DE ONDA (660 E 830 NM) DA TERAPIA A LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA REABILITAÇÃO DO NERVO ISQUIÁTICO EM RATOS

Rafael Inácio Barbosa

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Marisa de Cássia Registro Fonseca
Dissertação de Mestrado apresentada em 11/09/2009

Os nervos periféricos são estruturas que ao sofrerem lesões podem originar incapacidades motoras e sensitivas importantes. Diversos estudos têm utilizado recursos terapêuticos com o objetivo de promover a regeneração nervosa

precoce, dentre eles está o laser de baixa intensidade. A utilização do laser de baixa intensidade não apresenta um consenso quanto à metodologia proporcionando conclusões controversas. O objetivo desse estudo foi investigar através da avaliação funcional o efeito comparativo do comprimento de onda da terapia a laser de baixa intensidade (660 e 830 nm) na regeneração do nervo isquiático após esmagamento. Foram utilizados 27 ratos (Wistar) submetidos à lesão do nervo isquiático divididos em 3 grupos: grupo 1 (sham), grupo 2 foi submetido ao laser (AsGaAl, 660 nm, 10J/cm², 30mW e 0,07cm²) e o grupo 3 foi submetido ao laser (AsGaAl, 830 nm, 10J/cm², 30mW e 0,07cm²) por 21 dias no local da lesão. Para a avaliação funcional foi utilizado Índice Funcional do Cíatico (IFC) no pré-operatório, 7°, 14° e 21° dias pós-operatório. A comparação entre o IFC apresentou diferença quando comparado o grupo 2 em relação aos outros. Na mostra analisada podemos verificar que a utilização do laser 660 nm foi eficaz na recuperação funcional dos grupos estudados e o laser 830 nm apresentou similaridade com o sham.

PATOLOGIA EXPERIMENTAL

A ASSOCIAÇÃO ENTRE A DISCRETA ATIVAÇÃO DO NF-KB COM A APOPTOSE DE CÉLULAS ENTRELADAS HEPÁTICAS NA FIBROSE ESQUISTOSSOMÓTICA HUMANA

Mariana Mendes Braz

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Leandra Náira Zambelli Ramalho

Dissertação de Mestrado apresentada em 31/07/2009

Este estudo objetivou comparar a ativação do fator nuclear Kappa-B (NF-κB) na fibrose esquistossomótica e na cirrose induzida pelo vírus da hepatite C, além da relação desta ativação com a população de células estreladas hepáticas (CEH). CEH foram avaliadas pela imuno-histoquímica para α-actina de músculo liso (α-SMA) em biópsias hepáticas de pacientes com fibrose esquistossomótica (n= 40), cirrose induzida pelo vírus da hepatite C (n = 20), e de controles normais (n = 20). A marcação de CEH para NF-κB foi avaliada através da imuno-histoquímica, para NF-κB p65, e pela técnica Southwestern-histoquímica, para o complexo NF-κB ativado. A apoptose de CEH foi determinada pelo método de TUNEL. O número de CEH positivas para α-SMA e NF-κB, ativado foi maior na cirrose que na fibrose esquistossomótica e no fígado normal. Por outro lado, foi detectado um aumento da apoptose de CEH e de expressão do NF-κB p65 na fibrose esquistossomótica em relação aos fígados cirróticos e normais. Estes resultados mostraram uma possível associação entre a pouca ativação do complexo NF-κB com o aumento da apoptose de CEH na fibrose esquistossomótica, ocorrendo a redução do número de CEH quando em comparação com a cirrose. Este evento pode ser relacionado à discreta resposta inflamatória induzida pelos ovos do parasita, em contraste com o evidente processo necro-inflamatório observado na cirrose hepática. Além disso, a associação da ativação de NF-κB com o aumento de CEH pode constituir um alvo terapêutico para reprimir a fibrogênese hepática, embora mais estudos sejam necessários para garantir a maior compreensão deste fenômeno.

EFEITOS DA VARIAÇÃO DE FREQUÊNCIA E INTENSIDADE DE EXERCÍCIO FÍSICO EM BIOMARCADORES DE CARCINOGENESE COLÔNICA EXPERIMENTAL, NA EXPRESSÃO DE CICLOOXIGENASE-2 E EM PARÂMETROS SÉRICOS DE ESTRESSE OXIDATIVO

Tassiana Marini

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia

Dissertação de Mestrado apresentada em 31/07/2009

O risco de desenvolver câncer de cólon é reduzido por apropriados níveis de exercício físico. No entanto, os efeitos da variação de frequência e intensidade do exercício são poucos conhecidos. Nosso objetivo foi de analisar os efeitos de diferentes frequências e intensidades de exercício na carcinogênese do cólon em ratos tratados com 1-2 dimetil-hidrazina (DMH). Ratos Wistar machos foram divididos 5 grupos com 18 animais em cada grupo: Grupo sedentário (S), exercício episódico leve (EL), exercício episódico intenso (EI), exercício treino leve (TL), exercício treino intenso (TI). Cada um desses grupos foi subdividido em grupo com injeção de 1-2-dimetilhidrazina (D) e grupo sem tratamento (controle). O

exercício foi realizado por natação 60 minutos e 20 minutos um dia na semana (exercício episódico) e 5 dias na semana (exercício treino), durante 8 semanas. Após o sacrifício, o soro foi coletado para análise do estresse oxidativo (malondialdeído-MDA, glutatona reduzida-GSH, vitamina E). O cólon distal foi processado para avaliar a formação de focos de criptas aberrantes (FCA), a imunistoquímica para avaliação da proliferação celular (através do PCNA) e a expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2). Quando comparado ao grupo SD, o número de FCA foi diminuído no grupo TLD; e os grupos de exercício TLD, ELD e EID apresentaram uma atenuação do aumento da proliferação celular induzida pelo DMH e apenas o grupo TLD apresentou atenuação da expressão de COX-2. Os níveis séricos de GSH foram reduzidos em todos os grupos que praticaram exercício físico sem o tratamento com DMH, exceto o grupo TI. Os níveis de MDA foram diminuídos no TL, e os níveis de vitamina E apresentaram redução no EID quando comparado com o TID. Nós concluímos que (1) o exercício treino leve foi altamente efetivo na redução nos biomarcadores da carcinogênese de cólon e isso pode ser devido a atenuação da expressão de ciclooxigenase-2 no cólon e não ao estresse oxidativo sistêmico; (2) o exercício episódico pode exercer um efeito anti-carcinogênico.

Saúde da Criança e do Adolescente

A PERIODONTITE MATERNA COMO FATOR DE RISCO PARA NASCIMENTO PRÉ-TERMO

Margarete Aparecida Meneses de Almeida

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Heloísa Bettiol

Tese de Doutorado apresentada em 28/08/2009

Introdução: O nascimento de recém-nascidos pré-termo é considerado um grave problema de saúde pública, apresentando etiologia multifatorial. A inflamação causada por infecção materna de várias origens é apontada como um fator associado a esse desfecho. O papel da periodontite como fator de risco independente para parto pré-termo ainda é controverso, em parte devido às diversas formas de classificação da doença. **Objetivo:** avaliar a associação de periodontite materna com o nascimento de crianças pré-termo (PT), levando-se em conta formas diversas de classificação da doença, no município de Aracaju, SE. **Métodos:** estudo do tipo caso-controle aninhado dentro de um estudo de uma coorte de nascimentos ocorridos entre março e julho de 2005, que incluiu 4510 nascidos vivos de parto único hospitalar de mães procedentes da região metropolitana de Aracaju, SE, Brasil. Foi aplicado um questionário estruturado às puérperas, com informações sobre condições demográficas, sócio-econômicas, comportamentais, história sexual/reprodutiva, atenção médica na gestação/parto. A amostra do estudo de caso-controle aninhado compreendeu 350 puérperas, das quais 202 tiveram partos a termo (≥ 37 semanas de gestação) e 148 partos pré-termo (< 37 semanas). A periodontite materna foi definida utilizando-se dois critérios, um exclusivamente com perda de inserção clínica (PCI), e outro combinando PCI com a presença de bolsa periodontal (BP). A classificação exclusivamente com PCI incluiu definições combinando as extensões de 10%, 20% e 30% com limites de perda de inserção variando de 3 a 6 mm. A classificação que incluiu BP foi definida por presença de bolsa periodontal de pelo menos 4mm e perda de inserção variável de 3 a 5 mm e número de dentes envolvidos de 3 a 5. O modelo final de regressão logística múltipla, tendo o nascimento PT como variável resposta, foi construído com as variáveis logística bivariada ($\alpha = 0,05$) e também variáveis reconhecidas como fatores de confusão. Foram testadas interações plausíveis entre periodontite e idade da mãe e número de gestações na ocorrência de parto PT. **Resultados:** A análise multivariada evidenciou que não foi possível observar associação estatisticamente significativa entre periodontite e prematuridade quando a definição de periodontite incluiu a presença de bolsas periodontais. Quando a definição utilizou exclusivamente PIC a periodontite se mostrou estatisticamente associada à prematuridade somente entre mulheres na primeira gestação completa. Entre estes indivíduos houve tendência de menor ocorrência de periodontite entre casos do que controles (embora não estatisticamente significativa) para a definição que incluía 10% dos sítios ≥ 4 mm de PIC (Odds Ratio, OR:0,83; Intervalo de Confiança 95%, IC 95%: 0,37 - 1,82). No entanto, a partir desta gravidade a periodontite passou a ter maior ocorrência entre casos, sendo estatisticamente significativa a partir da definição de 20% de sítios com ≥ 5 mm (OR 7,20; 95% IC 2,02 - 30,91). **Conclusão:** Observou-se tendência de associação entre a periodontite materna e o nascimento de crianças pré-termo, principalmente quando a doença periodontal apresentou maior gravidade e extensão, e na primeira gestação. Observou-se associação entre a periodontite materna e o nascimento de crianças pré-termo, apenas entre mulheres na primeira gestação com mais de 20% dos sítios com perda de inserção ≥ 5 mm.

TABAGISMO MATERNO DURANTE A GESTAÇÃO E CEFALÉIA CRÔNICA NA IDADE ESCOLAR

Carlos Eduardo Fabbri

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Barbieri

Tese de Doutorado apresentada em 09/09/2009

Introdução: Diversos fatores como alimentos, álcool, tabagismo, obesidade e fatores sociais podem interagir com a predisposição genética de alguns indivíduos resultando em cefaléia. Alguns desses fatores são conhecidos na infância, porém nada se sabe sobre a associação da cefaléia crônica que se inicia na idade escolar com o tabagismo materno. **Objetivo:** Estudar a associação da cefaléia crônica observada na idade escolar com o tabagismo materno durante a gravidez e outros fatores de risco, em duas coortes de escolares. **Casuística e Métodos:** Estudo prospectivo de coorte de recém nascidos de parto único de Ribeirão Preto em 1994 e em São Luís 1997/98. Em 2004 filhos e mães foram re-entrevistados. Definiu-se os critérios para classificação da cefaléia crônica (variável resposta), o tabagismo materno (variável independente) e outras variáveis de confundimento. Calculou-se as suas respectivas prevalências. Por análise de regressão de Poisson definiu-se os fatores de risco a ela associados. **Resultados:** A prevalência da cefaléia crônica entre os escolares de ambos os sexos foi 28,4 % e 13,2% em Ribeirão Preto e São Luís. O principal fator de risco foi o tabagismo materno durante a gestação RR=1,47 (1,08-2,0) e 2,38 (1,10-5,15), respectivamente. Os demais fatores foram: sexo feminino RR=1,39 (1,08-1,79), apertar os dentes RR=1,43 (1,10-1,9), pressão arterial alterada RR=1,39 (1,04-1,85), escore de dificuldade geral alterado (SDQ) : Limítrofe IRR=1,44 (1,0-2,10), Anormal: RR=1,78 (1,32- 2,39) para Ribeirão Preto, e o mesmo escore para São Luís: Limítrofe RR=1,84 (0,97-3,48), Anormal: RR=2,29 (1,36-3,85), e Escolaridade Materna 8-11 anos: RR=1,57(1,04-2,37), ≥ 12 anos: RR=2,901 (1,23-6,870). **Conclusões:** O tabagismo materno durante a gestação foi fator de risco para cefaléia crônica na idade escolar. Também foram fatores de risco em Ribeirão Preto o sexo feminino, o apertar os dentes, e a alteração do escore SDQ, sendo este também um fator de risco em São Luís juntamente com a escolaridade materna 8-11 anos e ≥ anos ao nascimento.

Saúde Mental

REATIVIDADE À DOR, TEMPERAMENTO E COMPORTAMENTO NA TRAJETÓRIA DE DESENVOLVIMENTO DE NEONATOS PRÉ-TERMO ATÉ A FASE PRÉ-ESCOLAR

Vivian Caroline Klein

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Beatriz Martins Linhares

Tese de Doutorado apresentada em 15/09/2009

O nascimento prematuro é um fator de risco para problemas de auto-regulação e comportamento em crianças. O temperamento se relaciona a processos de auto-regulação e desempenha papel relevante na trajetória de desenvolvimento. A presente Tese reúne três estudos sobre uma amostra total de 38 neonatos pré-termo que foram acompanhados longitudinalmente. O **Estudo 1** teve por objetivo verificar se a reatividade e recuperação à dor e estresse no período neonatal seriam preditoras do temperamento em 38 crianças nascidas pré-termo, nas fases dos três primeiros anos e pré-escolar. A coleta de dados da reatividade e recuperação foi realizada em uma sessão de observação sistemática durante procedimento doloroso de rotina. A atividade facial dos neonatos foi analisada de acordo com o *Neonatal Facial Coding System*. Registrou-se a frequência cardíaca e os estados de vigília e sono, de acordo com a Behavioral State Scale. As mães foram entrevistadas para avaliar o temperamento da criança por meio do *Early Childhood Behavior Questionnaire* (ECBQ), nos três primeiros anos, e do *Children's Behavior Questionnaire* (CBQ), na fase pré-escolar. Foram realizadas análises de regressão para verificar se os indicadores de reatividade e recuperação, assim como a idade gestacional, o risco clínico neonatal e a quantidade de exposição à dor, seriam preditores do temperamento. Verificou-se que maior reatividade à dor na fase neonatal foi preditora de dimensões do temperamento com mais afeto negativo e impulsividade e menos sociabilidade na fase dos três primeiros anos. O **Estudo 2** teve por objetivo verificar o efeito de variáveis neonatais e do temperamento, avaliado na fase dos três primeiros anos, na predição do temperamento e dos problemas de comportamento posteriormente na fase pré-escolar, em 21 crianças nascidas pré-termo. O temperamento foi avaliado por meio do ECBQ e do CBQ e os problemas de comportamento por meio do *Child Behavior Checklist* (CBCL). As análises de regressão indicaram que menor peso ao nascimento foi preditor de temperamento com mais afeto negativo e de problemas de

comportamento na fase pré-escolar. Houve continuidade homotípica do fator afeto negativo e da dimensão controle inibitório entre as duas fases avaliadas. O **Estudo 3** teve por objetivo avaliar 32 crianças nascidas pré-termo quanto ao temperamento e aos problemas de comportamento, na fase dos três primeiros anos, em comparação com crianças nascidas a termo. O temperamento e os problemas de comportamento foram avaliados por meio do ECBQ e do CBCL. Foram realizadas comparações entre grupos por meio do teste *t de Student*. Em relação ao temperamento, quando comparadas às crianças a termo, as crianças nascidas pré-termo apresentaram temperamento com mais sensibilidade perceptual, prazer com estímulos de alta intensidade e ativação motora e menos aconchego ao cuidador. Em relação ao comportamento, estas apresentaram mais problemas de atenção em relação às crianças a termo. Os achados principais dos três estudos em conjunto demonstram que as variáveis neonatais têm influência tanto no temperamento quanto no comportamento de crianças nascidas pré-termo. A reatividade biocomportamental à dor avaliada nos neonatos pré-termo consiste em um precursor de processos de auto-regulação desenvolvimentais expressos no temperamento, o qual foi preditor de problemas de atenção na fase pré-escolar.

AGENTES COMUNITÁRIOS DE SAÚDE: EXPECTATIVAS E CRENÇAS ACERCA DO USO DE ÁLCOOL

Emmanuelle Silva Tavares Sobreira

Orientador: Prof. Dr. Erikson Felipe Furtado

Dissertação de Mestrado apresentada em 16/09/2009

O uso de álcool é um grave problema de saúde pública, sendo necessária à implantação de estratégias na atenção básica de saúde que atuem na prevenção das consequências geradas por este problema. Este trabalho se propôs verificar se as expectativas e as crenças em relação ao uso de álcool entre agentes comunitários de saúde estão associadas à prontidão para aplicação das Estratégias de Diagnóstico e Intervenções Breves (EDIB). Para tal foi realizado um estudo do tipo observacional, transversal sobre uma amostra de 149 agentes comunitários de saúde, provenientes das equipes de atenção básica da região de Ribeirão Preto, que participaram de treinamentos em EDIB do Programa de Ações Integradas para Prevenção e Atenção ao Uso de Álcool e Drogas na Comunidade (PAI-PAD) no período de 2003 a 2006. Os dados foram coletados a partir de um Caderno de Questões aplicados antes dos treinamentos em EDIB. Desse caderno foram utilizados: *IECPA* para avaliar as expectativas e crenças pessoais a cerca do álcool; *Questionário para profissionais da atenção primária sobre práticas relacionadas ao uso de álcool e drogas*, desenvolvido pela OMS, para investigar crenças, práticas e conceitos sobre a auto-eficácia na prevenção do uso de risco de álcool. Este instrumento é composto por três partes e para o presente trabalho foram selecionadas algumas questões da terceira parte. Para avaliar a prontidão dos agentes comunitários de saúde para aplicar as EDIB foi utilizado o *Questionário de prontidão para mudança (RTC)*. Também foi utilizado um *Questionário sócio-demográfico* para informações sócio-demográficas e características da equipe. A partir das análises foram obtidos os seguintes resultados: Os ACS apresentaram uma média no escore total do IECPA de 88,7 (DP = 40,9). Os 12,8% dos ACS que foram identificados com alta expectativa e conseqüente risco de ser ou vir a ser dependente de álcool obtiveram uma média no escore do IECPA de 177,1 (DP = 42,8). Ao responderem o *Questionário para profissionais da atenção primária sobre práticas relacionadas ao uso de álcool e drogas*, a maioria dos ACS apresentou crenças e atitudes positivas no que diz respeito à detecção e a intervenção no uso abusivo de álcool. Cerca de 74% dos ACS estavam em pré-contemplação no que se refere a prontidão para aplicação das EDIB. Foi encontrada correlação entre o IECPA e o RTC (*Correlação de Spearman*, $r = -0,178$; $p = 0,03$) sugerindo que as expectativas positivas com relação ao álcool podem influenciar a prontidão para aplicação das EDIB, ou seja, à predisposição para realizar prevenção e promoção de saúde. Além disso, foi verificado que há uma tendência das expectativas diminuírem com o aumento da idade (*Correlação de Spearman*, $r = -0,166$; $p = 0,04$), sendo encontrado escore no IECPA maior para os ACS com ≤ 30 anos (*Nonparametric Chi-Square*, $value = 7,8$; $p = 0,02$). Deste modo, podemos concluir que, para que ocorra mudança no comportamento do indivíduo no que diz respeito à saúde, é preciso que, tais mudanças estejam associadas a fatores como crenças, expectativas e valores que cada sujeito apresenta sobre os possíveis problemas de saúde que possam ocorrer. Sugere que ocorre uma redução da prontidão para atitudes preventivas à medida que as expectativas positivas acerca do álcool estão aumentadas, assim como quanto mais novo for o ACS maiores serão essas expectativas e menor será sua disposição para aplicação das EDIB. Também se pode inferir que é necessário cuidar da saúde destes profissionais para que os mesmos possam atuar de forma eficaz na promoção de saúde e prevenção de doenças.

SAÚDE NA COMUNIDADE

O PROCESSO DE INTERAÇÃO SOCIAL NA INCLUSÃO ESCOLAR DE CRIANÇAS COM SÍNDROME DE DOWN EM EDUCAÇÃO INFANTIL

Patrícia Páfaro Gomes Anhão

Orientador: Prof. Dr. Jair Lício Ferreira Santos

Dissertação de Mestrado apresentada em 06/08/2009

A atualidade do tema inclusão escolar na rede pública de ensino traz à tona uma série de discussões pertinentes e constituintes deste novo paradigma social, principalmente para as crianças com Síndrome de Down, as quais têm seu processo de desenvolvimento cada vez mais estudado. Pesquisas têm demonstrado as consequências do processo de inclusão junto a esta população. O objetivo geral desta Dissertação é verificar e analisar quali-quantitativamente como se dá o processo de interação social de crianças com Síndrome de Down e crianças com desenvolvimento típico, na rede regular de educação infantil do município de Ribeirão Preto. Os participantes foram crianças com Síndrome de Down, na faixa etária de três a seis anos, que já frequentaram o setor de estimulação precoce da Apae de Ribeirão Preto, e crianças com desenvolvimento típico que frequentavam as mesmas salas dos pares com Síndrome de Down, também na faixa etária de três a seis anos. As filmagens foram analisadas quali-quantitativamente, por meio de categorias que identificaram o processo de interação social desta criança junto aos seus pares, em ambiente escolar. Os resultados apontam que, de maneira geral, não foram observadas diferenças significativamente relevantes entre os comportamentos apresentados pelo grupo de estudo, composto por crianças com Síndrome de Down, e pelo grupo comparado, composto por crianças com desenvolvimento típico. Os comportamentos que apresentaram diferença significativa foram: “Estabelece contato inicial com outras pessoas” ($p=0,017$) e “Imita outras crianças” ($p=0,030$). O grupo de estudo apresentou maior frequência do comportamento “Imita outras crianças” quando comparado ao grupo de crianças com desenvolvimento típico. Já o grupo comparado apresentou maior frequência do comportamento “Estabelece contato inicial com outras pessoas” quando comparado ao grupo de crianças com Síndrome de Down, demonstrando um déficit das habilidades sócias assertivas e mostrando que as habilidades sociais passivas estão mais presentes neste grupo de crianças. O estudo concluiu que nos comportamentos observados e de acordo com a faixa etária estudada, o grupo de crianças com Síndrome de Down abordado, não apresentou características de interação social muito diferentes das crianças com desenvolvimento típico estudadas. Reforçando a importância do processo de inclusão escolar desta população.

CONSUMO DE ADOÇANTES E PRODUTOS DIETÉTICOS POR INDIVÍDUOS COM *Diabetes mellitus* TIPO 2, ATENDIDOS PELO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE EM RIBEIRÃO PRETO – SP

Paula Barbosa de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Laércio Joel Franco

Dissertação de Mestrado apresentada em 07/08/2009

Devido às suas complicações crônicas, o diabetes mellitus (DM) apresenta impacto considerável como problema de saúde pública pela morbidade, mortalidade e custos no seu tratamento. Para obter um bom controle metabólico, a educação alimentar é um dos pontos fundamentais no seu tratamento. O uso de adoçantes e alimentos dietéticos é importante para as pessoas com DM, apesar de serem dispensáveis na alimentação. Este setor cresceu nos últimos anos e atualmente 35% dos lares brasileiros consomem algum tipo de produto *light* ou *diet*. Diante das dificuldades e do pouco conhecimento dos indivíduos com DM sobre o uso destes produtos, verificou-se a necessidade de coletar informações sobre o assunto para subsidiar programas educativos. Este estudo tem como objetivo analisar o consumo de adoçantes e produtos dietéticos por indivíduos com diabetes tipo 2 (DM2), atendidos pelo Sistema Único de Saúde em Ribeirão Preto-SP. Os dados foram obtidos por meio de um questionário envolvendo variáveis sócio-demográficas, clínicas, relacionadas à hábitos alimentares e ao uso de produtos dietéticos e adoçantes, aplicado em uma amostra de 120 pacientes, sendo 60 do sexo feminino e 60 do sexo masculino, estratificados em adultos e idosos. Metade da amostra foi entrevistada no Centro de Saúde Escola da FMRP-USP (nível secundário de atendimento) e a outra metade nos Núcleos de Saúde da Família (nível primário de atendimento), vinculados à FMRP-USP, após concordância em participar do estudo e assinatura do termo de consentimento. As análises foram realizadas com ajuda do *software* Epi-Info e consistem na descrição das variáveis de

interesse, com realização de comparação, entre sexos, faixa etária e nível de atendimento (primário e secundário). Aplicou-se o teste exato de Fisher e fixou-se o valor de p em 0,05. A média de idade dos entrevistados foi de 63,1 (\pm 10,5) anos e a duração do diagnóstico médio de DM de 9,8 (\pm 8,6) anos. Os resultados encontrados mostram que a maioria apresentou sobrepeso ou obesidade. O uso de adoçante é frequente na população em estudo, com predomínio do tipo líquido, e o uso de produtos dietéticos é menor, porém significativo, com predomínio dos refrigerantes. O diagnóstico do DM foi determinante para o uso de ambos e o critério de seleção mais utilizado para os usuários de adoçante foi o sabor. É pequena a porcentagem da população estudada que sabe a diferença entre produto *diet* e *light*, que tem o hábito de ler o rótulo dos alimentos e que se preocupa com a quantidade utilizada de adoçante. Conclui-se que é uma necessidade a inclusão de informações sobre o uso adequado de adoçantes e produtos dietéticos nas atividades assistenciais aos pacientes com diabetes nos diversos níveis do Sistema Único de Saúde, levando em consideração as características educacionais da população assistida.

A DEFICIÊNCIA AUDITIVA NAS CIDADES ABRANGIDAS PELA DRS-6: CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ATENDIDA NA DIVISÃO DE SAÚDE AUDITIVA DO HRAC- USP DE BAURU

Cláudia Daniele Pelanda Zampronio

Orientador: Prof. Dr. Amaury Lelis Dal Fabbro

Dissertação de Mestrado apresentada em 21/08/2009

A deficiência auditiva presente ao nascimento ou estabelecida na mais tenra idade interfere significativamente no processo de desenvolvimento da criança. Quando ocorre em uma pessoa adulta pode levar a um quadro de isolamento, podendo torná-la dissociada da sua comunidade, limitando sua capacidade de atuar com independência e autonomia perante a sociedade. Assim, qualquer distúrbio no processo de audição normal, seja qual for sua causa, tipo ou severidade, constitui uma alteração auditiva que pode e deve ser evitada, em benefício da saúde do indivíduo e da sociedade como um todo.

Objetivo: Caracterização da deficiência auditiva nos pacientes atendidos na Divisão de Saúde Auditiva (DSA), do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais (HRAC), Universidade de São Paulo (USP), residentes nas 68 cidades do estado de São Paulo abrangidas pelo Departamento Regional de Saúde (DRS)-6, segundo algumas variáveis como: faixa etária, gênero, nível socioeconômico, escolaridade, etiologia, grau e tipo da deficiência auditiva.

Métodos: Levantamento dos pacientes que iniciaram tratamento na DSA do HRAC/USP, no período 1998 a 2007, residentes nas cidades abrangidas pelo DRS-6 e que tiveram diagnóstico audiológico concluído em deficiência auditiva em pelo menos uma orelha. Para melhor visualização das características da amostra estudada, os 692 sujeitos foram separados em dois grupos, sendo um grupo da cidade de Bauru e outro das demais cidades da DRS-6.

Resultados: Não houve predomínio entre os gêneros; a população idosa representou um número significativo de sujeitos quando comparada às demais faixas etárias; a maioria dos sujeitos pertence à classe socioeconômica baixa. Constatou-se que as principais etiologias encontradas em ambos os grupos foram: otite, otosclerose e presbiacusia.

Conclusão: Conhecendo as características de uma população, outras pesquisas poderão ser feitas e mudanças realizadas para melhoria na qualidade do atendimento ao deficiente auditivo, principalmente quanto à precisão do diagnóstico diferencial.