

**RESUMOS DE DISSERTAÇÕES DE MESTRADO E TESES DE DOUTORADO
APRESENTADAS NA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - USP
DE ABRIL A JUNHO DE 2008**

BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

PADRÃO DE RESPOSTA IMUNE CELULAR E DOSAGEM DE IgE E PGE2 DURANTE A EVOLUÇÃO DA CANDIDÍASE VAGINAL MURINA

Rosymar Coutinho de Lucas

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Maria Leite Maffei
Dissertação de Mestrado apresentada em 15/04/2008

Candidíase vulvovaginal é uma infecção oportunista que acomete três quartos das mulheres, pelo menos uma vez durante sua vida reprodutiva. O agente etiológico, em 85 a 90% dos casos sintomáticos, é a levedura *Candida albicans*. O mecanismo de defesa utilizado pelo hospedeiro contra esse fungo envolve a atividade da resposta imune inata e adaptativa. Porém, o conhecimento exato sobre o funcionamento do sistema imune local do trato genital feminino ainda é obscuro. Foi proposto que a fisiopatogenia dessa doença envolva a produção de IgE, liberação de histamina por mastócitos e produção de PGE2, mas os tipos celulares envolvidos na resposta imune não estão totalmente esclarecidos. A alta incidência de candidíase vulvovaginal e o aparecimento de quadros de recorrência dessa patologia, mesmo após tratamento com antifúngicos, têm estimulado a pesquisa de fatores que possam esclarecer a patogenicidade desse fungo e o padrão de resposta imunológica vaginal. Desta forma, os objetivos do nosso trabalho foram: avaliar, evolutivamente, em modelo murino de candidíase, o padrão de resposta imunológica celular (mastócitos, linfócitos T CD4 e CD8, e células dendríticas) e a dosagem de IgE e PGE2 nesse tecido. Para isso, foi inoculada amostra de *Candida albicans* produtora de fosfolipase e proteinase, indicando alto poder de virulência, na concentração de $1,5 \times 10^6$ células/mL, em camundongos fêmeas BALB/c tratadas com estradiol, três dias antes da infecção. Para o controle do experimento, foram utilizados grupos de animais tratados ou não tratados com estradiol, inoculados com soro fisiológico. Foi coletada a parede vaginal de 186 animais, nos tempos de 4hs, 8hs, 12hs, 24hs, 48hs, 120hs e 192hs. Esse material foi destinado à contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), à detecção de PGE2 e IgE por ELISA e à realização de cortes histológicos: parafinados para coloração de hematoxilina-eosina, prata e azul de toluidina e congelados para a realização de imunohistoquí-

mica visando à determinação das células envolvidas na resposta imune do tecido vaginal. Foi realizado ainda, o estudo do tecido infectado por microscopia eletrônica de transmissão e varredura.

Demonstrando a viabilidade do modelo experimental, a contagem de UFC foi positiva para todos os grupos, em níveis crescentes com a evolução da infecção, e após 24 horas, houve sempre o predomínio do parasitismo sob a forma de pseudohifas, com aumento de células infecciosas na camada epitelial, sem invasão de camadas mais profundas. Esses achados foram confirmados por microscopia eletrônica de varredura. Em qualquer tempo de infecção, os anticorpos específicos utilizados não demonstraram a presença de células dendríticas e afluxo de linfócitos TCD4 e TCD8 para o tecido vaginal. Nos primeiros tempos de infecção foram observadas dosagens de IgE e PGE2 em níveis semelhantes aos controles não infectados. Em 12hs, houve um pico de PGE2 que retornou ao nível basal do controle em 120hs, com nova exacerbação em 192hs, correspondendo no histopatológico a um aumento de leveduras no tecido e presença de inúmeras pseudohifas. Para IgE, foi observado sua elevação no tecido vaginal após 48 horas de infecção, permanecendo esses níveis elevados nos tempos posteriores, coincidente com a detecção de mastócitos degranulados na mucosa vaginal. Por conclusão, foi observado que a infecção experimental por *C. albicans* é predominantemente decorrente do parasitismo em forma de hifas e pseudohifas, envolvendo apenas a camada queratinizada do epitélio escamoso estratificado da vagina, sem comprometimento das camadas submucosa ou muscular, o que pode explicar o baixo impacto de células dendríticas e linfócitos TCD4 e TCD8 na defesa do hospedeiro, enquanto IgE e PGE2 participam da resposta à infecção vaginal experimental por *Candida albicans*, sendo que o aumento desses mediadores coincide com o aumento da carga fúngica e com a presença de mastócitos degranulados observada durante a evolução da infecção, sugerindo provável componente atópico envolvido na fisiopatogenia da candidíase vaginal.

CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE CALMODULINA E PEPTÍDEOS SINTÉTICOS E RECOMBINANTES CORRESPONDENTES AOS MOTIVOS IQ DO DOMÍNIO PESCOÇO DA MIOSINA Va

Renata Rocha de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Roy Edward Larson

Dissertação de Mestrado apresentada em 22/04/2008

Uma característica marcante da estrutura molecular da miosina Va é o domínio “pescoço”, composto de seis repetições do motivo IQ, identificado pela seqüência consenso IQxxxRGxxxR (onde x representa qualquer aminoácido), que constituem os sítios de ligação de calmodulina e cadeias leves essenciais. A calmodulina, um dos principais mediadores de cálcio na regulação de eventos e reações intracelulares, liga miosina Va na ausência de cálcio, entretanto concentrações micromolares de cálcio estimulam a atividade ATPásica da miosina Va, aumentam sua afinidade para F-actina e inibem a motilidade em ensaios *in vitro*. Estes efeitos aparentemente ocorrem via a interação de íons

cálcio com as calmodulinas já ligadas ao domínio pescoço. Nessa dissertação investigamos as propriedades estruturais relacionadas à ligação de calmodulina com os motivos IQ e sua regulação por Ca²⁺, utilizando peptídeos sintéticos correspondentes aos motivos IQ1, IQ5 e IQ6 e uma proteína recombinante correspondente aos motivos IQ5 e IQ6 em conjunto (His_IQ5-6). Também, subclonamos e expressamos a proteína recombinante correspondente ao domínio pescoço inteiro (IQ1-6). A interação entre calmodulina (que não tem triptofano em sua estrutura) e os IQs (que têm um triptofano cada um) foi determinada pela fluorescência intrínseca do triptofano dos peptídeos e das proteínas recombinantes, tanto na ausência quanto na presença de cálcio. Assim, demonstramos um efeito de cálcio sobre a conformação do complexo IQ/CaM já formado e sobre sua formação.

LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR E PADRÃO DE EXPRESSÃO DE NOVAS PROTEÍNAS DE *Drosophila melanogaster* CONSERVADAS EVOLUTIVAMENTE: dATX2 E dA2bp1/Fox1

Deise Cristina Poletto

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luisa Paçó-Larson
Tese de Doutorado apresentada em 07/05/2008

dATX2 é membro da família da ataxina-2 (ATX2), proteína cuja mutação é associada com a ataxia espinocerebelar do tipo 2 e uma forma hereditária dominante de Parkinsonismo. dA2bp1/Fox1 é parte de uma nova família de proteínas ligantes de RNA, inicialmente identificada em mamíferos por interagir com a ataxina 2 e que recentemente tem sido associada com autismo. As funções de ambas as famílias de proteínas são ainda desconhecidas, embora estudos de diferentes membros indiquem que estejam envolvidas com regulação pós-transcricional. Estudos bioquímicos sugerem que, semelhante à sua ortóloga em humanos, a dATX2 tem papel direto na regulação da tradução. Por outro lado, informações sobre a A2bp1/Fox1 de *Drosophila*, cujo gene é anotado como CG32062, inexistem na literatura. Neste trabalho, através do uso de anticorpos policlonais produzidos contra fragmentos dos polipeptídeos deduzidos de cDNAs demonstramos a existência de duas isoformas de ataxina-2 expressas diferencialmente. A isoforma menor (dATX2-PC) corresponde à isoforma maior (dATX2-PB) truncada em 61 aminoácidos no amino-terminal. dATX2-PC é expressa de modo regulado no desenvolvimento. dATX2-PB é detectada somente em extratos de tecidos dissecados (ovário, corpo gorduroso, discos imaginários, cérebro, carcaça e glândula salivar), sendo mais abundante em discos imaginários, cérebro e ovário. dA2bp1/Fox-1 também expressa diferentes isoformas proteicas na faixa de 84-88 kDa. Dentre os tecidos analisados, a isoforma maior se mos-

trou mais abundante no cérebro, pouco abundante em corpo gorduroso e indetectável em carcaça, enquanto a isoforma de menor peso molecular é mais abundante em carcaça. Experimentos de imuno-localização em células S2R+ mostraram que ambas as isoformas de dATX2 são detectadas predominantemente no citoplasma. Em condições fisiológicas de crescimento, a isoforma B apresenta-se concentrada em poucos focos arredondados de cerca de 0,5 µm de diâmetro numa percentagem pequena de células, enquanto a isoforma C parece se acumular em focos perinucleares pontuados ou alongados na maioria das células analisadas. A localização de dATX2-PB em focos citoplasmáticos aumenta significativamente em células submetidas a choque térmico, sugerindo que essa isoforma migre para corpos de estresse podendo participar da inibição da síntese proteica em resposta ao estresse. dA2bp1/Fox-1 também é de localização citoplasmática, mas diferentemente da dATX2 se localiza em inúmeros focos arredondados de cerca de 2-3 µm de diâmetro em todas as células, num padrão semelhante ao descrito para proteínas localizadas em partículas citoplasmáticas de ribonucleoproteínas. A inibição da síntese proteica por cicloheximida, mas não por puomicina, interfere com o padrão de distribuição em foco da dA2bp1/Fox-1 indicando que essa proteína se localize em *P-bodies*, complexos de mRNP envolvidos na degradação e/ou estocagem de mRNAs. Embora dATX2 não tenha sido detectada no imunoprecipitado de dA2bp1/Fox1, sugerindo que elas não interajam fisicamente, no conjunto os resultados obtidos indicam que membros dessas duas famílias de proteínas participem de processos de controle da tradução em *Drosophila melanogaster*.

INDUÇÃO DE SINCÍCIOS POR ISOLADOS CLÍNICOS DO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO HUMANO: RELAÇÕES COM TRANSCRIÇÃO DO GENE F E PRODUÇÃO DE PROGÊNIE

Talita Bianca Gagliardi

Orientador: Prof. Dr. Eurico Arruda Neto

Dissertação de Mestrado apresentada em 16/05/2008

O vírus sincicial respiratório humano (HRSV) é o agente mais freqüente de doença respiratória grave, inclusive bronquiolite, em crianças e uma importante causa de pneumonia no primeiro ano de vida. Ele é um vírus de RNA de polaridade negativa não segmentado, com nucleocapsídeo helicoidal e envelope lipoprotéico. Neste encontra-se inserida a glicoproteína F, principal responsável pela fusão entre o envelope viral e a membrana plasmática da célula hospedeira, permitindo a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma, bem como a formação de sincícios. O sincício, célula multinucleada resultante da fusão de três ou mais células adjacentes, é o principal componente do efeito citopático de HRSV e tem sido considerado como um dos principais modos de disseminação do vírus no epitélio respiratório, por evitar exposição do vírus ao fluído extracelular e anticorpos neutralizantes. O presente estudo avaliou a formação de sincícios por isolados clínicos puros de HRSV, em relação à quantidade de mRNA do gene da proteína F. Foi também estudado o efeito de coinfeções *in vitro* com parainfluenzavírus humano tipo 2 (HPIV-2), metapneumovírus humano (HMPV), influenza vírus humano tipo A (Flu-A) e rinovírus humano sorotipo 39 (HRV-39). Para o isolamento de HRSV foram utilizados aspirados nasofaríngeos, coleta-

dos de crianças menores de 5 anos, atendidas de 2005 a 2007, com sintomas de infecção respiratória em dois hospitais de Ribeirão Preto. As amostras HRSV-positivas foram inoculadas em cultura de células HEP-2 e os isolados passados serialmente até a visualização do efeito citopático, quando foi feito o ensaio de formação de sincício na passagem seguinte. Este ensaio consistiu em avaliar a quantidade de sincícios por contagem visual com coloração de Giemsa e por FACS. O tamanho dos sincícios foi avaliado por visualização. O título viral foi avaliado pelo ensaio de formação de placa de lise e o mRNA do gene da proteína F pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-TR). O estudo foi realizado com 7 isolados clínicos positivos apenas para HRSV. O ensaio de quantificação de sincícios por FACS mostrou ser mais sensível que a contagem visual. Não houve relação entre quantidade e tamanho de sincícios, nem entre quantidade de sincícios por FACS e tamanho do inóculo. Quantidades de mRNA do gene F por PCR-TR foram normalizadas pelo inóculo e nenhuma relação óbvia foi notada entre estas e as quantidades ou os tamanhos dos sincícios. A coinfeção *in vitro* de HRSV com HPIV-2, mas não com HMPV, mostrou aumentar a quantidade de sincícios, enquanto coinfeções com HRV-39 e Flu-A mostraram reduzir as quantidades de sincícios. Isolados clínicos puros de HRSV mostram atividade transcricional de mRNA de F diferentes entre si. Não foram notadas correlações entre mRNA de F e tamanhos ou quantidades de sincícios.

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE GENE QUE CONFERE RESISTÊNCIA À TERBINAFINA EM *Leishmania major*

Julio Flávio Meirelles Marchini

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Orsini Tosi

Tese de Doutorado apresentada em 13/06/2008

A amplificação gênica pode ser compreendida como um mecanismo de regulação de expressão protéica em *Leishmania*. A exposição a concentrações não letais de diferentes drogas isoladamente, como o metotrexato, a primaquina, cloroquina e antimônio levam à amplificação de regiões específicas como as localizadas no cromossomo 6 e no cromossomo 23. Essas linhagens tornam-se resistentes a estas drogas e eventualmente apresentam resistência cruzada a outras.

A terbinafina é uma substância sintética utilizada como antifúngico que age pela inibição da esqualeno epoxidase impedindo a síntese de ergosterol, componente

da membrana celular de *Leishmania*. A exposição do parasita à terbinafina leva à amplificação da região H. A fragmentação da região H permitiu delimitar a resistência a 2,8 kb; fragmento T1. Por mutagênese insercional o gene de resistência à terbinafina foi definido e nomeado HTBF.

A proteína codificada pelo HTBF possui uma extremidade N-terminal hidrofílica e C-terminal hidrofóbica com quatro alfa-hélices sendo, supostamente, uma proteína integral de membrana. Possui semelhança com a proteína Yip de *Saccharomyces cerevisiae*, que participa do transporte vesicular do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi. O gene HTBF foi detectado em linhagem sensível de *L. major* e de outras espécies de *Leishmania* e seu transcrito em linhagens sensíveis e resistentes de *L. major*.

Levantou-se a hipótese de se tratar de locus de resistência a múltiplas drogas já que as regiões amplificadas, mesmo que induzidas por uma determinada droga, podem

levar a resistência a outras. A co-transfecção do gene de resistência ao antimônio MRPA no transfectante portador do HTBF levou à diminuição em até cinco vezes da capacidade de resistência ao antimônio. Apesar dos genes de resistência amplificarem juntos na região H, foi constatado que possuem ação contrária.

Sendo que a terbinafina interfere na integridade da membrana celular, levantou-se hipótese na qual a resistência envolveria o mecanismo de reparo de membrana. A perda do fenótipo de resistência pela falta de cálcio sugerindo a inativação desse mecanismo é um fenômeno previsto corroborando a hipótese.

BIOQUÍMICA

INVESTIGAÇÃO DA CONFORMAÇÃO DE BOTHROPSTOXINA-I (PLA2-LYS 49) DO VENENO DE BOTHROPS JARARACUSSU EM SOLUÇÃO E EM ASSOCIAÇÃO COM MEMBRANAS ARTIFICIAIS

Tatiana Lopes Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Richard John Ward

Tese de Doutorado apresentada em 21/05/2008

A hidrólise de fosfolipídios de membrana pela fosfolipase A2 da classe-II (PLA²) é dependente do cofator Ca²⁺ que é parcialmente coordenado pelo resíduo de Asp49 na região do sítio ativo. Nos homólogos de Lys49-PLA², o Asp49 é substituído por Lys e as Lys49-PLA²s não mostram ligação de Ca²⁺ ou hidrólise de fosfolipídios detectável. As Lys49-PLA² mostram uma liberação rápida Ca²⁺-independente de marcadores encapsulados em lipossomos e demonstra potentes atividade bactericida e miotóxica. Bothropstoxina-I (BthTx-I) é uma Lys49-PLA² homodimérica presente no veneno da serpente *Bothrops jararacussu*. Estudos precedentes de cristalografia de raio X e de espectroscopia de fluorescência mostraram que o homodímero age como uma dobradiça molecular, permitindo a transição entre as conformações “aberta” e “fechada” de BthTx-I, sugerindo previamente que transições conformacionais similares do dímero na presença de membrana pode causar a atividade de danificação de membrana Ca²⁺-independente. Com o objetivo de compreender as mudanças estruturais de Lys49-PLA²s, o modelo de interação do BthTx-I com membranas foi estudado utilizando mutagênese de varredura do triptofano (MVT) em conjunto com espectroscopia de fluorescência intrínseca do triptofano (Trp). O único resíduo Trp77 da interface do dímero foi substituído previamente por histidina (W77H) sem efeitos significativos na estabilidade do homodímero ou na função biológica. No estudo atual, uma segunda etapa de mutagênese sítio-dirigida utilizando W77H como molde produziu 9 mutantes separados cada um com um resíduo único de Trp localizado na interface do dímero (nas posições 7 e 10), na superfície dorsal (nas posições 46 e 104), na superfície ventral (nas posições 31 e 67) e na região da alça C-terminal (nas posições 117, 119 e 125). Após a expressão em *E. coli*, enovelamento da proteína recombinante, e purificação por

cromatografia de troca catiônica, os mutantes foram caracterizados usando uma série de análises bioquímicas e biofísicas. A correlação entre a liberação do marcador encapsulado com estudos de interação da proteína com membranas de lipossomos demonstrou que uma eficiente permeabilização da membrana pode ocorrer por uma associação transiente entre a proteína e a membrana. Todos os mutantes mostraram uma atividade similar indicando que as interações hidrofóbicas possuem um papel secundário no estudo de afinidade da proteína pela membrana. Por outro lado, o aumento da proporção de carga negativa na membrana aumentou a ligação da proteína sugerindo que interações eletrostáticas possuem um papel importante nos estudos de interação. As cinéticas de modificação química dos resíduos de triptofano por bromosuccinamida foram correlacionadas com as mudanças de emissão intrínseca do triptofano, confirmando que os resíduos situados no Sítio de Reconhecimento Interfacial (SRI) da proteína interagem com a região hidrofóbica da bicamada da membrana. Resultados adicionais indicam que os resíduos da região C-terminal da proteína interagem com a superfície da bicamada, em contraste com atual consenso sobre a função desta região no mecanismo de danificação da membrana. Os resíduos de triptofano na região da interface dimérica podem participar da homotransferência de energia ressonante (HTER), e este efeito pode ser estudado através de alterações na anisotropia de fluorescência intrínseca do triptofano. Os mutantes K7W e L10W demonstram uma anisotropia de fluorescência reduzida, consistente com o efeito de homotransferência de energia. Uma vez que HTER é somente eficiente sob distâncias curtas, estes dados suportam fortemente a sugestão que o homodímero de BthTx-I adota uma conformação fechada em solução. Estes dados experimentais mostram uma correlação qualitativa com resultados de simulações de dinâmica molecular, que oferecem a possibilidade de compreender as mudanças estruturais subjacentes da atividade de danificação da membrana de Ca²⁺-independente de BthTx-I.

ESTUDO ESTRUTURA-ATIVIDADE DAS AÇÕES PRÓ-OXIDANTE E ANTIOXIDANTE DE ISOCUMARINAS SOBRE AS MITOCÔNDRIAS

Anaísa Fernandes Calgareo-Helena

Orientador: Prof. Dr. Carlos Curti

Tese de Doutorado apresentada em 26/05/2008

Mitocôndrias isoladas podem sofrer desacoplamento, e na presença de Ca^{2+} sob diferentes condições, uma Transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) associada à oxidação de grupos sulfidril de proteínas da membrana e inchamento mitocondrial sensível a inibição por ciclosporina A (CsA); a TPM pode causar morte celular por necrose ou apoptose. Isocumarinas isoladas a partir de *Peperomia bromelioides* (Eriocaulaceae) - pepalantina [(9,10-dihidroxi-5,7-dimetoxi-1H-nafto (2,3c) pirano-1-ona)], 8,8'-pepalantina dímero e vioxantina - foram estudadas nas concentrações de 1-50 $\mu\text{mol/L}$ em mitocôndrias isoladas de fígado de rato com relação a respiração mitocondrial, dissipação do potencial de membrana, liberação de Ca^{2+} , TPM, oxidação de grupos sulfidril de proteínas, depleção de ATP e interação/alteração na fluidez na membrana mitocondrial utilizando a sonda 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH). As isocumarinas não afetaram significativamente a respiração de estado 3 em mitocôndrias energizadas com succinato; entretanto, elas estimularam a respiração do estado 4, indicando desacoplamento mitocondrial. A indução da TPM e a oxidação de grupos sulfidril de proteínas foram avaliadas em mitocôndrias energizadas com succinato expostas a Ca^{2+} 10 $\mu\text{mol/L}$, e a inibição desses processos foi avaliada em organelas sob condições energizadas e não energizadas na presença de t-butil hidroperóxido 300 $\mu\text{mol/L}$ e Ca^{2+} 500 $\mu\text{mol/L}$. Apenas a pepalantina foi um efetivo indutor da TPM e da oxidação de grupos sulfidril das proteínas; este,

diferentemente do inchamento mitocondrial, foi independente de Ca^{2+} e não sensível a inibição por CsA. A pepalantina liberou Ca^{2+} a partir da mitocôndria, o qual foi 50% sensível a inibição por CsA, demonstrando ser parcialmente associado a TPM. As isocumarinas também depletaram ATP mitocondrial, independente da presença de Ca^{2+} , tendo a pepalantina sido a mais efetiva. A vioxantina foi um efetivo inibidor da TPM e da oxidação de grupos sulfidril de proteínas. Todas as isocumarinas se inseriram na porção hidrofóbica da membrana mitocondrial; entretanto, somente a pepalantina dímero e vioxantina diminuíram a sua fluidez. Uma reação direta com os grupos sulfidril de proteínas da membrana mitocondrial, envolvendo a oxidação dos mesmos, é proposta para a indução da TPM por pepalantina, enquanto que a restrição da oxidação desses mesmos grupos pela diminuição da fluidez de membrana, é proposta para inibição da TPM por vioxantina. Foi avaliada ainda a capacidade antioxidante das isocumarinas nas concentrações de 1-50 $\mu\text{mol/L}$ tanto em mitocôndrias isoladas de fígado de rato quanto em sistemas livres de mitocôndrias. A pepalantina e o seu dímero, mas não a vioxantina, foram efetivos na redução do radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e seqüestro do ânion superóxido em sistemas não mitocondriais, e protegeram a mitocôndria contra o acúmulo de H_2O_2 induzido por tert-butil hidroperóxido e peroxidação de lipídeos da membrana mitocondrial induzida por Fe^{2+} citrato. Esses resultados indicam a pepalantina, seguida do seu dímero, como potentes agentes protetores, aparentemente pelo seqüestro do ânion superóxido, contra condições de estresse oxidativo impostas sobre a mitocôndria, a mais importante fonte e alvo intracelular de espécies reativas de oxigênio.

CLONAGEM, EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL DO INIBIDOR ENDÓGENO DO PROTEASSOMA PI31 DE SCHISTOSOMA MANSONI

Carla Botelho Machado

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Rodrigues

Dissertação de Mestrado apresentada em 27/06/2008

A degradação intracelular de proteínas mediada pelo sistema de ubiquitina e proteassoma é uma importante rota na qual inúmeras proteínas são marcadas para a destruição. O principal componente deste sistema proteolítico é o proteassoma 26S. A modelagem estrutural e funcional do sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma apresenta diversos moduladores, os quais são responsáveis por fun-

ções específicas. No presente estudo, foi feita a caracterização molecular e funcional do inibidor endógeno do proteassoma PI31 do parasita *Schistosoma mansoni* durante seu ciclo evolutivo. Assim, o gene que codifica para PI31 foi recuperado dos bancos de dados do parasita, clonado, expresso em sistema heterólogo, e por fim a proteína recombinante foi purificada. A partir da proteína purificada, camundongos foram imunizados para a produção de anticorpos específicos anti-PI31. Nossos resultados demonstraram que a expressão gene que codifica para SmPI31 é diferencialmente expresso. Em relação à proteína, observa-

mos a presença de SmPI31 em todas as fases estudadas, ou seja, vermes adultos, cercária e ovos. Experimentos preliminares de atividade proteolítica exógena do proteossoma indicam que a proteína é funcional e diminui a atividade da protease em cerca de 70%. Desta forma, considerando-se

que PI31 exerce um papel inibitório do proteossoma em vários metazoários, em *S. mansoni* os nossos resultados indicam que esta proteína é funcional e pode contribuir de forma efetiva na modulação da atividade proteolítica do proteossoma durante o desenvolvimento do parasita.

CLÍNICA CIRÚRGICA

AVALIAÇÃO CLÍNICA E MORFOLÓGICA DO EFEITO DO TIOPENTAL E DA CLORPROMAZINA NA ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL TEMPORÁRIA EM RATOS

Ricardo Torres Santana

Orientador: Prof. Dr. Benedicto Oscar Colli

Tese de Doutorado apresentada em 04/04/2008

Introdução: A isquemia humana é um evento importante na prática clínica diária e nas cirurgias neurológicas, porque se situa entre as enfermidades que mais comprometem a espécie. Na atividade neurocirúrgica, o vasoespasma arterial crônico, após hemorragia subaracnóidea, e as clampedagens arteriais justificam o estudo desse problema. Estudos têm demonstrado o efeito neuroprotetor de barbitúricos em doses relacionadas com a supressão da atividade eletrencefálica, que se acompanha de grave instabilidade hemodinâmica e parece desencorajar sua aplicação na clínica diária. Por outro lado, não foram encontrados estudos da aplicação de clorpromazina em modelos de isquemia cerebral focal, embora seu efeito neuroprotetor na medula de coelhos e modelos *in vitro* tenham sido demonstrados. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do tiopental em doses anestésicas e da clorpromazina na isquemia focal temporária por oclusão da artéria cerebral média esquerda (OACM), em ratos.

Material e Métodos: Foram estudados 76 ratos machos Wistar, pesando 295 ± 15 g, divididos em 5 grupos. Quatro grupos de quinze animais: G1 - controle-isquemia; G2 - tiopental; G3 - clorpromazina; G4 - tiopental mais clorpromazina, e o grupo 5 - sham, com dez animais. Seis animais morreram antes da primeira avaliação clínica e foram repostos. Os grupos 1 a 4 foram submetidos a 90min de isquemia por OACM com um fio intraluminal, seguida de reperfusão por trinta dias. O grupo 5 foi submetido ao procedimento cirúrgico sem OACM. Todos os animais foram avaliados nos sétimo e trigésimo dias pós-isquemia com a utilização de teste clínico e foram sacrificados em seguida. Os cérebros foram perfundidos e fixados. E secções coronais de 10 μ m de espessura iniciando-se na face anterior do corpo caloso até a comissura posterior, coradas pela técnica luxol

fast blue foram utilizadas para morfometria, realizada com ajuda de sistema de análise de imagem KS400, Karl Zeiss, e aplicação de metodologia desenvolvida para este estudo.

Resultados: Houve diferença significativa entre os grupos na avaliação clínica realizada 7 e 30 dias pós-isquemia: os grupos 1 a 4 são equivalentes e têm valores significativamente superiores aos do grupo 5, (respectivamente $p < 0,0001$ e $p = 0,02$, 4 gl, Kruskal-Wallis, teste post hoc de Dunn). Houve diferença entre os grupos na evolução clínica observada pela diferença entre a primeira e a segunda avaliação clínica (grupos 1 a 4 equivalentes e com valores significativamente inferiores aos do grupo 5, teste post hoc de Dunn). Comparando os hemisférios cerebrais esquerdos (HE), houve diferença significativa entre os grupos (grupos 1 a 4 equivalentes e todos com valores significativamente inferiores aos do grupo 5, $p = 0,01$, 4 gl, Kruskal-Wallis, teste post hoc de Dunn). Comparando os hemisférios cerebrais direitos (HD), não houve diferença significativa entre os grupos ($p = 0,32$, 4 gl, Kruskal-Wallis). Comparando a razão do HE sobre o HD, houve diferença significativa entre os grupos (grupos 1 a 4 são equivalentes e todos têm valores significativamente inferiores aos do grupo 5, $p < 0,0001$, 4 gl, Kruskal-Wallis, teste post hoc de Dunn). Comparando os resultados da homeostase durante o procedimento cirúrgico pré-isquemia, não houve diferença significativa entre os grupos: glicemia ($p = 0,34$, ANOVA), hematócrito ($p = 0,15$, ANOVA), hemoglobina ($p = 0,29$, ANOVA). Comparando esses parâmetros pós-isquemia, o grupo 2 apresentou valores de glicemia significativamente inferiores aos dos grupos 1 e 3 ($p = 0,05$, ANOVA), e valores de hemoglobina significativamente superiores aos dos grupos 1 e 4 ($p = 0,04$, ANOVA). O grupo 5 tende a possuir valores de hematócrito inferiores aos do grupo 4 ($p = 0,06$, ANOVA).

Conclusões: Nas condições do presente estudo, o tiopental em dose anestésica e a clorpromazina, isoladamente ou associados, não apresentaram efeito de proteção à isquemia cerebral focal transitória em ratos.

A INFLUÊNCIA DA REGULAÇÃO MÉDICA E DA INCORPORAÇÃO DE NOVAS TECNOLOGIAS E PRÁTICAS CLÍNICO-CIRÚRGICAS NO PROGNÓSTICO DA PANCREATITE AGUDA BILIAR TRATADA EM UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE REFERÊNCIA EM URGÊNCIA

Francisco Ribeiro de Carvalho Neto

Orientador: Prof. Dr. José Sebastião dos Santos

Tese de Doutorado apresentada em 24/04/2008

A identificação de determinantes que podem influenciar o prognóstico da pancreatite aguda biliar (PAB), sobretudo na forma grave, continua sendo objeto de investigação. Nesse estudo avaliou-se a influência da regulação médica e da incorporação de recursos de suporte à vida, de diagnóstico e de tratamento menos invasivos da litíase biliar no prognóstico da PAB tratada em Hospital Universitário de referência em urgência. A coleta de dados dos prontuários dos pacientes com PAB tratados de janeiro 1995 a dezembro de 2004 foi direcionada para obtenção de dados demográficos, clínicos e laboratoriais para subsidiar a estratificação dos casos pelo Acute Physiology and Chronic Healthy Evaluation (APACHE II). Também se registrou a abordagem da colestase, da litíase biliar e da gestão do suporte à vida. A mortalidade foi avaliada nas fases precoce (até 14 dias da admissão) e tardia (após esse período). A análise foi realizada em dois períodos: 1995 a 1999 e 2000 a 2004, por situarem-se, temporalmente, antes e depois da implantação da regulação médica, bem como da ampliação dos recursos de suporte à vida e do emprego da colangiografia por ressonância nuclear magnética (CRNM) e da colecistectomia por videolaparoscopia (CVL). Do total

de 727 casos com pancreatite aguda atendidos, 267 apresentavam PAB. Houve redução dos encaminhamentos de casos entre os períodos, de 441 para 286 ($p < 0,001$). O perfil dos pacientes com PAB no primeiro período ($n = 154$) e no segundo ($n = 113$) foi semelhante quanto à idade, sexo, escore de APACHE II, incidência de colestase e mortalidade. Por outro lado, a incidência de pacientes com maior risco de óbito ($p = 0,019$) e hematócrito < 44 ($p < 0,002$) foi maior no segundo período. O emprego de CRNM, da CVL e do acesso à terapia intensiva foi significativamente maior no segundo período. A mortalidade global foi de 11,6%. A PAB branda (APACHE II < 8), no primeiro período, representou 68,2% dos casos com mortalidade de 3,8%; no segundo período foi de 67,3% dos casos com mortalidade de 3,9%. A PAB grave (APACHE II ≥ 8), no primeiro período, representou 31,8% dos casos com mortalidade de 22,4%; no segundo período, representou 32,7% dos casos, com mortalidade de 35,1%. Não houve diferença significativa quanto à mortalidade entre os períodos. A maioria dos óbitos ocorreu até os 14 dias de admissão, 73,4% no primeiro período e 81,3% no segundo. A organização do acesso ao hospital e a incorporação de recursos tecnológicos e práticas clínico-cirúrgicas não modificaram o prognóstico da PAB, o que pode indicar a necessidade de melhorar a sistematização do emprego desses recursos e de adoção de novas terapêuticas para o componente inflamatório dessa doença.

ATEROSCLEROSE CAROTÍDEA: ASSOCIAÇÃO COM FATORES DE RISCO E DOENÇAS ARTERIAIS SISTÊMICAS: ESTUDO ULTRA-SONOGRÁFICO

Procópio de Freitas

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eli Piccinato

Tese de Doutorado apresentada em 25/04/2008

Introdução: A aterosclerose é uma doença arterial degenerativa, de etiologia multicausal, onde os fatores de risco genéticos e adquiridos atuam em conjunto, determinando sua ocorrência em mais da metade da população adulta mundial, com manifestações clínicas em mais de 10% de toda a humanidade. A lesão aterosclerótica pode acometer importantes territórios arteriais sendo responsável por 75% dos acidentes vasculares cerebrais (AVC), 95% das coronariopatias e 85% das claudicações intermitentes dos membros inferiores, e é mais freqüente nos diabéticos.

Objetivo: Pesquisar a freqüência de lesões ateroscleróticas nas artérias carótidas extracranianas e sua relação com alguns fatores de risco, como: idade, sexo, hiper-

tensão arterial sistêmica, tabagismo, diabetes melito e obesidade. Além destes fatores, pesquisou-se a associação da aterosclerose com claudicação intermitente, doença arterial oclusiva periférica (DAOP), índice de tornozelo braquial (ITB $< 0,9$), espessamento médio-intimal (EMI) de carótida comum e acotovelamento carotídeo.

Métodos: Foram avaliadas as artérias carótidas extracranianas, bilateralmente, de 367 indivíduos (132 homens e 235 mulheres) com idade média de 63 anos (35 a 91 anos) por anamnese, semiologia clínica e ultra-sonografia, de amostra populacional do bairro Sumarezinho, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. A possibilidade de associação entre a doença aterosclerótica carotídea representada por placas ateromatosas inespecíficas (PAI) com estenoses maior que 10% e ateromatose discreta e difusa (ADD) com estenose menor que 10%, e os fatores de risco enunciados, além das outras condições clínicas, foi analisada através do "Odds-Ratio" com o índice de confiança de 95% e $p < 0,05$.

Resultados: Dos 367 indivíduos estudados, 92 (25%) foram considerados obesos por apresentarem índice massa corporal maior que 30 kg/m², 50 (13,6%) portadores de diabetes melito e 50 (13,6%) tabagistas. Com referência a manifestações de doenças vasculares associadas, 136 (37%) indivíduos eram hipertensos (pressões sistólicas e diastólicas maiores que 140/90 mmHg), 111 (30,2%) apresentaram EMI, 35 (9,5%) portadores de coronariopatia isquêmica, 28 (7,6%) com história pregressa de acidente vascular cerebral (AVC), 35 (9,5%) com antecedentes de ataque isquêmico transitório (AIT), 13 (3,5%) apresentaram oclusão de uma das artérias do sistema carotídeo no momento do exame e em 58 (15,8%) verificaram-se acotovelamentos carotídeos. Em relação à doença arterial oclusiva periférica (DAOP), 31 (8,4%) indivíduos apresentaram índice tornozelo braquial (ITB) menor que 0,9 e 10 (2,7%) referiram quadro de claudicação intermitente de um ou ambos os membros inferiores para menos de 500 m em locais planos. A análise estatística mostrou associação com EMI e idade maior que 64 anos, hipertensão arterial sistêmica, ITB < 0,9, acotovelamento e oclusão de alguma artéria do sistema carotídeo. Com a aterosclerose carotídea (ADD + PAI), houve associação entre

ADD com idade maior que 64 anos e obesidade. Em relação à PAI, houve associação com idade acima de 64 anos, AVC prévio, coronariopatia isquêmica, oclusão de alguma artéria do sistema carotídeo e tabagismo. Para estenose com repercussão hemodinâmica (= 60%), houve associação com idade acima de 64 anos, coronariopatia isquêmica e oclusão do sistema carotídeo. Com relação aos fatores de risco (variáveis secundárias), o *Odds-Ratio* mostrou associações significativas entre: acotovelamento e idade > 64 anos; sexo feminino e AVC prévio; diabetes melito e idade > 64 anos, AVC e obesidade; HAS e idade > 64 anos; diabetes melito, AVC prévio, obesidade e coronariopatia isquêmica; obesidade e idade > 64 anos; coronariopatia e idade > 64 anos; ITB < 0,9 e idade > 64 anos, AIT e tabagismo; AVC prévio e oclusão de artéria do sistema carotídeo.

Conclusão: A aterosclerose carotídea apresentou alta frequência (52%) e associação com vários fatores de risco (idade, obesidade, AVC, coronariopatia isquêmica, oclusão de alguma artéria do sistema carotídeo e tabagismo). Diante das informações obtidas sobre o comportamento da aterosclerose carotídea, sugere-se que novas pesquisas clínicas sobre esta doença devam ser estimuladas.

ALTERAÇÕES MORFOMÉTRICAS, ESTEROMÉTRICAS E FISIOLÓGICAS DO TRATO URINÁRIO INFERIOR : COMPARAÇÃO ENTRE RATOS ENVELHECIDOS E COM DIABETES INDUZIDO POR ALOXANO

Antônio Antunes Rodrigues Júnior

Orientador: Prof. Dr. Haylton Jorge Suaid

Tese de Doutorado apresentada em 29/05/2008

Introdução: As alterações funcionais do trato urinário inferior encontradas no envelhecimento e no diabetes mellitus podem estar relacionadas a alterações estruturais. Evidências apontam para a confirmação dessa hipótese, contudo não existem trabalhos analisando o trato urinário inferior no diabetes após períodos longos de observação, tampouco relatos de alterações estruturais uretrais secundárias a esses processos patológicos.

Objetivos: Avaliar as conseqüências funcionais sobre o trato urinário inferior das alterações morfométricas e estereométricas secundárias ao envelhecimento e ao diabetes induzido por aloxano. Descrever alterações morfométricas e estereométricas da composição de camada muscular e colágeno na uretra e bexiga de ratos no diabetes e no envelhecimento, correlacionando esses achados com as alterações cistométricas.

Material e Métodos: Ratos machos distribuídos em três grupos: A - 8 semanas de idade; B - 44 semanas de idade; C - diabéticos induzidos por aloxane com 44 semanas de idade. Nos três foram realizados estudos histológicos com medida da espessura da camada muscular, quantifica-

ção da proporção de fibrose e colágeno tipo I e III. Testes funcionais cisto métricos antes e após a desnervação vesical cirúrgica (DVC) foram realizados, com medida da capacidade cisto métrica máxima (CCM), intensidade máxima de contração vesical, frequência e tempo de contração, capacidade cistométrica máxima após DVC e pressão máxima de fechamento uretral. Estimativas das propriedades mecânicas da parede vesical foram realizadas.

Resultados: Não encontramos hipertrofia da camada muscular na bexiga e encontramos na uretra de animais diabéticos. Houve aumento da quantidade de fibrose tanto no envelhecimento quanto no diabetes, porém com acúmulo maior de colágeno tipo III nos animais diabéticos, tanto na bexiga quanto na uretra. Além das alterações morfológicas, encontramos aumento da CCM e complacência vesical associadas à diminuição da elasticidade da parede vesical nos animais diabéticos.

Conclusão: As diferenças funcionais entre os grupos correlacionaram-se com alterações morfométricas e estereométricas. O aumento observado na capacidade cistométrica máxima e complacência nos animais diabéticos foi um mecanismo compensatório à perda de elasticidade da parede vesical desses animais. Ocorreu aumento da deposição de colágeno tipo III na bexiga e uretra de animais diabéticos.

AVALIAÇÃO DA MUSCULATURA RESPIRATÓRIA E DOS VOLUMES PULMONARES COMO PREDITOR DE COMPLICAÇÕES RESPIRATÓRIAS NO PÓS-OPERATÓRIO DE CIRURGIA

Viviany Mendes Borges

Orientador: Prof. Dr. Alfredo José Rodrigues

Dissertação de Mestrado apresentada em 30/05/2008

A avaliação pré-operatória é parte integrante do preparo dos pacientes submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio e troca valvar. Alguns autores constataram que tem maior risco de desenvolver complicações respiratórias os pacientes que, por alguma razão, não conseguem elevar os valores de P_{Imáx.} e P_{Emáx.}, no pré-operatório de cirurgia cardíaca com toracotomia.

Objetivos: Apreciar as condições da musculatura respiratória e ventilação pulmonar e verificar se os parâmetros de manovacuométricos e ventilométricos têm valor preditivo para complicações respiratórias.

Materiais e Métodos: Trata-se de um estudo retros-

pectivo, com dados clínicos, incluindo a evolução pós-operatória, resultados obtidos pela manovacuometria e ventilometria pré-operatórias, realizadas a beira do leito de 226 pacientes que foram submetidos à cirurgia cardíaca de revascularização ou valvares.

Resultados: A análise de múltiplas variáveis pela regressão logística mostrou que a idade, doença pulmonar obstrutiva crônica, a pressão sistólica arterial pulmonar ≥ 50 mmHg, fração de ejeção FE $< 0,40$ e P_{Imáx.} e P_{Emáx.}, ambas com valores $< 70\%$ do predito para a idade e sexo eram preditores de complicações pulmonares no pós-operatório.

Conclusão: pode-se concluir que valores de P_{Imáx.} e P_{Emáx.}, ambas $< 70\%$ do previsto estão associada à maior incidência de complicações respiratórias no pós-operatório, podendo ser considerada um fator de risco. Assim, a detecção dessa disfunção pelo fisioterapeuta pode auxiliá-lo na estratificação do risco cirúrgico de seus pacientes.

EFEITO DA OXIGENOTERAPIA HIPERBÁRICA NA CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSES ISQUÊMICAS. ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS

Luciana Almeida Azevedo

Orientador: Prof. Dr. Omar Féres

Dissertação de Mestrado apresentada em 02/06/2008

Introdução: As cirurgias do trato gastrointestinal são um dos mais frequentes procedimentos cirúrgicos nos dias de hoje e a deiscência de anastomose ainda é complicação muito temida pelos cirurgiões. Vários trabalhos foram publicados avaliando a cicatrização de anastomoses intestinais associadas a diversas situações, como: fatores físicos, técnicas cirúrgicas, produtos químicos, doenças associadas, entre outras. Anastomoses submetidas a situações de isquemia apresentam diminuição dos níveis de hidroxiprolina (precursor do colágeno) e perda de força tênsil. Atualmente, a oxigenoterapia hiperbárica (OHB) está sendo utilizada com sucesso em situações de isquemia e infecção. O presente estudo tem a finalidade de avaliar os efeitos da oxigenoterapia hiperbárica na cicatrização de anastomoses colônicas isquêmicas em ratos.

Material e Métodos: Foram estudados 40 ratos da linhagem Wistar, separados em quatro grupos: controle (grupo I), controle e OHB (grupo II), isquemia (grupo III) e isquemia e OHB (grupo IV). Todos os animais foram submetidos à secção e anastomose colônica; nos animais dos

grupos isquêmicos, realizou-se esqueletização da arcada sanguínea próxima da anastomose. Em seguida, os animais dos grupos OHB foram submetidos a sete sessões diárias de OHB. Todos os animais foram sacrificados no oitavo dia pós-operatório e avaliados macroscopicamente quanto à presença de aderências, deiscência e distensão de cólon, e a região anastomótica foi retirada para dosagem de hidroxiprolina, avaliação histopatológica e para estudo imuno-histoquímico, com avaliação das metaloproteinases 1 e 9 (MMP1 e MMP9).

Resultados: Houve apenas dois óbitos, um no grupo isquemia e outro no grupo isquemia e OHB. Não foram observadas fístulas e peritonite. Aderências foram encontradas em maior número no grupo II, em comparação ao grupo I ($p=0,01$). Houve deiscência apenas nos grupos III (1 caso) e IV (2 casos), todas bloqueadas. Notou-se também um maior número de distensão intestinal em animais do grupo II em relação ao grupo I ($p < 0,01$); o mesmo ocorreu entre os grupos III e IV, com predominância no grupo IV ($p=0,99$). A avaliação histológica mostrou que no grupo IV houve uma diminuição do edema intersticial em comparação ao grupo III, mas sem diferença estatística ($p=0,12$); os demais parâmetros histológicos não apresentaram diferenças importantes. A média das dosagens de hidroxiprolina foi maior

no grupo II, em relação ao grupo I ($p < 0,01$); notou-se também aumento das médias encontradas no grupo IV em comparação ao grupo III, mas sem diferença estatística ($p=0,49$). Os estudos imuno-histoquímicos demonstraram: porcentagem de áreas marcadas pela metaloproteinase I maiores no grupo IV, em relação ao grupo III ($p < 0,01$); os resultados são semelhantes em relação à metaloproteinase 9, também presente em maior intensidade no grupo IV, em relação ao grupo III ($p < 0,01$).

Discussão: Concluiu-se que a oxigenoterapia hiperbárica atua na região anastomótica isquêmica de maneira benéfica, confirmado microscopicamente pela diminuição do edema intersticial e bioquimicamente, pelo aumento da concentração de hidroxiprolina. A avaliação imuno-histoquímica também confirma esta hipótese ao demonstrar um aumento da concentração das metaloproteinases 1 e 9 nos animais do grupo IV, significando maior atividade remodeladora da anastomose.

CLÍNICA MÉDICA

PERFIL CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO DE 121 CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA: 22 ANOS DE EXPERIÊNCIA DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Renato Augusto Zorzo

Orientador: Prof. Dr. José Abrão Cardeal da Costa
Dissertação de Mestrado apresentada em 03/04/2008

A doença renal crônica (DRC) atinge cada vez mais uma parcela significativa da população, e entre os pacientes adultos as doenças metabólicas são as principais causas, respondendo por aproximadamente 70% dos pacientes em tratamento dialítico. Porém, há poucas publicações sobre levantamento epidemiológico de DRC em crianças disponíveis na literatura. O objetivo deste trabalho foi descrever o perfil clínico-epidemiológico das crianças e adolescentes com DRC atendidos pelo Serviço de Nefrologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), contemplando 22 anos de experiência. Para tanto, foram revisados 121 prontuários e coletadas 21 variáveis de cada um deles. Do total, 58,7% eram do sexo masculino, e 41,3% do sexo feminino. A média de idade de entrada foi 59,1 meses. Os pacientes menores que 5 anos somaram 62,5% do total. Os pacientes procedentes de Ribeirão Preto ou de cidades com até 300km de distância somaram 63% dos casos. As causas básicas de DRC foram: uropatias (48,8%), glomerulopatias (20,7%), displasias renais congênitas ou policísticas (7,4%), vasculopatias (6,6%), tubulopatias (2,5%), outras causas (7,4%) e causa indeterminada (6,6%). Das glomerulopatias, os tipos histológicos encontrados foram a glomerulosclerose segmentar e focal (GESF) (25,0%), a proliferação mesangial difusa (PMD)

(20,8%), a glomerulonefrite (GN) avançada (12,5%), a glomerulonefrite crescêntica (GNC) (8,3%) e a Síndrome de Alport (8,3%), sendo que 4,2% dos casos foram considerados indeterminados e 20,8% dos pacientes não foram submetidos a biópsia. A grande maioria dos pacientes (59,8%) tinha estatura abaixo do 5º percentil para idade e sexo no momento do diagnóstico. O tempo de seguimento clínico variou de 2 a 263 meses, com média de 67,5 meses. A creatinina sérica no momento do diagnóstico variou de 0,5 a 12,1 mg/dL, com média igual a 3,0 mg/dL. A média de RFG calculado pela Fórmula de Schwartz no momento do diagnóstico foi 27,4 mL/min/1,73m². A maioria dos casos (62,3%) chegou ao serviço em DRC estágios 4, 5 ou em diálise. Hipertensão arterial (HA) foi detectada em 56,2% dos pacientes em algum momento do curso clínico. Acidose metabólica foi detectada em 53,7% dos pacientes no momento do diagnóstico. Do total de pacientes, 38,0% foram submetidos a tratamento dialítico, sendo as modalidades peritoneais preferidas em 80,4% dos casos. Transplante renal foi realizado em 24,8% dos pacientes, sendo as proporções de doador vivo relacionado (DVR) e doador cadáver (DC) semelhantes. A proporção de óbitos no período do estudo foi 22,3%. Dos demais pacientes, 17,4% foram transferidos para seguimento pela Clínica Médica do HCFMRP-USP, e 38,8% dos casos ainda estavam em seguimento pela Nefrologia Pediátrica em dezembro de 2005. Concluímos que a população estudada mostrou características clínicoepidemiológicas semelhantes às publicações nacionais e internacionais consultadas.

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO VORICONAZOL, COMPARATIVAMENTE A OUTROS ANTIFÚNGICOS, NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE EXPERIMENTAL DO RATO

Daniela Silva Granzoto

Orientador: Prof. Dr. Roberto Martinez

Dissertação de Mestrado apresentada em 25/04/2008

Neste estudo avaliou-se a eficácia do voriconazol em comparação ao cetoconazol, fluconazol, itraconazol e sulfametoxazol-trimetoprim na infecção experimental de ratos Wistar, fêmeas, por *Paracoccidioides brasiliensis*. Os parâmetros utilizados para quantificar a resposta às drogas foram as contagens de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Paracoccidioides brasiliensis* no pulmão e baço e a sobrevivência dos animais. A terapia antifúngica iniciou-se sete dias após a infecção. As medicações foram administradas por gavagem durante 6 a 15 dias, conforme o experimento, nas seguintes doses diárias em mg/kg de peso: voriconazol-5, 7, 10 e 20; cetoconazol-10, 12 e 15; fluconazol-6; itraconazol-4; sulfametoxazol-trimetoprim-100, 120 e 150 (de sulfametoxazol). Na avaliação da eficácia das drogas feita por contagem de UFC, os animais tratados com voriconazol-7mg/kg/dia apresentaram uma redução significativa da infecção esplênica comparado ao grupo controle

(médias de $36,9 \times 10^3$ e $68,8 \times 10^3$ /órgão). A dose diária de 10mg/kg diminuiu a infecção fúngica no pulmão (médias de $20,1 \times 10^6$ e $96,5 \times 10^6$) e no baço (médias de $9,1 \times 10^6$ e $108,9 \times 10^3$) em relação aos ratos não tratados. Contudo, itraconazol e fluconazol mostraram maior eficácia na redução da carga fúngica no pulmão e no baço do que voriconazol. Em dois estudos, voriconazol (10mg/kg de peso/dia) prolongou discretamente a sobrevivência dos animais tratados com a droga. Em relação ao grupo controle, o período de mortalidade de 50% dos animais tratados com 6 doses de voriconazol, cetoconazol, fluconazol, itraconazol e sulfametoxazol-trimetoprim foi respectivamente, de 16, 22, 22, 39, 28 e 26 dias. Com 12 doses administradas, os valores correspondentes a 50% de mortalidade foram, respectivamente, 16, 17, 14, 36, 25 e 32 dias após inoculação. Voriconazol mostrou um efeito dose-dependente, pois observou-se uma menor eficácia não significativa nas doses recomendadas para uso clínico (5 e 7mg/kg/dia) em relação as dosagens maiores de (10 e 20mg/kg/dia). O tratamento com voriconazol proporcionou uma redução da carga fúngica tecidual e uma maior sobrevivência dos ratos, podendo representar uma nova opção terapêutica na paracoccidioidomicose humana.

AVALIAÇÃO DO CONTROLE DE INFECÇÃO CRUZADA EM SERVIÇOS ODONTOLÓGICOS DE SERTÃOZINHO, SP

Wanessa Teixeira Bellíssimo Rodrigues

Orientadora: Profa. Dra. Alcyone Artioli Machado

Tese de Doutorado apresentada em 29/04/2008

Garantir a segurança do cliente é hoje uma preocupação constante em todos os segmentos da assistência à saúde. Pela grande quantidade de microorganismos presentes na cavidade oral, pela extensa contaminação do ar, superfícies adjacentes ao cliente em atendimento e equipamentos que ocorre durante o atendimento odontológico, o risco de transmissão de doenças infecto-contagiosas como a aids, as hepatites B e C pode ser elevado nesse cenário, caso medidas preventivas não sejam estritamente adotadas. Diante disso, o presente estudo avaliou entre os cirurgiões-dentistas da rede privada e pública de Sertãozinho (SP), o nível de conhecimento e as práticas de controle de infecção cruzada adotadas durante seu exercício profissional, por meio de entrevista individual. Esses dados foram digitados em um banco de dados do programa Epi-Info (CDC, versão 6.04d) e variáveis selecionadas foram submetidas ao teste χ^2 ou exato de Fisher bicaudal, para comparação entre os setores privado e público (análise transversal). Participaram do estudo 135 cirurgiões-dentistas, pre-

dominando o sexo feminino (63,0%) e adultos jovens (média de idade = 34,5 anos). Entre os profissionais que receberam informações sobre controle de infecção cruzada na graduação, 50,4% as julgaram insuficientes. Apenas 26,7% relataram trabalhar constantemente com auxiliar. Realizavam higienização das mãos, antes e após os atendimentos, 86,7% dos participantes, sendo que aqueles com vínculo privado usavam sabonete líquido e toalhas descartáveis com maior frequência ($p < 0,001$). A maioria dos profissionais avaliados (97,8%) usava luvas regularmente nos atendimentos clínicos, mas 8,2% deles relataram reutilizar o mesmo par de luvas em diferentes atendimentos. Grande parte dos cirurgiões-dentistas (80,0%) empregava exclusivamente a estufa para a esterilização de artigos termorresistentes, mas os parâmetros adequados de tempo de exposição e temperatura eram atingidos por apenas 32,1% dos profissionais públicos e 70,0% dos privados ($p < 0,001$). A desinfecção de artigos termossensíveis era feita com substâncias adequadas por 60,0% dos profissionais de ambos os setores ($p = 0,908$). De maneira geral, os dados apontam a existência de um hiato extenso entre as recomendações sobre controle de infecção firmadas na literatura e a prática exercida pelos cirurgiões-dentistas na localidade estudada, sendo pior a situação encontrada nos serviços públi-

cos, em relação aos privados. Através dos dados apresentados, pode-se inferir que as causas desse problema são a falta de condições estruturais e funcionais adequadas ao exercício da profissão, a falta de conhecimentos específicos por parte dos cirurgiões-dentistas, assim como sua fal-

ta de envolvimento com a questão. Para modificar essa situação, e garantir a preservação da saúde dos clientes sob atendimento odontológico, este problema deve ser amplamente debatido e divulgado no âmbito das associações de classe, faculdades de odontologia e gestores públicos.

AVALIAÇÃO PROSPECTIVA DOS PADRÕES DE SENSIBILIDADE DE AMOSTRAS DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA ISOLADAS DE SECREÇÕES RESPIRATÓRIAS DE PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA

Fúlvia Patrícia Gonçalves Mazzo

Orientador: Prof. Dr. José Fernando de Castro Figueiredo
Dissertação de Mestrado apresentada em 05/05/2008

A principal causa de morbidade e mortalidade dos pacientes portadores de fibrose cística (FC) é a ocorrência de infecções pulmonares crônicas, frequentemente causadas por *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). Sabe-se que o uso crônico de antimicrobianos aumenta a sobrevivência dos pacientes mas pode, ao longo do tempo, induzir a seleção de bactérias resistentes aos medicamentos. O objetivo do presente trabalho foi determinar, prospectivamente, os padrões de sensibilidade de amostras de *P. aeruginosa*, isoladas de secreções respiratórias de pacientes portadores de Fibrose Cística, atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCRP) da Universidade de São Paulo (USP), no período de abril de 2004 a abril de 2005, procurando associar este dado com a utilização de antimicrobianos e com algumas variáveis clínicas dos pacientes.

Casuística e métodos: Foram avaliadas 129 amostras de *P. aeruginosa* (62 mucóides; 67 não mucóides), provenientes de 34 pacientes portadores de FC, isoladas e identificadas segundo recomendações do CLSI. A avaliação da sensibilidade destas amostras à amicacina, gentamicina, cefepime, ceftazidima, ciprofloxacina e imipenem foi feita por meio do sistema automatizado MicroScan-Walkway, por método de difusão em placas (Kirby-Bauer) e por meio de teste de microdiluição em placas. No caso de divergência entre os resultados destes testes, adotou-se, como referência, o resultado do método de Kirby-Bauer. Para a determi-

nação da concentração inibitória mínima (CIM) utilizou-se, como *screening* do ponto de corte da CIM, o dobro da maior concentração proposta pelo CLSI para a cepa padrão de *P. aeruginosa* (ATCC 27853), em caldo Muller Hinton.

Resultados e Conclusões: O percentual de resistência aos antimicrobianos, no conjunto das amostras estudadas, foi de 47,3% para gentamicina, 39,5% para amicacina, 20,9% para cefepime, 15,7% para ciprofloxacina, 11,6% para ceftazidima e 7,8% para imipenem. Quando as amostras foram analisadas em conjunto, constatou-se aumento da resistência das amostras ao longo do tempo para amicacina, gentamicina, ceftazidima e ciprofloxacina. Quando analisadas individualmente, por paciente, verificou-se aumento da resistência ao longo do tempo para amicacina e gentamicina, sendo esse aumento bem evidente para cepas mucóides, e menos pronunciado para as cepas não mucóides. Houve também um aumento significativo da resistência para imipenem nas cepas mucóides e para ceftazidima, embora pouco pronunciado, tanto nas cepas mucóides como não mucóides. Não encontramos associação entre resistência aos antimicrobianos e tipo de cepa bacteriana, sexo do paciente, tempo de diagnóstico de FC, presença de agudizações da doença pulmonar e uso prévio de drogas específicas. Houve alto grau de discordância dos resultados do método de microdiluição em placas quando comparados com os resultados obtidos por meio do sistema automatizado MicroScan-Walkway e pelo método de Kirby-Bauer, especialmente para amicacina, imipenem e gentamicina, dessa maneira, é recomendável a utilização do método de Kirby-Bauer para a determinação final da sensibilidade de amostras de *P. aeruginosa* isoladas de secreção respiratória de pacientes com FC.

INIBIÇÃO DA REPLICAÇÃO DO VÍRUS DENGUE TIPO 2 POR RNA DE INTERFERÊNCIA EM CÉLULAS HUMANAS

Alessandra Cristina Gomes Ruiz

Orientador: Prof. Dr. Benedito Antônio Lopes da Fonseca
Tese de Doutorado apresentada em 07/05/2008

A dengue é atualmente considerada a mais importante arbovirose que afeta o homem em termos de morbida-

de e mortalidade. Estima-se a ocorrência de 100 milhões de casos de dengue ao ano em todo o planeta. A necessidade de um tratamento seguro e eficaz tem sido prioridade global, no entanto, nenhuma vacina efetiva para a dengue está disponível. Nesse estudo, a possibilidade de atenuar a infecção pelo dengue usando pequenos fragmentos interferen-

tes (siRNA) em células HepG2 e U937 foram avaliados. RNA de interferência (RNAi) é um fenômeno específico de silenciamento gênico pós-transcricional desencadeado pela produção de moléculas endógenas ou exógenas de RNA dupla fita (ds)RNA. As seqüências alvo para o silenciamento gênico (5' UTR, 3' UTR e prM) do genoma dos vírus dengue, foram alinhadas com os 4 sorotipos do vírus e seqüências homólogas selecionadas para a construção dos "hairpins" de RNA dupla (shRNA) posteriormente inseridos no vetor pSilencer®. Os DNAs plasmidiais contendo os "hairpins" foram, então, seqüenciados, purificados e utilizados para a transfecção estável em células HepG2 e transiente em células monocíticas U937. O desafio com DENV-2 com MOI 0,1 e 5, nos clones celulares expressando constitutivamente os "hairpins" em relação aos controles, através da análise por PCR em Tempo Real, mostraram-se capazes de atenuar a infecção causada pelo vírus. Entretanto, os "hairpins" 5' UTR

e prM se mostram mais efetivos no silenciamento que o 3' UTR. Paralelamente, a detecção de antígenos virais por imunofluorescência indireta nestes clones, expressando os "hairpins" em relação aos controles, mostrou uma redução do número de células infectadas. Através da detecção da fita de RNA intermediário por PCR, foi possível observar uma diminuição da replicação viral nessas células a partir do 3º dia de infecção com DENV-2 corroborando os demais resultados. Em células U937, o fenômeno de silenciamento gênico também foi observado, mas apenas 48hs pós-infecção, indicando posteriormente a perda do fenótipo previamente conferido a célula, pela presença do vetor expressando os shRNAs. Para excluímos a possibilidade de um efeito não específico, na redução da produção viral, a expressão relativa de genes estimulados por interferon, entre os clones celulares infectados e o mock, mostraram que os nossos shRNAs não induzem o sistema imune.

DIABETES MELLITUS E DOENÇAS ASSOCIADAS EM NIPO-BRASILEIROS DE MOMBUCA, GUATAPARÁ-SP

Regina Célia Garcia de Andrade

Orientador: Prof. Dr. Milton César Foss

Tese de Doutorado apresentada em 09/05/2008

É plenamente conhecida a relação da prevalência de doenças crônicas, como diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e doenças cardiovasculares, com diferentes etnias e sua distribuição geográfica segundo o estilo de vida. Populações de origem japonesa, que originalmente apresentavam baixa morbidade por diabetes, após mudanças socioculturais significativas, motivadas pela migração ao ocidente, passaram a apresentar, em um curto período de tempo, maior risco para desenvolver estas doenças. A comunidade nipo-brasileira de Mombuca, do Município de Guatapar-SP estabeleceu-se no Brasil nos anos 60, mantendo muitos de seus costumes tradicionais. O objetivo do estudo  estimar as prevalências de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e tolerância diminuída  glicose (TDG) na comunidade de Mombuca, Guatapar-SP, relacionando-as com alguns fatores de risco cardiovascular (FRCV). Trata-se de estudo transversal, realizado em 2005, com nipo-brasileiros com idade ≥ 20 anos e de ambos os sexos. Questionários socioculturais/saúde padronizados; realizadas medidas de pressão arterial, peso,

altura e circunferência abdominal. Coleta de sangue venoso para dosagem glicmica e lipídica. Dados expressos como médias (desvio padrão), intervalos de confiança ou porcentagens. Variáveis contínuas comparadas mediante teste t de Student ou ANOVA e as categóricas pelo teste qui² ou exato de Fisher. O nível de significância previamente estabelecido foi de 5%. Dos 131 participantes (67% da populao), a maioria (58,8%)  do sexo feminino; idade média de 55 anos (15,9). As prevalências de DM2 (13,7%) e de TDG (14,5%) foram maiores entre as mulheres (15,6 VS. 20,8%) do que entre homens (11,1 vs. 5,6%), respectivamente. Na distribuio por faixas etárias encontram-se coeficientes que variam de 14,3% na populao < 30 anos até 48,5% nos > 70 anos. Em relao aos FRCV, 76,3% apresentaram dislipidemia, 52,7% obesidade abdominal (OA), 48,1% hipertensão arterial (HA), 42,3% obesidade geral e 27,1% síndrome metabólica (SM - critério NCEP). Houve associao significativa de HA (Razão de Prevalências = RP = 2,10 e IC 95%: 1,46 - 2,99) e SM (RP= 4,10 e IC 95%: 2,39 - 7,05) com DM2 em relao aos normoglicêmicos. As prevalências de DM2, TDG e FRCV, superiores aos valores encontrados em Ribeirão Preto-SP (1996-97) são dados que permitem uma maior reflexão sobre o estilo de vida e outros fatores desencadeantes.

CARACTERIZAO DE NÓDULOS MAMÁRIOS POR TÉCNICAS QUANTITATIVAS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA

Ruth Helena de Moraes Bonini

Orientador: Prof. Dr. Valdair Francisco Muglia

Tese de Doutorado apresentada em 09/05/2008

A Ressonância Magnética (RM)  um método importante na investigao do câncer mamário. Embora reconhecida como método de escolha para o rastreo das paci-

entes de alto risco e para outras indicações, o papel da RM na caracterização de lesões mamárias permanece controverso. Recentemente, alguns autores têm defendido o uso de critérios morfológicos e pós-contraste dinâmico para este propósito. Técnicas quantitativas de RM não têm sido usadas extensamente na mama. Relaxometria T2 e Transferência de Magnetização (TM) são técnicas quantitativas muito utilizadas para investigação de doenças neurológicas. Nas doenças mamárias, o uso da TM tem sido limitado a melhorar a visualização de áreas de realce patológico em imagens pós-contraste e a relaxometria T2 foi empregada para avaliar tecidos mamários e lesões, usando, na maioria das vezes, seqüências duplo-eco.

O objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade e a utilidade da relaxometria T2 e da TM na diferenciação de lesões nodulares benignas de malignas. Cinquenta e quatro lesões de cinquenta pacientes, classificadas como Bi-RADS 4 ou 5 foram prospectivamente avaliadas usando análise morfofocinética, relaxometria T2 e Razão de Transferência de Magnetização (MTR), isoladamente ou em associação.

Os pacientes foram divididos em dois grupos, um de lesões benignas e outro de malignas. Um escore foi utilizado na análise morfofocinética para caracterizar as lesões. O valor de T2 e a MTR dos músculos peitorais, tecido fibroglandular, gordura e lesões mamárias foi calculado.

A análise morfofocinética isolada teve sensibilidade de 100% e especificidade de 78,9%. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre lesões benignas e malignas para o valor de T2. Uma diferença estatisticamente significativa foi encontrada para os valores de MTR das lesões benignas e malignas. Quando se associou o parâmetro MTR ao escore morfofocinético, usando o valor de 19,1, como discriminador de lesões benignas e malignas, a especificidade aumentou para 89,5%

Nossos resultados sugerem que a TM pode ser utilizada na avaliação de lesões mamárias, podendo ser usada para melhorar a especificidade da análise padrão, morfofocinética. Estudos adicionais são necessários para melhor definição da aplicabilidade desta técnica.

EXPRESSÃO DO RECEPTOR DE GLICOCORTICÓIDES E DA PROTEÍNA PRAME EM DOENÇAS LINFOPROLIFERATIVAS COM FENÓTIPO NK (*Natural Killer*)

André Fiorin Marinato

Orientador: Prof. Dr. Roberto Passetto Falcão

Dissertação de Mestrado apresentada em 14/05/2008

Os linfócitos *natural killer* (NK) e T/NK são células originadas na medula óssea que têm uma origem em comum, mas diferentes processos de maturação, resultando em linfócitos NK verdadeiros ou linfócitos T citotóxicos que expressam marcadores típicos da linhagem NK. Estas células podem originar neoplasias, cuja raridade dificulta seu melhor conhecimento e boas estratégias de tratamento. O receptor de glicocorticóides humano (RGh) possui várias isoformas, das quais destacam-se a α , mediador primário da ação dos corticóides, e a β , seu modulador negativo. A relação entre estas isoformas parece indicar a sensibilidade das células à ação dos corticóides, sendo mais sensível quanto maior a relação κ/β , mas esta informação nunca havia sido explorada nas doenças NK e T/NK. A proteína PRAME (*preferentially expressed antigen in melanoma*), um antígeno associado a tumores, já foi reconhecida em várias neoplasias hematológicas e tumores sólidos, com implicações diagnósticas e prognósticas, mas nunca foi estudada nas neoplasias NK e T/NK. Além disso, a PRAME representa um possível alvo terapêutico. Nesta investigação foram estudadas a expressão das isoformas do RGh em células leucêmicas de seis casos de doenças NK, 13 de doenças T/NK e em linfócitos NK e T/NK de 16 controles. A expressão proteica da PRAME foi investigada em seis casos de doenças NK, 12 de doenças T/NK e 10

controles. A citometria de fluxo foi o método de eleição para esta investigação. Os linfócitos NK e T/NK normais, assim como as células NK e T/NK leucêmicas, expressam as isoformas κ e β do RGh. No grupo das doenças NK, a expressão de RGh κ nas células leucêmicas foi semelhante à dos linfócitos NK normais ($p=0,44$, Mann Whitney), porém a expressão de RGh β foi significativamente menor nas células doentes ($p=0,03$), revelando uma relação κ/β maior nos linfócitos doentes ($p=0,01$). Entre as doenças T/NK, a expressão de RGh κ nas células leucêmicas foi maior do que nos linfócitos T/NK normais ($p=0,027$) e a expressão de RGh β foi menor nas células leucêmicas ($p=0,0001$), ocasionando uma relação α/β significativamente maior nas células doentes ($p=0,0001$). A proteína PRAME não se mostrou expressa na superfície dos linfócitos NK ou T/NK normais ou leucêmicos. Entretanto, houve expressão intracelular em mais de 87% das células NK e T/NK normais e em mais de 54% das neoplásicas. O estudo das isoformas κ e β do RGh em linfócitos NK e T/NK normais e leucêmicos é inédito, e sua análise quantitativa indica uma provável maior susceptibilidade das células NK e T/NK neoplásicas à ação dos corticóides, em relação aos linfócitos NK e T/NK normais. Os resultados da PRAME, pela primeira vez analisada em linfócitos NK e T/NK normais e leucêmicos, demonstram que este antígeno não é expresso na membrana celular nestas neoplasias, ao contrário do observado em outras doenças oncohematológicas. No entanto, encontramos expressão intracelular desta proteína tanto nos linfócitos normais quanto nos doentes analisados, o que não contribui para novas estratégias diagnósticas ou terapêuticas.

ESTUDO DA ISOFORMA NEURONAL DA SINTASE DE ÓXIDO NÍTRICO PRESENTE NO SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO PERIFÉRICO EM RATAS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSAS (SHR) ANTES E APÓS DESENVOLVEREM HIPERTENSÃO ARTERIAL

Andréia Fernanda Carvalho Leone Aguiar

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Barbosa Coelho

Tese de Doutorado apresentada em 14/05/2008

Neste trabalho, nosso objetivo foi investigar a função e a expressão da isoforma neuronal da enzima sintase de óxido nítrico (nNOS) em ratas Wistar normotensas (N) e espontaneamente hipertensas (SHR) em diferentes fases de desenvolvimento. Estudos a resposta vasoconstritora induzida pela estimulação elétrica de nervos simpáticos periarteriais (EEP) em leito arterial mesentérico (LAM) isolado e perfundido (Krebs, 4ml/min) de ratas N com 30 e 180 dias e SHR de mesma idade. Também foi investigado a influência da hipertensão arterial sobre a modulação nitrérgica da resposta simpática usando um inibidor seletivo para nNOS, S-metil-tiocitulina (SMTC) (20 μ M), além de western blot e histoquímica (NADPH-diaforase) do gânglio simpático mesentérico superior. A pressão arterial nos animais de 30 dias foi maior no grupo SHR quando comparada ao grupo N (132,0 \pm 1,0 vs 115,9 \pm 2,3, SHR; P=0,01) assim como aos 180d (183,0 \pm 1,3 vs 126,7 \pm 3,1; SHR; P=0,001). Em ambos os animais a pressão arterial se elevou com o envelhecimento (126,7 \pm 3,1 vs 115,9 \pm 2,3, N; P=0,01); (183,0 \pm 1,3 vs 132,0 \pm 1,0, SHR; P=0,001). A pressão basal de perfusão dos LAM isolados de N 30d e SHR 30d não apresentaram diferenças (15,5 \pm 0,4 vs 13,4 \pm 1,0). Entretanto houve um aumento nos animais SHR 180d quando comparados aos N 180d (26,9 \pm 0,9 vs 15,7 \pm 0,4). A resposta simpática à EEP mostrou que em SHR 30d houve um aumento da resposta vasoconstritora máxima à EEP, quando comparado com N 30d (183,1 [153,3-212,9] vs (78,2 [70,2-86,2] EMAX \pm EPM, P=0,001). O mesmo foi observado no grupo SHR 180d em relação ao grupo N 180d (171,1 [165,1-177,2] vs (106,1 [91,1-125,5] EMAX \pm EPM, P=0,003). Em animais SHR 180d houve um aumento da sensibilidade a EEP em relação ao SHR

30d (14,3 [13,8-14,9] vs (18,7 [15,4-22,0], FE₅₀ [IC95%], P=0,05). Em contraste, nos animais N 180d foi observado um aumento do efeito máximo em relação ao N 30d (106,1 [91,1-125,5] (78,2 [70,2-86,2] EMAX \pm EPM, P=0,002). A perfusão de SMTC não modificou a resposta a EEP em preparações de animais N 30d. Porém, a SMTC produziu um aumento da sensibilidade a EEP em preparações SHR 30d quando comparadas com SHR 30d na ausência do inibidor (15,3 [13,1-17,5] vs 18,7 [15,4-22,0], FE₅₀ [IC95%], P=0,04). O mesmo foi observado em preparações N 180d (14,8 [12,8-16,7] vs 18,8 [14,4-22,1], FE₅₀ [IC95%], P=0,03), não houve alterações entre as preparações de animais SHR 180d na presença ou na ausência de SMTC. A histoquímica do gânglio mesentérico superior mostrou diminuição significativa de neurônios NADPH-diaforase positivos SHR quando comparadas com N 30 e 180d (0,6 \pm 0,2 vs 2,8 \pm 0,4, P=0,001), (0,7 \pm 0,46 vs 2,4 \pm 0,4 P=0,007). O Western blot mostrou uma redução significativa na expressão proteica da nNOS em gânglio mesentérico superior dos animais SHR 180d quando comparados com animais N 180d (0,1 \pm 0,009 vs 0,3 \pm 0,01, P=0,005). Resumindo, os resultados desse trabalho mostram um menor número de neurônios NADPH-diaforase positivos no gânglio mesentérico superior de ratas SHR, presentes desde a fase de pré-hipertensão e mantidos durante a fase de hipertensão estabelecida, sugerindo uma relação causal entre a redução dos neurônios NADPH-diaforase positivos e o surgimento da hipertensão arterial nesse modelo. A análise dos dados funcionais e da expressão proteica da nNOS mostram que nas fases de pré-hipertensão há uma resposta adrenérgica exacerbada, modulada pelo NO, sugerindo um papel contra-regulador do óxido nítrico sobre a atividade adrenérgica. Nossos dados também mostram que esse mecanismo inicial se esgota com o tempo, uma vez que na fase de hipertensão estabelecida a atividade da enzima, assim como sua expressão encontram-se reduzidas.

ALTERAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA INDUZIDA PELA EXPANSÃO *in vitro* DE CÉLULAS PRECURSORAS HEMATOPOÉTICAS

Dalila Luciola Zanette

Orientadora: Profa. Dra. Angela Kaysel Cruz

Tese de Doutorado apresentada em 15/05/2008

O número total de células precursoras é o principal fator limitante para o uso do sangue de cordão umbilical (SCU) como fonte de células precursoras hematopoéticas

(CPHs). A expansão *in vitro* destas células seria uma alternativa promissora. No entanto, quando usadas em transplantes, as células expandidas geralmente não apresentam vantagens em relação às células frescas. Este estudo foi feito para acumular conhecimentos acerca dos mecanismos moleculares ativos nas CPHs cultivadas, com intenção de sugerir melhorias nos protocolos de expansão existentes.

As amostras de células CD34⁺ de SCU foram cultivadas com citocinas, na ausência de soro e estroma. No momento da purificação (t0) e depois de 3 dias de cultivo (t3), as células foi verificada por citometria de fluxo a porcentagem de células em apoptose, a de células com fenótipos primitivos (CD34⁺/CD38^{neg} e CD34⁺/CD90⁺) e duplamente positivas para CD34⁺ e CXCR4⁺. O potencial clonogênico e de diferenciação foi avaliado em ensaios de metilcelulose. Com o RNA das amostras foram feitos pools para gerar dois perfis de expressão gênica independentes, das células em t0 e em t3, usando microarrays de oligonucleotídeos. As amostras foram utilizadas individualmente para avaliar a expressão dos genes IL9R, SMAD6, BIRC5, CDC25C, WNT5B, WIF1, GSK3B, AKT1, Bmi-1, HOXB4 e CCND1 por PCR quantitativa em tempo real (qPCR). Foi encontrado um aumento médio de 2,8 vezes no número de total de células e pelo menos 80% das células expressavam o CD34 após o cultivo. O número absoluto de células CD34⁺/CD38^{neg} e CD34⁺/CD90⁺ aumentou 2 e 6 vezes, respectivamente. Havia uma maior porcentagem de células viáveis em t3 comparado com t0 (média de 75% e 63%, respectivamente). A porcentagem de células CD34⁺/CXCR4⁺ foi significativamente menor em t3.

O número absoluto e relativo de colônias, demonstrado pelos ensaios clonogênicos, não se alterou, indicando que a capacidade de diferenciação foi mantida pelas células cultivadas. Genes envolvidos com o ciclo celular e com a mitose estavam regulados positivamente em t3, como o CDC25C. A expressão dos genes reguladores intrínsecos de CPHs, HOXB4 e Bmi-1, estava significativamente diminuída em t3. Também foram confirmadas a menor expressão de CXCR4, que tem conhecida função de favorecer o homing; de GSK3B, que participa da via Wnt; e de WIF1, inibidor desta mesma via. Observamos a regulação positiva de genes como o IL9R, associado com proliferação através da via JAK/STAT; SMAD6, um regulador negativo da via TGF-1; WNT5B, um ligante da via de sinalização Wnt, e BIRC5, um inibidor da apoptose. Desta maneira, o uso deste protocolo de curto prazo expandiu o número de células CD34⁺, aumentou o número absoluto de células com fenótipo associado às CPHs, sem afetar a viabilidade e o potencial clonogênico destas células. A avaliação funcional das alterações da expressão gênica que acompanharam o cultivo deverá ajudar a melhorar os protocolos de expansão de CPHs mantendo as características celulares desejadas.

EXPOSIÇÃO A ALÉRGENOS DE CAMUNDONGO E RATO EM DOMICÍLIOS DE CRIANÇAS COM ASMA E/OU CHIADO EM RIBEIRÃO PRETO

Alessandra Santos Zampolo

Orientadora: Profa. Dra. Luisa Karla Paula Arruda

Dissertação de Mestrado apresentada em 20/05/2008

Estudos recentes têm identificado a importância de alérgenos de camundongo e rato como causa de sensibilização entre crianças com asma vivendo em grandes cidades nos Estados Unidos, e demonstraram que a combinação de sensibilização a camundongo e exposição domiciliar a níveis elevados de alérgeno de camundongo foi associada a maior morbidade por asma entre crianças pertencentes a famílias de baixa renda, predominantemente de raça negra. Em trabalhadores de laboratório, alérgenos de camundongo e rato são causa frequente de sensibilização e desenvolvimento de sintomas alérgicos. Os principais alérgenos de camundongo e rato, Mus m 1 e Rat n 1, respectivamente, pertencem à família das calicinas ou lipocalinas, que inclui alérgenos potentes de barata, cachorro e vaca. No presente estudo, utilizamos ensaio imunoenzimático (ELISA) para determinar os níveis de alérgenos de camundongo e rato em amostras de poeira de domicílios de crianças vivendo em Ribeirão Preto, que apresentaram crise aguda de chiado. Dos 113 domicílios analisados, 39 (34,5%) apresentaram níveis detectáveis de alérgeno de camundongo Mus m 1, e

14 (10,6%) foram positivo para alérgeno de rato Rat n 1. Análise de amostras de poeira de cama, quarto, sala de TV e cozinha de cada domicílio não mostrou diferença significativa entre a frequência de detecção de alérgeno de camundongo nos diferentes locais da casa. Os níveis de alérgenos de camundongo variaram de 0,04 a 3,7 µg Mus m 1 / g de poeira. Seis das amostras positivas para Mus m 1 (2,2%) continham valor acima de 1,6 µg de Mus m 1 / g de poeira, nível considerado elevado e associado a sensibilização. Os níveis de Rat n 1 variaram de 0,04 a 0,3 µg / g de poeira, e nenhuma das amostras apresentou valores acima de 1,6 µg Rat n 1 / g de poeira. Alérgeno de barata Bla g 1 foi detectado em 77% dos domicílios. Não houve correlação entre os níveis de Mus m 1 e Bla g 1 nos diferentes locais, e não ocorreu diferença dos níveis de Mus m 1 de acordo com a presença ou não de Bla g 1. Nossos resultados indicam que alérgenos de camundongo e rato foram encontrados em domicílios de crianças com crise aguda de chiado vivendo em Ribeirão Preto, e que níveis elevados foram detectados em uma proporção de domicílios. Estudos subsequentes deverão ser realizados para avaliar a sensibilização a esses alérgenos em nosso meio e para estabelecer o papel de alérgenos de camundongo e rato como fator de risco para chiado e asma.

EFEITO DO PARTHENOLIDE NA PATOGÊNESE DA GLOMERULONEFRITE MESANGIAL AGUDA INDUZIDA PELO VENENO DA COBRA HABU (TRIMERESURUS FLAVOVIRIDIS)

Alexandra Fabbris Verceze

Orientador: Prof. Dr. Márcio Dantas

Dissertação de Mestrado apresentada em 21/05/2008

O fator de transcrição nuclear factor-kappa B (NF-kappa B) participa da patogênese das glomerulopatias. Neste estudo avaliamos os efeitos da administração de parthenolide (PIN), um inibidor do NF-kappa B, na glomerulonefrite mesangial aguda (GMA) induzida pelo veneno da cobra habu (HSV). Material e Métodos: Camundongos uninefrectomizados foram tratados por via i. v. ou com HSV para indução de GMA ou com veículo durante 2 dias alternados. PTN diluído em dimetil-sulfóxido (DMSO) ou apenas DMSO foi administrado por via i.p., diariamente até o dia do sacrifício (7º ou 14º dia). Os camundongos dos grupos controle C-DMSO e C-PIN e com glomerulonefrite G-DMSO e G-PIN foram avaliados para creatinina sérica, área e nº de células do tufo capilar glomerular/(TCG). Por imunohistoquímica foram avaliadas a expressão glomerular e intersticial de α -smooth muscle actin (α -SMA), o nº de

células PCNA (proliferating cell nuclear antigen) positivas/TCG e o nº de macrófagos/TCG. Resultados: Todos os camundongos que receberam HSV desenvolveram quadro histopatológico de glomerulonefrite proliferativa mesangial focal, independentemente do tratamento com PIN, mas esta glomerulonefrite não resultou em albuminúria e tampouco em alteração da creatinina. Em comparação com seu respectivo controle C-DMSO, os camundongos do grupo G-DMSO apresentaram aumento estatisticamente significativo da área do TCG no 7º e no 14º, da expressão intersticial no 7º dia e, apenas no 14º dia, maior expressão glomerular de α -SMA e do nº de macrófagos/TCG. Entretanto, o grupo G-DMSO não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo G-PIN em nenhum dos dois momentos do estudo. Em conclusão, o tratamento com parthenolide aparentemente diminuiu a atividade de alguns mecanismos envolvidos com a patogênese da GMA induzida pelo HSV em camundongos. Entretanto, estes efeitos parecem ter ocorrido em intensidade inferior à esperada, talvez pela característica focal deste modelo experimental de GMA.

FATORES DE RISCO DE DIFICULDADE DE DEGLUTIÇÃO EM PACIENTES COM ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO

Anna Flávia Ferraz Barros Baroni

Orientador: Prof. Dr. Roberto Oliveira Dantas

Dissertação de Mestrado apresentada em 26/05/2008

A disfagia comumente está associada às desordens neurológicas graves, entre elas, o Acidente Vascular Encefálico (AVE). Os objetivos desse estudo foram: avaliar a deglutição em pacientes com AVE; avaliar a prevalência de dificuldade de deglutição nesses pacientes; analisar fatores que possam estar associados às alterações de deglutição como: idade, sexo, único ou múltiplos AVE, tipo de AVE, tempo e localização da lesão, expressão oral, compreensão oral, alterações motora e/ou de sensibilidade, alteração respiratória, presença de complicações como febre e pneumonia, e capacidade funcional; e relacionar a presença de dificuldade de deglutição com a realização de fonoterapia e a mortalidade após três meses do AVE. Foram selecionados 212 pacientes com diagnóstico médico de AVE, confirmado por meio de exame neurológico e exames de imagem. A avaliação funcional da deglutição foi realizada à

beira do leito por uma fonoaudióloga e os pacientes foram divididos em dois grupos: Grupo I: pacientes sem alteração de deglutição e Grupo II: pacientes com alteração de deglutição. Após três meses do AVE, foi verificada, subjetivamente, a melhora das alterações de fala e deglutição, a presença de óbito e a realização de fonoterapia. Verificou-se que 63% dos pacientes com AVE apresentaram alteração de deglutição. As variáveis sexo e localização da lesão não estavam associadas à presença ou não de dificuldade de deglutição. Os pacientes com maior chance de terem essa alteração foram aqueles que tinham: prévios episódios de AVE, AVE no hemisfério esquerdo, alterações motoras e/ou de sensibilidade, alterações na compreensão oral, expressão oral e nível de consciência, necessidade de auxílio de oxigênio, complicações como febre e pneumonia; e índices baixos nas escalas de Rankin e Barthel. Esses pacientes apresentaram maior tempo de internação e maior mortalidade. Assim, a deglutição deve ser avaliada em todos os pacientes com AVE, sendo necessário para evitar complicações, diminuir o tempo de internação e melhorar a qualidade de vida.

EFETOS DA PRÁTICA DO CANTO SOBRE PARÂMETROS FUNCIONAIS RESPIRATÓRIOS, SINTOMAS E QUALIDADE DE VIDA DE PACIENTES PORTADORES DE DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA

Amanda Gimenes Bonilha

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Baddini Martinez
Dissertação de Mestrado apresentada em 27/05/2008

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) está associada com alta morbidade e graves prejuízos da qualidade de vida, principalmente devido ao desenvolvimento de dispnéia e limitação para a realização de atividades físicas. O canto faz parte da condição humana desde tempos remotos. A respiração no canto cursa com inspirações rápidas e curtas; expirações lentas e prolongadas contra a glote semicerrada; uso do padrão respiratório costo-abdominal; grandes exigências da musculatura respiratória e requer amplo controle respiratório. Tais características da respiração no canto guardam o potencial de beneficiar pacientes com DPOC por possível melhora do controle e do padrão respiratório, treinamento da musculatura respiratória, redução da dispnéia e melhora da qualidade de vida. Os objetivos deste estudo foram investigar em pacientes com DPOC estáveis os efeitos imediatos do ato de cantar sobre parâmetros funcionais respiratórios, cardiovasculares e intensidade da dispnéia, no início da prática do canto e ao final de seis meses de treinamento. Além disso, também foram investigados os efeitos tardios sobre parâmetros funcionais respiratórios, intensidade da dispnéia, grau de ansiedade e depressão, e medidas de qualidade de vida relacionada à saúde, após seis meses de prática. Para tanto, 30 pacientes foram divididos em dois grupos: Grupo Canto (GC; 12 homens; idade: $69,8 \pm 7,4$ anos; VEF1: $48,8 \pm 20,8$ %) e Grupo Atividades Manuais (GAM; 12 homens; idade: $73,6 \pm 7,5$ anos; VEF1: $53,4 \pm 20,1$ %). Ambos os grupos participaram de 24 aulas semanais de canto ou de atividades manuais,

sendo o último o grupo controle. Os resultados foram expressos como valores absolutos das variações das medidas finais em relação às iniciais. A avaliação dos efeitos imediatos foi realizada após três aulas e repetida ao término de 24 sessões, e foi composta por medidas realizadas antes, durante e após o ato de cantar. Na avaliação após três aulas, o GC mostrou, logo após o ato de cantar, variações significativamente maiores de capacidade inspiratória (GC: $0,09 \pm 0,21$ X GAM: $-0,09 \pm 0,20$ L), FR (GC: $3,1 \pm 3,5$ X GAM: $1,1 \pm 2,1$ ipm), SaO₂ (GC: $1,5 \pm 2,1$ X GAM: $-0,2 \pm 1,1$ %) e dispnéia (GC: $1,3 \pm 1,6$ X GAM: 0 ± 1) e menores do volume de reserva expiratório (GC: $-0,07 \pm 0,17$ X GAM: $0,10 \pm 0,13$ L). Comportamento semelhante foi observado após 24 aulas (VRE= GC: $-0,01 \pm 0,11$ X GAM: $0,09 \pm 0,14$ L; CI= GC: $0,14 \pm 0,25$ X GAM: $-0,08 \pm 0,18$ L; FR= GC: 2 ± 1 X GAM: $0,07 \pm 1,71$ ipm; Dispnéia= GC: $0,47 \pm 0,74$ X GAM: $-0,33 \pm 0,62$). Na avaliação dos efeitos tardios foram obtidas, antes e após a intervenção: espirometria, gasometria arterial, medidas de pressões respiratórias, medida de dispnéia pelo índice de dispnéia basal, escala de ansiedade e depressão, e avaliações de qualidade de vida pelos questionários de Saint George e SF-36. Ao final do treinamento o GC mostrou ganhos significativamente maiores de pressão expiratória máxima (GC: $3 \pm 17,2$ X GAM: $-11,3 \pm 20,2$ cmH₂O) e do componente físico do questionário SF-36 (GC: $3,96 \pm 6,00$ X GAM: $-2,06 \pm 7,11$). Houve também ganhos de qualidade de vida de grau semelhante em ambos os grupos pela análise do questionário de Saint George (GC: $-5,92 \pm 5,75$ X GAM: $-5,00 \pm 7,75$). Os resultados obtidos indicam que a prática do canto leva a reduções transitórias do grau de hiperinsuflação pulmonar. Além disso, também pode reduzir o ritmo de deterioração da pressão expiratória máxima e melhorar aspectos ligados a qualidade de vida dos pacientes com DPOC.

ESTUDO DA DEGLUTIÇÃO EM PACIENTES COM MIOPATIA MITOCONDRIAL DO TIPO OFTALMOPLEGIA EXTERNA CRÔNICA PROGRESSIVA : AVALIAÇÃO CLÍNICA, MANO MÉTRICA E VIDEOFLUOROSCÓPICA

Danielle Ramos Domenis

Orientador: Prof. Dr. Roberto Oliveira Dantas
Dissertação de Mestrado apresentada em 27/05/2008

As miopatias mitocondriais formam um grupo de desordens clinicamente heterogêneas que podem afetar múltiplos sistemas além do músculo esquelético. A oftal-

moplegia externa crônica progressiva (CPEO) é um tipo de miopatia mitocondrial que tem como características alterações nos movimentos oculares, ptose, podendo ter acometimento da musculatura facial, além de atrofia muscular de membros. A fadigabilidade precoce pode ser a queixa principal e claramente desproporcional ao grau de fraqueza e atrofia muscular detectada. A disfagia na doença é uma

manifestação descrita por muitos autores, porém pouco estudada ou caracterizada. O presente estudo teve como objetivo avaliar a deglutição de pacientes com miopatia mitocondrial do tipo CPEO através de avaliação clínica, manométrica e videofluoroscópica. Para tanto, foram selecionados 14 pacientes com diagnóstico de miopatia mitocondrial do tipo CPEO, em acompanhamento no Ambulatório de Doenças Neuromusculares do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, independente de apresentarem queixas ou não quanto à alimentação. A idade variou de 15 a 62 anos, com idade média de 35,3 anos sendo 5 (35,7%) do gênero masculino e 9 (64,3%) do feminino. O grupo controle foi formado por 16 indivíduos saudáveis (sem doenças neurológicas ou queixas quanto à alimentação) com idade variando de 21 a 44 anos, idade média de 27,5 anos, sendo 6 (37,5%) do gênero masculino e 10 (62,5%) do feminino. Na avaliação clínica, além da anamnese, foi realizada avaliação estrutural e funcional da deglutição. Para isso foram utilizadas as consistências pastosa, líquida e sólida, em volume livre, conforme hábito do paciente. Na avaliação manométrica, as medidas foram feitas durante a deglutição líquida, para avaliar as pressões intraluminares no corpo do esôfago. Foram realizadas 10 deglutições com intervalo de 30 segundos entre elas e após cinco minutos de repouso mais 10 deglutições com intervalo de 10 segundos entre elas. Foram consideradas as medidas da pressão intraluminal, sua duração, área sob a curva e tempos parciais e totais de deslocamento da onda. Na avaliação videofluoroscópica utilizaram-se as dietas pastosa, líquida e sólida, sendo as duas primeiras em volume controlado de 5ml. Para todas as consistências foram realizadas três ofertas, sendo que para o pastoso e sólido esse processo foi repetido. Além da

dinâmica da deglutição na fase orofaríngea foram analisados os tempos de fase oral (TFO), depuração faríngea (DF), trânsito faríngeo (TF), trânsito pela transição faringoesofágica (TTFE) e tempo de movimentação hióidea (TMH). Em anamnese observamos que 9 (64,3%) pacientes tinham queixas quanto a alimentação mas apenas 7 (50%) apresentaram alterações na avaliação clínica, sendo essas alterações principalmente para as consistências pastosa (57,1%) e sólida (100%). As principais alterações foram fase oral prolongada, mastigação inadequada, deglutições múltiplas e fadiga. Na avaliação manométrica foi observado redução da motilidade esofágica sendo essa principalmente no esôfago proximal, com amplitude, duração e área sob a curva reduzidas. Quando comparado o desempenho do esôfago nos diferentes intervalos de deglutição, não houve relação com a presença da doença, pois a diferença foi significativa tanto para os pacientes como para os controles. Na videofluoroscopia da deglutição, assim como na avaliação clínica, as principais alterações encontradas foram para as consistências pastosa e sólida, sendo elas tanto em fase oral como faríngea. Apesar disso não foi encontrado nenhum episódio de aspiração laringotraqueal. Quanto aos tempos de deglutição, apenas o TFO foi significativamente maior nos pacientes, sendo menor nos outros parâmetros como TF e TTFE. Ao compararmos as primeiras com as últimas deglutições para as consistências pastosa e sólida, verificamos que os pacientes apresentaram um aumento dos tempos de DF, TF, TTFE e TMH para a consistência sólida, sendo significativa apenas para TF. O estudo permitiu concluir que pacientes com miopatia mitocondrial do tipo CPEO apresentam dificuldades de deglutição, com alterações orofaríngeas e esofágicas, sendo maiores para as consistências pastosa e sólida.

PREVALÊNCIA DA CONSTIPAÇÃO INTESTINAL CRÔNICA E SUA RELAÇÃO COM QUALIDADE DE VIDA EM PACIENTES IDOSOS ATENDIDOS EM AMBULATÓRIO DE HOSPITAL PÚBLICO DE NÍVEL TERCIÁRIO

Patrícia Teixeira Meirelles Villela

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Brandt de Oliveira

Dissertação de Mestrado apresentada em 27/05/2008

O estudo, de caráter descritivo transversal, teve como objetivos verificar a prevalência de constipação intestinal crônica entre os pacientes do ambulatório de geriatria geral do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e a influência da constipação intestinal sobre a qualidade de vida desses pacientes. Foram entrevistados 620 pacientes, de ambos os gêneros, com idade igual ou superior a 60 anos. Os dados foram coletados entre setembro de 2006 a maio de 2007. As entrevistas foram realizadas pela pesqui-

sadora, com questionário próprio para: identificação da presença, ou não, de constipação intestinal conforme os critérios Roma 11, e para a obtenção das seguintes variáveis: gênero, idade, uso de laxante e duração de constipação. Um instrumento medir qualidade de vida relacionada a saúde (SF- I 36) foi aplicado nos últimos 120 pacientes entrevistados, apresentassem ou não a constipação intestinal, o SF-36 se divide em oito domínios: Capacidade Funcional, Aspecto Físico, Dor, Estado Geral de Saúde, Vitalidade, Aspecto Social, Aspecto Emocional, Saúde Mental. Foram excluídos pacientes com: déficit cognitivo grave, conforme avaliação médica, deficiência física, pacientes acamados, pacientes que, por algum motivo, após aceitarem participar

da pesquisa, apresentaram sinais de desconforto físico, I ansiedade intensa ou outra reação emocional no início ou durante a aplicação do questionário. Resultados e Conclusão: Dos 620 pacientes entrevistados, 306 (49,3%) apresentavam constipação intestinal crônica, cuja prevalência foi significativamente maior ($p=0,004$) entre as mulheres (203 das 428, 47,4 %) do que entre os homens (54 dos 192 homens, 28,1 %). O estudo mostrou também a associação estatisticamente significativa entre gênero feminino e uso de laxante ($p < 0,001$). O gênero masculino tem risco 40,4%

menor do que o gênero feminino de desenvolver constipação intestinal crônica ($p=0,003$) e o risco de ter constipação aumenta 2,3% a cada ano em ambos os gêneros ($p=0,042$). qualidade de vida dos pacientes constipados foi significativamente menor do que a qualidade de vida dos pacientes não constipados, conforme todos os domínios do instrumento (SF-36). A menor média dos escores dos domínios foi a vitalidade. O estudo obteve resultados satisfatórios de consistência Interna segundo Alfa de Crombach acima de 0,8 em todos os domínios do instrumento.

RELAÇÃO ENTRE HOMOCISTEÍNA E PARÂMETROS DO ESTADO NUTRICIONAL EM PACIENTES MANTIDOS EM DIÁLISE

Carla Cristina Silva de Almeida

Orientadora: Profa. Dra. Paula Garcia Chiarello
Dissertação de Mestrado apresentada em 04/06/2008

O acúmulo de Homocisteína (Hcy) é reconhecido como fator de risco para doenças cardiovasculares (DCV) e, em pacientes em diálise, esta associação pode estar invertida, demonstrando que uma redução, ao invés de um aumento na concentração de Hcy, pode ser preditor de resultados clínicos ruins e de DCV, fenômeno este referido como epidemiologia reversa. Dessa forma, o presente estudo objetiva que o esclarecimento das relações entre homocisteína, parâmetros indicadores do estado nutricional (bioquímicos, antropométricos e dietéticos), estado inflamatório e fatores de risco tradicionais para doenças cardiovasculares em pacientes tratados com diálise, na presença ou não da síndrome subnutrição-inflamação, possam esclarecer o significado da hiperhomocisteinemia nestes grupos. A hiperhomocisteinemia foi constatada em grande parte dos pacientes em ambos os grupos (88,2% em HD e 81 % em PD), com prevalência total de 85,7%, sendo 60% na forma leve e 25,7% na forma moderada, embora os pacientes não tenham apresentado deficiências de ácido fólico e vitamina B₁₂. Por meio da pontuação aumentada da Avaliação Subjetiva Global (AGS) e importante prevalência de

hipoalbuminemia (69%), constatou-se a presença de subnutrição acompanhada de inflamação, conforme foi observado pelo aumento das citocinas inflamatórias (100% apresentavam Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) acima dos valores de referência, 43% apresentavam Interleucina-6 (IL-6) aumentada e 47% apresentavam Proteína-C reativa (PCR) aumentada. A Hcy se correlacionou positivamente com albumina e creatinina e negativamente com Colesterol Total (CT), Lipoproteína de Alta Densidade (HDLc), Prega Cutânea do Tríceps (PCT), % de gordura corporal, ácido fólico e vitamina B₁₂. Os principais determinantes da hiperhomocisteinemia nesses pacientes foram o próprio método de diálise, a Circunferência Muscular do Braço (CMB), creatinina, creatina-kinase (Ck), HDLc e ácido fólico. Entretanto, o melhor modelo que explicaria o aumento da concentração plasmática de Hcy nesses pacientes foi determinado pela diálise, creatinina, Ck, ácido fólico e CT. Conclui-se, portanto, que os pacientes estudados apresentavam a Síndrome Subnutrição-Inflamação, a qual poderia contribuir para o aumento da concentração plasmática de Hcy, sendo que alguns dos principais marcadores nutricionais que poderiam determinar essa hiperhomocisteinemia corroboram os achados de alguns autores quanto à presença do fenômeno da Epidemiologia Reversa nesses grupos.

EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO NA MOBILIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO CIRCULANTES: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE INDIVÍDUOS NORMAIS E PORTADORES DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

Camila Quaglio Bertini

Orientadora: Profa. Dra. Belinda Pinto Simões
Dissertação de Mestrado apresentada em 26/06/2008

Introdução: Ainda que o princípio da regeneração miocárdica pela terapia celular já tenha alcançado o pata-

mar da aplicação clínica em humanos, muito ainda resta para ser compreendido sobre os mecanismos fisiológicos envolvidos na cinética das células envolvidas na reparação tissular e os mecanismos farmacológicos e fisiológicos de mobilização/circulação e alojamento nos tecidos que necessitam de reparo. O exercício físico é conhecidamente um

estímulo fisiológico mobilizador de células-tronco hematopoéticas e possivelmente facilitador do processo de regeneração dos tecidos lesados. Em sua maioria, porém, os trabalhos que avaliam o papel do exercício físico incluem pacientes portadores de cardiopatia tanto isquêmica quanto não isquêmica. Neste sentido foi selecionado um grupo de pacientes bastante restrito cuja causa de insuficiência cardíaca era de origem hipertensiva e/ou diabética excluindo-se casos de isquemia miocárdica. Para tal foi avaliado o papel do exercício físico, na forma de um teste ergométrico sintoma-limitado, como estímulo para mobilização de três células envolvidas no processo de dano/reparo tissular: célula-tronco hematopoética, célula progenitora endotelial e célula endotelial circulante.

Resultados: O exercício físico foi capaz de mobilizar

os três tipos celulares para o sangue periférico de indivíduos adultos saudáveis e nos indivíduos diabéticos/hipertensos sem cardiopatia ($p < 0,05$). Nos indivíduos portadores de miocardiopatia de origem diabética e hipertensiva apenas as células endoteliais circulantes aumentaram com o esforço físico ($p < 0,05$), não havendo aumento das outras duas células.

Conclusão: o exercício físico em pacientes portadores de diabetes mellitus e hipertensão é capaz de mobilizar células progenitoras (hematopoéticas e endoteliais), o que não ocorre no grupo com comprometimento cardíaco estabelecido. O aumento das CECs em cardiopatas reflete a ocorrência de lesão tissular, neste grupo não secundária à isquemia miocárdica, mas secundária à disfunção endotelial.

FARMACOLOGIA

PAPEL DA QUIMIOCINA MIP-1 α E DO RECEPTOR CCR2 EM LESÕES PERIAPICAIAS OSTEOLÍTICAS EXPERIMENTAIS

Thiago Pompermaier Garlet

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha
Dissertação de Mestrado apresentada em 09/04/2008

Lesões periapicais são alterações ósseas dos maxilares, decorrentes de processos infecciosos da polpa dentária. Com a progressão do processo para o periápice ocorre a liberação de mediadores e a migração de células inflamatórias, desencadeando uma resposta inflamatória e destruição tecidual, com a reabsorção dos tecidos mineralizados de suporte, comprometendo a sustentação do elemento dental. Sabe-se que diferentes citocinas e quimiocinas participam do processo de osteoclastogênese e reabsorção óssea em diferentes doenças, mas o papel destes mediadores na patogênese das lesões periapicais não está bem definido. O objetivo deste trabalho foi estudar o papel da quimiocina MIP-1 α e do receptor CCR2 em um modelo

de lesão periapical em camundongos, utilizando animais geneticamente deficientes para CCR2, o receptor de MCP-1, e de MIP-1 α . A lesão periapical foi induzida por meio de exposição pulpar cirúrgica com o auxílio de uma broca 1/4 e inoculação de bactérias patogênicas. Os animais foram sacrificados nos tempos de 0, 3, 7, 14 e 21 dias. Os animais MIP-1 α KO apresentaram lesões semelhantes às dos animais selvagens, enquanto os animais CCR2 KO apresentaram lesões de maior extensão. Da mesma forma, os animais MIP-1 α KO apresentaram uma cinética de expressão de citocinas e quimiocinas similar aos animais selvagens, enquanto os animais CCR2 KO apresentaram uma maior expressão de fatores relacionados à diferenciação e atividade de osteoclastos, e de migração de neutrófilos. Os resultados sugerem que nenhuma das quimiocinas estudadas é indispensável na osteoclastogênese, e que o receptor CCR2, é importante na proteção do hospedeiro frente à destruição óssea periapical.

ENVOLVIMENTO DO SULFETO DE HIDROGÊNIO, ÓXIDO NÍTRICO, MONÓXIDO DE CARBONO E DA BILIVERDINA NA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS

Daniela Dal Secco

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha
Tese de Doutorado apresentada em 28/04/2008

No presente estudo investigamos o papel do sulfeto de hidrogênio (H₂S) no rolamento, adesão e migração dos

neutrófilos durante a resposta imune inata ou adaptativa. Observamos que o H_2S aumenta a migração neutrofílica para as cavidades peritoneal ou articular induzida por LPS (resposta inata) ou mBSA (resposta adaptativa). Este efeito do H_2S associa-se com uma potencialização do rolamento e adesão leucocitária no endotélio venular, devido ao aumento da expressão das moléculas de adesão P-selectina e ICAM-1 nas células endoteliais, e também da quimiotaxia dos neutrófilos. Confirmando que o aumento das moléculas de adesão está envolvido com o efeito do H_2S , observamos que este mediador não potencializa a adesão e migração dos neutrófilos induzidas por LPS em camundongos deficientes em ICAM-1 (ICAM-1^{-/-}) ou em seu ligante β_2 -integrina (β_2 -integrina^{-/-}). Observamos também que o H_2S não altera a produção dos mediadores quimiotáticos para neutrófilos (TNF- κ , KC e LTB₄) induzida por LPS ou mBSA, sugerindo que o efeito do H_2S sobre a migração de neutrófilos não envolve, além da expressão das moléculas de adesão e a quimiotaxia, a síntese e/ou liberação de mediadores quimiotáticos. Em relação aos efeitos do H_2S sobre a quimiotaxia, demonstramos que ele aumenta a quimiotaxia de neutrófilos induzida por CXCL8 (IL-8) ou CXCL2 (MIP-2). Este efeito deve-se possivelmente a prevenção da internalização do receptor quimiotático destas quimiocinas, o CXCR2. Além disso, verificamos que há aumento da atividade da enzima formadora de H_2S , a cistationina- γ -liase (CSE), em neutrófilos. Todos os efeitos produzidos pelo H_2S sobre os parâmetros acima citados parecem decorrer da abertura de

canais de potássio sensíveis ao ATP (K^+_{ATP}). Essa sugestão baseia-se no fato de que a glibenclamida, inibidor desses canais, previne os efeitos induzidos pelo H_2S ; enquanto que o diazoxide, um abridor dos mesmos, apresenta efeitos semelhantes aos do H_2S . Por outro lado, demonstramos que os efeitos do H_2S não decorrem da ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), visto que o inibidor dessa enzima (ODQ) não previne os efeitos do H_2S , ao contrário, os efeitos do ODQ somam-se aos do H_2S . No presente estudo investigamos, ainda, os mecanismos pelos quais o óxido nítrico (NO), e os produtos da heme oxigenase-1 (HO-1), monóxido de carbono (CO) ou biliverdina inibem a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por LPS. Observamos que estes mediadores inibem o recrutamento neutrofílico por reduzirem a expressão de ICAM-1, e conseqüentemente, a adesão leucocitária. Além disso, os efeitos do NO e CO, diferentemente daqueles do H_2S , são decorrentes da ativação da GCs, visto que na presença de ODQ, os efeitos destes mediadores foram inibidos. Ademais, os efeitos antiinflamatórios do NO são mediados indiretamente através da ativação da HO-1, visto que a inibição da atividade dessa enzima previne os efeitos do NO. Em conjunto, os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que o H_2S , NO, CO e a biliverdina são importantes mediadores envolvidos no controle da migração neutrofílica, atribuindo-lhes o status de importantes alvos para desenvolvimentos de novas farmacoterapias dirigidas ao manejo de diversas doenças de origem inflamatória.

ESTUDO DA RESPOSTA FEBRIL ONDUZIDA POR PERITONITE CAUSADA PELA i.p. DE *Escherichia coli*

Denis de Melo Soares

Orientadora: Profa. Dra. Glória Emília Petto de Souza
Tese de Doutorado apresentada em 09/05/2008

Tem sido sugerido que modelo de febre por toxinas (Ex. SEB e LPS) não é fisiologicamente relevante, pois durante uma infecção não há uma grande quantidade de toxina liberada de uma só vez, como as quantidades injetadas nestes experimentos. A injeção de *E. coli* subcutaneamente em ratos promove o aparecimento de resposta febril anteriormente ao aumento da concentração plasmática de IL-1 e TNF- α mediadores considerados importantes para a resposta febril induzida pelo LPS. A injeção de uma só vez, de grande quantidade das toxinas induz uma gama de mediadores que não necessariamente estão envolvidos na resposta febril, possivelmente mascarando os mediadores realmente importantes. Poucos estudos envolvendo resposta febril são realizados com a utilização de bactérias vivas sendo necessário um melhor entendimento desse modelo,

uma vez que, mimetiza melhor a infecção. Desse modo o presente estudo objetivou a padronização do modelo de indução de resposta febril por infecção causada por *E. coli* comparando os mediadores envolvidos neste modelo com os conhecidamente importantes para a febre induzida pelo LPS. Também investigamos o efeito do tratamento com diferentes antipiréticos sobre a febre e sobrevida dos ratos infectados na busca do entendimento sobre a importância da resposta febril para a defesa do hospedeiro. Ratos controles (SAL) e os que receberam a dose de 10^3 UFC não desenvolveram resposta febril. Já os ratos que receberam 10^6 e 10^8 UFC apresentaram resposta febril. A dose de $2,5 \times 10^8$ UFC promoveu uma resposta febril considerável com uma baixa mortalidade (20%). Esta foi a dose escolhida para avaliar o efeito dos antipiréticos na resposta febril por se tratar de um estímulo não-severo, uma vez que os estímulos com 5×10^8 e 10^9 UFC apesar de causar febres robustas, resultaram em choque séptico e na morte rápida de todos os animais. O aumento da temperatura corporal induzido

pela *E. coli* foi acompanhado por uma diminuição da temperatura da cauda dos animais, característico de febre, mas não de hipertermia. Foi realizada contagem de bactérias no lavado peritoneal e sangue no pico (3 h) de febre induzida pela injeção de *E. coli* com as respectivos valores de Log UFC ml⁻¹: Sangue = 2,5±0,2; Lavado Peritoneal = 6,5±0,19. Os pré-tratamentos com dipirona (240 mg/kg) e paracetamol (300 mg/kg) promoveram melhora na sobrevida dos animais, ao passo que tanto o diclofenaco como o celecoxibe causaram uma piora na sobrevida dos animais. A indometacina promoveu uma considerável redução da febre na dose de 8 mg/kg, mas não na dose de 2 mg/kg. As duas doses de indometacina promoveram piora na sobrevida. A dexametasona, não alterou a febre nem a sobrevida causada pela *E. coli*. O ibuprofeno não alterou a febre, mas 3 doses causaram piora na sobrevida dos animais. A injeção i.p. de 2,5 x 10⁸ UFC *E. coli* induziu um aumento na concentração de PGE2 no CSF dos ratos 0,5; 3; 12; 24 e 48 horas após esta administração. O pico de aumento coincidiu com o pico de temperatura (3h). Observaram-se também quantidades significantes de TNF- α , IL-1 β e IL-6, 3 h após a infecção no soro dos animais que receberam 2,5 x 10⁸ UFC/cavidade foram detectados. Nos exudatos peritoneais foram detectados TNF- α , IL-1 β e IL-6 no período de 0,5 e 3 h após a infecção. Não houve detecção das citocinas no CSF dos

ratos que receberam esta dose. Por outro lado, no soro e exudato animais que receberam 10⁹ UFC/cavidade houve detecção de 2 vezes mais de IL-1 β e IL-6 do que o encontrado nos que receberam 2,5 x 10⁸ UFC. Encontrou-se o dobro da concentração de TNF- α no soro, mas no exudato, apesar de ser maior que a encontrada na dose menor, foi menor que o ocorrido para o período de 0,5 na dose menor demonstrando ocorrer um rápido aumento desta citocina no local da injeção. No CSF dos animais que receberam a dose de 10⁹ UFC/cavidade ocorreu a detecção de TNF- α , IL1 β e IL-6. O pré-tratamento com o antagonista de receptores de IL-1, o IL-1ra, não alterou a febre causada pela *E. coli*. O pré-tratamento com o receptor solúvel de TNF (sTNFr), não alterou a febre causada por 10⁸ UFC/cavidade de *E. coli*. Nenhum dos antagonistas dos receptores de endotelina (ET_A BQ 123 ou ETB BQ 788) ou de bradicinina (B₂ HOE-140 ou B1 DALBK) alteram a febre induzida tanto pela *E. coli*. O tratamento com o anticorpo anti IL-6 inibiu a febre induzi da pela *E. coli*. Com base nos achados acima demonstrados é possível concluir que o modelo de febre induzida pela bactéria viva reproduz bem um quadro infeccioso, os mediadores diferem daqueles envolvidos na febre do LPS. Além disso, nossos dados reforçam a necessidade de estudos aprofundados sobre os antipiréticos devido ao uso indiscriminado durante quadros infecciosos.

O PAPEL DO COMPLEMENTO C5A NA HIPERNOCICEPÇÃO MECÂNICA INFLAMATÓRIA: O POTENCIAL DO USO DE ANTAGONISTAS DO RECEPTOR C5A PARA O CONTROLE DA DOR INFLAMATÓRIA

Elizabeth Ting

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira
Tese de Doutorado apresentada em 15/05/2008

O fator C5a é um produto liberado na ativação do sistema complemento, exibe um amplo espectro de atividades inflamatórias, particularmente quimioatração de neutrófilos. No presente estudo, o papel do C5a na gênese da hipernocicepção inflamatória foi investigada em ratos e em camundongos utilizando o antagonista específico do receptor C5a, PMX53 (AcF-[OP (D-Cha) WR]). A hipernocicepção mecânica foi avaliada através do teste de Randall-Selitto modificado em ratos e o teste de Von Frey eletrônico modificado em camundongos. As citocinas foram medidas pelo método de ELISA e a migração de neutrófilos foi determinada indiretamente pela atividade de mieloperoxidase (MPO). O pré-tratamento local dos ratos com PMX53 (60-180 μ g/pata) inibiu a hipernocicepção induzida por zimosan, carragenina, lipopolissacarídeo (LPS) e antígeno (OVA). Estes efeitos estão associados ao bloqueio do receptor C5a. O PMX53 foi capaz também de inibir a hipernocicepção

induzida pelo soro ativado por zimosan (ZAS) e o próprio C5a, mas não quando os mediadores hipernociceptivos eram prostaglandina E₂ e dopamina que exercem ações diretas sobre o receptor da membrana na fibra aferente primária (nociceptor). Paralelamente aos mecanismos hipernociceptivos envolvendo C5a, PMX53 não alterou a liberação de citocinas induzida por estímulos inflamatórios. No entanto, PMX53 inibiu a hipernocicepção induzida por citocinas. O PMX53 também inibiu o recrutamento de neutrófilos induzido por zimosan, mas não por carragenina ou LPS, indicando uma participação de neutrófilos no efeito hipernociceptivo induzido por C5a. Além disso, a hipernocicepção induzida por C5a foi diminuída em ratos com depleção de neutrófilos. Em camundongos, o PMX53 foi capaz de reduzir a hipernocicepção articular induzida por zimosan ou TNF- α . Estes resultados sugerem que C5a é um importante mediador hipernociceptivo inflamatório que participa de um mecanismo independente da liberação de citocinas hipernociceptivas, porém dependentes da presença de neutrófilos. Com isso, a inibição de C5a parece ter um potencial para constituir uma nova terapia para o controle da dor inflamatória.

ENVOLVIMENTO DO SISTEMA DE NEUROTRANSMISSÃO SEROTONÉRGICO DO NÚCLEO DORSAL DA RAFE E DA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL NA MEDIAÇÃO DE COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS ASSOCIADOS AOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE GENERALIZADA E DO PÂNICO

Roger Luís Henschel Pobbe

Orientador: Prof. Dr. Hélio Zangrossi Júnior

Tese de Doutorado apresentada em 02/06/2008

O núcleo dorsal da rafe (NDR), juntamente com o núcleo mediano da rafe (NMR), representa a principal fonte de neurônios serotonérgicos que se projetam ao encéfalo anterior por vias ascendentes. Evidências experimentais apontam para o envolvimento de duas vias distintas que partem deste núcleo, a prosencefálica, innervando a amígdala e o córtex frontal, e a periventricular, que envia projeções para a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD), na mediação de respostas defensivas que têm sido relacionadas à ansiedade (ex. esquiva inibitória) e ao medo (ex. fuga). Em termos de fisiopatologia, tais comportamentos têm sido associados, respectivamente, aos transtornos de ansiedade generalizada e do pânico.

Na primeira etapa deste trabalho, investigamos o envolvimento de uma área encefálica que tem sido relacionada ao controle da atividade de neurônios serotonérgicos localizados no NDR, a habênula lateral (HbL), na mediação dos comportamentos defensivos de esquiva inibitória e de fuga de ratos expostos ao labirinto em T elevado (LTE). Para tal, ratos *Wistar* foram submetidos à lesão eletrolítica da HbL ou à implantação de cânulas nessa mesma estrutura, visando a estimulação química por meio da infusão local do aminoácido excitatório ácido caínico. Nossos dados mostraram que a lesão eletrolítica da HbL prejudicou a esquiva inibitória e facilitou a resposta de fuga dos animais no LTE. Já a estimulação química dos neurônios da HbL produziu efeito oposto, ou seja, facilitou a esquiva inibitória e prejudicou a resposta de fuga.

Subseqüentemente, verificamos o efeito do bloqueio dos receptores serotonérgicos dos tipos 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} da SCPD e dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA do NDR, previamente à estimulação química dos neurônios da HbL. Os dados obtidos revelaram que a infusão prévia de WAY-100635 (antagonista de receptores do tipo 5-HT_{1A}) na SCPD reverteu o efeito da administração intra-HbL de ácido caínico sobre a resposta de fuga. Já a injeção prévia de quetanserina (antagonista preferencial de receptores do tipo 5-HT_{2A}) nesta área encefálica foi capaz de bloquear os efeitos da estimulação química da HbL sobre as duas respostas de defesa avaliadas no LTE. Em relação ao NDR, a administração prévia de AP-7 (antagonista de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA) neste núcleo bloqueou o efeito da estimulação química da HbL sobre a resposta de

esquiva inibitória.

Na segunda etapa do presente estudo, procuramos estender as análises sobre o envolvimento do NDR e da SCPD na mediação de respostas comportamentais defensivas, ao empregarmos outra espécie animal, o camundongo. Para tal, foram utilizados dois modelos experimentais que permitem o estudo de vários comportamentos defensivos eliciados nesta espécie de roedores, em duas situações distintas. A bateria de testes de defesa envolve o confronto direto do camundongo com um rato anestesiado guiado pelo experimentador, o qual inicialmente se aproxima, em seguida persegue e finalmente entra em contato com o camundongo. Já o teste de exposição ao rato foi desenvolvido para possibilitar uma situação de ameaça menos intensa, na qual uma grade impede o contato do rato com o camundongo. Em tal situação, o camundongo pode procurar ou evitar o estímulo aversivo e assim regular sua própria exposição à ameaça.

Para realização desta etapa, camundongos foram submetidos à cirurgia para implantação de cânulas no NDR ou na SCPD visando à injeção intra-NDR de WAY-100635 e intra-SCPD de 8-OH-DPAT (agonista de receptores do tipo 5-HT_{1A}) ou de DOI (agonista de receptores dos tipos 5-HT_{2A/2C}). Os dados obtidos na bateria de testes de defesa com a infusão de WAY-100635 no NDR mostraram que tal procedimento facilitou a expressão de comportamentos que têm sido associados tanto à ansiedade generalizada (ex. avaliação de risco) quanto ao pânico (ex. fuga).

Por sua vez, a análise dos resultados obtidos na bateria de testes de defesa com a injeção de 8-OH-DPAT e de DOI na SCPD revelou que ambas as drogas prejudicaram a expressão da resposta de fuga neste modelo. Por outro lado, os efeitos gerados sobre comportamentos defensivos relacionados à ansiedade generalizada medidos na bateria de testes de defesa foram mais pronunciados com a administração de 8-OH-DPAT na SCPD. No teste de exposição ao rato, somente a infusão de 8-OH-DPAT na SCPD promoveu efeitos comportamentais significativos. Tal procedimento prejudicou as respostas de esquiva e de avaliação de risco emitidas pelos camundongos nesta situação experimental.

Em conjunto, os dados obtidos no presente estudo indicam que o sistema serotonérgico do NDR e da SCPD de duas espécies de roedores, ratos e camundongos, exerce importante função na mediação de comportamentos defensivos que têm sido associados aos transtornos de ansiedade generalizada (ex. esquiva e avaliação de risco) e do pânico (ex. fuga).

EFEITOS DA ISOPRENALINA E DA FORSCOLINA SOBRE A MOBILIZAÇÃO DE Ca^{+2} E PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM CÉLULAS ENDOTELIAIS DE AORTA DE RATOS

Mário dos Anjos Neto Filho

Orientadora: Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack
Tese de Doutorado apresentada em 06/06/2008

A enzima adenilato-ciclase pode ser ativada via receptores b-adrenérgicos acoplados à proteína G_s por agonistas como a isoprenalina ou pela ativação direta com forskolina, resultando na produção de AMPc, que ativa a PKA, capaz de modular a concentração citoplasmática de Ca^{+2} ($[Ca^{+2}]_c$). A hipótese do estudo foi de que a isoprenalina (via receptores b-adrenérgicos) e a forskolina (diretamente) poderiam ativar o aumento da $[Ca^{+2}]_c$ pela mobilização dos estoques de Ca^{+2} do retículo endoplasmático, via receptores de IP_3 e de rianodina, e/ou pelo influxo de Ca^{+2} , favorecendo a formação do complexo Ca^{+2} -calmodulina, ativando a eNOS que produz NO em células endoteliais de aorta de ratos. Demonstramos que a isoprenalina e a forskolina mobilizaram Ca^{+2} do retículo endoplasmático, uma vez que a incubação das células (meio zero- Ca^{+2}) com a associação de 2-APB e tetracaína diminuiu a $[Ca^{+2}]_c$ abaixo do basal. O 2-APB inibiu mais significativamente o efeito da isoprenalina sobre a $[Ca^{+2}]_c$ do que o efeito da forskolina. Por outro lado, a tetracaína teve maior efeito inibitório sobre a forskolina em aumentar a $[Ca^{+2}]_c$ do que a isoprenalina. Em meio contendo Ca^{+2} (1,6 mmol/L), a incubação das células com verapamil diminuiu o efeito da isoprenalina e da forskolina sobre a $[Ca^{+2}]_c$. O efeito da isoprenalina sobre a $[Ca^{+2}]_c$ foi mais inibido do que o da forskolina

quando as células foram incubadas com KT5720. A isoprenalina e a forskolina aumentaram a produção de NO, que foi parcialmente inibida pelo L-NNA. Entretanto, a incubação das células com KT5720 não modificou a produção de NO ativada pela isoprenalina ou forskolina. A produção de NO foi semelhante em meio contendo Ca^{+2} (1,6 mmol/L) ou em meio zero- Ca^{+2} . A incubação das células com verapamil não modificou a produção de NO ativada pela isoprenalina ou forskolina. Entretanto, a associação de 2-ABP e tetracaína inibiu a produção de NO ativada com isoprenalina e forskolina. A incubação das células apenas com o 2-APB diminuiu mais significativamente a produção de NO ativada pela forskolina do que a ativada pela isoprenalina. Já a incubação das células apenas com tetracaína teve maior efeito inibitório sobre a produção de NO ativada pela isoprenalina do que a ativada pela forskolina. A inibição da calmodulina com o W7 praticamente aboliu a produção de NO ativada pela isoprenalina e pela forskolina. O conjunto dos nossos resultados permite sugerir que em células endoteliais da aorta de ratos, a isoprenalina e forskolina aumentam a $[Ca^{+2}]_c$ via ativação da PKA pela liberação de Ca^{+2} do retículo endoplasmático através de receptores de IP_3 e de rianodina e pelo influxo extracelular de Ca^{+2} . A produção de NO é dependente de Ca^{+2} e da formação do complexo Ca^{+2} -calmodulina, mas independente da PKA. Os íons Ca^{+2} relacionados à produção de NO são primariamente liberados do retículo endoplasmático, via receptores de IP_3 e de rianodina. Palavras-chave: endotélio, óxido nítrico, AMPc, cálcio, isoprenalina e forskolina.

INTERAÇÃO ENTRE AS VIAS DE FORMAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO E PROSTANÓIDES NA HIPOREATIVIDADE VASCULAR A CONSTRITORES ASSOCIADA AO TÉRMINO DA GESTAÇÃO EM RATAS

Maria Regina Martinez

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina de Oliveira Salgado
Tese de Doutorado apresentada em 16/06/2008

O término da gestação em ratas está associado a uma diminuída reatividade a agentes vasoconstritores que pode ser mediada por alterações na produção ou liberação de óxido nítrico (NO) e/ou prostanóides. Este trabalho estuda a contribuição do NO e/ou prostanóides, além de uma possível interação entre os produtos dependentes da atividade NOS e COX, na diminuída resposta a constritores em anéis de aorta de ratas ao término da gestação. Curvas concentração-efeito à fenilefrina (FE) ou cloreto de potássio (KCl) foram construídas em anéis de aorta torácica de ratas

não grávidas (NG, na fase estro do ciclo estral) e grávidas (G, 19-20 dias de gestação). Os experimentos foram realizados em vasos com o endotélio preservado ou removido, na ausência ou presença de inibidor de NOS, N^G -nitro-L-arginina (L-NNA, 100 μ M), sequestrador de NO, hemoglobina (Hb, 10 μ M), de inibidor da COX, diclofenaco de sódio (DF, 10 μ M), e de inibidor da sintase- de TXA_2 , ozagret {OZ, μ M). As respostas contráteis à FE e ao KCl foram diminuídas em anéis de aorta de G. Após remoção da camada endotelial e na presença de L-NNA ou Hb as respostas foram aumentadas e as diferenças entre os grupos diminuíram. DF sozinho não afetou a resposta em anéis de G e NG. A adição de L-NNA ou Hb após a incubação com DF aumentou a reatividade de NG e G, mas não aboliu as diferenças entre os grupos. De modo similar ao DF, OZ não alterou

a reatividade à FE e ao KCl, mas afetou o efeito do L-NNA. Surpreendentemente, a adição de L-NNA antes de OZ foi capaz de abolir as diferenças entre G e NG. Estes resultados

sugerem que a inibição do NO na aorta de ratas grávidas favorece a formação de tromboxano A_2 ; contudo, a formação de tromboxano A_2 depende da síntese prévia de NO.

INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS MOLECULARES ASSOCIADOS À INDUÇÃO DA HIPER- NOCICEPÇÃO PERSISTENTE PELA ADMINISTRAÇÃO INTRAPLANTAR DE PGE₂

Mani Indiana Funez

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira

Tese de Doutorado apresentada em 17/06/2008

O objetivo do presente estudo foi investigar os mecanismos responsáveis pela persistência da hipernocicepção mecânica induzida pelo principal mediador inibido por drogas antiinflamatórias não-esteroidais (AINEs), PGE₂ (prostaglandina E₂). Observamos que a antinocicepção diária induzida por dipirona ou oligodeoxinucleotídeos (ODNs) para canais de sódio Na_v 1.8 não é suficiente para prevenir a instalação do quadro persistente. Numa segunda etapa de nossos experimentos investigamos se a ativação da via de sinalização da PGE₂ poderia conter elementos importantes para o processo de cronificação. Como ferramenta foram utilizadas drogas inibidoras das duas principais quinases ativadas pela PGE₂, PKA e PKC- epsilon, além de uma droga inibidora de adenilil ciclase. Neste caso foi observada prevenção total do quadro de hipernocicepção

persistente para todos os tratamentos propostos. Tanto PKA quanto PKC- epsilon parecem ser igualmente importantes visto que sua inibição isolada ou concomitante preveniu o quadro persistente. Da mesma forma, a ativação diária de PKA ou PKC- epsilon, utilizando agonistas seletivos, é capaz de induzir um quadro de hipernocicepção persistente similar ao induzido pela PGE₂. Também investigamos a participação do fator de transcrição relacionado à via de sinalização AMPc-PKA, o CREB, e do fator de transcrição kappa B (NF-kappa B). Observamos que CREB parece ser importante para a expressão do fenótipo de hipernocicepção persistente, enquanto que NF-kappa B parece não ser importante para a instalação do quadro. O conjunto de nossos resultados sugere fortemente que analgesia sem inibição do processo inflamatório pode ser um tratamento não eficaz quando a prevenção de mudanças no nociceptor que levam à cronificação é desejada. Adicionalmente, PKA e PKC- epsilon parecem ter um papel chave na sensibilização aguda do nociceptor bem como na sensibilização crônica.

FISIOLOGIA

CARACTERIZAÇÃO DAS NEUROTRANSMISSÕES GABAérgica E GLUTAMATÉRGICA EM UM NÚCLEO ENVOLVIDO NO PROCESSAMENTO AUDITIVO EM PÁSSAROS CANOROS

André Luiz Andreotti Dagostin

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Mauricio Xavier Leão

Dissertação de Mestrado apresentada em 08/04/2008

O canto em pássaros canoros é usado para a demarcação territorial e para o acasalamento. Assim, para que um indivíduo seja bem sucedido em seu contexto social, é necessário que aprenda a cantar e reconhecer o canto de sua espécie de maneira adequada. A habilidade de aprender o canto não é característica geral dos pássaros, mas sim, de um grupo específico: os pássaros canoros (subordem oscine). O circuito telencefálico responsável pelo reconhecimento do canto é presente tanto em machos quanto em

fêmeas, sendo o nidopálio caudomedial (NCM) um núcleo proeminentemente relacionado a esse reconhecimento e à memória auditiva. O NCM responde especificamente ao canto da espécie induzindo a expressão do gene de expressão imediata (IEG) *zenk*, um fator de transcrição responsável pela expressão de diversos genes alvo. Porém, os mecanismos neurais e sinápticos no NCM e como eles respondem ao estímulo canoro são pouco conhecidos. O objetivo deste trabalho é a investigação das características da neurotransmissão dos neurônios do NCM em fatias frescas. Para isso, mandarins (*Taeniopygia guttata*) adultos machos e fêmeas foram estimulados com canto específico da espécie ou mantidos em isolamento. O registro da atividade

sináptica foi feito utilizando-se a técnica de *patch-clamp* em modo *voltage clamp* para registros de correntes pós-sinápticas espontâneas (sPSCs). Em nossos registros, observamos que as correntes que compõem a neurotransmissão no NCM são geradas pelos neurotransmissores GABA (sIPSCs) e glutamato (sEPSCs), sendo os sIPSCs muito mais abundantes que os sEPSCs. Os registros de correntes em miniatura (na presença de TTX) mostraram que as sEPSCs correspondem a mEPSCs, diferentemente dos sIPSCs, que são bastante sensíveis à TTX. A estimulação pelo canto aumentou a excitabilidade da rede glutamatérgica evidenciada pelo aparecimento de *bursts* de correntes

glutamatérgicas após a desinibição por bicuculina. Em machos estimulados, essas correntes apareceram mesmo sem a inibição da transmissão GABAérgica e provavelmente são a causa do aumento da frequência dos sIPSCs no NCM desses pássaros. Experimentos em fêmeas isoladas de machos por 7 a 30 dias sugerem que a conectividade da rede glutamatérgica no NCM dependa de um contínuo estímulo canoro. Concluímos que o estímulo canoro desencadeia um aumento da excitabilidade dos neurônios glutamatérgicos no NCM que poderia representar uma forma de plasticidade induzida pelo canto relevante para o reconhecimento vocal do pássaro.

EFEITOS DO ESTRADIOL NA EXPRESSÃO HIPOTALÂMICA DOS MEDIADORES ENVOLVIDOS NO CONTROLE DA HOMEOSTASE ENERGÉTICA

Lilian Eslaine Costa Mendes

Orientadora: Profa. Dra. Lucila Leico Kagohara Elias
Dissertação de Mestrado apresentada em 17/04/2008

A ingestão alimentar é controlada por fatores neurais, endócrinos, adipocitários e intestinais. O sistema nervoso central, mais especificamente o hipotálamo, juntamente com os sinais periféricos indicadores do estado nutricional interagem no controle da homeostase energética. Diferentes neuropeptídeos e receptores expressos no hipotálamo apresentam efeitos específicos na ingestão alimentar por meio de suas ações anorexígenas ou orexígenas e no balanço energético. O estradiol também participa na regulação da homeostase energética, como evidenciado pelo aumento da ingestão alimentar e do ganho de peso corporal após ovariectomia. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da ovariectomia, com e sem reposição de estradiol, na ingestão alimentar e na expressão gênica de mediadores hipotalâmicos envolvidos no controle da homeostase energética. Para tanto, ratas Wistar foram submetidas à ovariectomia bilateral (OVX) e divididas em dois grupos: animais que receberam injeção subcutânea de ciproionato de estradiol (10 µg/Kg peso corporal, grupo OVX+E); e animais sem reposição que receberam apenas veículo (óleo de milho, grupo OVX), por oito dias consecutivos. A ingestão alimentar e o peso corporal foram avaliados durante este período, e no oitavo dia, a dieta foi retirada às 16h e um subgrupo de ratas OVX e OVX+E foi decapitado às 17h (período pré-alimentação). Outro subgrupo de ratas OVX e OVX+E, teve a dieta reapresentada às 18h, e decapitado às 22h (período pós-alimentação). Amostras de sangue do tronco e o cérebro foram coletados sob condições livres de RNase. O plasma foi utilizado para dosagem de leptina por radioimunoensaio e o cérebro para quantificação, por PCR em tempo real, da expressão de RNAm de neuropeptídeo Y (NPY), proteína relacionada ao agouti (AgRP), pró-opiomelanocortina (POMC), transcrito regu-

lado por cocaína e anfetamina (CART), fator liberador de corticotrofina (CRF), pró-hormônio concentrador de melanina (pró-MCH), orexina A, receptor de forma longa de leptina (Obrb) e receptor 4 da melanocortina (MC4-R) em núcleos específicos do hipotálamo: núcleo arqueado (ARC), núcleo paraventricular (PVN) e área hipotalâmica lateral (LHA). Em um outro protocolo experimental realizou-se a injeção intracerebroventricular (ventrículo lateral, icv) de leptina (10 µg/5µL) ou salina estéril em ratas OVX e OVX+E, uma hora antes do início da fase escura (17h) para determinação da ingestão alimentar e do peso corporal. Observamos que a reposição de estradiol em ratas ovariectomizadas induziu: menor ingestão alimentar e menor ganho de peso corporal, maiores concentrações plasmáticas de leptina no estado pré-alimentar, bem como em resposta à alimentação; redução da expressão de RNAm de NPY, AgRP e CART no ARC; e de orexina A na LHA; aumento da expressão de RNAm de Obrb, MC4-R, CART e, principalmente, de CRF no PVN e de Obrb e CART na LHA. No protocolo de injeção icv de leptina, a resposta anorexigênica foi semelhante entre os grupos OVX e OVX+E, porém, a perda de peso foi maior no grupo OVX+E, indicando efeito maior da leptina no gasto energético com a reposição estrogênica. O conjunto desses dados sugere que o efeito hipofágico do estradiol está associado à redução da expressão gênica de neuropeptídeos orexigênicos como NPY, AgRP e orexina A e aumento da expressão gênica de MC4-R, Obrb e do CRF, receptores e neuropeptídeo com efeitos anorexigênicos, no hipotálamo. Além disso, a expressão maior de CRF poderia contribuir para o aumento do efeito da leptina no gasto energético na presença do estradiol. Sendo assim, os efeitos do estradiol na homeostase energética são observados tanto na ingestão alimentar como no gasto energético. Esses efeitos são mediados por fatores periféricos, como a liberação de leptina pelo tecido adiposo; e por fatores centrais, como expressão diferenciada de neuropeptídeos hipotalâmicos.

EFEITOS DA DIETA HIPERCALÓRICA E DO SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO NA GERAÇÃO DE GLICEROL-3-FOSFATO NOS TECIDOS ADIPOSOS BRANCO E MARROM DE RATOS

Valéria Ernetânia Chaves

Orientadora: Profa. Dra. Isis do Carmo Kettelhut

Tese de Doutorado apresentada em 05/05/2008

O objetivo do presente trabalho foi verificar o efeito da dieta hipercalórica (do tipo cafeteria) na geração de glicerol-3-fosfato (G3P) pelos tecidos adiposos branco (TAB) e marrom (TAM) antes e após a desnervação simpática cirúrgica unilateral. As três vias metabólicas de geração de G3P foram investigadas: a) *via* glicolítica, estimada pela captação de glicose *in vivo*, b) *via* gliceroneogênica, avaliada pela incorporação de 1-14C-piruvato em glicerol-triacilglicerol (TAG) e pela atividade da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK); e c) processo de fosforilação direta do glicerol, avaliado pela incorporação de glicerol-U-14C em glicerol-TAG e pela atividade da gliceroquinase (GK). Como controle dos ratos alimentados com a dieta cafeteria foram utilizados ratos alimentados com dieta balanceada comercial. Os dois grupos foram submetidos à desnervação cirúrgica unilateral do tecido adiposo marrom (TAM) e apenas o grupo cafeteria foi submetido à desnervação do tecido adiposo branco (TAB) retroperitoneal. Os tecidos contralaterais intactos foram utilizados como controle. A administração da dieta cafeteria durante três semanas induziu um aumento acentuado nos níveis plasmáticos de insulina e triacilglicerol (TAG), no conteúdo de ácido graxo total da carcaça, no peso de diferentes depósitos de TAB (epididimal, retroperitoneal, inguinal e mesentérico) e na capacidade termogênica do TAM, avaliada pela velocidade de renovação de noradrenalina, pela ligação de GDP e pelo conteúdo de UCP-1, sem, no entanto, alterar o ganho de peso corporal dos animais quando comparado aos con-

troles. Os resultados obtidos na avaliação das vias de geração de G3P mostram que, após três semanas, os ratos alimentados com a dieta cafeteria apresentam uma maior velocidade de captação de glicose no TAM e no TAB (epididimal e retroperitoneal). Esses animais também apresentam um aumento na atividade da GK e na velocidade de incorporação de glicerol-U-14C em glicerol-TAG *in vitro* em ambos os tecidos. Em contraste aos efeitos na utilização de glicose, na atividade da GK e na síntese de glicerol-TAG de glicerol, a dieta cafeteria induziu uma redução acentuada na atividade da PEPCK e na velocidade de incorporação de 1-14C-piruvato em glicerol-TAG em ambos TAM e TAB (epididimal e retroperitoneal). A desnervação do TAM e TAB retroperitoneal promoveu uma redução significativa (50%) na atividade da GK, mas não afetou a captação de glicose e a gliceroneogênese, avaliada pela atividade da enzima chave e pelo fluxo da via. Nossos resultados demonstram que a gliceroneogênese pode ser inibida para ajustar o suprimento de G3P em situações em que a produção deste metabólito por outras vias (glicolítica e gliceroquinase) encontra-se aumentada. Este achado suporta a hipótese que a atividade das vias geradoras de G3P são reguladas para manter o suprimento adequado de G3P necessário para a esterificação e armazenamento de TAG. Os resultados obtidos com a desnervação do tecido adiposo, especialmente do TAM (um tecido ricamente inervado), permitem-nos sugerir a existência de uma regulação reciprocamente coordenada entre as *vias* glicolítica e gliceroneogênica, independente do processo de fosforilação direta do glicerol pela gliceroquinase, garantindo o fornecimento de G3P necessário para a esterificação dos ácidos graxos e armazenamento do TAG.

PAPEL DOS NÚCLEOS DA RAPE NA QUIMIOSENSIBILIDADE AO CO₂/pH

Mirela Barros Dias

Orientador: Prof. Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco

Tese de Doutorado apresentada em 07/05/2008

Estudo Nº 1: Participação do núcleo magno da rafe na resposta ventilatória e termorregulatória à hipercapnia

Sabe-se que a serotonina (5-HT) participa das respostas fisiológicas à hipercapnia e evidências indicam que os neurônios serotoninérgicos da rafe bulbar são quimiossensíveis. No núcleo magno da rafe (RMg), 15–20% dos neurônios são serotoninérgicos. No presente estudo, foi estudado: 1) o envolvimento do RMg nas respostas ventilatória e termorregulatória à hipercapnia (7% CO₂); 2) o papel dos neurônios serotoninérgicos do RMg nestas respostas; 3) a participação dos receptores serotoninérgi-

cos 5-HT1A, 5-HT2 e 5-HT7, no RMg, na modulação da ventilação (VE) e da termorregulação em resposta ao CO₂. Para tal, ratos Wistar receberam microinjeções de: 1) ácido ibotênico, para causar lesão não-específica do RMg, ou seja, lesão de qualquer neurônio que possua receptores para aminoácidos excitatórios; 2) anti-SERT-SAP para causar lesão específica dos neurônios serotoninérgicos do RMg; 3) WAY-100635 (antagonista do receptor 5-HT1A), Ketanserina (antagonista do receptor 5-HT2), ou SB269970 (antagonista do receptor 5-HT7) para causar bloqueio dos receptores serotoninérgicos do RMg. A hipercapnia causou hiperventilação e hipotermia em todos os grupos. Lesões do RMg (tanto não-específicas quanto específicas) resultaram em diminuição da resposta ventilatória ao CO₂, sendo que as lesões específicas causaram também uma ate-

nuação da ventilação em condições de normocapnia. A resposta hipotérmica à hipercapnia não foi modificada por lesão específica ou não-específica dos neurônios serotoninérgicos. A microinjeção de SB269970 ou ketanserina intrarRMg não alterou a hiperventilação induzida por hipercapnia, porém o tratamento com WAY-100635 causou atenuação da resposta ventilatória ao CO₂. A resposta térmica ao CO₂ não foi modificada pela microinjeção dos antagonistas dos receptores serotoninérgicos 5-HT1A, 5-HT2 ou 5-HT7. Nossos resultados sugerem que o RMg participa da resposta ventilatória à hipercapnia, mas não possui papel na resposta termorregulatória ao CO₂. Ainda, os neurônios serotoninérgicos do RMg, além de participarem da resposta ventilatória ao CO₂, têm papel tônico no controle da ventilação. Os resultados mostram também que a serotonina, atuando nos receptores 5-HT1A do RMg, causa aumento da ventilação durante a exposição ao CO₂.

Estudo Nº 2: Interação entre o Núcleo Obscuro da Rafe e Núcleo Retrotrapezóide na resposta ventilatória à acidificação local

Estudo prévio mostrou que a inibição simultânea do núcleo retrotrapezóide (RTN) e do núcleo obscuro da rafe (ROb) diminui em 51% a resposta ventilatória à hipercapnia, sendo este efeito maior do que a inibição do RTN (-24%) ou ROb (0%) separadamente, o que sugere que o ROb modula a quimiorrecepção por meio da interação com o RTN. A interação do ROb com o RTN na resposta ventilatória ao

CO₂ foi investigada por meio da microdiálise de líquido cérebro-espinhal equilibrado com 25% de CO₂, simultaneamente em 2 sondas posicionadas em direção ao RTN e ao ROb, ou adjacentes à esses núcleos, em ratos. A ventilação foi mensurada por meio de pletismografia corporal à temperatura ambiente de 30°C, correspondente à zona termoneutra do animal. Os animais foram divididos em 4 grupos (N=5): 1) ambos os probes posicionados no RTN e ROb (“RTN-ROb”); 2) um dos probes posicionado no RTN e o outro probe posicionado periféricamente ao ROb (“RTN – peri-ROb”); 3) um dos probes posicionado no ROb, o outro adjacente ao RTN (“ROb – peri-RTN”); 4) ambos os probes posicionados periféricamente às áreas de interesse (“peri-RTN –peri-ROb”). A acidificação local do “RTN-ROb” aumentou significativamente a .VE em até 22%, comparado com a .VE basal, sendo este aumento devido tanto ao aumento da f quanto do VT. A acidificação do grupo “RTN -peri-ROb” aumentou a .VE em até 15%, comparado com a .VE basal, enquanto que no grupo “ROb – peri-RTN”, a acidificação local não modificou a .VE em relação aos seus valores basais. A acidificação de regiões periféricas ao RTN e ROb reduziu em 11% a resposta ventilatória ao CO₂, em comparação com a .VE basal. Os resultados deste estudo mostram que a simultânea acidificação do RTN e ROb potencializou os efeitos da acidificação local do RTN, indicando que o ROb possui um papel modulador no que diz respeito à quimiorrecepção central exercida pelo RTN.

HETEROGENEIDADE GENÉTICA DA SÍNDROME DE RESISTÊNCIA AO ACTH

Cristhianna Viesti Advincula Collares

Orientadora: Profa. Dra. Lucila Leico Kagohara Elias
Tese de Doutorado apresentada em 08/05/2008

A síndrome de resistência ao ACTH inclui a deficiência de glicocorticóide familiar (DGF) e a síndrome do triplo A. Estas doenças são raras, ambas apresentam herança autossômica recessiva e caracterizam-se pela presença de insuficiência adrenal primária. A DGF é uma doença geneticamente heterogênea caracterizada pela ausência de resposta da adrenal ao ACTH sem deficiência de mineralocorticóide. Mutações no gene do receptor do ACTH (*MC2R*) são causas de DGF. Recentemente, a proteína acessória ao receptor 2 da melanocortina (*MRAP*) foi descrita como um co-fator essencial para a expressão do *MC2R*. Mutações no gene *MRAP* foram associadas à DGF. A síndrome do triplo A é caracterizada pela tríade insuficiência adrenal, acalasia e alácrima. O gene *AAAS*, que codifica uma proteína de 547 aminoácidos denominada ALADIN, foi identificado como base molecular da síndrome do triplo A. No presente estudo realizamos a análise molecular dos genes *MC2R*, *MRAP* e *AAAS* em cinco famílias brasileiras, não relacionadas, com síndrome de resistência ao ACTH. Os

probandos das famílias 1, 2, 4 e 5 apresentavam insuficiência adrenal primária precoce, enquanto o probando da família 3 apresentava acalasia e alácrima, além da insuficiência adrenal primária. O sequenciamento da região codificadora do gene *MC2R* revelou, na paciente 1, uma mutação *missense* em homozigose, que resulta na substituição de glicina por valina no códon 116 (p.Gly116Val), não descrita previamente. Seus pais bem como seu irmão saudável apresentaram a mesma mutação em heterozigose. O estudo funcional em células Y6 transfectadas com o DNA do receptor *MC2R* normal ou a variante G116V mostrou uma diminuição na geração de AMPc pelo receptor mutado, quando comparado com o receptor normal. O sequenciamento do gene *MRAP* mostrou, na paciente 2, uma mutação *missense* em homozigose (p.Met1Ile) no códon de iniciação desse gene (exon 3). A análise molecular do gene *AAAS* da paciente 3 revelou, uma mutação inédita, caracterizada por deleção g.782_783delTG no exon 1, a qual introduz um códon de parada prematuro na posição 19. Nas outras duas pacientes não encontramos nenhuma alteração nos genes analisados. A análise molecular da região promotora do *MC2R* mostrou nas pacientes 1, 2, 4 e 5 a alteração em homozigose CG para GC nos nucleotídeos -790/-791; A para G no

nucleotídeo -694 e A para C no nucleotídeo -759. Estas alterações também foram encontradas em indivíduos controles. Estes resultados demonstram que mutações nos genes *MC2R* e *MRAP* estão associadas com a DGF e que a deleção

encontrada no gene *AAAS* está associada com a síndrome do triplo A. A mutação p.Gly116Val do gene *MC2R*, induz perda da sinalização deste receptor, levando à resistência ao ACTH.

PAPEL DOS HORMÔNIOS NEURO-HIPOFISÁRIOS NA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS PERITONIAIS

Angelita Maria Stábile

Orientadora: Profa. Dra. Evelin Capellari Cárnio
Tese de Doutorado apresentada em 13/05/2008

A vasopressina (AVP) e a ocitocina (OT) são hormônios peptídicos sintetizados nos núcleos supraóptico e paraventricular do hipotálamo e estocados na neuro-hipófise. Estes hormônios possuem ações bem definidas na regulação da homeostase e das funções reprodutivas. Entretanto, a AVP e a OT e seus receptores têm sido encontrados em tecidos relacionados com o sistema imunológico como o timo e os macrófagos. O objetivo deste trabalho foi determinar se a AVP e a OT afetam a síntese de óxido nítrico (NO) *in vivo* e em cultura de macrófagos peritoniais estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) por meio da mensuração da produção de nitrito, um metabólito do NO. A administra-

ção de LPS aumentou a concentração plasmática de AVP, OT e nitrito. O tratamento prévio com o antagonista do receptor V1 *in vivo* diminuiu a concentração plasmática de nitrito e atenuou a hipotensão induzida pelo LPS. Por outro lado, o tratamento com antagonista do receptor de OT não demonstrou efeito. A incubação de cultura de macrófago com LPS causou um aumento significativo na concentração de nitrito no meio de cultura. A AVP aumentou a produção de nitrito pelos macrófagos ativados com LPS, mas não nos macrófagos não ativados. A OT, por outro lado, não afetou a produção de nitrito pelos macrófagos. O antagonista do subtipo V1a do receptor de AVP inibiu o efeito da AVP, enquanto os antagonistas dos receptores de V1b e V2 não demonstraram efeito. Portanto, este estudo sugere que os macrófagos podem ser células alvo da AVP, e este hormônio neuro-hipofisário age sinergicamente com o LPS induzindo a produção de NO por macrófagos.

CANAIS ATIVADOS POR ATP EXTRACELULAR EM CÉLULAS DE LEYDIG DE CAMUNDONGOS

Ligia Subitoni Antonio

Orientador: Prof. Dr. Wamberto Antonio Varanda
Dissertação de Mestrado apresentada em 16/05/2008

Nos últimos anos, o ATP tem sido alvo de estudo em vários aspectos ligados à sinalização intercelular. Há evidências de que ele possa atuar tanto exercendo a função de mediador de eventos rápidos, como na neurotransmissão, como também em processos celulares de longo prazo, envolvendo mecanismos ligados à proteína G. A ação do ATP na membrana celular se dá por meio de receptores purinérgicos do tipo P2X (canais iônicos ativados por ligantes) e P2Y (receptores acoplados à proteína G). Até o momento, já foram identificados e clonados sete subtipos de receptores P2X (P2X1 - P2X7). O influxo de cálcio (Ca²⁺) por esses canais justifica em parte o aumento da concentração de Ca²⁺ intracelular ([Ca²⁺]_i) observado em algumas situações fisiológicas, o que evidencia que esta é uma importante via envolvida nas respostas mediadas por receptores P2X *in vivo*. O tratamento de células de Leydig de ratos e camundongos, com ATP, causa aumento na [Ca²⁺]_i e na secreção de testosterona, reforçando a hipótese de que a sinalização via Ca²⁺ pode contribuir para o controle da secreção de testosterona nessas células. Os receptores purinérgicos descritos em células de Leydig de camundon-

gos apresentam perfil farmacológico e eletrofisiológico característico do subtipo P2X2. Além disso, existem evidências de que o influxo de Ca²⁺ (gerado pela abertura do receptor P2X) ativa canais para K⁺ de alta condutância (BKCa) e que estes podem influenciar o decurso temporal da dessensibilização dos receptores P2X nessas células. Dessa forma, o presente estudo objetivou identificar os subtipos de receptores purinérgicos P2X em células de Leydig de camundongos adultos, analisando propriedades moleculares e eletrofisiológicas dessas células, e observar se há interação entre estes e a atividade de canais para K⁺ ativados por Ca²⁺ de alta condutância (BKCa). Experimentos de “Western Blot” e Imunofluorescência mostraram a presença de receptores purinérgicos dos subtipos P2X2, P2X4, P2X6 e P2X7 nas células de Leydig. Registros eletrofisiológicos, utilizando a técnica de “patch clamp” sugerem a presença de receptores heteroméricos, possivelmente P2X2/4/6, que exibem perfil farmacológico dominante para a subunidade P2X2 e indicam que há interação entre os canais BKCa e o influxo de Ca²⁺ decorrente da ativação de receptores P2X. O aumento de atividade dos canais BKCa após o influxo de Ca²⁺ por abertura de canais P2X é dose-dependente e reversível. Os resultados de captação de corantes fluorescentes mostram que os receptores P2X7 não são funcionais nessas células.

EFEITO DO ANTAGONISTA DO RECEPTOR CRH-R1 SOBRE A SECREÇÃO DE GONADOTROFINAS, PROLACTINA, CORTICOSTERONA E PROGESTERONA EM RATAS SUBMETIDAS A ESTRESSE

Guillermo Andrey Ariza Traslaviña

Orientador: Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci

Dissertação de Mestrado apresentada em 21/05/2008

O estresse agudo altera a atividade do eixo hipotálamo-hipotálamo-gonadal (HPG) em vários níveis. O hormônio liberador de corticotrofina (CRH) é a principal substância hipotalâmica reguladora do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e exerce suas ações via ativação de receptores CRH-R1 e CRH-R2. O CRH-R1 tem expressão maior no sistema nervoso central e está mais envolvido em distúrbios relacionados à hiperatividade do eixo HPA. Antalarmin é um antagonista seletivo não peptídico dos receptores CRH-R1. No presente foi avaliado se o efeito de estresse agudo em associação à ação estrogênica sobre a secreção de hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH), prolactina (PRL), corticosterona (B) e progesterona (P) tem mediação de CRH através de receptores CRH-R1.

Ratas fêmeas castradas submetidas à terapia substitutiva com estrógeno (10µg s.c. por 3 dias) receberam antalarmin (doses de 0,1 ou 0,5mg/kg por via endovenosa ou 11g/0,5ul por via intracerebroventricular) ou veículo antes de serem submetidas a estresse de contenção por 40 minutos. Realizou-se coleta seriada de amostras de sangue através de cânula jugular antes (às 10h) e depois do estresse para avaliar efeitos imediatos (até 14h) e os efeitos na tarde após estresse (até 18h). O estresse induziu aumento significativo ($P<0,001$) da secreção de LH, B e P, que foi atenuado por antalarmin ($P<0,001$). As concentrações de PRL e FSH não foram alteradas imediatamente após o estresse, mas, houve atraso do pico de secreção da PRL LH e FSH. Somente os efeitos do estresse sobre a PRL foram revertidos por antalarmin ($P<0,001$). Os resultados indicam que as alterações induzidas por nosso modelo de estresse no eixo HPA, no eixo HPG, e no sistema de controle de secreção de PRL, podem ser mediadas em parte por ações do CRH através de receptores CRH-R1.

EFEITO DA EXPOSIÇÃO NEONATAL AO LIPOPOLISSACARÍDEO SOBRE A HIPOTENSÃO, SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO E VASOPRESSINA PLASMÁTICA DURANTE O CHOQUE ENDOTOXÊMICO EXPERIMENTAL

Dalize Maria Squebola

Orientadora: Profa. Dra. Evelin Capellari Cárnio

Dissertação de Mestrado apresentada em 28/05/2008

Sepse e sua complicação mais comum o choque séptico é um fenômeno geralmente induzido pela ação de endotoxinas. A presença de microorganismos patogênicos e de suas toxinas na circulação sanguínea provoca uma produção excessiva de mediadores, como citocinas e o óxido nítrico (NO). Estudos recentes têm verificado que a administração única de lipopolissacarídeo (LPS), um componente da membrana externa de bactérias gram-negativas durante o período neonatal, levam a ativação do sistema endócrino, principalmente do eixo hipotálamo-hipófise. Este estímulo com LPS, durante o período neonatal, leva a uma espécie de mudança “programada” nas concentrações de fatores pró-inflamatórios quando esses animais entram novamente em contato com produtos bacterianos. O presente estudo teve como objetivo avaliar se a exposição neonatal ao LPS leva a alterações nas concentrações plasmáticas de AVP durante o choque endotoxêmico experimental. Ratos

Wistar foram expostos ao LPS (100 µg/kg) com 14 dias de vida (período neonatal) e após 60 a 75 dias de vida sofreram uma outra administração de LPS (10 mg/kg). A administração intraperitoneal de LPS provocou uma queda significativa da pressão arterial, aumento da frequência cardíaca, aumento das concentrações de nitrato plasmático e diminuição da temperatura corporal nas primeiras duas horas após a administração de LPS, seguido de um aumento desta, a partir da terceira hora após a administração de LPS. Nos animais endotoxêmicos observamos um aumento da concentração plasmática de AVP na segunda hora após a administração de LPS. Após esse período as concentrações de AVP diminuem, retornando a valores basais na sexta hora após a administração de LPS. A exposição neonatal ao LPS atenuou a hipotensão e a febre induzida pelo LPS. Ao mesmo tempo elevou as concentrações plasmáticas de AVP e atenuou a síntese exacerbada de NO.

Esses resultados sugerem que a exposição ao LPS no período neonatal pode alterar o desenvolvimento de sistemas neurais modulando a liberação de AVP e síntese de NO, que conseqüentemente atenuou a hipotensão e a febre induzida pelo choque endotoxêmico.

ANÁLISE DOS SISTEMAS NITRÉRGICO E DOPAMINÉRGICO NA LINHAGEM DE CAMUNDONGOS WEAVER

Roberta Cavalcanti Kwiatroski

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Aparecida Del Bel
Dissertação de Mestrado apresentada em 30/05/2008

Introdução e Objetivo: A literatura documenta evidências de inter-relação entre os sistemas nitrérgico e dopaminérgico no circuito mesoestriatal. Entretanto, investigações de interações entre estes neurotransmissores neste circuito são escassas. O fenótipo Weaver em camundongos é uma desordem recessiva autossômica neurológica, caracterizada por ataxia severa, hiperatividade, e tremores que se manifestam dentro de duas semanas após o nascimento. A mutação Weaver foi identificada no gene *Girk2*, que codifica um canal-K⁺ retificador de entrada ligado à proteína G (*GIRK2*). Esta mutação é crítica para a seletividade iônica do canal, induzindo alterações na excitabilidade da membrana. Animais desta linhagem apresentam degeneração progressiva de neurônios dopaminérgicos, similar ao sinal patológico da doença de Parkinson em humanos. O objetivo do presente estudo foi analisar a presença das enzimas sintase do óxido nítrico e tirosina hidroxilase na linhagem de camundongos Weaver homocigotos (*Girk2^{Wv}*) em diferentes fases do desenvolvimento, em algumas regiões dos sistemas mesoestriatal e mesolímbicocortical.

Material e Métodos: Foram utilizados camundongos selvagens e mutantes *Girk2^{Wv}* com 10 dias, 1 mês e 2 meses de idade (n = 5/grupo). Os camundongos foram anestesiados com pentobarbital sódico (60mg/kg, i.p.) e sacrificados por meio de perfusão intracardíaca. Em seguida os cérebros foram retirados e incluídos em parafina. Cortes encefálicos coronais com 5 ‘mü’ de espessura foram realizados e submetidos à imunohistoquímica para as enzimas sintase do óxido nítrico neuronal (nNOS) e tirosina hidroxilase (TH). A análise estatística foi realizada usando teste t e Two Way ANOVA seguida do teste de compara-

ção múltipla de Duncan (p < 0.05).

Resultados: A análise da imunoreatividade para TH demonstrou uma degeneração de células dopaminérgicas mesencefálicas de caráter progressivo e que afeta principalmente a via mesoestriatal. A neurodegeneração também afetou as células da área tegmental ventral, porém, de forma menos intensa. Com relação à imunohistoquímica para a nNOS, nossos resultados demonstraram que a densidade de células nNOS positivas diminuiu, ao longo do tempo, para cada núcleo tanto em animais selvagens quanto mutantes. Porém, a substância negra compacta constitui uma exceção, pois foi observado um aumento significativo na densidade de células nNOS positivas nos camundongos *Girk2^{Wv}* com um e dois meses de idade. A análise da densidade de células nNOS+ nos camundongos selvagens e weaver com 10 dias mostrou valores similares em todas as regiões analisadas. Adicionalmente, nos animais com um mês de idade, o núcleo subtalâmico apresentou redução na densidade de células nNOS-IR em relação aos animais selvagens. O mutante *Girk2^{Wv}* com 2 meses de idade, apresentaram uma redução significativa na densidade de células nNOS-IR no núcleo acumbens, em adição à observada no núcleo subtalâmico. Nenhuma diferença foi observada no córtex, estriado, amígdala basolateral e área tegmental ventral. **Conclusão:** Nosso estudo (1) confirmou a degeneração de células dopaminérgicas mesencefálicas de camundongos weaver, principalmente na substância negra compacta (via mesoestriatal); (2) demonstrou um aumento na densidade de células nNOS positivas nessa região, concomitante à degeneração dopaminérgica; (3) mostrou ainda uma redução destas mesmas células nos núcleos acumbens e subtalâmico. As modificações observadas podem ser resultantes de adaptações plásticas compensando a perda da inervação dopaminérgica, evidenciando um possível papel do NO neste processo.

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DE LEPTINA SOBRE A VENTILAÇÃO PULMONAR DE CAMUNDONGOS OBESOS

Mirian Bassi

Orientador: Prof. Dr. Mogens Lesner Glass
Tese de Doutorado apresentada em 30/06/2008

Composta de 167 aminoácidos, a leptina é uma proteína produzida por células de gordura, os adipócitos. Apresenta diversas funções, como o aumento da atividade do nervo simpático, indução de angiogênese e controle do peso corporal. Além disso, diversos estudos têm associado à leptina com os mecanismos de controle respiratório.

Animais obesos apresentam depressão ventilatória quando submetidos a ambientes hiperbaricos (elevação de C’O IND. 2’). Esse déficit de resposta foi associado à ausência da leptina. Com o intuito de melhor elucidar onde e como a leptina atua em relação ao controle ventilatório, o presente estudo teve como principal objetivo avaliar as respostas ventilatórias de animais obesos em diversas condições gasosas e verificar o efeito da administração central de leptina sobre a ventilação, volume corrente e frequência respiratória. Os possíveis locais de ação dessa proteína

também foram avaliados através da marcação de receptores OB-R para leptina no tronco encefálico. Nas diversas condições avaliadas, a ventilação em ml.¹ Kg POT. 1'.¹ min POT. 1' de camundongos normais e obesos foram significativamente diferente ($P < 0,05$). Sendo respectivamente, magros e obesos: 2.019 mais ou menos 230 e 864 mais ou menos 75 (normóxia); de 2.789 mais ou menos 466 e 1.070 mais ou menos 169 (hipóxia de 8%); de 1.860 mais ou menos 203 e 833 mais ou menos 43 (hiperóxia de 40%) e de 3.694 mais ou menos 331 e 1.303 mais ou menos 56 (hipercarbia 7%). A gasometria também apresentou diferença ($P < 0,05$), A PC'O IND. 2' foi de 28.4 mais ou menos 2.57 em camundongos

normais e 44.6 mais ou menos 6.6 nos ob/ob, o pH de 7.43 mais ou menos 0.02 e 7.21 mais ou menos 0,07. O tratamento com microinjeções diárias de leptina (i.c.v.) aumentou a resposta ventilatória dos animais obesos significativamente. Porém esta resposta só foi evidenciada após o terceiro dia de administração central. Receptores de leptina (Ob-R) foram identificados no núcleo do trato solitário, lócus coeruleus e núcleo da rafe, regiões associadas ao controle da ventilação. Com esses resultados verificamos a participação de leptina na modulação das respostas ventilatórias de camundongos obesos (ob/ob) em condições hipercarbicas.

GENÉTICA

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM ENDOMETRIOSE

Juliana Meola

Orientadora: Profa.Dra. Lucia Regina Martelli
Tese de Doutorado apresentada em 01/04/2008

A endometriose é uma doença ginecológica benigna, de etiologia complexa e multifatorial, caracterizada pela presença de estroma e tecido glandular tipo endométrio fora da cavidade uterina. Afeta de 10 a 15% da população feminina, que apresentam sintomatologia variada, incluindo dor pélvica e infertilidade. Para elucidar mecanismos potenciais que estejam envolvidos com a fisiopatologia complexa desta doença, analisamos o perfil de expressão gênica diferencial pela metodologia de hibridação subtrativa em tecido eutópico e ectópico (lesões peritoniais e endometrioma ovariano) de 17 mulheres com endometriose, no início da fase proliferativa do ciclo menstrual. Foram

identificados 291 genes desregulados nas lesões endometrióticas, considerados como genes candidatos. Para a validação dos dados, utilizamos a metodologia de PCR em tempo real para os genes *CTGF* e *SPARC*, indicados como superexpressos; e *MYC*, *MMP3*, *IGFBP1* e *PAEP* como menos expressos nas lesões. Diferenças significativas de expressão nas lesões peritoniais foram obtidas para os genes *SPARC*, *MYC*, *IGFBP1*, *PAEP* e nos endometriomas ovarianos para os genes *MMP3* e *PAEP*. Sugerimos que a desregulação dos genes *SPARC*, *MYC*, *MMP3*, *IGFBP1* e *PAEP* seja responsável pela perda da homeostase celular nas lesões endometrióticas, contribuindo para a implantação e sobrevivência do tecido ectópico no ambiente extra-uterino. Este trabalho disponibilizou ao banco de dados da literatura, 291 genes com expressão gênica diferencial em lesões endometrióticas peritoniais e ovarianas como candidatos a investigações futuras.

EXPRESSÃO DOS GENES *TSPX* E *SRY* EM EMBRIÕES BOVINOS PRÉ-IMPLANTAÇÃO

Paula Lume Takeuchi

Orientadora: Profa.Dra. Ester Silveira Ramos
Tese de Doutorado apresentada em 02/04/2008

TSPX e *SRY* são genes específicos dos cromossomos X e Y, respectivamente, que estão envolvidos nos processos de transcrição, regulação do ciclo celular e podem estar relacionados à diferença na velocidade de desenvol-

vimento entre embriões machos e fêmeas de mamíferos no período pré-implantacional.

Objetivos: Verificar a expressão dos genes *TSPX* e *SRY* em embriões bovinos pré-implantação produzidos por fertilização *in vitro* e comparar a expressão de *TSPX* entre embriões masculinos e femininos por PCR em tempo real.

Material e Métodos: Como amostra controle foi utilizado tecido testicular bovino. Foram analisado *pools* de 20 embriões produzidos por fertilização *in vitro* para cada

fase do desenvolvimento embrionário pré-implantação (1-2; 2-4; 4-8; 8-16; 16-32 células, mórula e blastocisto) para a análise qualitativa de expressão dos genes *TSPX* e *SRY* por RT-PCR. A seqüência obtida após a amplificação para o gene *TSPX* foi seqüenciada para confirmação da origem do segmento estudado. Para a análise quantitativa por PCR em tempo real foram obtidos seis embriões individualizados submetidos à extração concomitante de DNA (para a sexagem utilizando o gene *TSPY*) e RNA. O gene da *b-actina* serviu como controle.

Resultados: Foram encontrados transcritos dos genes *TSPX* e *SRY* no tecido testicular e em todas as fases analisadas do desenvolvimento embrionário bovino, exceto

no estágio de 1-2 células. Com o DNA extraído foi possível realizar a sexagem dos embriões antes da análise quantitativa, a qual revelou a presença de transcritos de *TSPX* apenas nos blastocistos femininos e no tecido testicular.

Conclusão: A expressão dos genes estudados mostrou-se muito precoce, sendo verificada em todos os estágios, exceto no de 1-2 células. Foi detectado um padrão de expressão diferencial de *TSPX* entre machos e fêmeas no estágio de blastocisto que, associado à expressão de *SRY* nos embriões masculinos, poderia contribuir para a diferença na velocidade de desenvolvimento entre os embriões machos e fêmeas relatada por vários autores nesse período do desenvolvimento embrionário.

CONEXÃO *in silico* ENTRE PLANTAS MEDICINAIS E ANIMAIS VENENOSOS

Renato David Puga

Orientadora: Profa.Dra. Silvana Giuliatti

Dissertação de Mestrado apresentada em 15/04/2008

Na grande diversidade de plantas encontrada em todo o mundo, encontram-se as plantas medicinais com propriedades antivenenos. O estudo da relação dessas plantas com venenos de animais contribui muito para o desenvolvimento de novos medicamentos. A quantidade de dados a ser armazenada e a relação dessas informações é um processo que deve ser administrado por um sistema computacional. O desenvolvimento de sistemas de computadores tem se destacado nos últimos anos na Bioinformática e são muito úteis para organizar diferentes tipos de dados e, juntamente, com o uso de gerenciadores de conteúdo, eles contribuem, significativamente, no processo de desenvolvimento de *softwares*. O presente projeto teve como objetivo o desenvolvimento de um sistema computacional para *Web*, o qual relaciona dados de plantas medicinais com propriedades antivenenos e de animais venenosos, permitindo a integração dos mesmos, através de diferentes aplicativos de busca. O sistema foi denominado de *Venom*

e está disponível no site <http://gbi.fmrp.usp.br/venom/>. Foram criadas categorias para a classificação dos dados de plantas e de animais. Essa categorização das informações é muito importante, pois possibilita o relacionamento das mesmas nas buscas por categorias. Os dados, tanto de plantas quanto de animais, foram extraídos de artigos científicos e de bases de dados públicos. Família, espécie, composto isolado e nome popular são algumas das informações referentes às plantas. Quanto aos animais venenosos, o sistema oferece informações tais como, espécie, seqüência de aminoácidos no formato FASTA, entre outras. Até o momento, encontram-se categorizados e disponíveis no sistema 97 dados de plantas medicinais com propriedades antiveneno, distribuídos em 42 famílias e 4.623 dados de animais venenosos, distribuídos em 392 espécies entre 10 diferentes organismos. Novas informações podem ser depositadas por colaboradores cadastrados no sistema. Tais depósitos entram em uma fila de espera e, se os campos requisitados estiverem preenchidos e os dados categorizados corretamente, o conteúdo é liberado de acordo com as regras de permissão estabelecidas pelo sistema de segurança. A interface do *Venom* é simples, contribuindo, assim, para um acesso rápido e funcional.

ESTUDO POPULACIONAL DOS POLIMORFISMOS 500 C>G E 540 C>T DA REGIÃO 3' NÃO TRADUZIDA DO GENE CDKN2A E DE SUAS POSSÍVEIS INTERAÇÕES COM *microRNAs*

Jair Huber

Orientadora: Profa.Dra. Ester Silveira Ramos

Tese de Doutorado apresentada em 22/04/2008

O melanoma é um tumor maligno originário dos melanócitos, células presentes na pele que produzem melanina protegendo contra a radiação solar. Sua prevalên-

cia vem crescendo em todo mundo sendo que o Brasil possui um maior número de casos na região sul. O fator de risco mais significativo para o melanoma é a história familiar, a qual é positiva em cerca de 10% dos casos. O gene CDKN2A foi o primeiro a estar associado com o risco para o tumor e é considerado atualmente como o principal gene de suscetibilidade à doença. Encontra-se mapeado na região 9p21 e

apresenta uma característica especial que consiste na produção de dois transcritos que codificam as proteínas p16INK4A

e p14ARF, ambas envolvidas na regulação do ciclo celular exercendo um papel de supressores tumorais. Mutações no gene CDKN2A em linhagens germinativas têm sido detectadas em famílias portadoras de melanoma numa frequência variada e a probabilidade de que uma família seja portadora de mutação no gene está diretamente relacionada com o número de parentes afetados pela doença. Entretanto, a pesquisa de mutações nas regiões codificadoras desse gene revela uma baixa prevalência de alterações na sequência de nucleotídeos em algumas famílias com melanoma. Em virtude desse fato, existem pesquisas de outras alterações fora dessas regiões do CDKN2A que possam levar à diminuição da expressão do gene e à perda do controle do ciclo celular. Alguns estudos, incluindo estudo prévio do nosso laboratório, mostraram uma alta prevalência dos polimorfismos 500 C>G e 540 C>T da região 3' não traduzida do gene CDKN2A em famílias com melanoma sinalizando uma possível associação destes com o tumor. O objetivo desta pesquisa foi avaliar as frequências desses polimorfismos em 270 indivíduos voluntários saudáveis sem história prévia pessoal ou familiar de melanoma (controle) e compará-las com a fre-

quência dos polimorfismos em uma população com critérios clínicos de melanoma familiar (calculada em estudo prévio). As técnicas utilizadas foram a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e genotipagem para os polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP). Utilizando-se de ferramentas de bioinformática, foram pesquisados também possíveis microRNAs que possam agir em sítios regulatórios na região 3' não traduzida do gene. Os resultados demonstraram frequências estatisticamente semelhantes dos dois polimorfismos entre as duas populações não podendo, através desses dados, ser associada a presença dos polimorfismos com o risco aumentado para o melanoma. Foram encontrados dois microRNAs (hsa-mir-10b e hsa-mir-328) que apresentam uma sequência de nucleotídeos parcialmente complementar à região 3'-UTR envolvendo o polimorfismo 540 C>T, indicando possível interação destes nessa região do gene. A predição de possíveis microRNAs (hsa-miR-10b e/ou hsa-miR-328) pareando na região junto ao polimorfismo 540 C>T aponta para outros caminhos e vias de regulação da expressão gênica do CDKN2A que devem ser investigados e validados biologicamente.

EXPRESSÃO GÊNICA ENVOLVIDA NOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA À ACRIFLAVINA, GRISEOFULVINA E TERBINAFINA EM FUNGOS FILAMENTOSOS

Fernando Segato

Orientadora: Profa.Dra. Nilce Maria Martinez Rossi
Tese de Doutorado apresentada em 09/05/2008

Agentes citotóxicos que interferem em diversas funções celulares são comumente utilizados no controle de infecções, mas o seu mecanismo de ação é ainda mal compreendido. As dermatofitoses são doenças infecciosas causadas por fungos patogênicos como *Trichophyton rubrum*, que representa o fungo mais prevalente em lesões de pele e unhas de humanos. No entanto, pouca informação sobre a biologia deste fungo está disponível. No presente estudo, investigamos as mudanças no perfil de expressão gênica de *T. rubrum* e *Aspergillus nidulans* após exposição à acriflavina, griseofulvina e terbinafina, que representam diferentes classes de antifúngicos. O objetivo deste estudo foi contribuir para avançar na compreensão dos mecanismos de ação desses agentes e para identificar genes de *T. rubrum* que poderiam estar envolvidos na resposta ao estresse geral. Utilizando as técnicas de Híbridação Subtrativa Supressiva (SSH) e *Diferencial Display* (DDRT-PCR) nós isolamos transcritos diferencialmente expressos durante a exposição de *T. rubrum* aos referidos agentes citotóxicos. Dentre os genes responsivos aos agentes citotóxicos men-

cionados, que tiveram sua expressão validada por *Northern Blot*, estão os transcritos similares a genes que codificam as seguintes proteínas: *NIMA interactive protein* (TINA) e uma *DNA mismatch repair*, envolvidas na divisão celular; *Cooper resistance-associated P-type ATPase*, responsável pela homeostase celular do cobre; *Carboxylic ester hydrolase*, relacionada a defesa celular; uma *DEAD helicase*, envolvida na transcrição e um transposon, provavelmente envolvido na resposta ao estresse a drogas em *T. rubrum*. Além disso, a expressão de genes que codificam para prolina oxidase, riboflavina quinase, citocromo c oxidase e um transportador MFS, similar a uma proteína transportadora de ferro, foi induzida pela acriflavina em *T. rubrum*. O agrupamento funcional destas enzimas sugere seu envolvimento no transporte de elétrons na mitocôndria e no transporte de ferro. Além disso, muitos genes com expressão elevada na presença de agentes citotóxicos mostraram similaridade com genes que codificam proteínas de resistência a múltiplas drogas e tiveram sua expressão diferencial confirmada. Estes resultados mostram que a ação de genes de diferentes vias celulares é necessária para assegurar uma resposta eficaz de *T. rubrum* aos antifúngicos, revelando potenciais alvos celulares para o desenvolvimento de novas classes de agentes antifúngicos.

ESTUDO DA EXPRESSÃO DOS GENES DE CLASSE I DAS HISTONAS DESACETILASES (HDACs 1, 2, 3 E 8) EM LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES

Daniel Antunes Moreno

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone

Dissertação de Mestrado apresentada em 15/05/2008

A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) é uma doença heterogênea em relação à biologia e ao prognóstico. Além de alterações genéticas, anormalidades epigenéticas, estão estreitamente relacionadas ao processo de carcinogênese e entre os mecanismos epigenéticos, a acetilação das histonas é um componente essencial para a regulação da estrutura da cromatina e atividade transcricional. Esse processo é mediado pelas histonas acetiltransferases (HATs). Por outro lado, a desacetilação, por meio das histonas desacetilases (HDACs), está relacionada à condensação da cromatina e repressão transcricional. A expressão anormal das HDACs tem sido associada ao processo de leucemogênese, revelando ser uma área promissora na caracterização de grupos de risco e tratamento do câncer. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a expressão dos genes da classe I de HDACs (HDAC 1, 2, 3 e 8), correlacionar os resultados com as características clínicas e de prognóstico (idade, gênero, grupo de risco, contagem inicial de blastos, imunofenótipo, resposta ao tratamento, doença residual mínima nos dias 14 e 18 e a sobrevida livre de eventos) em

46 amostras consecutivas de medula óssea de crianças e adolescentes portadores de LLA; comparar e correlacionar a expressão dos genes estudados entre as amostras de pacientes portadores LLA e 10 amostras de medula óssea sem doença hematológica. A análise da expressão gênica foi realizada através da técnica de PCR em Tempo Real pelo método TaqMan®. Foi observado um aumento da expressão do gene HDAC1 nas amostras dos pacientes bons respondedores ao tratamento. O gene HDAC2 foi mais expresso no grupo de pacientes do gênero masculino ($p=0,038$). Esse gene também mostrou uma expressão aumentada nos pacientes de alto risco ($p=0,060$) e com sobrevida menor ($p=0,065$), entretanto os valores encontrados não foram estatisticamente significativos. Além disso, foi observada uma expressão aumentada dos genes HDAC2 ($p=0,007$), HDAC3 ($p=0,014$) e HDAC8 ($p=0,002$) em amostras de pacientes com LLA quando comparadas às amostras de medula óssea sem doença hematológica. Houve correlação entre a expressão de todos os genes de classe I das HDACs, exceto entre HDAC1 e HDAC8. Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que as HDACs de classe I, podem representar importantes alvos para futuros estudos em LLA, no entanto são necessários de testes funcionais para confirmar estes resultados.

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE UMA POPULAÇÃO DO GADO CRIOULO PÉ-DURO DO PIAUÍ, ATRAVÉS DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

Ana Paula Ferreira de Oliveira

Orientadora: Profa. Dra. Eucleia Primo Betioli Contel

Tese de Doutorado apresentada em 16/05/2008

A raça crioula Pé-duro do Piauí (*Bos taurus*) é extremamente bem adaptada às condições ambientais desfavoráveis da zona semi-árida do Nordeste Brasileiro e está em risco de extinção. Neste trabalho foi caracterizada geneticamente, por microsatélites, uma amostra ($n=126$) originária da Fazenda Experimental Octavio Domingues, da Embrapa Meio-Norte, no município de São João do Piauí. A variabilidade genética foi estimada através de frequências gênicas, diversidade gênica, heterozigose esperada e observada, riqueza alélica, valor do Pic (conteúdo de informação de polimorfismo), coeficiente de endogamia e verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os locos analisados

foram *SPS115*, *BM1824*, *BM2113*, *BMS4049*, *TGLA122*, *ETH225*, *ETH10*, *INRA23*, *UWCA46* e *BMS348*, identificando-se um total de 101 alelos. A diversidade gênica média foi de 75,6%, com valores extremos verificados nos locos *TGLA122* (91,3%) e *BMS4049* (45,4%). O valor médio da heterozigose esperada foi 75,5%, observada 60,0%, e Pic 72,3%. O coeficiente de endogamia *Fis* foi estatisticamente significativo ($Fis=0,206$; $P<0,01$). Foram observados também desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg em nove dos dez locos analisados. A partir dos dados obtidos foi possível observar que ainda existe diversidade genética nesta população, porém os desvios do equilíbrio, o valor significativo do *Fis*, e a heterozigose observada menor em todos os locos em relação à esperada, demonstraram a ocorrência de cruzamentos endogâmicos resultando em alto nível de homozigose nesta população.

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA MOLECULAR DE CROMOSSOMOS MARCADORES EXTRANUMERÁRIOS

Ana Carolina Laus

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Regina Martelli

Tese de Doutorado apresentada em 21/05/2008

Rearranjos cromossômicos envolvendo a presença de cromossomos marcadores extranumerário são achados citogenéticos frequentes em pacientes que apresentam deficiência mental, alterações de crescimento, distorções e/ou malformações. A presença desse material é responsável por trissomia ou tetrassomia parcial de determinadas regiões cromossômicas, causando quadros clínicos distintos e inespecíficos. A variabilidade fenotípica está relacionada principalmente com os diferentes graus de mosaicismo, os genes presentes na região adicional, o cromossomo de origem, entre outros fatores. Sendo assim, a caracterização desse material cromossômico é de importância fundamental para a determinação do prognóstico e do aconselhamento genético dos pacientes e suas famílias. O presente estudo teve como objetivo a análise de cromossomos marcadores extranumerários por meio de técnicas de citogenética convencional e molecular. Foram selecionados onze pacientes que são acompanhados pelo o Serviço de Genética Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, todos com diagnóstico citogenético convencional por bandeamentos GTG de cromossomo marcador extranumerário. Para determinação da origem e caracterização dos cromossomos marcadores foram aplicadas as técnicas de Cariótipo Espectral (SKY) e de Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH). Em dez pacientes foi possível determinar a origem e composição dos marcadores. Dois pacientes apresentam cromossomos marcadores

identificados como duplicações invertidas do cromossomo 15, com cariótipos definidos, respectivamente, como 47,XY,+idic(15)(pter→q15::q15→pter) e 47,XX,+idic(15)(pterq21::q21→p11.2), um paciente possui cromossomo marcador derivativo do cromossomo 15, com cariótipo 47,XX,+der(15)(pterq21) e dois pacientes, sendo uma menina e seu pai, possuem cromossomos marcadores derivativos do cromossomo 15 com cariótipos, respectivamente, 48,XX,+2der(15)(pterq12) e 48,XY,+2der(15)(pterq12). Dois pacientes possuem cromossomos marcadores derivativos do cromossomo 9, com cariótipos definidos, respectivamente, como 47,XX,+der(9)(pterq21) e 47,XX,+der(9)(pterq32) e um paciente apresenta cromossomo derivativo do cromossomo 4 [47,XX,+der(4)(p16q21)[9]/48,XX,+der(4)(p16q21),+mar[91]]. Um paciente possui um cromossomo marcador translocado derivativo do cromossomo 22 [47,XY,+der(22)t(11;22)(q25;q11.2)] e outro paciente, um cromossomo translocado derivativo do cromossomo 15 [47,XY,+der(15)t(15;16)(q13;q13)], ambos herdados de mães portadoras de translocações aparente balanceadas. Em um caso, não foi possível a caracterização dos cromossomos marcadores por meio das técnicas aplicadas. Há uma grande variação fenotípica associada à presença de cromossomos marcadores e muitas vezes o prognóstico e o aconselhamento genético são difíceis de determinar. As técnicas de citogenética molecular são ferramentas importantes para a caracterização dos cromossomos marcadores, tanto durante o pré-natal, como para uma família que já possui um membro afetado, auxiliando no mapeamento gênico de cada região envolvida para futura correlação cariótipo-genótipo-fenótipo.

PROCESSOS CELULARES NO DESENVOLVIMENTO DO OLHO COMPOSTO DE *Apis mellifera*

David Santos Marco Antonio

Orientador: Prof.Dr. Klaus Hartmann Hartfelder

Dissertação de Mestrado apresentada em 30/05/2008

Os processos que regem o desenvolvimento dos olhos compostos em insetos têm sido amplamente estudados em *Drosophila melanogaster* onde estes se originam a partir de discos imaginais. Pouco se sabe, porém, sobre o desenvolvimento do lóbulos óptico e da retina em outros insetos que, na sua grande maioria, não possuem discos imaginais de olhos separados do sistema nervoso central. Neste sentido, a análise comparada do desenvolvimento dos olhos de *Apis mellifera* pode contribuir não somente para aspectos evo-devo entre as grandes famílias dos insetos holometábolos, quanto pode elucidar questões de plasticidade de desenvolvimento pois os olhos compostos apresentam fortes características sexo e casta-específicas. Com

o objetivo primário de elucidar os padrões de divisão e diferenciação celular durante o desenvolvimento do olho em *A. mellifera* realizamos análises histológicas e de imunomarcagem durante o desenvolvimento pós-embriônico, juntamente com análise de expressão do gene *roughest* em tempo real. Para imunomarcagem utilizamos o anticorpo anti-fosfohistona H3 fosforilada que marca células em fase M do ciclo celular. Foram analisadas larvas operárias entre o terceiro instar larval (L3) até pupas de olho branco, rosa e marrom, com foco sobre o quinto instar larval que fica subdividida em fase de alimentação e crescimento (L5F), fases de tecelagem de casulo (L5S) e prepupa (PP). O desenvolvimento do lóbulos óptico em *Apis mellifera* ocorre por dobramento neuroepitelial, a partir de um centro de diferenciação, sequencialmente gerando as camadas neurais do lóbulos óptico (lóbulos, medula e lâmina). A lâmina (última a surgir) apresen-

tou-se com desenvolvimento mais lento e em duas fases antes da metamorfose: a primeira fase é o seu surgimento no começo do quinto instar larval acompanhando o primeiro pico de expressão de *roughest* e a segunda fase ocorre durante a tecelagem de casulo com o desenvolvimento do córtex acompanhando o segundo pico de expressão de *roughest*. Ainda durante o segundo pico de expressão de *roughest* os rabdômeros da retina começam a ficar visíveis, assim como

os feixes axonais. Estes porém estarão completamente formados somente após a metamorfose. O desenvolvimento completo da lâmina, lóbula e medula e da retina ocorre somente após a metamorfose. Durante a fase pupal as estruturas do lóbulo óptico estão prontas, porém na retina observa-se ainda gradual pigmentação, encurtamento dos feixes axonais e alongamento dos rabdômeros até atingirem o seu comprimento final logo antes da emergência.

MARCADORES GENÉTICOS DE ANCESTRALIDADE EM COMUNIDADES FUNDADAS POR AÇORIANOS NA ILHA DE SANTA CATARINA

Yara Costa Muniz Netto

Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões

Tese de Doutorado apresentada em 30/05/2008

As comunidades da Costa da Lagoa (CL) e São João do Rio Vermelho (RV) estão localizadas na Ilha de Santa Catarina, Sul do Brasil, e foram colonizadas na segunda metade do século XVIII por imigrantes vindos do Arquipélago de Açores. Estudos demográficos e genéticos mostraram também a presença de componentes africanos e ameríndios. CL é considerada isolada devido à sua localização geográfica e RV está em fase de quebra de isolamento pelo aumento de migração, principalmente nos últimos 20 anos. Os objetivos deste estudo foram verificar a hipótese dos diferentes graus de isolamento nas duas comunidades, estimar as proporções de mistura étnica, assim como estabelecer comparações entre elas e com portugueses, especialmente açorianos. As frequências de oito AIMs (FY, RB, LPL, AT3, Sb19.3, APO, PV92 e CYP1A1) e dos STRs do haplótipo estendido do cromossomo Y foram então estimadas nas comunidades de CL (n=120), RV (n=163) e na amostra urbana HM (n=50) a partir de PCR e PCR-RFLP. A informação obtida a partir das mesmas foi comparada com resultados de estu-

dos históricos, demográficos e genéticos prévios realizados nestas comunidades. As análises estatísticas empregaram programas já descritos (GENEPOP, DISPAN, GDA, ARLEQUIN, STRUCTURE, MVSP e ADMIX 2 e 3). Com relação ao cromossomo Y, concluímos que as duas comunidades ainda apresentam semelhanças considerando as análises de diferenciação gênica. Isto pode ser devido à origem comum e recente e à proximidade geográfica, o que torna possível um fluxo de homens entre as duas comunidades. Entretanto, o acréscimo no número de marcadores ligados ao cromossomo Y permitiu a diferenciação entre estas duas comunidades, como mostram os valores de *FST* e de diferenciação haplotípica. As estimativas de mistura indicam preponderância do componente europeu. Entretanto, dada à indisponibilidade da literatura, faz-se ainda necessária uma escolha mais adequada das frequências parentais no caso dos Y-STRs. Admitindo que os AIMs sejam marcadores mais eficientes em estimativas de mistura étnica, dado seus altos diferenciais de frequência alélica entre populações parentais, as contribuições de populações não europeias (principalmente africanas) observadas mantêm a hipótese de cruzamentos preferenciais entre homens portugueses e mulheres ameríndias e/ou africanas na formação das comunidades.

GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA

POLIMORFISMO *IGF-2/ApaI* EM GESTANTES PORTADORAS DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA TIPO 1 USUÁRIAS DE ANTIRETROVIRAIS

Alessandra Cristina Marcolin

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Duarte

Tese de Doutorado apresentada em 01/04/2008

Introdução: Estudos avaliando os efeitos dos antirretrovirais (ARV) em pacientes portadoras do HIV-1 têm

demonstrado a ocorrência de hiperglicemia e intolerância à glicose secundárias à resistência insulínica ou até quadros semelhantes ao *Diabetes mellitus* tipo 1. Por outro lado, algumas publicações mencionam o efeito dos distúrbios da expressão dos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF) na função da célula β pancreática em humanos.

Polimorfismos do *IGF-2/ApaI* têm sido associados à obesidade e à distúrbios do metabolismo da glicose.

Objetivos: Estudar o polimorfismo *IGF-2/ApaI* em gestantes portadoras do HIV-1 usuárias de ARV que desenvolveram hiperglicemia ao longo do período gestacional e identificar os subgrupos de pacientes que estão sob maior risco de desenvolverem esse distúrbio.

Métodos: Estudo de coorte histórica com controle externo envolvendo 87 gestantes normais, 43 gestantes portadoras do HIV-1 usuárias de ARV que apresentaram acréscimo dos valores da Área sob a Curva das glicemias ao longo da gravidez e 43 pacientes diabéticas gestacionais, soronegativas para o HIV-1. A reação em cadeia da polimerase foi utilizada para amplificação da seqüência do *IGF-2*, a partir do DNA genômico extraído do sangue periférico. Para avaliação do polimorfismo *IGF-2/ApaI* foi utilizada a técnica do polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição. Para análise estatística foram utilizados o teste de

Kolmogorov-Smirnov, o teste *ANOVA* e o teste do Qui-quadrado.

Resultados: Não foram observadas diferenças significativas entre as frequências genotípicas obtidas nos três grupos analisados. Considerando a terapêutica ARV utilizada, não há diferenças na distribuição dos genótipos entre o grupo de usuárias de Zidovudina e o da terapia tríplice. Não foram detectadas diferenças entre as frequências gênicas das populações examinadas neste estudo. Pacientes não brancas têm maior probabilidade de apresentarem o genótipo GG quando comparadas às gestantes brancas.

Conclusões: Os resultados obtidos contribuem para o melhor entendimento das alterações do metabolismo glicídico em gestantes submetidas à terapia ARV, desonerando o polimorfismo *IGF-2/ApaI* como único responsável por essas alterações. Esses dados sinalizam positivamente que outras variáveis devem ser estudadas para a elucidação dessas anormalidades.

AVALIAÇÃO DO FUSO MEIÓTICO E DISTRIBUIÇÃO CROMOSSÔMICA DE OÓCITOS MATURADOS *in vitro* DE PORTADORAS DA SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICO SUBMETIDAS À ESTIMULAÇÃO OVARIANA: ESTUDO PILOTO

Rodolpho Cruz Vieira

Orientadora: Profa. Dra. Paula Andrea de A. Salles Navarro
Dissertação de Mestrado apresentada em 17/04/2008

Objetivos: Avaliar o fuso meiótico e a distribuição cromossômica de oócitos maturados *in vitro* obtidos de ciclos estimulados de mulheres inférteis com Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) e fator masculino e/ou tubário de infertilidade.

Métodos: Cinco pacientes inférteis com SOP e 8 pacientes com fator tubário e/ou masculino de infertilidade, submetidas a ciclos estimulados para captação oocitária para injeção intracitoplasmática de espermatozóide, foram selecionadas prospectiva e consecutivamente e divididas em grupos de estudo e controle, respectivamente. Oócitos em estágio de vesícula germinativa (VG) e em metáfase I (MI) foram submetidos à maturação *in vitro* (MIV), respectivamente, por 19 horas \pm 1 hora (VG) e 4 horas \pm 30 minutos (MI), conforme curva de MIV previamente realizada no presente serviço. Oócitos em metáfase II (MII) após MIV foram fixados, submetidos a imunocoloração e microscopia

de fluorescência para avaliação morfológica do fuso e da distribuição cromossômica.

Resultados: Respectivamente 6 dos 10 oócitos (60%) em MII analisados do grupo de estudo e 4 dos 12 oócitos (33.3%) MII analisados do grupo controle apresentaram anomalias meióticas, caracterizadas por anomalias do fuso e/ou distribuição cromossômica oocitárias. Observou-se ausência de diferença significativa entre as proporções de anomalias meióticas entre os dois grupos analisados.

Conclusões: Os dados preliminares do presente estudo, apesar de não demonstrarem aumento significativo na incidência de anomalias meióticas nas portadoras de SOP, sugerem uma tendência a maior ocorrência de anomalias meióticas nos oócitos deste grupo de pacientes, quando comparados aos de portadoras de fator masculino e/ou tubário de infertilidade, o que deverá ser melhor avaliado em estudos com maiores casuísticas. Estes achados têm potencial clínico para apontar uma possível explicação para as controversas menores taxas de fertilização observadas em pacientes com SOP submetidas às Técnicas de Reprodução Assistida.

AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES POSTURAS E DOS MÚSCULOS PÉLVICOS EM MULHERES PORTADORAS DE DOR PÉLVICA CRÔNICA

Mary Lourdes Lima de Souza Montenegro

Orientador: Prof. Dr. Omero Benedicto Poli Neto
Dissertação de Mestrado apresentada em 24/04/2008

Introdução: Dor pélvica crônica é uma dor recorrente ou contínua na região inferior do abdome ou pelve, excluindo gravidez e malignidade, suficientemente severa para

interferir nas atividades habituais e que necessita de tratamento clínico e/ou cirúrgico. Excluindo ainda dismenorréia e dispareunia como causas isoladas da dor. Sua etiologia não é clara, geralmente resulta de uma complexa interação entre os sistemas gastrointestinal, urinário, neurológico, ginecológico e músculo-esquelético influenciada ainda por fatores psicológicos e sócio-culturais. Alguns estudos demonstram uma associação entre alterações musculares e DPC, porém apesar do crescente interesse, são poucos os estudos que caracterizam estas alterações em mulheres portadoras de DPC.

Objetivo: Caracterizar o acometimento postural e dos músculos pélvicos em mulheres portadoras de DPC.

Metodologia: Foi realizado um estudo do tipo transversal incluindo 108 mulheres portadoras de DPC (grupo DPC) e 48 mulheres voluntárias saudáveis (grupo controle) com idade média entre 31 e 35 anos, atendidas consecutivamente no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-

USP). Foram então realizadas avaliação postural, da musculatura abdominal e pélvica. Para análise dos dados, foram utilizadas análises univariadas e descritivas, utilizando teste t student ou Mann-Whitney e teste do Qui-quadrado ou teste exato de Fisher para análise de dados categóricos conforme mais apropriado. Considerou-se significante $p < 0,05$.

Resultados: Alterações posturais foram observadas mais frequentemente no grupo DPC que no grupo controle, principalmente nos seguimentos cabeça ($P < 0,01$), coluna cervical ($P = 0,01$), escápulas ($P < 0,01$), e triângulo de Tales ($P < 0,01$). A frequência de espasmo em músculos pélvicos foi de 58,3%. Mulheres com DPC e espasmo em músculos pélvicos, tiveram uma maior frequência de dispareunia moderada e severa, que aquelas com DPC e sem espasmo em músculos pélvicos ($P < 0,01$).

Conclusão: Uma grande proporção de mulheres com DPC apresentaram significativas alterações posturais e espasmo em músculos pélvicos, associados à dispareunia e altos índices sugestivos de depressão.

ANENCEFALIA: ANÁLISE CRÍTICA NOS ÂMBITOS MÉDICO E LEGAL

Flávia Correa Meziara

Orientador: Prof. Dr. Sergio Pereira da Cunha
Dissertação de Mestrado apresentada em 30/04/2008

A questão do aborto por de fetos malformados no Brasil é problemática, face a ausência de legislação que permita a interrupção da gestação. Tais tipos de aborto são considerados ilegais, já que o Código Penal vigente prevê somente duas possibilidades de interrupção: risco de vida

para a mãe e em decorrência de estupro. A presente pesquisa objetivou analisar os casos de fetos malformados cujas mães foram atendidas no HCRP/USP e propor na Justiça os pedidos de interrupção destas gestações quando assim desejassem. Conclui-se que ainda há falta de informação por parte dos médicos em relação a possibilidade de indicação deste tipo de gestação, ainda que o quadro tenha melhorado e que quanto mais os magistrados conhecem e têm acesso ao que a medicina pode lhes oferecer, maior a probabilidade de deferimento destes Alvarás.

PRODUÇÃO DE VEGF E HIF-1K EM PACIENTES COM CARCINOMA DE MAMA LOCALMENTE AVANÇADO SUBMETIDAS À QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE

Alexandre Pavan Garieri

Orientador: Prof. Dr. Heitor Ricardo Cosiski Marana
Dissertação de Mestrado apresentada em 09/05/2008

Objetivo: Determinar o valor prognóstico e preditivo do VEGF (vascular endothelial growth factor) e do HIF-1 κ (Hypoxia-inducible factor-1) em relação à sobrevida livre de doença (SLD) e sobrevida global (SG) em pacientes com carcinoma de mama localmente avançado (CMLA) tratadas primariamente pela quimioterapia neoadjuvante.

Materiais e Métodos: VEGF e HIF foram quantificados consecutivamente em plasma de 36 pacientes com CMLA pelo método de ELISA (*enzyme labeling immunoassay absorbant*) para o VEGF₁₆₅ e o HIF-1 α . O tratamento neoadjuvante foi realizado em todas as pacientes

com docetaxel e epirrubicina. O tempo médio de seguimento foi de 56 meses.

Resultados: Uma análise univariada demonstrou que o HIF-1 κ está significativamente relacionado à SLD ($P = .0238$) e à SG ($P = .0121$) com as pacientes HER-2 positivas. Não houve diferença significativa para a SLD ou SG no que diz respeito aos receptores de hormônio, comprometimento axilar ou grau tumoral. Os valores de VEGF foram maiores no grupo de pacientes RE+ do que no grupo RE negativo ($P = .01$). Inversamente os valores de HIF-1 κ foram menores no grupo RE+ comparados ao grupo RE- ($P = .02$). Pacientes com recorrência óssea apresentaram uma tendência a apresentarem valores de VEGF menores (média, 175,7 pg/ml) do que aquelas com recorrência visceral (441 pg/ml). Uma análise multivariada demonstrou o com-

prometimento axilar ($P = .0004$), receptores de estrógeno (ER) ($P < .0001$), e tamanho do tumor ($P = .0085$) como fatores independentes de SLD. O HIF-1 κ foi tido como um fator independente preditivo de SG ($P = .0180$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores plasmáticos de HIF-1 κ ou VEGF nos períodos pré e pós quimioterapia.

Conclusões: Os resultados sugerem que o nível plasmático do HIF-1 κ é preditivo de SLD e SG nas pacientes com CMLA apresentando uma sobreposição as pacientes HER-2 positivas. As dosagens de VEGF podem ser preditivas de resposta e prognóstico no tratamento neoadjuvante, mas são necessários novos estudos prospectivos comparados ao HIF-1 κ para conclusões mais consistentes.

INTERVENÇÃO PSICOLÓGICA EM GESTANTES CUJOS FETOS APRESENTAM MALFORMAÇÃO CONGÊNITA

Renata Panico Gorayeb

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Duarte

Tese de Doutorado apresentada em 14/05/2008

No período gestacional as mudanças psico-afetivas são usuais em todas as mulheres. Naquelas gestantes com fetos malformados, observa-se que as alterações comportamentais são mais frequentes, potencializando índices mais elevados de ansiedade, depressão e depressão pós-parto, dificultando os processos de elaboração afetiva do luto da criança desejada. Este estudo teve como objetivo avaliar e descrever os potenciais benefícios da intervenção psicológica a uma população de gestantes cujos fetos apresentavam malformação. Foram avaliadas 96 gestantes divididas em quatro grupos, atendidas em hospital universitário, que presta atendimento obstétrico de nível terciário. Os grupos de gestantes que receberam intervenção psicológica foram: 1) de mães com fetos malformados, composto por 16 gestantes; 2) de gestantes com fetos considerados normais, formado por 15 mães; e o 3) de gestantes cujos fetos evoluíram para óbito, com 15 mães. O quarto grupo foi composto por 19 mães cujas crianças também apresentavam malformação, mas que não tiveram acompanhamento psicoterápico durante a gravidez. Todas as mães foram avaliadas para critérios de ansiedade, depressão, depressão pós-parto e enfrentamento (Escala Hospitalar de Ansiedade e Depressão, Escala de Avaliação de Depressão Pós-Parto, Escala de Modo de Enfrentamento de Problemas)

bem como submetidas à entrevista qualitativa sobre temas relacionados à malformação fetal. Foram analisadas também as formas de enfrentamentos relatados pelas pacientes durante a gravidez e para aquelas que deram continuidade ao trabalho, nos primeiros seis meses de vida da criança. Os resultados obtidos demonstraram que as mães submetidas à intervenção psicológica no pré-natal apresentaram comportamentos de ansiedade e depressão significativamente inferiores às mães que iniciaram seu atendimento no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo somente para os cuidados pós-natais. Observou-se também que as mães de crianças malformadas que foram submetidas a acompanhamento psicológico no pré-natal tiveram seus índices de ansiedade, depressão e depressão pós-parto reduzidos a valores compatíveis aos das mães de crianças sem malformação, demonstrando que estas mães se encontraram em melhores condições de elaboração psicológica da situação. Estes resultados confirmam dados da literatura sobre a importância da preparação materna prévia ao parto de crianças malformadas como redutor dos índices de alterações de humor, que poderiam prejudicar o vínculo adequado mãe-criança e reforçam a importância de um aconselhamento profissional especializado em psicologia, que em interface com os profissionais das equipes obstétrica e cirúrgicas infantis, pode favorecer a elaboração cognitiva e afetiva materna e o pleno desenvolvimento da relação mãe-malformação-criança.

PERDAS DE OPORTUNIDADES NA PREVENÇÃO DO CÂNCER DE COLO UTERINO DURANTE O PRÉ-NATAL EM MUNICÍPIO DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

Carla Vitola Gonçalves

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Duarte

Tese de Doutorado apresentada em 04/06/2008

Um terço dos casos de carcinoma cervical ocorre no período reprodutivo. Sendo que, cerca de 3% dos diagnósticos são realizados durante a gravidez. Evidências atuais indicam que as gestantes apresentam maior chance de terem diagnosticadas lesões iniciais. Pois a gravidez é uma

excelente oportunidade para o rastreamento desta neoplasia, já que faz parte da rotina pré-natal o exame ginecológico. No entanto, na prática esta oportunidade parece não estar sendo aproveitada na sua totalidade. Com este estudo objetivou-se avaliar o conhecimento das puérperas sobre a prevenção do carcinoma cervical, descrever características associadas a não realização do citopatológico nos últimos três anos e comparar a cobertura da citologia no início e no final do pré-natal. Trata-se de uma avaliação transversal realizada na cidade de Rio Grande-RS, entre maio e junho de 2007.

A amostra foi calculada pelo programa Epi-Info 6.04, totalizando 224 puérperas. Durante a internação hospitalar foi aplicado às puérperas um questionário estruturado e pré-codificado. Os dados foram digitados no Epi-Info 6.04, sendo a análise bruta realizada no software SPSS e a multivariada pela Regressão de Poisson no programa Stata. Das 230 puérperas entrevistadas 96,5% referiram conhecer o exame preventivo do câncer do colo uterino. Apesar disso, a prevalência de citopatológico nos últimos 36 meses era de 32,6% no início da gestação, chegando a 55,2% no puerpério. Mostrando a associação positiva do pré-natal na cobertura do citopatológico ($p > 0,001$). Mesmo assim, 74 puérperas (32,2%) permaneceram sem nunca terem coletado o citopatológico e 29 (12,6%) continuaram com a citologia desatualizada. Na análise bruta, o grupo de puérperas com idade igual ou inferior a 19 anos, não brancas, de escolaridade igual ou inferior a oito anos, com renda familiar *per capita* inferior a um salário mínimo, início da vida sexual aos 15 anos ou menos, com início do pré-natal no 2º e 3º trimestres, que realizaram cinco consultas ou menos e que fizeram o acompanhamento no SUS, apresentaram diferenças estatísticas significantes para uma menor cobertura do

exame citopatológico ao final do pré-natal. Após a análise ajustada, o grupo que consultou no Hospital Universitário da Fundação Universidade Federal do Rio Grande - FURG (IC_{95%}: 0,18 – 0,82) e as puérperas com idade entre 25 a 29 anos (IC_{95%}: 0,29 – 0,90), mostraram-se significativamente associadas à melhora da cobertura do citopatológico nos últimos três anos. Portanto, evidenciou-se neste estudo que apesar do pré-natal ter melhorado a cobertura do exame citopatológico. O serviço local de saúde mostra-se pouco efetivo pois cobriu menos mulheres do que o preconizado, e desigual porque o acesso ao exame variou conforme algumas características das usuárias. Além disso, os critérios epidemiológicos de risco para o carcinoma cervical não foram priorizados pela assistência médica. Os resultados revelam a necessidade de aumentar a cobertura do citopatológico e melhorar a qualidade da atenção pré-natal oferecida em Rio Grande. Motivando e capacitando os profissionais de saúde quanto à importância dos procedimentos da rotina pré-natal, pois apenas as gestantes que consultaram no Hospital Universitário da FURG tiveram a cobertura do citopatológico próxima do preconizado pela Organização Mundial da saúde.

IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

MONTAGEM DE cDNAs QUE REPRESENTAM REGIÕES SOBREPOSTAS DE TODO O GENOMA DE UM VÍRUS BRASILEIRO DE DENGUE TIPO 3 E ANÁLISES DA DIVERSIDADE DA PROTEÍNA DO ENVELOPE (E)

Alberto Anastacio Amarilla Oritz

Orientador: Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana
Dissertação Mestrado apresentada em 14/04/2008

A dengue é uma doença infecciosa causada pelo vírus da dengue (gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*), e transmitida pela picada de mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti*. Esta doença é um importante problema de saúde pública em todo o mundo; segundo a Organização Mundial de Saúde, cerca de 50 a 100 milhões de pessoas são infectadas anualmente em mais de 100 países de todos os continentes. A dengue apresenta-se em três formas clínicas principais; doença febril indiferenciada, febre clássica do dengue (FD) e dengue hemorrágica com ou sem choque (DHF/DSS). Recentemente, viu-se um dramático aumento do número de casos de DHF/DSS nas Américas, e este aumento coincidiu com a introdução do vírus dengue tipo 3 (DENV-3), genótipo III. Neste trabalho, três fragmentos sobrepostos que representam todo o genoma viral foram construídos a partir de um isolado brasi-

leiro (D3BR/RP1/2003) de DENV-3. Os três fragmentos encontram-se inseridos em vetores plasmidiais, sendo que dois fragmentos representam a metade 5' do genoma viral e o terceiro a metade 3'. Estes fragmentos serão utilizados futuramente para construção de um clone infeccioso, o qual servirá como ferramenta para estudar os processos relacionados à patogênese, replicação, mecanismos de escape do sistema imune, e até para a produção de vacinas. A diversidade genética dos DENV-3 isolados em todo mundo foi estudada analisado o gene da proteína E. A análise filogenética mostrou que o D3BR/RP1/2003 pertence ao genótipo III. Por outro lado, esta análise mostrou a existência de agrupamentos genéticos distintos dentro de três dos quatro genótipos conhecidos de DENV-3. Assim, observamos que o genótipo I possui duas linhagens e duas sub-linhagens; o genótipo II está constituído por duas linhagens e 4 sub-linhagens; e o genótipo III compreende duas linhagens e duas sub-linhagens. Estes dados poderão fornecer informações para melhor entendimento da evolução destes vírus e até para a seleção de um candidato a vacina.

CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE CAMUNDONGOS COM ISOLADOS DE LEISHMANIA BRAZILIENSIS RESISTENTES E SUSCETÍVEIS AO ANTÍMÔNIO E AO ÓXIDO NÍTRICO

Diego Luís Costa

Orientador: Prof. Dr. João Santana da Silva

Dissertação Mestrado apresentada em 24/04/2008

A leishmaniose constitui um espectro de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, dentre as quais, no Brasil, a mais comum é a leishmaniose tegumentar americana (LTA). A resposta imune de padrão Th1 confere proteção contra a infecção, enquanto respostas Th2 levam à suscetibilidade. Células T reguladoras podem suprimir a atividade de células efetoras Th1 ou Th2, favorecendo ou não, respectivamente, a sobrevivência do parasita. No município de Corte de Pedra - Bahia, foram isoladas, de pacientes com LTA, refratários ou não ao tratamento com antimônio, amostras de *L. braziliensis*, resistentes (LTCP 393 - R) ou suscetíveis (LTCP 15171 - S) à morte por óxido nítrico, respectivamente. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi caracterizar, em modelo murino, os parâmetros imunológicos da infecção com ambos os isolados. Assim como em humanos, a infecção de camundongos BALB/c com o isolado resistente resultou no desenvolvimento de lesões maiores. Elas também foram mais duradouras, com maior infiltrado inflamatório, composto principalmente de células TCD4⁺, neutrófilos e macrófagos, e maior quantidade de parasitas. Entretanto, nos linfonodos, não houve tal diferença; porém, o número de patógenos foi maior nos pontos mais tardios em ambas as infecções. Cé-

lulas IFN- γ ⁺ IL-10⁺, segundo a literatura exercem atividades supressoras, permitindo a sobrevivência e replicação parasitária, e estas foram encontradas nestes órgãos em maior proporção justamente nestes pontos, corroborando com o resultado anterior. Não houve diferença expressiva na produção e expressão de RNAm para citocinas como IFN- γ e TNF- α , entre os grupos, mas a expressão e produção da citocina IL-4 estiveram maiores nas células das lesões e nos linfonodos respectivamente, de animais infectados com LTCP 393 - R. Nas orelhas não houve diferença na expressão de RNAm para IL-10 nem TGF- β , porém, nos linfonodos de animais infectados com LTCP 15171 - S, encontramos maior proporção de células TCD4⁺ FoxP3⁺ IL-10⁺. Tomados em conjunto, estes dados sugerem que a produção da citocina IL-4 em animais infectados com o isolado resistente pode estar sendo responsável pelo deficiente controle da infecção. Além disso, a associação encontrada sugere que a menor produção de IL-10 por células CD4⁺ FoxP3⁺ IL-10⁺ pode estar induzindo menor regulação de respostas Th2 nestes animais, enquanto no grupo infectado com o isolado suscetível, a maior produção de IL-10 por estas células pode estar inibindo a montagem deste tipo de resposta. Finalmente, o entendimento das respostas imunológicas induzidas nas infecções por parasitas resistentes ou suscetíveis ao NO e a drogas como o antimônio poderia possibilitar o desenvolvimento de novas terapias para o controle, em pacientes, da leishmaniose refratária aos tratamentos convencionais.

PAPEL DE CCR2 NA INFECÇÃO ORAL POR *Toxoplasma gondii*

Luciana Benevides

Orientadora: Profa. Dra. Neide Maria da Silva

Dissertação Mestrado apresentada em 25/04/2008

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório. Estima-se que 1/3 da população do mundo esteja infectada por esse patógeno. A infecção oral por esse parasito induz uma reação inflamatória exacerbada que se não controlada pode levar a morte do animal. Além disso, quimiocinas produzidas por células epiteliais intestinais infectadas estão envolvidas na migração e ativação de células inflamatórias. Entretanto, como a via de infecção natural é a oral, nosso objetivo foi verificar o papel de CCR2 na infecção oral por *T. gondii*. Dessa forma, animais C57BL/6 e CCR2^{-/-} foram infectados por via oral com 5 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* e a sobrevivência e parâmetros imunológicos foram avaliados. Os dados obtidos nesse

estudo demonstram um aumento da migração de células CCR2⁺ no intestino delgado, bem como de células CCL2⁺ em ambas as linhagens dos animais após a infecção. Contudo, os animais CCR2^{-/-} apresentam uma profunda suscetibilidade à infecção pelo parasito, com 100% de mortalidade até o 280 dia após a infecção. Os órgãos periféricos dos animais CCR2^{-/-} apresentam um aumento do parasitismo tecidual e uma reação inflamatória suave, que no intestino delgado, são associados com uma pequena migração de células T CD4⁺ e MAC-1⁺. Em contraste, há um aumento na migração de células TCD8⁺ que são relacionados com o controle da resposta imune inflamatória nesse órgão. Entretanto, no início da fase crônica, camundongos CCR2^{-/-} apresentam um aumento do parasitismo tecidual no SNC com uma diminuição de células T CD4⁺ e MAC-1⁺ e um aumento de células T CD8⁺ quando comparados com os animais C57BL/6. Foi observado também, que na ausência

do receptor, a expressão de iNOS é ausente no intestino delgado na fase aguda e no SNC no início da fase crônica de infecção. Além disso, na ausência de CCR2 a produção de NO por células de baço é quase ausente. Em conjunto,

os resultados sugerem que CCR2 é essencial para ativar mediadores microbicidas principalmente no SNC para o controle da proliferação do parasito, favorecendo a resistência do hospedeiro.

O PAPEL DAS CÉLULAS T REGULADORAS NO DESENVOLVIMENTO DA IMUNOSSUPRESSÃO DURANTE A SEPSE GRAVE EXPERIMENTAL

Daniele Carvalho Bernardo Nascimento

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha

Dissertação de Mestrado apresentada em 30/04/2008

A sepsé é uma resposta inflamatória sistêmica decorrente de uma infecção. Na evolução do processo séptico é comum a ocorrência de uma significativa disfunção cardiovascular e extensa lesão tecidual. Observa-se também uma significativa disfunção imune que contribui para o agravamento do processo séptico e instalação de um quadro de imunossupressão. De fato, estudos recentes demonstraram que tanto em pacientes, como em modelos experimentais de sepsé grave, ocorre um quadro de imunossupressão, caracterizado por aumento da frequência de células T reguladoras. Assim, nosso objetivo foi investigar a possível contribuição das células T reguladoras no desenvolvimento da imunossupressão durante a sepsé grave experimental em modelo murino. Os camundongos C57BL/6 submetidos à sepsé grave, pelo modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP), e tratados com antibiótico durante três dias, apresentaram aproximadamente 50 % de sobrevivência. Esses animais sobreviventes do processo séptico são altamente susceptíveis (mortalidade de 100 %) à infecção secundária induzida por *Legionella pneumophila*, 15 dias após a indução da CLP. A cinética da frequência de

células T reguladoras (CD4⁺CD25⁺ e Foxp3⁺ ou CD103⁺ ou CTLA-4⁺ ou GITR⁺) foi avaliada em tecidos distintos (lavado peritoneal, linfonodo drenante, timo e baço) e em diferentes intervalos de tempo após a indução de sepsé grave. Observou-se um aumento na expressão da maioria dos marcadores de células T reguladoras em todos os tecidos analisados, no primeiro dia após a CLP. Posteriormente, a frequência de células T reguladoras reduziu significativamente, com exceção do timo que apresentou aumento em 7 e 15 dias após a CLP e do baço que apresentou aumento novamente em 15 dias após a CLP. No décimo quinto dia, observamos também uma diminuição na capacidade proliferativa das células T CD4⁺CD25⁻ do baço estimuladas com anticorpo anti-CD3. Nesse período, o comprometimento nas células T CD4⁺ não foi revertido *in vitro* utilizando anticorpos anti-CTLA-4 ou anti-GITR, que inibem a atividade das células T reguladoras, sugere-se que esse comprometimento ocorra numa fase inicial do processo séptico. Desta forma, a inibição da atividade supressora das células T reguladoras pelo pré- e pós-tratamento de camundongos sépticos com anticorpo anti-GITR promoveu um aumento da resistência (~ 80 % de sobrevivência) destes animais à infecção não letal. Em conjunto os dados demonstram a contribuição das células T reguladoras no desenvolvimento da imunossupressão durante a sepsé grave.

ESTUDO DE CO-INFEÇÕES POR HELMINTOS E *Mycobacterium tuberculosis*. IMPLICAÇÕES NO USO DA VACINA TERAPÊUTICA DNA-hsp65

Fabiani Gai Frantz

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli

Tese de Doutorado apresentada em 13/05/2008

O número crescente de casos de tuberculose, o aparecimento de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a múltiplas drogas (MDR), e as extremamente resistentes (XDR), fizeram ressurgir um novo desafio para a comunidade científica no que se refere a novas medidas profiláticas e terapêuticas para o seu controle. A vacina de DNA que codifica a proteína de choque térmico hsp65 de *Mycobacterium leprae* tem se mostrado eficiente na profilaxia e terapia contra a tuberculose experimental. Sabendo-se que em regiões endêmicas de tuberculose, a co-infecção

por helmintos é bastante comum, o entendimento da modulação da resposta imune na co-infecção é de fundamental importância no estudo de intervenções terapêuticas contra a tuberculose. A vacina DNA-hsp65 induz um padrão T_H1 de resposta imune e pró-inflamatória, com estimulação da produção de citocinas como o IL-12, IFN- γ e TNF- α . Por outro lado, a infecção por helmintos induz um padrão T_H2 de resposta imune, com produção de IL-4 e IL-5. No entanto, não se conhece qual o impacto da co-existência desses padrões opostos de resposta imune na eficácia do tratamento com DNA-hsp65. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi estudar três aspectos fundamentais no entendimento da interação entre os parasitas e o hospedeiro na co-infecção. Inicialmente, avaliamos a resposta imune em animais co-infectados, com tuberculose e helmintíases. A se-

gunda abordagem foi avaliar se a co-infecção altera o efeito terapêutico da vacina DNA-hsp65 contra a tuberculose. Por fim, avaliamos o efeito direto da vacina DNA-hsp65 na formação de granulomas do tipo 2, que são induzidos pela administração de ovos de *S. mansoni*. Os animais dos diferentes grupos foram avaliados quanto à capacidade de eliminação da bactéria, a produção de citocinas e a histologia pulmonar. Em conjunto, nossos dados sugerem que a infecção por *Toxocara canis* não aumentou a susceptibilidade à infecção por *M. tuberculosis*, enquanto o *Schistosoma mansoni* influenciou fortemente o crescimento da bactéria, induzindo aumento na recuperação de unidades formadoras de colônia que foi mediada pela pressão T_H2 , não prote-

tora, induzida pelo helminto. Pela primeira vez, demonstramos que o efeito terapêutico da vacina DNA-hsp65 não foi influenciado pela presença da resposta T_H2 induzida por *T. canis* ou *S. mansoni*, sendo que a vacina reverteu a resposta imune pré-estabelecida para um perfil protetor. Estes dados confirmam a eficácia do DNA-hsp65 e reforçam a possibilidade de sua utilização clínica. Por fim, também de forma inédita, foi demonstrado o efeito protetor do DNA-hsp65 em infecções helmínticas, visto que a imunização induziu preservação do parênquima pulmonar e diminuição no tamanho dos granulomas do tipo 2. Com isso, sugerimos a importância da regulação da resposta imune influenciada pela imunização com antígenos não correlacionados.

IMUNOGENICIDADE DE LINHAGENS VACINAIS DE *Salmonella enterica* EXPRESSANDO A PROTEÍNA VapA DE *Rhodococcus equi*

Aline Ferreira de Oliveira Pereira

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina R. Antunes Barreira
Tese de Doutorado apresentada em 16/05/2008

A infecção de potros jovens e de humanos imunocomprometidos por *Rhodococcus equi* resulta em grave pneumonia. A antibioticoterapia nem sempre é eficaz, uma vez que há amostras de *R. equi* resistentes aos antibióticos convencionais (rifampicina / eritromicina).

Além disso, o tratamento é longo, tem alto custo e diversos efeitos colaterais. Já foram desenvolvidos vários estudos com a finalidade de se obter vacinas efetivas contra a rodococose; entretanto, as estratégias de imunização ensaiadas não induziram efeito protetor considerável.

Uma vez que a proteína VapA, principal fator de virulência de *R. equi*, é dotada de alta imunogenicidade e linhagens atenuadas de *S. enterica Typhimurium* são boas carreadoras de proteínas heterólogas para células do sistema linfóide, nosso laboratório, com a colaboração do Dr. Marcelo Brocchi (Instituto de Biologia, UNICAMP), utilizou uma linhagem atenuada de *S. enterica Typhimurium* χ 3987 para expressar a proteína VapA. A administração dessa linhagem em camundongos resultou em proteção contra a infecção por *R. equi*, manifesta por maior taxa de sobrevivência, maior clearance bacteriano e menor resposta inflamatória, em relação aos grupo inoculado somente com PBS ou com *S. enterica Typhimurium* χ 3987 carregando apenas o plasmídeo pYA3137 (Oliveira et al., 2007). Demonstrou-se assim que o procedimento de imunização oral com a linhagem atenuada de *S. enterica Typhimurium* expressando VapA confere proteção frente a rodococose experimental, o que fundamenta a busca de se avaliar o padrão de resposta imune específica para *R. equi* desencadeado pelo processo de vacinação.

Camundongos vacinados produziram altos títulos de IgA de mucosa e de anticorpos séricos específicos, pre-

dominantemente do isotipo IgG2a. Suas células peritoneais, ao serem estimuladas *in vitro* com APTX (material rico em proteína VapA), produziram altos níveis de óxido nítrico, IL-12, TNF- α e IL-1 β . Além disso, suas células esplênicas secretaram maiores concentrações de IL-12, IFN- γ , TNF- α e IL-10. Em contrapartida, não se detectou IL-4 no sobrenadante dessas células. A maior produção de citocinas relacionadas ao padrão Th1 de resposta associou-se a uma maior expressão do fator de transcrição T-bet pelos camundongos vacinados, em comparação aos animais dos outros dois grupos.

Frente ao desafio com *R. equi* virulento, os animais imunizados produziram níveis maiores de IL-12, IFN- γ , IL-10 e de óxido nítrico em todos os órgãos analisados (pulmão, baço e fígado), embora menores concentrações de TNF- α e de IL-4 tenham sido verificadas.

A análise das subpopulações celulares que participam na proteção de camundongos imunizados contra a infecção por *R. equi* revelou a ocorrência de números significativamente maiores de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺, linfócitos B e células T CD4⁺CD25⁺. Além disso, esses animais apresentaram maior expressão de TGF- β e Foxp3, quando comparados aos animais dos dois grupos controles.

O estímulo com APTX de células esplênicas de animais vacinados resultou em significativa linfoproliferação.

Esse conjunto de resultados indica que a imunização com *S. enterica Typhimurium* expressando VapA gera imunidade específica humoral, celular e de mucosa. A resposta é predominantemente de padrão Th1 e capaz de conferir proteção contra a rodococose experimental. O aumento de células T CD4⁺CD25⁺, associado a maior expressão de Foxp3 e de TGF- β , e a produção aumentada de IL-10 e diminuída de TNF- α , detectados *in vivo*, podem ser cruciais para a atenuação da reação inflamatória verificada nos órgãos de camundongos imunizados frente ao desafio com *R. equi*.

RNA MENSAGEIRO CODIFICADOR DA PROTEÍNA hsp65 DE *Mycobacterium leprae* COMO UMA NOVA ESTRATÉGIA VACINAL NO COMBATE DA TUBERCULOSE EXPERIMENTAL

Júlio César Cetrulo Lorenzi

Orientadora: Profa. Dra. Arlete A. Martins Coelho-Castelo
Dissertação de Mestrado apresentada em 27/05/2008

O uso do RNA mensageiro como estratégia para a estimulação do sistema imune tem sido utilizado atualmente, principalmente em estratégias para a terapia do câncer. Esse trabalho demonstra que a utilização de um RNA mensageiro, codificando para a proteína hsp65 de *Mycobacterium leprae*, como estratégia vacinal para o controle da tuberculose experimental tem grande potencial. Nossos dados mostraram que a vacinação de camundongos com uma única dose de 10ug desse RNAm nu, por via intranasal foi capaz de induzir uma resposta imune protetora contra o subsequente desafio com cepa virulenta de *M. tuberculosis*. Tal efeito não foi observado quando o mesmo foi dado via intramuscular ou encapsulado em lipossomas pela via intranasal. Embora a vacinação com RNAmhsp65-ORF nu reduziu a carga bacilar nos animais vacinados, não levou a um aumento dos níveis de anticorpos IgG1, IgG2A, IgM e IgA anti-hsp65. Além disso, a análise de células de memória do fenótipo T CD44hi/CD62low, não mostrou diferença entre os grupos analisados. Por outro lado, quando se anali-

sou o perfil de expressão dos fatores de transcrição T-bet e Gata-3 ficou demonstrado que o grupo que recebeu RNAmhsp65-ORF nu, embora não tenha induzido altos níveis de T-BET apresentou níveis menores de GATA-3 em relação aos grupos controles. Esses dados sugerem que a vacinação com o RNAm nu, pela via intranasal, foi capaz de sustentar uma resposta imune por trinta dias, tempo do desafio, com um padrão mais do tipo misto e/ou tendendo ao Th1, o que pode estar relacionado com a proteção observada. Para verificar quais as sub-populações de células apresentadoras de antígeno presentes no pulmão eram capazes de capturar o RNAm injetado por via intranasal foram realizados experimentos de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência. Esses experimentos demonstraram que 30 minutos e até 8 horas após o inoculo, essas células foram capazes de capturar o RNAm injetado. Após 8 horas foi possível verificar que a molécula de RNAmhsp65-ORF estava presente no citosol celular. Pode-se concluir então que a vacinação com RNAm por via intranasal foi eficiente nesse tipo de estratégia e abre perspectivas para uso em outras patologias bem como para o entendimento dos mecanismos envolvidos na indução da proteção observada.

PARTICIPAÇÃO DAS ENZIMAS 5-LIPOXIGENASE (5-LO) E HEME OXIGENASE (HO-1) NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA CONTRA *Trypanosoma cruzi*

Wander Rogério Pavanelli

Orientador: Prof. Dr. João Santana da Silva
Tese de Doutorado apresentada em 13/06/2008

Durante a fase aguda da infecção com *Trypanosoma cruzi*, uma forte resposta inflamatória é frequentemente observada no miocárdio, a qual esta relacionada com alterações crônicas e conseqüente fibrose. Diversos fatores regulam a intensidade da resposta inflamatória, entre eles citocinas e quimiocinas, produzidos pelos leucócitos e cardiomiócitos. Atualmente alguns estudos têm-se concentrado em avaliar a participação de outros mediadores inflamatórios, responsáveis pela iniciação, manutenção ou mesmo regulação da inflamação. De um lado da resposta inflamatória, a enzima 5-lipoxigenase (5-LO) atua no metabolismo do ácido araquidônico, dando origem aos leucotrienos que agem na fase de iniciação e manutenção da resposta inflamatória. Por outro lado, a enzima heme-oxigenase-1 (HO-1), envolvida na degradação do grupo heme, possui

funções antiinflamatórias e antioxidantes, dessa forma regulando a inflamação. Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar ambos os fatores (pró e antiinflamatórios) da resposta imune gerada contra o *T. cruzi*, utilizando dois modelos experimentais distintos. O primeiro modelo verificará a participação da enzima 5-lipoxigenase (5-LO) e seus metabólicos pró-inflamatórios (leucotrienos) na infecção induzida por *T. cruzi*, utilizando animais geneticamente deficientes (5-LO^{-/-}). O segundo modelo avaliará a influencia da enzima heme oxigenase (HO-1) na resposta imune desencadeada contra *T. cruzi*, utilizando um inibidor (ZnPPiX) e um indutor (hemin) desta enzima. Em ambos os modelos, após a infecção com *T. cruzi*, vários parâmetros foram avaliados. A princípio, no primeiro modelo experimental (5-LO), foi possível observar que a infecção com *T. cruzi* induz produção de leucotrienos B₄ (LTB₄), um metabólico oriundo da atividade da enzima 5-LO, demonstrando que esta enzima participa da resposta inflamatória desencadeada contra o parasito. Em seguida, foi possível verificar que

camundongos geneticamente deficientes (5-LO^{-/-}), embora possuindo maior parasitemia, foram mais resistentes à infecção que animais selvagens (129-WT). Quanto ao aspecto inflamatório, foi possível verificar que camundongos 5-LO^{-/-} apresentaram menor inflamação, com reduzida quantidade de células CD4⁺, CD8⁺ e IFN- γ quando comparado com camundongos WT. Contudo foi observado nesses animais aumento na porcentagem de células CD4⁺CD25⁺ (Tregs) expressando os respectivos marcadores fenotípicos. Em seguida avaliamos a produção de citocinas e observamos que camundongos 5-LO^{-/-} possuíam níveis reduzidos de citocinas como IFN- γ e TNF- α . Isto está correlacionado com produção reduzida de óxido nítrico e aumento (aos 15 dias de infecção) na presença de antígenos de *T. cruzi* encontrados nesses animais. Já para o segundo modelo experimental (HO-1), foi possível verificar que camundongos BALB/c tratados com ZnPPIX (inibidor), embora apresentando menor parasitemia, foram mais susceptíveis a infecção com *T. cruzi*, quando comparado a camundongos tratados como hemin (indutor) ou mesmo não tratados (controle). Estes resultados demonstram que a HO-1 está efetivamente envolvida nos mecanismos que regulam

a miocardite em animais infectados com *T. cruzi*. Adicionalmente, a análise histopatológica mostrou aumento da resposta inflamatória no coração e fígado destes camundongos. Isto está diretamente correlacionado com aumento na presença de células CD4⁺, CD8⁺, e IFN- γ no coração e predominância de citocinas associadas ao padrão Th1 (IFN- γ e TNF- α) nos animais tratados com ZnPPIX. Este aumento provavelmente está relacionado com diminuição na porcentagem de células CD4⁺CD25⁺ (Tregs) encontradas nestes animais. Entretanto, animais tratados com hemin apresentaram níveis elevados de citocinas (IL-4) do padrão Th2 e citocinas (IL-10 e TGF- β) imunomoduladoras. Também foi possível observar aumento na porcentagem de células CD4⁺CD25⁺ (Tregs) expressando os respectivos marcadores fenotípicos (Foxp3, GITR e CTLA-4). Estes resultados claramente demonstram que a reação inflamatória desencadeada contra *T. cruzi* pode ser regulada pela HO-1. Portanto, sugerimos que durante a infecção experimental com *T. cruzi*, diversos fatores da resposta inflamatória podem determinar a intensidade da inflamação, podendo levar ao controle da replicação do patógeno e/ou morte do hospedeiro.

AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA FOSFOLIPASE C COMO FATOR DE VIRULÊNCIA DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Camila Matias Peres

Orientadora: Profa. Dra Lúcia Helena Faccioli
Tese de Doutorado apresentada em 27/06/2008

Os mecanismos que conferem resistência de *M. tuberculosis* à destruição pelo hospedeiro, além da sua capacidade em permanecer e/ou multiplicar-se no interior das células fagocitárias são ainda pouco compreendidos. A identificação de antígenos espécie-específicos de *M. tuberculosis* é um passo essencial para elucidar os mecanismos exclusivos através dos quais este microorganismo é patogênico para o homem. A presença de genes de fosfolipase C no genoma de *M. tuberculosis*, e não em outras micobactérias, sugere um papel desta enzima na patogenia desta infecção. Neste trabalho, demonstramos que as PLCs de *Mycobacterium tuberculosis* são fatores de virulência desta bactéria e promovem a patogenicidade através da indução, na fase cônica da tuberculose, de uma resposta inflamatória exacerbada e injúria tecidual. Este último ocorre possível-

mente em resposta à ativação constante de macrófagos, demonstrada pelos níveis elevados de IFN- γ e NO, os quais podem estar envolvidos na destruição do parênquima pulmonar, necrose, e morte dos animais. Além disso, as PLCs possibilitaram o aumento, *in vivo*, do crescimento de bacilos nos pulmões e baço, mesmo na presença de uma forte resposta celular T_H1. Além disso, experimentos *in vitro* demonstraram que a PLC induz a internalização de Mtb por macrófagos alveolares, porém inibe a atividade microbicida destas células, por mecanismo dependente de prostaglandinas. Desta forma, poder-se-ia sugerir que PLCs de Mtb induzem a patogenia na tuberculose através da 1) estimulação exacerbada da inflamação e da resposta imune celular e 2) produção de prostaglandinas, particularmente PGE₂. Estas estariam envolvidas na destruição tecidual com deposição de fibrina e colágeno nos pulmões, impossibilitando as trocas gasosas e na supressão das atividades antimicrobianas dos macrófagos alveolares, que em conjunto, permitem a permanência dos bacilos nos pulmões e outros órgãos.

NEUROLOGIA

DETECÇÃO DE DISFAGIA NA FASE AGUDA DO ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO. PROPOSIÇÃO DE CONDUTA BASEADA NA CARACTERIZAÇÃO DOS FATORES DE RISCO

Paula de Carvalho Macedo Issa Okubo

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Massaiti Takayanagui

Tese de Doutorado apresentada em 03/04/2008

A disfagia orofaríngea é uma manifestação comum apresentada na fase aguda do acidente vascular cerebral (AVC). A aspiração decorrente das dificuldades de deglutição é um sintoma que deve ser considerado devido à frequente presença de pneumonias aspirativas que podem influenciar na recuperação do paciente trazendo complicações ao seu quadro clínico em geral e até mesmo risco de morte. A caracterização clínica precoce das alterações de deglutição pode auxiliar na definição de condutas e evitar a administração de dieta por via oral oferecendo riscos ao paciente. O presente estudo teve por objetivo, propor a via mais segura de alimentação na fase aguda do acidente vascular cerebral isquêmico (AVCI) com o intuito de minimizar complicações, utilizando a escala de AVC proposta pelo “National Institutes of Health”, o NIHSS e considerando alguns fatores de risco para disfagia na clínica apresentada por estes pacientes, com a formulação de um algoritmo. Para tanto, foram avaliados 50 pacientes internados na Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo com diagnóstico de AVCI confirmado, clinicamente, por um médico neurologista, dentro de, no máximo, 48 horas entre o início dos sintomas e a avaliação. Os pacientes foram avaliados desde que se enquadrassem nos critérios propostos, sendo 25 do gênero feminino e 25 do masculino, com idade média de 64,90 anos (variação de 26 a 91 anos). Uma anamnese foi realizada antes da participação do paciente no estudo, para que fosse assegurada a ausência de história de dificuldades de deglutição anteriores ao quadro atual. A avaliação clínica fonoaudiológica foi realizada à beira do leito através de um protocolo constituído por dados de identificação do paciente, data do início dos sintomas, data de entrada no hospital, escore da escala de coma de Glasgow (ECG) e do NIHSS obtidos na avaliação neurológica inicial e no dia da avaliação, fatores de risco para AVC, achados clínicos obtidos na avaliação neurológica do paciente, resultado do exame de imagem (tomografia computadorizada ou ressonância magnética). A segunda parte foi destinada à escala do NIHSS e, por fim, a terceira parte constou da avaliação da deglutição, sendo subdi-

vidada em estrutural e funcional. Para a avaliação funcional da deglutição foram utilizadas as consistências alimentares pastosa, líquida e sólida (quando possível, dependendo das condições apresentadas pelo paciente). O volume da oferta também dependeu das possibilidades apresentadas: aqueles pacientes que não ofereciam condições clínicas para a realização da avaliação, como os que se encontravam com intubação orotraqueal, estado de sonolência profunda ou em estado de coma, esta foi contra-indicada. Após a avaliação clínica, com a obtenção dos dados estruturais e funcionais, concluiu-se se a avaliação clínica da deglutição apresentava-se normal ou alterada. A partir de então, era concluído sobre a possibilidade de introdução de dieta por via oral. Para a análise estatística foi utilizado o teste exato de Fisher, verificando a associação entre as variáveis. Para avaliar se o escore do NIHSS caracterizaria um indicador de fator de risco para a disfagia, foi construída a curva ROC visando obter características quanto à sensibilidade e especificidade da escala para este propósito. Os resultados demonstraram que a disfagia é uma manifestação frequente na fase aguda do AVCI, presente em 32% dos pacientes analisados. A avaliação clínica da deglutição é um método confiável de detecção das dificuldades de deglutição. Entretanto, os fatores preditivos de risco para a função devem ser ponderados, devendo ser considerada a gravidade do quadro, o nível de consciência e a presença de comorbidades pré-existentes. A hipertensão arterial sistêmica (HAS) demonstrou ser o principal fator de risco para o AVC apresentada por 72% dos pacientes, seguida do tabagismo (36%), etilismo (20%) e diabetes melito (20%). Gênero e hemisfério cerebral acometido não tiveram associação estatisticamente significativa com a presença de disfagia. Idade, NIHSS, ECG, alterações de fala e linguagem e topografia da lesão são fatores preditivos de disfagia apresentando diferenças estatisticamente significativas. Pacientes com lesões em território carotídeo apresentaram maior prevalência quanto à presença de disfagia (58,88%). O NIHSS apresenta alta sensibilidade (88%) e especificidade (85%) para detecção de disfagia considerando 12 como valor de corte para sua existência. A formulação de um algoritmo para detecção de disfagia na fase aguda do AVCI poderá auxiliar na definição de condutas quanto à melhor via de administração da dieta enquanto se aguarda uma avaliação fonoaudiológica especializada.

CONTRIBUIÇÃO DA TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA POR EMISSÃO DE FÓTON ÚNICO (SPECT) NA AVALIAÇÃO PRÉ-CIRÚRGICA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS COM EPILEPSIA DO LOBO FRONTAL

Emerson Henklain Ferruzzi

Orientador: Prof. Dr. Américo Ceiki Sakamoto
Dissertação de Mestrado apresentada em 08/04/2008

Objetivo: Descrever as características clínicas, resultados das avaliações pré-cirúrgicas e da abordagem cirúrgica de pacientes pediátricos com epilepsia do lobo frontal (ELF) farmacologicamente resistentes. Analisar a contribuição dos SPECTs crítico e intercrítico na avaliação pré-cirúrgica dos pacientes pediátricos com ELF.

Métodos: Foram analisados retrospectivamente 34 pacientes monitorizados no período de abril de 1994 a março de 2006 no Centro de Cirurgia de Epilepsia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CIREF-HCFMRP-USP), sendo analisada história clínica, exame neurológico, monitorização por vídeo-eletroencefalograma (VEEG), exames de neuroimagem estrutural e funcional. Os estudos de neuroimagem incluíram tomografia de crânio (TC), ressonância magnética (RM) e Single photon emission computed tomography (SPECT) crítico e intercrítico. Quando necessário estes exames foram acrescidos de avaliações psiquiátricas.

Resultados: Foi observado que fatores como sexo, idade da primeira crise, idade da cirurgia, dominância manual, presença de crise febril, número de crises antes da cirurgia e presença de generalização das crises não apresentaram significância estatística para bom resultado cirúrgico, mas a presença de anormalidade ao exame físico foi associada a um pior resultado cirúrgico ($p=0,04$). Foi observado que o EEG crítico lateralizou a zona epileptogênica (ZE) em 50 % dos casos. A RM localizou as lesões epileptogênicas em todos os pacientes do estudo, exceto no paciente com RM normal. O SPECT crítico pré-cirúrgico foi realizado em 29 pacientes, e considerado localizatório em 48,3 % dos pacientes, lateralizatório em 13,7 % dos pacientes, totalizando 62 % de lateralização da ZE, e o SPECT intercrítico pré-cirúrgico foi realizado em 16 pacientes, sendo localizatório em 31,2 % e lateralizatório em 37,5 %, auxiliando assim a lateralização da ZE em 68,7%. Quatro pacientes apresentaram complicações pós-cirúrgicas, sendo que dois pacientes evoluíram para óbito. O uso de uma detalhada avaliação clínica associada a exames de neuroimagem estrutural e funcional levaram a 71 % dos pacientes a se tornarem livres de crises.

Conclusão: O tratamento cirúrgico foi efetivo no controle das crises dos pacientes pediátricos portadores de ELF farmacologicamente refratários. O uso do SPECT crítico e intercrítico contribuiu para a localização da ZE, sendo de maior sensibilidade em lesões do tipo malformação do desenvolvimento cortical (MDC). Técnicas de neuroimagem estrutural aliadas a exames de neuroimagem funcional aumentam a precisão da localização da ZE. São necessários mais estudos sobre o uso do SPECT em epilepsia do lobo frontal, especialmente em pacientes pediátricos.

ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E RELEVÂNCIA DAS COMORBIDADES PSQUIÁTRICAS PRÉ-CIRÚRGICAS NO PROGNÓSTICO NEUROLÓGICO E PSQUIÁTRICO DE PACIENTES COM EPILEPSIA DE LOBO TEMPORAL CIRURGICAMENTE TRATADOS

Ricardo Guarnieri

Orientador: Prof. Dr. Américo Ceiki Sakamoto
Tese de Doutorado apresentada em 08/04/2008

Transtornos psiquiátricos pré-cirúrgicos podem estar associados à presença de resultados pós-cirúrgicos insatisfatórios, do ponto de vista neurológico e psiquiátrico, na cirurgia de epilepsia de lobo temporal mesial (ELTM). Os objetivos deste estudo foram: 1) avaliar se as características clínicas e demográficas pré-cirúrgicas, incluindo-se os transtornos psiquiátricos, poderiam ser fatores de risco para resultados pós-cirúrgicos neurológicos insatisfatórios, no longo prazo da cirurgia de ELTM associada à esclerose do hipocampo (ELTM-EH). 2) avaliar se as mesmas variáveis

pré-cirúrgicas, além do *status* neurológico pós-cirúrgico, poderiam ser fatores de risco para a ocorrência de transtornos psiquiátricos após o primeiro ano da cirurgia de ELTM. Para a análise dos fatores de risco para o resultado neurológico insatisfatório, 186 pacientes com ELTM-EH operados entre os anos de 1995 a 2004, com 16 anos ou mais de idade, foram acompanhados por um período médio de 6 anos. As variáveis pré-cirúrgicas foram comparadas com o resultado neurológico pós-cirúrgico, com base no sistema de classificação de Engel. Para a análise dos fatores de risco para a presença de transtornos psiquiátricos após o primeiro ano da cirurgia de ELTM, foram selecionados 138 dos 186 pacientes da amostra inicial. O motivo da seleção foi o seguimento psiquiátrico regular no primeiro ano pós-cirúrgico. A análise estatística utilizou-se do método de curva de sobre-

vida de Kaplan-Meier e do modelo de regressão logística binária multivariada. Os resultados da primeira análise foram: 77 (41,4%) dos 186 pacientes tiveram pelo menos um transtorno psiquiátrico no período pré-cirúrgico. Trinta e seis pacientes tiveram depressão; 11 transtorno disfórico interictal; 14 psicose interictal; 6 psicose pós-ictal; e 10 transtornos de ansiedade. Vinte e três pacientes tiveram diagnóstico de transtorno de personalidade (eixo II). Os resultados neurológicos foram: E1: 143 (76,9%) pacientes (subcategorias: E1A: 61; E1B: 38; E1C: 39; E1D: 5 pacientes); E2: 15; E3: 26; E4: 2 pacientes. Nenhuma associação estatisticamente significativa foi encontrada entre as variáveis pré-cirúrgicas para a presença de crises epiléticas pós-cirúrgicas (E2 ou maior). Quando a subcategoria E1A (“livre de crises desde a cirurgia”) foi comparada com as subcategorias E1B ou maior, somente as variáveis pré-cirúrgicas transtornos de ansiedade (aHR = 2,48, IC 95% = 1,25-4,93, $p = 0,009$) e transtornos de personalidade (aHR = 2,02, IC 95% = 1,27-3,22, $p = 0,003$) mantiveram significância estatística para a condição E1B ou maior. Em relação aos resultados da segunda análise, dos 138 pacientes da amostra, 59 (42,8%) tiveram ao menos um transtorno psiquiátrico após o primei-

ro ano da cirurgia. Destes 59 pacientes, 45 (76%) tiveram diagnóstico de transtornos psiquiátricos pré-cirúrgicos. A análise estatística confirmou que a presença de transtornos psiquiátricos pré-cirúrgicos estava positivamente correlacionada com a presença de transtornos psiquiátricos pós-cirúrgicos (OR = 9,48, IC 95% = 4,32-20,80, $p < 0,0001$). Além disso, entre os pacientes com diagnósticos psiquiátricos nos dois períodos, o transtorno psiquiátrico pós-cirúrgico apresentava, geralmente, características semelhantes ao respectivo transtorno psiquiátrico pré-cirúrgico. Em conclusão, transtornos pré-cirúrgicos de ansiedade e de personalidade estiveram positivamente correlacionados com a presença de auras no período pós-cirúrgico de longo prazo. A presença de transtornos psiquiátricos pré-cirúrgicos foram os principais fatores associados com a presença de transtornos psiquiátricos após o primeiro ano de cirurgia de ELTM. Estes resultados apontam para a importância das avaliações psiquiátricas nos serviços de cirurgia de epilepsia, tanto no período pré-cirúrgico, com o devido aconselhamento e informação aos pacientes com epilepsia e transtornos psiquiátricos, quanto no acompanhamento mais intensivo desses pacientes no período pós-cirúrgico.

CARACTERIZAÇÃO DO CIRCUITO ANTICONVULSIVO ENDÓGENO ESTRIADO - SUBSTÂNCIA NEGRA RETICULADA - COLÍCULO SUPERIOR NA EXPRESSÃO DE CRISES EPILÉPTICAS EM ANIMAIS DA CEPA *Wistar Audiogenic Rat* (WAR)

Franco Rossetti

Orientador: Prof. Dr. Norberto Garcia Cairasco
Tese de Doutorado apresentada em 22/04/2008

A cepa *Wistar Audiogenic Rat* (WAR) é caracterizada pela ocorrência de crises audiogênicas através da exposição aguda ao som de alta intensidade (110 dB) e, entre os circuitos cerebrais envolvidos, acredita-se que o circuito estriado-substância negra reticulada-colículo superior (EST-SNPr-CS) pertença a um sistema anticonvulsivante endógeno, composto por neurônios GABAérgicos, que é capaz de produzir efeitos anticonvulsivos. No entanto, sua ação em crises audiogênicas ainda é muito controversa.

Objetivo: O objetivo principal deste trabalho foi estudar o funcionamento do circuito EST-SNPr-CS nos WARs através de injeções de drogas, estudos comportamentais, EEGráficos e anatômicos.

Materiais e Métodos: 1) 24 WARs machos formaram 4 grupos e foram injetados sistemicamente com 4 doses de fenobarbital. Através do Índice de Gravidade de crises mesencefálicas categorizado (ISc) analisamos os efeitos anticonvulsivos e através dos *scores* de ataxia e sedação analisamos os efeitos colaterais das 4 doses. Logo após, 10 fêmeas WARs foram injetadas sistemicamente com a dose

ótima de fenobarbital encontrada nos machos e as mesmas análises foram feitas. Um grupo de 6 machos WARs foi implantado estereotaxicamente com eletrodos monopolares nos EST, na SNPr e no CS e foi injetado sistemicamente com a dose ótima de fenobarbital. Foram feitas análises morfológicas e espectrais (transformada de *wavelets*) nos EEGs, antes, durante e após as crises audiogênicas; 2) Foram implantados estereotaxicamente eletrodos no EST e no CS, um quimetrodo da SNPr direita e 1 cânula de injeção na SNPr esquerda de 14 machos WARs. Dois grupos de 7 animais foram formados sendo um grupo com injeções intranigricas bilaterais de muscimol e o outro grupo com injeções intranigricas bilaterais de fenobarbital. O efeito anticonvulsivo foi avaliado pelo ISc e o EEG dos períodos basais e adaptação foi analisado espectralmente. 3) 15 machos WARs foram estereotaxicamente implantados com eletrodos no EST e na SNPr e 6 animais deste grupo foram implantados com quimetrodo na parte anterior do CS (CSa) e nove na parte posterior do CS (CSp). Em todos os animais foram microinjetados bicuculina e muscimol e a análise do efeito anticonvulsivo foi feito através do ISc. Foi realizada análise neuroetológica dos períodos basal, 1 minuto pré, durante e 1 minuto após a crise audiogênica nos dois grupos, e um novo grupo (n = 7) sem cirurgia foi usado como controle do grupo basal. Os EEGs dos períodos basal, adap-

tação e crises audiogênicas foram analisados morfológica e espectralmente. **4)** A neuroanatomia do circuito SNPr-CS foi estudada com a injeção de *FluoroGold* no CSa de WARs (n = 4) e de Wistar (n = 4) e no CSp de WARs (n = 4) e de Wistar (n = 5).

Os neurônios marcados SNPr foram analisados, parte anterior e parte posterior, co-localizados com imunofluorescência para receptores GABA_A.

Resultados: Capítulo 1 - a injeção sistêmica de 15 mg/kg de fenobarbital provoca diminuição da oscilação da SNPr e do CS, coincidente com efeito anticonvulsivo dose-dependente em WARs, sem efeitos colaterais. **Capítulo 2** - injeções de drogas GABAérgicas (muscimol e fenobarbital) na SNPr não provocam sua inibição, induzem movimentos exploratórios estereotipados e não bloqueiam as crises

audiogênicas. **Capítulo 3** - o CS em WARs se apresenta em duas porções funcionalmente distintas, CSa e CSp, com diferentes respostas comportamentais e EEGráficas à injeção de BIC e MUS sendo que apenas o CSp participa das crises audiogênicas como um núcleo pró-convulsivo. **Capítulo 4** - nos WARs, a SNPr posterior apresenta maior quantidade de neurônios que enviam projeções ao núcleo pró-convulsivo CSp do que a SNPr anterior.

Conclusão: A SNPr nos WARs poderia funcionar como um núcleo anticonvulsivo se conseguisse inibir suficientemente o CSp para que este não fosse ativado durante o estímulo sonoro, mas mudanças anatômicas nas projeções dos neurônios entre a parte anterior e posterior da SNPr podem trazer aos WARs uma deficiência do circuito SNPr-CSp, que permite a instalação da crise audiogênica.

CONTRIBUIÇÃO DA SCALA COOPERATIVA INTERNACIONAL DE AVALIAÇÃO DA ATAXIA (ICARS) E ESCALA DE AVALIAÇÃO PARA ATAXIA DE FRIEDREICH (FARS) PARA A DIFERENCIAÇÃO DA ATAXIA DE FRIEDREICH (AF) DAS OUTRAS ATAXIAS DE INÍCIO PRECOCE

Fernanda de Oliveira Yamane

Orientador: Prof. Dr. Wilson Marques Júnior

Dissertação de Mestrado apresentada em 28/04/2008

A ataxia de Friedreich (AF) é uma afecção neurodegenerativa progressiva, de herança autossômica recessiva, cujas características clínicas, na forma clássica da doença estabelecida, são muito característica, mas cujo diagnóstico nas fases iniciais ou nas formas não clássicas pode ser difícil. As escalas de avaliação são primariamente usadas para a quantificação e monitoração das doenças. No entanto, por avaliarem de forma sistematizada as diversas manifestações possíveis, poderiam ser utilizadas para a identificação de particularidades úteis para a distinção das diversas doenças pertencentes a um mesmo grupo. No caso específico da AF, a utilização das escalas disponíveis poderia possibilitar a diferenciação dessa das demais ACAR, o que repercutiria, não só no diagnóstico clínico, mas também no screening genético a ser requisitado. Os objetivos deste estudo foram caracterizar a AF através da Escala de Avaliação da Ataxia Cooperativa Internacional (ICARS) e da Escala de Avaliação para Ataxia de Friedreich (FARS) e verificar se essa caracterização ajudaria na diferenciação dessa ataxia das demais ACAR. Inicialmente, fizemos a validação lingüística da aparência e do conteúdo das duas escalas e analisamos a concordância na sua utilização, o que foi plenamente satisfatório. A seguir, comparamos os resultados da avaliação de 10 pacientes com AF, 16 pacientes com ataxia não Friedreich (ANF) e 15 indivíduos normais. Observamos que as duas escalas permitem diferenciar os pacientes com AF e ANF dos indivíduos normais e que também é possível distinguir AF de ANF, através da análise dos testes: ICARS I.1 - Ca-

pacidade de andar, ICARS I.2 - Velocidade da marcha, ICARS I.3 - Capacidade de ficar em pé, com os olhos abertos, ICARS I.4 - Distância dos pés na posição natural, sem suporte e com os olhos abertos, ICARS I.5 - Balanço do corpo com os pés juntos e os olhos abertos, ICARS I.6 - Balanço do corpo com os pés juntos e os olhos fechados, ICARS II.10 - Teste dedo-nariz: decomposição, ICARS 11 = teste dedo-nariz: tremor de intenção do dedo, Avaliação do estágio funcional da marcha - FARS I, FARS II.2 - Deglutição, FARS II.5 - Higiene pessoal, FARS II.7 - Avaliação da marcha, FARS II.8 - Quantificar aposição sentada, FARS II.9 - Função da bexiga, FARS III.1A - Atrofia, fasciculação, mioclonia e fraqueza facial, FARS III. 2A - Atrofia, fasciculação, mioclonia e fraqueza de língua, FARS III.3A - Tosse, FARS III.4A - Fala voluntária, FARS III.2B - Teste nariz-dedo, FARS III.3B - Dismetria, FARS III.4B - Movimentos rápidos e alternados das mãos, FARS III.5B - Bater os dedos, FARS III.1C - Deslizar o calcanhar ao longo da perna, FARS III.2C - Bater o calcanhar na tíbia, FARS III.1D - Atrofia dos músculos, FARS III.2D - Fraqueza muscular, FARS III.3D - Sensibilidade vibratória, FARS III.4D - Sensibilidade cinestésica, FARS III.5D - Reflexos tendinosos profundos, FARS III.1E - Postura sentada, FARS III.2E - Postura com os pés separados, FARS III.3E - Postura - pés juntos, FARS III.6E - Marcha pé-ante-pé, FARS III.7E - Marcha. Concluindo, neste estudo fizemos a validação das escalas ICARS e FARS e demonstramos que a utilização das mesmas permitiu a identificação de testes que possibilitam distinguir a AF das demais ACAR, o que tem implicações clínicas importantes. A confirmação desses dados pela análise isolada desses testes em pacientes ainda sem diagnóstico molecular estabelecido contribuiria para testar a validade e a aplicabilidade clínica dos nossos resultados.

ANORMALIDADES SEMIOLÓGICAS FOCAIS ASSOCIADAS AO ESPECTRO DAS EPILEPSIAS GENERALIZADAS IDIOPÁTICAS: UM ESTUDO ANALÍTICO

Rodrigo Fernandes Cury

Orientadora: Profa. Dra. Regina Maria França Fernandes
Tese de Doutorado apresentada em 29/04/2008

As epilepsias generalizadas idiopáticas (EGIs) representam um quinto das epilepsias humanas; são condições de expressão idade-dependente, geneticamente determinadas e provavelmente vitalícias. Ao eletrencefalograma (EEG), caracterizam-se pela presença ubíqua de descargas paroxísticas espontâneas bissíncronas do tipo pontanda e/ou poliponta-onda. De acordo com a semiologia ictal, elas se apresentam como crises dos tipos das ausências típicas, mioclônicas, tônico-clônico generalizadas ou como uma combinação entre estas. Anormalidades semiológicas ictais focais têm sido descritas nestes pacientes, particularmente em portadores de epilepsia mioclônica juvenil; a literatura médica pertinente, no entanto, não tem abordado o tema de maneira sistemática, de forma que o significado clínico destas alterações permanece incerto. A fim de investigar a questão, conduzimos um estudo observacional, retrospectivo, em que selecionamos 128 portadores de EGIs com base em seus EEGs e posteriormente os dividimos em dois grandes grupos: epiléticos com EGIs típicas (n = 84) e com EGIs atípicas (n = 44), de acordo somente com a ausência ou presença de anormalidades semi-

ológicas focais, respectivamente. A análise estatística revelou que as seguintes características estiveram significativamente associadas ao grupo atípico: um antecedente de insulto precipitante inicial, paroxismos focais independentes aos EEGs, anormalidades estruturais à imagem por ressonância magnética, história de crises tônico-clônicas generalizadas, alterações à tomografia computadorizada de crânio, um regime de politerapia medicamentosa e uso menos freqüente de valproato; uma tendência a um maior tempo de epilepsia ativa também foi notada. Regressão logística binária também demonstrou que as primeiras três variáveis predizem a característica estudada de forma independente. A análise de subgrupos, representados por portadores de EGIs do tipo ausência, com e sem anormalidades semiológicas focais, confirmou, em linhas gerais, os achados anteriores. Posteriormente, tomando-se somente os pacientes com EGIs típicas, observamos que a presença de paroxismos focais independentes aos EEGs está correlacionada a um maior tempo de epilepsia ativa, e que anormalidades estruturais estão ligadas a um antecedente de crises febris e possivelmente a um pior prognóstico clínico. Nossos dados demonstram que a interação entre outros fatores de suscetibilidade herdados e injúrias ambientais comumente modificam o fenótipo destas epilepsias geneticamente determinadas, com implicações imediatas para o seu manejo diagnóstico, terapêutico e prognóstico.

AVALIAÇÃO DE QUATRO DIFERENTES TÉCNICAS PARA A DETECÇÃO DA DUPLICAÇÃO E DA DELEÇÃO 17p11.2-p12

Alana Franco Verola

Orientador: Prof. Dr. Wilson Marques Júnior
Dissertação de Mestrado apresentada em 12/05/2008

A doença de Charcot-Marie-Tooth (CMT) é a mais freqüente das neuropatias periféricas hereditárias, sendo que a duplicação da região 17p11.2-p12, onde está contido o gene da proteína da mielina periférica 22 (PMP22), a mais freqüente mutação (CMT1A), respondendo por 50% de todas as formas de CMT e aproximadamente 70% das formas desmielinizantes autossômicas dominantes, em todas as regiões do mundo até agora estudadas, incluindo o Brasil. A detecção desta duplicação genômica pode ser feita por vários métodos, quantitativos ou qualitativos, empregando as mais diversas técnicas moleculares, tais como "southern blot", eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), detecção de um novo fragmento juncional por PCR semiquantitativo, hibridização em "situ" fluorescente (FISH),

análise qualitativa e quantitativa de microssatélites, análise quantitativa por PCR (STs), amplificação por sondas "multiplex" por ligação dependente (MLPA), transcriptase reversa - PCR (RT-PCR) e cromatografia líquida desnaturante de alta-eficiência (DHPLC). A maioria deles apresentando aspectos positivos e negativos. Neste trabalho, avaliamos a sensibilidade e especificidade de 4 diferentes técnicas para diagnóstico molecular: análise de marcadores microssatélites amplificados por PCR fluorescente, análise de novo fragmento juncional por PCR, análise quantitativa de STS amplificado por PCR e DHPLC. O DHPLC foi o método mais sensível e mais específico para o diagnóstico molecular da duplicação e deleção 17p11.2-p12, mas depende de equipamento caro e técnicos treinados. O diagnóstico por microssatélites foi o segundo método mais sensível e mais específico. A avaliação quantitativa de STS amplificados por PCR apresentou baixa sensibilidade e baixa especificidade, enquanto a análise por detecção de novo fragmento juncional teve baixa sensibilidade, mas alta especificidade, tratando-

se de um método barato e que não exige equipamentos caros. Propomos que em países economicamente menos favorecidos, centros de referência locais utilizem a análise de novos fragmentos juncionais. Se o teste for negativo,

então a análise deverá ser feita pela técnica mais sensível e específica, em centros mais especializados. Dentre os métodos testados neste trabalho, seriam o DHPLC e a análise por microssatélite.

DOENÇA DE CHARCOT-MARIE-TOOTH, ESTRATÉGIA DE INVESTIGAÇÃO DIAGNÓSTICA E ANÁLISE MUTACIONAL DOS GENES PMP22, MPZ E Cx32

Silmara Paula Gouvêa de Lima

Orientador: Prof. Dr. Wilson Marques Júnior

Tese de Doutorado apresentada em 12/05/2008

A doença de Charcot-Marie-Tooth tipo 1 (CMT1), a mais comum neuropatia hereditária em humanos é caracterizada por heterogeneidade clínica e genética. A causa mais comum em CMT1 é a duplicação do cromossomo 17p11.2, no gene PMP22 (proteína mielínica periférica 22), cujo efeito da dosagem é a causa da doença. Em adição a duplicação 17p, mutações de ponto e pequenas deleções e inserções em alguns genes, principalmente PMP22, MPZ (proteína zero da mielina) e Cx32 (conexina 32) estão relacionados à doença. No presente estudo, selecionamos 50 casos índice de pacientes brasileiros com CMT1 não duplicados.

Entre os 50 pacientes estudados 4 apresentaram mutação no gene da Cx32, 2 no gene MPZ, 1 no gene PMP22, também encontramos dois polimorfismos, 1 no gene PMP22 e 1 no gene MPZ. A frequência total de mutações de ponto para estes genes foi de 14%. Nós encontramos a mutação Ser72Leu, no gene PMP22, confirmando esta posição como um "hot spot" para mutações de ponto no gene PMP22. Surpreendentemente, nós encontramos uma família onde a mutação Ser72Leu segregou com a duplicação 17p. Contrária a todas as publicações prévias, a CMT composta do presente estudo está associada a um fenótipo muito brando. Assim, propomos que a CMT composta deve ser pesquisada na presença de alguma variabilidade clínica significativa, tanto mais severa quanto mais branda. Em conclusão, nós encontramos a causa molecular em 14% dos pacientes desta pesquisa, incluindo 2 novas mutações.

SEGMENTAÇÃO DE TECIDOS CEREBRAIS USANDO ENTROPIA Q EM IMAGENS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DE PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA

Paula Rejane Beserra Diniz

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos dos Santos

Dissertação de Mestrado apresentada em 20/05/2008

A perda volumétrica cerebral ou atrofia é um importante índice de destruição tecidual e pode ser usada para apoio ao diagnóstico e para quantificar a progressão de diversas doenças com componente degenerativo, como a esclerose múltipla (EM), por exemplo. Nesta doença ocorre perda tecidual regional, com reflexo no volume cerebral total. Assim, a presença e a progressão da atrofia podem ser usadas como um indexador da progressão da doença. A quantificação do volume cerebral é um procedimento relativamente simples, porém, quando feito manualmente é extremamente trabalhoso, consome grande tempo de trabalho e está sujeito a uma variação muito grande inter e intra-observador. Portanto, para a solução destes problemas há necessidade de um processo automatizado de segmentação do volume encefálico. Porém, o algoritmo computacional a ser utilizado deve ser preciso o suficiente para detectar pequenas diferenças e robusto para permitir medidas reproduzíveis a serem utilizadas em acompanhamentos evolutivos. Neste trabalho foi desenvolvido um algoritmo computacional ba-

seado em Imagens de Ressonância Magnética para medir atrofia cerebral em controles saudáveis e em pacientes com EM, sendo que para a classificação dos tecidos foi utilizada a teoria da entropia generalizada de Tsallis. Foram utilizadas para análise exames de ressonância magnética de 43 pacientes e 10 controles saudáveis pareados quanto ao sexo e idade para validação do algoritmo. Os valores encontrados para o índice entrópico q foram: para o líquido cerebrospinal 0,2; para a substância branca 0,1 e para a substância cinzenta 1,5. Nos resultados da extração do tecido não cerebral, foi possível constatar, visualmente, uma boa segmentação, fato este que foi confirmado através dos valores de volume intracraniano total. Estes valores mostraram-se com variações insignificantes ($p=0,05$) ao longo do tempo. Para a classificação dos tecidos encontramos erros de falsos negativos e de falsos positivos, respectivamente, para o líquido cerebrospinal de 15% e 11%, para a substância branca 8% e 14%, e substância cinzenta de 8% e 12%. Com a utilização deste algoritmo foi possível detectar um perda anual para os pacientes de 0,98% o que está de acordo com a literatura. Desta forma, podemos concluir que a entropia de Tsallis acrescenta vantagens ao processo de segmentação de classes de tecido, o que não havia sido demonstrado anteriormente.

COMPLEXO ESCLEROSE TUBEROSA – ESTUDO CLÍNICO-EVOLUTIVO DOS CASOS ATENDIDOS NO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO – USP, NO PERÍODO DE 1975 A 2004

Andrea Rizzuto de Oliveira Weinmann

Orientador: Prof. Dr. Américo Ceiki Sakamoto
Dissertação de Mestrado apresentada em 02/06/2008

Complexo Esclerose Tuberosa (CET) é uma doença neurocutânea, multissistêmica e hereditária, autossômica dominante com expressividade variável e penetrância completa, com incidência de 1:10.000 habitantes, associada a mutação dos genes TSC1 e TSC2, respectivamente localizados nos cromossomos 9q34 e 16p13.3. Pode acometer pele, sistema nervoso central, rins, coração, olhos, vasos sanguíneos, pulmões, ossos e trato gastrointestinal. As anormalidades cerebrais primárias são os túberes corticais e nódulos subependimários que são considerados como resultantes de anormalidades de proliferação, migração e organização cortical. As crises epilépticas começam frequentemente na infância, sendo graves e fármaco-resistentes em grande número de casos. Retardo mental ocorre em cerca de 50% dos casos. O diagnóstico de CET é baseado na identificação de hamartomas em mais de um órgão. No presente estudo foram analisados retrospectivamente 68 casos com CET avaliados no período 1975 a 2004, sendo considerados: idade, sexo, presença de epilepsia, presença de história familiar de epilepsia e /ou esclerose tuberosa, idade de início das crises epilépticas, resposta ao tratamento medicamentoso da epilepsia, exame físico geral e neurológico, comprometimento cognitivo, eletroencefalograma (EEG), achados de neuroimagem e tratamento cirúrgico da epilepsia. Observou-se distribuição simétrica em relação ao sexo e a faixa etária variou entre 14 dias a 44 anos; 31 pacientes tinham história familiar de epilepsia ou esclerose

tuberosa; 63 pacientes tinham manifestações cutâneas; 63 pacientes apresentavam epilepsia associada, sendo que em 69,4% deles as crises iniciaram com menos de um ano de idade; crises parciais motoras e espasmos infantis constituíram os tipos de crise predominantes na infância; em relação à evolução da epilepsia, 32 pacientes foram farmacologicamente intratáveis; quanto ao estado cognitivo, 47 pacientes tinham algum grau de retardo mental; 46 pacientes apresentavam tomografia computadorizada de crânio alterada e dentre as anormalidades tomográficas, 60,4% correspondiam a nódulos subependimários; os 50 pacientes que realizaram ressonância magnética de encéfalo (RNM) (n=50) apresentavam exames com anormalidades, 48 deles apresentavam túberes corticais e subcorticais, 43 deles nódulos subependimários, 7 com astrocitoma de células gigantes, 5 com displasia cortical, 4 com hamartomas; em relação ao EEG 46 pacientes tinham anormalidades eletroencefalográficas, dentre estes 33 tinham alterações compatíveis com epilepsia focal, 7 com alterações com múltiplos, 7 com anormalidades difusas, 7 com hipsarrítmia e 2 apresentavam padrão evolutivo de Síndrome de West; 45 pacientes realizaram ultra-sonografia abdominal, sendo observadas alterações em 20 deles; 37 pacientes já haviam realizado ecocardiograma e destes 16 apresentavam alguma anormalidade; 9 pacientes foram submetidos a cirurgia para tratamento de epilepsia. Em nossa casuística a frequência de túberes encontrados na RNM foi maior do que a de muitos estudos revisados (mediana de 14). Os túberes corticais frontais ocorreram de forma mais freqüente em relação as outras regiões. Não houve correlação significativa entre número e localização dos túberes com retardo mental e com epilepsia intratável.

PURIFICAÇÃO PARCIAL DA PROTEÍNA p83, UMA PROTEÍNA APARENTEMENTE NOVA, SISTEMA NERVOSO-ESPECÍFICA E DESENVOLVIMENTO-REGULADA

Thais Caroline Dallabona Dombroski

Orientador: Prof. Dr. Antonio Roberto Martins
Tese de Doutorado apresentada em 02/06/2008

KM⁺ é uma lectina ligante de D⁽⁺⁾-manose, que foi purificada de semente de jaqueira (*Artocarpus integrifolia*). Estudos realizados em nosso laboratório usando anticorpos policlonais específicos anti-KM⁺, purificados por afinidade usando coluna de Sepharose-KM⁺, mostraram que o cerebelo e cérebro de rato em desenvolvimento exibem imunorreatividade KM⁺ símile marcando eventos do desenvolvimento. A proteína responsável por essa imunorreatividade

de foi parcialmente caracterizada a partir de cerebelo de rato em desenvolvimento, usando anticorpos anti-KM⁺ como sonda. Esta proteína é solúvel, não exibe propriedades de lectina convencional, possui massa molecular aparente 83 kDa e foi por conseguinte denominada p83. A proteína p83 foi detectada através de Western blot em homogeneizados de cerebelo e cérebro de rato, mas não em homogeneizados de pulmão, rim, coração, baço, fígado e sangue. P83 também foi detectada no córtex cerebral e cerebelo humanos por Western blot. Mostrou-se que p83 está aparentemente associada a laminina, tau, tubulina e calmodulina, proteínas que estão envolvidas em processos de desenvolvimento

neural normal e patológico, e também à *heat-shock protein 90b* (HSP90b) (Viapiano *et al.*, 2001), uma importante chaperona molecular. Estas associações macromoleculares de p83, se por um lado indicam sua importância biológica, por outro dificultam sua purificação. O objetivo deste trabalho foi purificar a proteína p83 para obter amostras sequenciáveis e estudar a expressão de p83 em cerebelo de rato em desenvolvimento, por imunohistoquímica, utilizando o anticorpo anti-KM⁺. O protocolo de purificação de p83 foi estabelecido e consistiu em homogeneização hipotônica de 150g de cérebro ou cerebelo de rato, precipitação fracionada com sulfato de amônio, cromatografia de troca aniônica em coluna de DEAE-Sepharose, cromatografia hidrofóbica em colunas de Phenyl-Sepharose e Butyl-Sepharose e, alternativamente, cromatografia em coluna de Hidroxiapatita e/ou Gel-filtração em coluna de Sephacryl S300, para refinamento. A seguir a amostra purificada foi separada por SDS-PAGE preparativo e a banda correspondente à p83 imunoreativa foi excisada do gel e enviada para sequenciamento. Uma amostra purificada e sequenciada na Rockefeller University

resultou na *similar to p53 associated parkin-like cytoplasmic protein*. A análise bioinformática desta proteína mostrou a presença de domínios conservados em sua estrutura, como APC10, CPH e IBR. Paralelamente, em nosso laboratório um gene foi clonado a partir de uma biblioteca de expressão de cerebelo de rato, utilizando anti-KM⁺ como sonda. O fragmento de cDNA sequenciado foi identificado como drebrina. Com imunohistoquímica, a expressão de p83 imunoreativa foi observada durante o desenvolvimento cerebelar do rato em células granulares da camada pré-migratória e em células em processo de migração. Foi observado também em processos celulares direcionados à superfície pial, em células de Purkinje e em tratos de fibras na substância branca. No rato e humano adulto e idoso, p83 imunoreativa é principalmente detectada no corpo celular e varicosidades das colaterais recorrentes das células de Purkinje, nas células granulares e fibras na substância branca. Estes resultados indicam que p83 é uma proteína aparentemente nova e sua expressão é regulada durante o desenvolvimento do rato.

OFTALMOLOGIA, OTORRINOLARINGOLOGIA E CIRURGIA DE CABEÇA E PESCOÇO

AVALIAÇÃO DE ÍNDICES DA MECÂNICA OCULAR DE COELHOS APÓS INJEÇÃO INTRA-ORBITÁRIA DE CARBOXIMETILCELULOSE

Maria Lucia Habib Simão

Orientador: Prof. Dr. Harley E. A. Bicas

Tese de Doutorado apresentada em 18/04/2008

Objetivo: Avaliar se a carboximetilcelulose a 6,0% é capaz de atuar como modificadora do sistema oculomotor de coelhos por meio de forças de ação viscoelástica. Em caso positivo, determinar a durabilidade de seu efeito.

Métodos: Foram utilizados 29 coelhos da raça Nova Zelândia, divididos em dois grupos experimentais: um grupo tratado com injeção orbitária de carboximetilcelulose (CMC) 6,0% e um grupo controle que foi submetido à injeção peribulbar de 3,0mL de soro fisiológico (SF) 0,9%. O grupo tratado com CMC foi subdividido em dois grupos de acordo com a forma de injeção da CMC (peribulbar ou subtenoniana). No grupo submetido à injeção peribulbar de CMC, variou-se o volume total injetado, obtendo-se, assim, quatro subgrupos (1,0, 1,5, 2,0 e 3,0mL). Já no grupo subtenoniano, o volume total de CMC injetado variou en-

tre 2,0 e 3,0mL. Um aparelho foi desenvolvido para permitir a medida da força necessária para promover deslocamentos tangenciais de adução. Além da medida da força, avaliação clínica dos sinais oftalmológicos externos e medida da pressão intra-ocular também foram realizadas. Os animais foram sacrificados com 60 dias de pós-operatório para análise histológica.

Resultados: A força média encontrada 60 dias após a injeção da CMC 6,0% foi menor no grupo 1,0 e maior nos grupos 1,5, 2,0 e 3,0 quando comparada à força antes da injeção. A análise histológica revelou processo inflamatório do tipo histiocitário com formação de fibrose nos grupos em que houve aumento da força e a presença da CMC nos tecidos perioculares.

Conclusões: A carboximetilcelulose 6,0% atuou como modificadora do sistema oculomotor de coelhos, podendo facilitar ou dificultar movimentos. Não foi possível concluir se o aumento da força ocorreu devido apenas ao processo inflamatório ou à soma de inflamação com um possível atrito viscoso provocado pela CMC.

EXPRESSÃO DOS ANTÍGENOS “CANCER/TESTIS” MAGEA4 (CT 1.4) E MAGEC1 (CT 7.1) EM CARCINOMA ESPINOCELULAR DE CAVIDADE ORAL

José Raphael de Moura Campos Montoro

Orientador: Prof. Dr. Rui Celso Martins Mamede

Dissertação de Mestrado apresentada em 28/04/2008

Com base na diversidade de resultados clínicos e de comportamento tumoral, os pesquisadores procuram antígenos tumorais que possam servir como fatores prognósticos e preditivos, ou como imunoterápico, em pacientes com carcinomas espinocelulares (CEC) de cavidade oral.

Objetivo: O presente estudo visa identificar a expressão imuno-histoquímica dos antígenos CT MAGEA4 e MAGEC1 nesses tumores, analisar a correlação da expressão com variáveis relacionadas ao paciente e ao tumor e comparar as curvas de sobrevida global naqueles que expressam e que não expressam estes antígenos.

Materiais e Métodos: Obteve-se dos blocos de parafina cortes seriados representativos do tumor que foram

marcados com os anticorpos 57B (MAGE A-4) e CT 7-33 (MAGE C1) para análise da imunomarcagem.

Resultados: A expressão do antígeno CT MAGEA4 foi de 56,5% e do MAGEC1 foi de 47,8%. Não houve relação significativa entre a expressão gênica e as variáveis estudadas, tão pouco houve diferença entre as curvas de sobrevida.

Discussão: Sabe-se que a influência da expressão dos antígenos CT depende do verdadeiro papel deles na carcinogênese, papel esse que ainda não está definido. A ausência de significância estatística entre a expressão dos antígenos CT com as variáveis estudadas e com a sobrevida, provavelmente, é devida ao tamanho da amostra.

Conclusões: O MAGEA4 foi expresso em 56,5% e o MAGEC1 em 47,8%. Pelo menos um dos antígenos CT foi expresso em 78,3% dos casos e a sua expressão não teve relação com as variáveis estudadas, nem com as curvas de sobrevida.

HAPLOTIPOS HLA DE CLASSE I E EVOLUÇÃO DO GLAUCOMA PRIMÁRIO DE ÂNGULO ABERTO

Fábio Zenha

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes V. Rodrigues

Tese de Doutorado apresentada em 06/05/2008

Hipótese: Indivíduos com Glaucoma Primário de Ângulo Aberto (GPAA) com haplotipos HLA de classe I (HLA - A9-B12; -A2-B40; e -A1-B8) associados a essa doença poderiam ter progressão mais rápida do que pacientes que não apresentassem esses haplotipos.

Método: Avaliação anatômica e funcional de 25 pacientes (seis dos quais com um dos haplotipos associados a glaucoma), seguidos no Ambulatório de Glaucoma do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão

Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), por dez anos, depois da tipificação de seus antígenos HLA, para comparação com as condições anteriores.

Resultados: Houve aumento maior da relação Escavação/Disco em pacientes com haplotipos HLA associados com predisposição para GPAA, no entanto não foram encontradas diferenças significantes entre esses e outros pacientes com glaucoma na progressão do dano funcional e nem na perda de fibras nervosas da retina.

Conclusão: Os resultados indicam a associação de haplotipos HLA de classe I com progressão mais rápida de alterações anatômicas da cabeça do nervo óptico em pacientes com glaucoma.

ANÁLISE POLARIMÉTRICA DA REGIÃO PERIPAPILAR EM PORTADORES DE GLAUCOMA

Mariane Ballester Mellem Kairala

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes V. Rodrigues

Tese de Doutorado apresentada em 07/05/2008

Objetivo: Investigar a região peripapilar no glaucoma por meio de um novo método de análise polarimétrica, avaliando sua eficácia em melhorar a detecção e o acompanhamento de alterações nessa região.

Método: Setenta e um olhos de pacientes com glaucoma crônico de ângulo aberto, ou suspeitos de glaucoma,

foram selecionados e testados no Ambulatório de Glaucoma do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. A aquisição dos dados polarimétricos foi realizada com a utilização de um Polarímetro de Varredura a LASER, disponível comercialmente, o GDx-N (Carl Zeiss Meditec, SanDiego, CA, USA). Utilizando uma iluminação infravermelha em 20 diferentes ângulos de incidência, uma série de dados foi digitalizada e removida do equipamento para ser analisada em programa desenvolvido especificamente para criar novas imagens,

de acordo com as diferentes características polarimétricas do olho. Retinografias coloridas obtidas com retinógrafo digital (Opto Global Pty Ltd., Austrália) foram utilizadas para classificar a atrofia e a hiperpigmentação peripapilares. De acordo com a retinografia, as amostras de hiperpigmentação e de atrofia e seus respectivos controles foram selecionados e quantificados nas novas imagens polarimétricas calculadas. Os valores de brilho dentro e fora das regiões de interesse foram utilizados para calcular o contraste em cada uma das imagens polarimétricas.

Resultados: As diferenças de brilho entre as amostras de hiperpigmentação e atrofia e seus respectivos con-

troles foram estatisticamente significantes ($P < 0.0001$) para todas as imagens calculadas. A análise estatística demonstrou a existência de relação entre o grau de hiperpigmentação e as imagens polarimétricas, mas apenas para a Imagem Despolarizada e a *Ratio Despolarized* ($P < 0.0001$). A análise demonstrou também uma correlação moderada entre o grau de atrofia e as Imagens Despolarizadas ($P < 0.0001$). O contraste das Imagens Confocais não foi significativo para hiperpigmentação ou para atrofia.

Conclusão: A análise polarimétrica é capaz de aumentar o contraste e facilitar a detecção precoce de alterações peripapilares como hiperpigmentação e atrofia.

ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DA CERATITE FÚNGICA

Marlon Moraes Ibrahim

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha
Tese de Doutorado apresentada em 07/05/2008

Objetivos: Este estudo foi conduzido no intuito de determinar os fatores de risco, avaliar aspectos epidemiológicos e clínicos, avaliar a habilidade dos oftalmologistas em prever o diagnóstico clínico e identificar os principais achados que influenciaram no diagnóstico das ceratites microbianas.

Métodos: Estudo retrospectivo baseado na revisão de prontuários médicos de dois grupos de pacientes. Uma ficha padrão foi preenchida para cada paciente onde eram documentados aspectos clínicos e epidemiológicos e informações pertinentes aos fatores de risco. O estudo A é composto por pacientes com diagnóstico clínico de ceratite microbiana atendidos no HC-FCM-UNICAMP no período de 2003 a 2006. O estudo B é composto por pacientes com diagnóstico de ceratite fúngica, com resultado confirmado por análise microbiológica atendidos entre 2000 e 2004 no HC-FCM-UNICAMP e no HC-FMRP-USP. Para o estudo B também foram avaliadas as abordagens terapêuticas.

Resultados: Estudo A: Um total de 119 pacientes com o diagnóstico clínico de ceratite microbiana foi revisado, dos quais 66 (55,46%) foram considerados de etiologia bacteriana, 52 (43,69%), fúngica e 1 (0,84%), Acantameba. As principais bactérias e fungos isolados foram *S. epidermidis* 13/56 (23,21%) e *Fusarium sp.* 11/17 (64,70%).

Pacientes com etiologia bacteriana eram mais velhos em relação aos de etiologia fúngica ($p = 0,016$). A ceratite fúngica foi mais prevalente entre a população rural ($p = 0,018$) e trabalhadores que exercem suas atividades ao ar livre ($p = 0,0004$). Trauma corneano prévio ($p < 0,0001$) em especial por material orgânico ($p = 0,002$) foi o principal fator de risco para ceratite fúngica. Setenta e oito casos (61,10%) tiveram o diagnóstico previsto corretamente. O diagnóstico foi previsto de maneira correta em 81,57% dos casos de ceratite bacteriana e 48,08% da fúngica. Estudo B: De 66 pacientes, 53 eram homens e 13 mulheres, com idade média de $40,7 \pm 16$ anos, quando da início do seguimento. Cinquenta por cento dos pacientes eram trabalhadores rurais. Trauma ocular ocorreu em 27 olhos (40%). O principal agente etiológico foi *Fusarium sp.* 67% dos casos. O tratamento clínico resolveu 39% dos casos num período médio de $24,5 \pm 12$ dias. Dos submetidos à cirurgia, 38% sofreram ceratoplastia penetrante (CTP) e 15% evisceração. A acuidade visual (AV) na entrada era $< 0,1$ em 74,5% e a final AV era $< 0,1$ em 63% dos casos.

Conclusão: Trabalhadores rurais e pessoas que sofreram traumas estão mais sujeitas à infecção fúngica. Presença de problemas oculares prévios e doenças sistêmicas aumentam a susceptibilidade à infecção bacteriana. O exame não pode ser a única referência na adoção do tratamento medicamentoso, porém auxilia na escolha inicial. Estes achados servem de base como informação e auxiliarão na decisão de tratamento empírico na região estudada.

DESORDEM TEMPOROMANDIBULAR: ESTUDO RETROSPECTIVO DE 1000 CASOS E AS BASES PARA O DIAGNÓSTICO INCLUINDO AS CONDIÇÕES MIOFUNCIONAIS OROFACIAIS

Cláudia Lúcia Pimenta Ferreira

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Maria de Felício
Dissertação de Mestrado apresentada em 09/05/2008

A Desordem Temporomandibular (DTM) é uma con-

dição de grande prevalência na população em geral e pode representar um problema de saúde contemporâneo. Muitas vezes a DTM está associada a alterações das condições miofuncionais orofaciais. Contudo, no Brasil, poucos estudos envolveram amostras amplas, tampouco há relatos na literatura de pesquisas que tenham analisado o grau de distúrbio miofuncional orofacial (DMO). Com base nisso, a pesquisa teve como objetivo identificar e analisar as características de mil pacientes brasileiros com DTM e verificar a frequência e o grau de DMO em 24% desta amostra. Foi realizado um levantamento dos dados de 1000 prontuários de pacientes com diagnóstico de DTM, atendidos em um serviço público universitário, entre os anos de 1989 e 2005, e da amostra total foram considerados os dados de 240 sujeitos, que também foram submetidos à avaliação clínica fonoaudiológica (avaliação miofuncional orofacial), para a associação destes com os dados contidos nos protocolos de avaliação odontológica destes sujeitos. De acordo com os resultados, prevaleceu o número de pacientes do gênero feminino, sendo que a média de idade e de duração da DTM foi semelhante entre os grupos feminino e masculino.

Também foi maior o número de pacientes da faixa etária adulto-jovem (idades entre 19 e 40 anos) e foi constatada correlação significativa da idade dos sujeitos com o número de queixas e o número de sintomas de DTM. O tempo médio de acometimento dos sujeitos pela DTM foi longo, e houve correlação significativa da duração da DTM com o número de queixas espontâneas e com o número de sintomas. Na presente amostra, as queixas e os sintomas mais frequentes estavam relacionados à presença da dor, sendo observada, ainda, associação entre os seguintes sintomas de DTM: dor nos músculos da face e cefaléia, fadiga nos músculos da face e dor na(s) ATM; ruído na(s) ATM e dor na(s) ATM. A grande maioria dos pacientes apresentou algum grau de DMO, sendo significativo o grau maior ou igual a 5 em comparação aos graus inferiores. Não houve correlação significativa entre o grau de DMO e o número de sintomas de DTM. Os achados do presente estudo permitiram concluir que embora, os sujeitos possam expressar espontaneamente as suas queixas, eles nem sempre relatam o conjunto de sinais e sintomas que os acomete, ou os distúrbios associados.

CIRURGIA MONOCULAR PARA ESOTROPIAS DE GRANDE ÂNGULO: UM NOVO PARADIGMA

Edmilson Gigante

Orientador: Prof. Dr. Harley E. A. Bicas

Dissertação de Mestrado apresentada em 09/05/2008

Historicamente, as primeiras cirurgias utilizadas na correção das esotropias, as miotomias e as tenotomias, eram feitas, simplesmente, seccionando-se o músculo reto medial ou o seu tendão, o que causava, com o tempo, uma exotropia secundária, esteticamente pior do que o desvio anterior. Jameson, em 1922, propôs uma solução para esse problema, fazendo recuos do reto medial com sutura na esclera, de, no máximo, 5 mm, o que se tornou uma regra para os demais cirurgiões. Apesar de alguns autores já terem praticado recuos maiores, os cirurgiões continuam obedecendo ao limite de 5 mm, o que os obriga a praticarem, sempre, a cirurgia binocular para as esotropias de grande ângulo. O objetivo deste trabalho é mostrar a viabilidade da cirurgia monocular para esses casos, praticando-se recuos e ressecções acima dos valores usuais. Foram, então, operados, por meio da cirurgia monocular e com anestesia geral, 46 pacientes com esotropias de grande ângulo (50Δ ou mais), relativamente, comitantes, de ambos os sexos, de todas as faixas etárias e com acuidade visual variável, em cada um dos olhos. Os métodos utilizados para refratometria, medida da acuidade visual e do ângulo de desvio, foram os, tradicionalmente, utilizados em estrabologia. Além da avaliação pós-cirúrgica

em PPO, foi feita uma avaliação da motilidade do olho operado nas lateroversões (duções e versões). Os resultados foram avaliados com relação ao ângulo de desvio em PPO, às incomitâncias em PPO, às duções do olho operado e às medidas do ângulo de desvio nas lateroversões, nos períodos de tempo de uma semana, seis meses, dois anos e quatro a sete anos. Com relação ao ângulo de desvio em PPO, os resultados foram semelhantes aos relatados pela literatura e mantiveram-se iguais, estatisticamente, no decorrer do tempo. As incomitâncias em PPO diminuíram da primeira semana para o sexto mês, mantendo-se estáveis nos outros períodos. Com relação às duções do olho operado e às medidas do ângulo de desvio nas lateroversões, encontrou-se alguma limitação na motilidade do olho operado, em adução, mas nada que pudesse comprometer a função ocular ou a estética desses pacientes, sendo, que, essas pequenas limitações, mantiveram-se estáveis no decorrer do tempo. Ainda foram comparados os resultados de adultos com os de crianças, os de amblíopes com os de não amblíopes e os de ângulos “menores” com os de ângulos “maiores”, não sendo encontradas diferenças, estatisticamente, significativas entre eles. Assim sendo, entende-se ser possível afirmar que a cirurgia monocular de recuo-ressecção, pode ser considerada uma opção viável para a correção cirúrgica das esotropias de grande ângulo, tanto para adultos como para crianças, bem como para amblíopes e não amblíopes.

ANÁLISE DO EFEITO DA TERAPIA MIOFUNCIONAL OROFACIAL EM CASOS DE DTM POR MEIO DE PROTOCOLOS CLÍNICOS

Melissa Melchior de Oliveira

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Maria de Felício

Dissertação de Mestrado apresentada em 09/05/2008

A terapia miofuncional orofacial tem sido utilizada para o tratamento das desordens temporomandibulares (DTMs), porém faltam evidências científicas sobre sua eficácia.

Objetivo: Analisar os efeitos da terapia miofuncional orofacial em um grupo de sujeitos com DTM e compará-los, com base em 4 diferentes protocolos clínicos, aos resultados obtidos para um grupo tratado com placa oclusal (GP), para um grupo controle constituídos por sujeitos assintomáticos (GC) e outro grupo controle constituído por sujeitos sintomáticos, mas que não receberam tratamento durante o período de estudo.

Método: Oito sujeitos sem DTM (GC) e 30 sujeitos com desordens intra-articulares fizeram parte do estudo. Destes, 10 foram tratados com terapia miofuncional orofacial e 10 com placa oclusal. Os dez sujeitos restantes constituíram o grupo controle com DTM (CDTM), o qual não recebeu tratamento durante o período do estudo. Todos os sujeitos foram submetidos a um exame clínico detalhado para a determinação dos Índices de Disfunção Clínica (Di) e Anamnésico (Ai) de Helkimo, do auto-julgamento de severidade dos sinais e sintomas de DTM, da avaliação miofuncional orofacial e para a classificação da desordem segundo

o Research Diagnostic Criteria for Temporomandibular Disorders (RDC/TMD). Os dados foram analisados estatisticamente para as comparações entre e intra-grupos.

Resultados: Após o tratamento, o grupo T apresentou redução da sensibilidade dolorosa à palpação e da frequência e severidade dos sinais e sintomas, aumento na amplitude dos movimentos excursivos da mandíbula e melhora dos escores da avaliação miofuncional orofacial (AMIOFE). Em comparação aos outros grupos, na fase de diagnóstico (FD) o grupo T foi similar ao P e ao CDTM e diferenciou-se significativamente do grupo C. Na fase final (FF) ambos os grupos tratados apresentaram melhoras significativas. O grupo T diferenciou-se do CDTM na sensibilidade dolorosa dos músculos elevadores da mandíbula e das articulações temporomandibulares (ATMs), na frequência e severidade dos sinais e sintomas, no aspecto/postura das estruturas orofaciais e na performance miofuncional orofacial. O grupo T deixou de apresentar diferenças significativas com relação ao grupo C em diversos itens, e permaneceu diferente deste em 27% dos itens. Na fase final, os grupos T e P apresentaram diferenças, com alguns resultados mais favoráveis para o grupo T.

Conclusão: A terapia miofuncional orofacial aplicada a pacientes com DTM articular favoreceu a remissão dos sinais e sintomas de DTM e o equilíbrio funcional do sistema estomatognático.

RELAÇÃO ENTRE A DEFORMIDADE DO ARCABOUÇO ÓSSEO ORBITÁRIO E ALTERAÇÃO OCULOMOTORA NAS FRATURAS ORBITÁRIAS

Gustavo Cavalcanti Dutra Eichenberger

Orientador: Prof. Dr. Harley E. A. Bicas

Tese de Doutorado apresentada em 16/05/2008

Foram analisados o equilíbrio oculomotor e o grau de deformidade orbitária de 24 pacientes (19 pacientes do sexo masculino) com fraturas do terço médio da face com acometimento orbitário unilateral. As idades variaram de 18 a 52 anos. Os critérios de inclusão foram: fraturas envolvendo o arcabouço ósseo orbitário, diagnosticadas clinicamente e/ou por exames de imagem (tomografia computadorizada), unilateralidade, acuidade visual preservada, com ou sem queixas de visão dupla e capacidade cognitiva mantida para a realização do teste tela de Hess. O tempo desde o trauma até a avaliação do paciente variou de 15 a 300 dias. Todos os pacientes foram submetidos à avaliação oftalmológica e incluídos em um protocolo com: nome completo, idade, sexo, queixa principal, acuidade visual, lado fraturado, tempo do trauma em dias, causa do trauma (veículo automotor, acidente de trabalho, esporte, violência, acidente doméstico e

outros), tipo de fratura seguindo a classificação de Jackson. Todos os pacientes foram submetidos à exame de imagem orbitária por tomografia computadorizada com cortes contíguos finos coronais de 2mm e 3mm. Para cada uma das 48 órbitas da amostra (24 fraturadas e 24 normais), as áreas orbitárias foram medidas nos cortes coronais utilizando-se um software de processamento de imagens em formato DICOM que permite vários tipos de medidas das imagens. As medidas foram realizadas no sentido ântero-posterior a partir do rebordo lateral até o ápice orbitário. Os resultados mostraram pelo menos cinco tipos de deformidades orbitárias: expansão global, aumento predominantemente anterior, expansão posterior, expansão anterior com diminuição posterior e diminuição global. As alterações oculomotoras foram quantificadas por meio de estabelecimento de um índice expresso pela reação entre as áreas da tela de Hess (olho normal/olho afetado). Os índices variaram de 1 (normalidade) a 10 (grande alteração oculomotora). Os piores índices foram predominantemente verificados nos pacientes com alteração morfológica do tipo expansão global.

ESTUDO COMPARATIVO DA FARMACOCINÉTICA VÍTREA E TOXICIDADE RETINIANA ENTRE O ACETONIDO DE TRIANCINOLONA COM E SEM PRESERVATIVO, EM OLHOS DE COELHOS

Rafael Cardoso Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Jorge

Tese de Doutorado apresentada em 20/05/2008

O objetivo deste estudo foi avaliar a farmacocinética vítrea e a toxicidade retiniana dos dois tipos de triancinolona, com e sem preservativo álcool benzílico, em olhos de coelhos. Foram utilizados sessenta coelhos albinos machos, divididos em dois grupos: Grupo I, composto por 25 coelhos, que receberam 4mg (0,1mL) intravítrea de triancinolona com preservativo álcool benzílico (TACP), no olho direito e Grupo II, formado por 25 coelhos, os quais receberam também no olho direito, 4mg (0,1mL) de triancinolona livre de preservativo (TASP). Foram sacrificados cinco coelhos de cada grupo nos dias 3, 7, 14, 21 e 28 após a injeção intravítrea, sendo a dosagem da triancinolona realizada por cromatografia líquida (CLAE). Todos os animais foram avaliados por meio de exame ocular externo e oftalmoscopia binocular indireta. A pressão ocular foi aferida antes e imediatamente após as injeções em todos os coelhos, e nos dias 14 e 28 após as aplicações. Para o estudo da toxicidade, 10 coelhos foram utilizados, sendo escolhidos, aleatoria-

mente, cinco de cada grupo. Vinte e quatro horas antes da injeção e no vigésimo sétimo dia após, os cinco coelhos do grupo I e os cinco do grupo II foram submetidos ao eletrorretinograma. No vigésimo oitavo dia, esses dez animais foram sacrificados e tiveram os olhos direitos processados para análise histopatológica.

A concentração intravítrea de triancinolona observada nos olhos dos animais do grupo I apresentou médias de 1713.34µg/mL, 1250.62µg/mL, 770.52µg/mL, 436.44µg/mL, e 203.3µg/mL, nos dias 3, 7, 14, 21 e 28, respectivamente. No grupo II, a média da concentração intravítrea de triancinolona observada nos mesmos dias foi 1362.50µg/mL, 655.66µg/mL, 507.06µg/mL, 289.82µg/mL e 119.54µg/mL, respectivamente.

Os resultados obtidos indicam que a injeção intravítrea de triancinolona com preservativo álcool benzílico e a triancinolona livre de preservativo apresentaram maior diferença de concentração vítrea da droga nos olhos de coelhos do grupo I no sétimo dia do estudo (valor-p<0,03). Nos demais dias, não se constatou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Os estudos, histológico e eletrorretinográfico, não evidenciaram toxicidade do tecido retiniano.

GENES CODIFICANTES DE PEPTÍDEOS ESPECÍFICOS EM DOENÇAS BENIGNAS E MALIGNAS DA TIREÓIDE: ANÁLISE POR IMUNO-HISTOQUÍMICA

Daniel Hardy Melo

Orientador: Prof. Dr. Rui Celso Martins Mamede

Dissertação de Mestrado apresentada em 21/05/2008

Introdução: Alguns tumores da tireóide apresentam características histológicas que dificultam a interpretação histopatológica e os critérios diagnósticos usados frequentemente, são sutis e subjetivos. Assim, análises imuno-histoquímica e de biologia molecular têm sido utilizadas na tentativa de esclarecer o diagnóstico, mas ainda não alcançaram um nível de confiança para serem introduzidas na rotina dos laboratórios de Patologia. Por isso, impõe-se a necessidade de encontrar marcadores mais objetivos para, melhor que a morfologia clássica, caracterizar essas lesões. Dentre esse marcadores, a família MAGE, um grupo de peptídeos antigênicos de tumores apresentados por moléculas HLA classe I e reconhecidos por linfócitos T citotóxicos, expressa-se em cânceres de vários tipos histológicos. Entretanto, o seu papel nas doenças da tireóide é pouco investigado. A presente pesquisa tem a intenção de estudar se a expressão das proteínas MAGE-A4 e MAGE-C1 podem colaborar: (1) no diagnóstico diferencial das doenças folicula-

res benignas e malignas da glândula tireóide; (2) nas características histológicas do tumor e (3) nas curvas de sobrevivência global.

Materiais e Métodos: Trata-se de estudo retrospectivo, caso-controle, com 70 casos operados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), no período de 1991 a 2005, distribuídos em quatro grupos: 20 bócios adenomatosos, 10 adenomas foliculares, 16 carcinomas foliculares e 24 carcinomas papilíferos. Os critérios de inclusão foram: dados clínicos e macroscópicos disponíveis, representação adequada da lesão, processamento histológico apropriado e disponibilidade de blocos de parafina em boas condições. As análises dos dados clínicos, anatomopatológicos e a imuno-histoquímica dos biomarcadores MAGE-A4 e MAGE-C1 foram realizadas.

Resultados: No grupo de pacientes com doenças benignas, a proporção entre mulheres e homens foi de 9:1; a média de idade foi de 42,9 anos, com desvio padrão de 9,88 anos e mediana de 43 anos. Na avaliação clínica, podemos observar que o tamanho dos nódulos em função do maior diâmetro obteve média de $3,0 \pm 1,53$ cm (1 a 8cm). Vinte e um

casos tinham tumores localizados no lobo D e nove casos no lobo E da glândula tireóide. Ao considerar a casuística para as doenças malignas, a distribuição, segundo o gênero, revelou que 85% dos pacientes eram do sexo feminino, com proporção entre mulheres e homens de 8,5:1,5. A média de idade foi de 48,45 anos, com desvio padrão de 17,0 anos e mediana de 48 anos. Na avaliação clínica, o tamanho dos nódulos em função do maior diâmetro obteve média de $3,63 \pm 1,73$ cm (0,6 a 8 cm). No grupo com carcinoma folicular, a localização do tumor foi predominantemente no lobo direito em relação ao lobo esquerdo (1,5:1). Entre os casos de carcinoma papilífero, a localização do tumor foi, em 25 casos, no lobo esquerdo e em 15, no lobo direito. A invasão

angiolímfática foi observada em 37,5% dos pacientes com carcinomas foliculares e em 50% dos pacientes com carcinoma papilífero. Não foi observada imunomarcagem dos antígenos MAGE-A4 e MAGE-C1, de qualquer grau de intensidade, em nenhuma das amostras.

Discussão: A degeneração maligna de tecidos é um processo multifatorial, no qual estão envolvidos elementos genéticos e ambientais em proporções variáveis, nos diversos tipos de tumores e de indivíduos. Esse fato, acreditamos, explica a ausência de expressão dos genes aqui estudados.

Conclusão: Não houve expressão dos antídotos analisados.

ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DAS FIBRAS COLÁGENAS E ELÁSTICAS NO CONJUNTIVO DAS PREGAS VENTRICULARES

André Silva Lucas

Orientador: Prof. Dr. Rui Celso Martins Mamede
Dissertação de Mestrado apresentada em 23/05/2008

Introdução: Como estrutura complexa que é, o estudo da composição anatômica e histológica da laringe torna-se fundamental à assimilação das funções por ela exercidas. Diferentemente das pregas vocais, em que o conjuntivo da lâmina própria estratificada em camadas tem sido exaustivamente pesquisado, nas pregas ventriculares a distribuição e quantificação dessas fibras no conjuntivo ainda permanecem desconhecidas.

Objetivos: Analisar a prega ventricular e quantificar a distribuição das fibras colágenas e elásticas, relacionadas com as da prega vocal.

Materiais e Métodos: Este estudo foi realizado em 126 cortes provenientes do terço de 14 hemi-laringes masculinas retiradas de cadáveres e coradas para a descrição histológica e, posterior, quantificação e análise das fibras elásticas e colágenas, utilizando software manipulador de imagens.

Resultados: O epitélio que recobre a laringe é o colunar pseudoestratificado ciliado, exceto na prega vocal e na borda livre da prega ventricular, onde se faz presente o epitélio escamoso estratificado não queratinizado. A distribuição do colágeno nas pregas ventriculares não observa

padrões de estratificação tendo sido encontrados 29,82% das fibras na camada superficial, 25,81% na intermediária e 44,38% na profunda, com prevalência do colágeno tipo I (69,59%). A presença de fibras elásticas é escassa, representando apenas 1,12% das estruturas da área, e com padrão de distribuição similar ao das fibras colágenas, com aumento da densidade próximo às glândulas.

Discussão: As recentes funções atribuídas às pregas ventriculares, e seu potencial na reabilitação fonatória têm despertado a atenção da comunidade científica para a importância do conhecimento aprofundado dessa estrutura. Acreditamos que o fato da prega possuir epitélio semelhante à da prega vocal pode interferir diretamente nos resultados da fonação exercida por elas. A lâmina própria das pregas ventriculares não apresenta a especialização observada nas pregas vocais, porém estudos futuros devem confirmar o potencial de desenvolvimento e especialização dessas pregas quando submetidas a novas funções.

Conclusão: A prega ventricular é composta de lâmina própria não estratificada, recoberta em sua borda livre por epitélio escamoso estratificado não queratinizado e apresenta maior quantidade de fibras colágenas em relação à prega vocal, principalmente nas proximidades das glândulas sero-mucosas. As fibras elásticas são escassas e também obedecem a esse padrão.

EXPRESSÃO DA PROTEÍNA LIGADORA DE CÁLCIO S100A7 EM CARCINOMA ESPINOCELULAR DE LARINGE E SUA CORRELAÇÃO COM A CLÍNICA: ANÁLISE POR IMUNOHISTOQUÍMICA

Rogério Costa Tiveron

Orientador: Prof. Dr. Rui Celso Martins Mamede
Tese de Doutorado apresentada em 28/05/2008

O Câncer de Laringe, com 8.000 casos por ano, cor-

responde a 2% dos do Brasil e é o segundo mais frequente do sistema respiratório, perdendo apenas para o de pulmão. O Carcinoma Espinocelular de Laringe (CECL), responsável por 94% dos casos, se caracteriza por ser heterogêneo, com evoluções indefinidas. Nos últimos anos, o

estudo das alterações celulares e moleculares tem buscado marcadores capazes de identificar os tumores mais agressivos. As proteínas ligadoras de Cálcio S100, com atuação em uma série de processos celulares como progressão e diferenciação do ciclo celular, têm sido estudadas em muitos tipos de cânceres, excetuando os de laringe.

Objetivos: Em CECL pretendeu-se identificar a expressão imuno-histoquímica da proteína ligadora de cálcio S100 A7 e a sua correlação com características clínicas e histopatológicas do tumor.

Casuística e Métodos: Avaliados 63 pacientes com diagnóstico histopatológico de CECL, tratados cirurgicamente no período de 2001 a 2005. Seus respectivos espécimes foram submetidos a reações de imuno-histoquímica com o anticorpo S100 A7 (Psoriasin) – *liquid mouse monoclonal antibody* NCL-L-S100 A7 – Novocastra Laboratories®. As reações foram classificadas quanto à extensão da imunomarcação em: **Zero**; **1+**: 5 – 25% das células neoplásicas marcadas; **2+**: 25 – 50%; **3+**: 50 – 75%; **4+**: > 75% (nível de significância $p \leq 0,05$).

Resultados: A amostra de 63 pacientes, 58 homens e cinco mulheres, com idade variando de 27 a 78 anos (média de 57,46) constituiu-se de 36 casos de tumores pertencentes à supraglote, 24 à glote e apenas três à subglote, sendo 13 BD, 37 MD e 13 PD. A análise das falhas do tratamento revelou dez recidivas locais, sete recidivas regionais, uma metástase e cinco 2º tumores primários. Os escores foram correlacionados com diversas variáveis. Observou-se tendência dos tumores glóticos a terem escores altos (15 de 24 com escore 3+ e 4+) e os supraglóticos, escore baixo (20 em

26 abaixo de 3+). O grupo BD apresentou escores significativamente superiores aos MD e aos PD; e o grupo MD superior ao PD ($p < 0,01^*$). No grupo MD notou-se predomínio de escores altos nos estádios I e II (7 casos com escore 3+ e 4+ de 10), ao passo que nos estádios avançados (III e IV), a distribuição do escore foi mais homogênea (13/27 escores 0 a 2+ e 14/27 escores 3+ e 4+). Com relação às falhas do tratamento, houve diferença estatisticamente significativa do grupo escore 0 (3/4 complicações: 75%) com os demais escores (13/59: 22%) ($p = 0,02^*$).

Discussão: O gene *proteína ligadora de cálcio S100 A7* pertence à família S100 e é amplamente expresso em epitélio de doenças que cursam com hiperplasias da epiderme, como a psoríase. Recentemente, tem sido relatada alta expressão em lesões neoplásicas (carcinoma ductal de mama, carcinoma espinocelular de bexiga e carcinoma espinocelular de cavidade oral). À semelhança desses estudos, observou-se alta expressão em tumores BD, ao passo que em tumores indiferenciados esse gene parece não atuar. À medida que a massa tumoral aumenta os escores tendem a diminuir (isto foi observado nos tumores MD), o que reforça a hipótese da sua ação se concentrar nas fases iniciais da carcinogênese.

Conclusões: O marcador Psoriasin 1 (S100A7) foi expresso em 93,7% dos casos de CECL com maior positividade em tumores mais diferenciados e com menor índice de falhas de tratamento (estatisticamente significativa). Há tendência dos tumores glóticos terem maior escore na expressão (sem significância). O escore obtido não representou impacto na sobrevida dos pacientes estudados.

AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE ADAPTAÇÃO DE PRÓTESES AUDITIVAS EM USUÁRIOS ATENDIDOS NO PROGRAMA DE ATENÇÃO À SAÚDE AUDITIVA DO HCFMRP-USP

Mariana Blecha Pereira

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Lancia Cury Féres
Dissertação de Mestrado apresentada em 11/06/2008

De acordo com o Sistema Ambulatorial de Informações/Sistema Único de Saúde, no Estado de São Paulo foram distribuídas 35.503 próteses auditivas no ano de 2006, beneficiando, aproximadamente, 20.415 pessoas. A enorme quantidade de pacientes que buscam auxílio no Sistema Único de Saúde para obtenção de aparelhos auditivos, proveniente de diferentes situações econômicas, sociais, culturais, familiares, com diferentes doenças de base, e, conseqüentemente, com uma sintomatologia variada, gera um conjunto muito rico de dados a serem coletados e analisados, para melhor conhecimento dessa população. Conhecer melhor a população atendida, por sua vez, propicia uma importante retro-alimentação para o Programa de Saúde Auditiva, e para o próprio Sistema Único de Saúde, uma vez que permite avaliar se os objetivos estão sendo atingi-

dos, e de que forma.

Objetivo: Traçar o perfil da população atendida no Programa de Saúde Auditiva, assim como as mudanças ocorridas no zumbido e na tontura após três meses de adaptação da prótese auditiva.

Materiais e Métodos: O estudo contou com a colaboração de 67 participantes candidatos ao uso de prótese auditiva. Foi aplicado questionário a respeito das condições sócio-econômicas, das queixas audiológicas e da expectativa do participante, no momento da indicação da prótese auditiva. Após três meses de adaptação, foi aplicado novo questionário, retomando as queixas audiológicas, pesquisando os cuidados e a facilidade do manuseio das próteses e o grau de satisfação dos participantes.

Resultados: Foi observada prevalência de perda auditiva neurosensorial de grau moderado bilateral, sendo que a prótese auditiva programável retroauricular foi a mais freqüentemente adaptada. O zumbido estava presente em 33 participantes no momento pré-adaptação, sendo obser-

vada melhora de 90% após uso da prótese. Os pacientes que se denominavam satisfeitos com o Programa correspondem a 89% da população estudada.

Conclusão: A perda auditiva neurossensorial de grau moderado bilateral com dados imitanciométricos compatíveis foi a mais comum entre os participantes da pesquisa.

Aparelhos auditivos programáveis retroauriculares foram os mais utilizados pelos participantes, sendo a adaptação bilateral indicada para a maioria da população estudada. A melhora do zumbido foi estatisticamente significativa após adaptação da prótese auditiva. Não foi possível relacionar melhora da tontura com o uso da prótese auditiva.

ORTOPEDIA, TRAUMATOLOGIA E REABILITAÇÃO

UTILIZAÇÃO DA SOLUÇÃO HIPERTÔNICA COMO LÍQUIDO DE REPOSIÇÃO NA HEMODILUIÇÃO NORMOVOLÊMICA AGUDA EM CIRURGIAS DE ESCOLIOSE. EFEITOS HEMODINÂMICOS E LABORATORIAIS

Liana Maria Torres de Araújo

Orientador: Prof.Dr. Luis Vicente Garcia

Tese de Doutorado apresentada em 17/04/2008

A HNA é uma terapia mundialmente reconhecida como vantajosa em cirurgias que possuem grande potencial para sangramento como as cirurgias ortopédicas para correção de escoliose, mas o edema provocado pela maior infusão de fluidos pode ser danoso em alguns pacientes. No intuito de avaliar as repercussões hemodinâmicas e laboratoriais da utilização da solução salina hipertônica a 7,5% como líquido parcial de reposição na HNA foram estudados 20 pacientes submetidos à artrodese para correção de escoliose de coluna. No Grupo SS 0,9% (n=10) a HNA, realizada antes da cirurgia, foi repostada por solução salina 0,9% em um volume três vezes maior que o retirado. No Grupo SS 7,5% (n=10) a metade do que foi retirado foi

reposto com solução a 0,9% (3x o volume retirado) e a outra metade por 4ml.kg⁻¹ de solução hipertônica a 7,5%. Nenhum dos pacientes apresentou acidose significativa ou elevação anormal dos níveis de sódio plasmático. Também não foi observado sangramento anormal intra-operatório ou dorsosens neurológicas pós-operatórias. Os pacientes apresentaram incidência semelhante de transfusão sangüínea embora os pacientes do grupo solução hipertônica tenham ficado clinicamente menos edemaciados. Mesmo não sendo objeto do estudo observou-se uma menor incidência de infecções pós-operatórias nos pacientes submetidos à infusão de solução hipertônica, o que pode significar um possível potencial protetor da solução. Embora mais estudos com números maiores de pacientes sejam necessários para se comprovar seus efeitos a solução hipertônica mostrou-se barata, simples e segura como maneira de redução do volume infundido na HNA.

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE PARÂMETROS DA ULTRA-SONOMETRIA ÓSSEA E TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA NA AVALIAÇÃO DA CONSOLIDAÇÃO DE TÍBIAS DE CARNEIRO OSTEOTOMIZADAS

Giuliano Barbieri

Orientador: Prof.Dr. Cláudio Henrique Barbieri

Tese de Doutorado apresentada em 24/06/2008

Foi realizado um estudo experimental *in vivo* e *in vitro* para comparar a ultra-sonometria óssea e a tomografia computadorizada na avaliação da consolidação do osso cortical em diferentes períodos, usando um modelo de osteotomia médio-diafisária da tibia direita, fixada com um fixador externo flexível, em carneiros. Foram usados 22 carneiros da raça Santa Inês, com peso médio de 37 kg, divididas em três grupos de cinco animais cada (Grupos 1 a 3) e

um grupo de sete animais (Grupo 4), de acordo com o período de observação pós-operatória, de 30, 45, 60 e 90 dias, respectivamente. As tíbias esquerda intacta dos 22 animais foram usadas como controle. O processo de consolidação foi monitorado com radiografias convencionais tomadas a intervalos de duas semanas nos Grupos 1 a 3, e a intervalos mensais no Grupo 4, no qual também foi realizada a avaliação ultra-sonométrica longitudinal *in vivo*, nos mesmos intervalos. Os animais foram sacrificados ao final dos períodos de observação de cada grupo e as tíbias direita e esquerda, removidas para as avaliações ultra-sonométricas subaquáticas e de contato, e pela tomografia computadorizada. Os diâmetros no local da osteotomia foram medidos

nos planos frontal e sagital e correlacionados com a velocidade de propagação do ultra-som (VPUS), atenuação do ultra-som de banda larga (SUA) e densidade óssea Hounsfield. Tanto a VPUS como a densidade óssea aumentaram com a progressão da consolidação, enquanto que o diâmetro e a SUA diminuíram, com diferenças significativas

entre os grupos experimentais e de controle e entre os próprios grupos experimentais, na maioria das comparações. Concluiu-se que o método da ultra-sonometria como usado nesta investigação é factível e confiável para avaliar a consolidação do osso cortical, com grande potencial de aplicação clínica.

CORRELAÇÃO ENTRE TESTES DE CABECEIRA E TESTES DE FUNÇÃO PULMONAR EM QUATRO GRUPOS: CONTROLE, GESTANTE, OBESO E IDOSO

Elaine Caetano Silva

Orientador: Prof. Dr. Luís Vicente Garcia

Tese de Doutorado apresentada em 27/06/2008

O objetivo deste estudo foi investigar a correlação entre testes de cabeceira e de função pulmonar em quatro grupos: controle (sadios), gestantes (36ª semana), obesos ($IMC \geq 40 \text{ Kg/m}^2$) e idosos (≥ 60 anos). Cada grupo foi formado por 20 indivíduos. Os testes de função pulmonar foram realizados com ventilômetro - ventilometria e VVM (ventilação voluntária máxima), espirômetro - CVF (capacidade vital forçada), VEF1 (volume expirado forçado de primeiro segundo) e PFE (pico de fluxo expiratório) e manovacuômetro analógico - Pimax (pressão inspiratória máxima) e Pemax (pressão expiratória máxima). Os testes de cabeceira constaram de teste de vela, teste de apnéia, cirtometria torácica (circunferência torácica) e cirtometria abdominal (circunferência abdominal). Denominou-se Δ torácico inspiratório a diferença entre a cirtometria na inspiração máxima e a cirtometria na posição de repouso e Δ torácico expiratório a diferença entre a cirtometria na posição de repouso e após expiração máxima. O Δ abdominal inspiratório e o Δ abdominal expiratório foram obtidos da mesma forma. Nas correlações entre teste de apnéia e testes de função pulmonar, houve, no grupo controle, significância estatística apenas com o PFE. Nas gestantes, a significância só ocorreu com a CVF. Nos obesos, só não houve significância com a Pimax e,

nos idosos, não houve significância com nenhuma das correlações. Nas correlações entre o teste da vela e os testes de função pulmonar, houve, no grupo controle, significância estatística com a CVF e VEF1. Nas gestantes, nenhuma das correlações foi significativa. Nos obesos, houve correlação significativa com a VVM, CVF, VEF1 e PFE e, nos idosos, ocorreu significância só com o PFE. Não houve, no grupo controle, significância em nenhuma das correlações entre o Δ torácico inspiratório e os testes de função pulmonar. Nas gestantes, a significância só ocorreu com a VVM e nos obesos só com o VEF1. Nos idosos, a significância ocorreu com a VVM e a CVF. Não houve, nos grupos controle e idoso, significância em nenhuma das correlações entre o Δ torácico expiratório e os testes de função pulmonar. Nas gestantes, a significância só ocorreu com a VVM e nos obesos com o PFE e Pimax. Não houve, nos grupos controle e gestante, significância em nenhuma das correlações entre o Δ abdominal inspiratório e os testes de função pulmonar. Nos obesos, a significância ocorreu com a CVF e PFE e nos idosos só com a CVF. Não houve, nos grupos controle, gestante e obeso, significância nas correlações entre o 'delta' abdominal expiratório e os testes de função pulmonar. Nos idosos a significância só ocorreu com a Pimax. O valor dos coeficientes (Pearson e Spearman) foi baixo em todas as correlações testadas, em todos os grupos. No grupo obeso, a maioria das correlações foram significantes e os coeficientes de correlação foram os maiores.

PATOLOGIA EXPERIMENTAL

REMODELAMENTO DO COMPLEXO DE GLICOPROTEÍNAS ASSOCIADAS À DISTROFINA, DO DISCO INTERCALAR E DAS PROTEÍNAS CONTRÁTEIS NO CORAÇÃO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À SÉPSIS INDUZIDA POR LIGAÇÃO E PERFURAÇÃO DO CECO

Mara Rúbia Nunes Celes

Orientador: Prof. Dr. Marcos A. Rossi

Tese de Doutorado apresentada em 16/04/2008

A sépsis e o choque séptico representam uma síndrome complexa de intensa resposta inflamatória sistêmica, com múltiplas anormalidades fisiológicas e imunológicas,

comumente causadas por infecção bacteriana. A principal consequência dessa resposta é o comprometimento de muitos órgãos e tecidos. A disfunção cardíaca, decorrente de um prejuízo na contratilidade miocárdica, tem sido reconhecida como um fator importante que contribui para os altos índices de mortalidade observados na sépsis. Dados recentes do nosso laboratório indicam que alterações estruturais no miocárdio podem ser responsáveis pela disfunção cardíaca observada na sépsis. Considerando que a maquinaria contrátil interna das miofibras deve permanecer intimamente conectada com a membrana e a matriz extracelular, o presente estudo foi proposto para avaliar alterações nas comunicações intercelulares e acoplamento mecânico entre os cardiomiócitos vizinhos e avaliar a expressão de proteínas do arcabouço celular e da matriz extracelular (especificamente a laminina- $\alpha 2$) durante a sépsis grave. Nossos resultados mostraram que há uma diminuição na expressão das proteínas envolvidas na formação das *gap junctions* (conexina43) e junções aderentes (N-caderina), o que resultaria na perda da integridade estrutural dos discos intercalares, alterando

o acoplamento mecânico e eletro-químico entre os cardiomiócitos vizinhos. Além disso, demonstramos que há redução na expressão de distrofina e das proteínas que constituem o complexo de glicoproteínas associadas a distrofina (CGD) durante a sépsis experimental. A redução ou perda da expressão de distrofina é o evento primário que ocorre seguido pela degeneração miofilamentar, caracterizada pela lise dos filamentos de actina e miosina. A diminuição na expressão das glicoproteínas associadas à distrofina: ândroglicana e laminina foram considerados eventos secundários. Os resultados sugerem que durante a sépsis induzida por ligação e perfuração do ceco (CLP), há perda de proteínas importantes envolvidas tanto no remodelamento do disco intercalar quanto na expressão de glicoproteínas envolvidas na ligação mecânica entre o citoesqueleto intracelular e a matriz extracelular. Embora estudos funcionais sejam necessários para determinar o efeito direto dessas alterações sobre o miocárdio podemos sugerir que as alterações estruturais são parcialmente responsáveis pela depressão miocárdica observada na sépsis.

INTERFERON- γ , INTERLEUCINA-10, MOLÉCULA DE ADESÃO CELULAR-1 E RECEPTOR DE QUIMIOCINAS 5 DESEMPENHAM PAPEL PROTETOR ENQUANTO INTERLEUCINA-4 NÃO ALTERA O DESENVOLVIMENTO DA LESÃO PERIAPICAL EXPERIMENTALMENTE INDUZIDA EM CAMUNDONGOS

Andiara De Rossi

Orientador: Prof. Dr. Marcos A. Rossi

Tese de Doutorado apresentada em 07/05/2008

A utilização de camundongos *knockout* tem criado novas possibilidades para o estudo da imunopatogênese das doenças; pode fornecer importante contribuição dos mecanismos moleculares envolvidos em seu início, manutenção e/ou resolução. O objetivo desse estudo foi caracterizar a cinética de desenvolvimento de lesões periapicais experimentalmente induzidas em camundongos *wild-type* (WT) e avaliar o papel de citocinas Th1 (IFN- γ) e Th2 (IL-4 e IL-10), uma molécula de adesão celular (ICAM-1) e um receptor de quimiocinas (CCR5), utilizando animais *knockout*, visando estabelecer se esses fatores são predominantemente protetores ou estimuladores do desenvolvimento da lesão periapical. Após a abertura coronária os canais radiculares dos primeiros molares foram inoculados com 4 linhagens bacterianas e deixados expostos ao ambiente bucal. As lesões periapicais obtidas foram avaliadas em diferentes estágios de desenvolvimento por meio de microscopia convencional (HE, picrossírius vermelho, Brown e Brenn e TRAP), microscopia de fluorescência, imunistoquímica (neutrófilos, macrófagos e linfócitos), imunofluorescência (RANK, RANKL e OPG) e real-time PCR (IL-1 κ , TNF- κ , IFN- γ , IL-10, RANK, RANKL, OPG e catepsina K). Nos animais WT veri-

ficou-se um aumento progressivo no tamanho da lesão periapical acompanhado do aumento na expressão de RNAm de IL-1 κ , IFN- γ , IL-10, RANK, RANKL, OPG e catepsina K. A microscopia de fluorescência das seções coradas com HE favoreceu a visualização e delimitação da lesão periapical, constituindo importante ferramenta no estudo histológico qualitativo e quantitativo. Aos 21 e 42 dias após a contaminação do canal radicular, os animais *knockout* de IFN- γ , IL-10, ICAM-1 e CCR5 apresentaram lesões periapicais maiores que os animais WT controles. Não verificou-se diferença significativa no tamanho das lesões periapicais induzidas em animais *knockout* de IL-4 e WT, em todos os períodos avaliados. Nossos resultados sugerem que a IL-1 κ , IFN- γ e IL-10 possam estar envolvidas na determinação da severidade da doença periapical como moduladores da migração celular e da osteoclastogênese via RANK, RANKL e OPG. Ainda, isoladamente, o IFN- γ , IL-10, ICAM-1 e CCR5 endógenos desempenham importante papel protetor enquanto a IL-4 não apresenta efeito significativo na modulação da lesão periapical experimentalmente induzida. A investigação da dinâmica de equilíbrio entre mecanismos defensivos e destrutivos pode fornecer bases imunopatológicas para a melhor compreensão dos sinais e sintomas da lesão periapical, possivelmente influenciando sua estratégia de tratamento e fornecendo alguma luz aos mecanismos da reabsorção óssea e dentária.

ESTUDO DE NEUROTRANSMISSORES RELACIONADOS À DEPRESSÃO E PSICOSE EM AMOSTRAS DE CÉREBRO HUMANO DE PACIENTES SUBMETIDOS À CIRURGIA POR EPILEPSIA DE LOBO TEMPORAL

Edson Arthur Scherer

Orientador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Moreira
Tese de Doutorado apresentada em 09/05/2008

A epilepsia é um transtorno do funcionamento cerebral caracterizado por crises epiléticas recorrentes que acomete cerca de 1 a 2% da população mundial. A epilepsia do lobo temporal (ELT) é o subtipo mais prevalente. A refratariedade aos medicamentos é comum e cerca de 40 % destes pacientes apresentam transtornos psiquiátricos. Neste trabalho utilizamos o método de TacMan *real time* PCR para quantificar o mRNA de subtipos dos receptores de noradrenalina, dopamina, serotonina e substância P em hipocampus cirurgicamente removidos de pacientes com ELT para conhecer o papel destes na ELT com ou sem comorbidade psiquiátrica (depressão ou psicose). Nossa amostra foi de 48 pacientes com ELT sem (Epilepsia - 24) ou com comorbidade psicótica (Psicose - 10) ou depressiva (Depressão - 14) e 8 Controles (necrópsias). O receptor adrenérgico- κ 2A (AD2A) apresentou diferença entre os grupos ($p = 0,0059$) com significância para a variável Antiepilético ($p = 0,0374$) e pós-teste significativo de maior expressão do mRNA de AD2A no grupo Epilepsia comparado com Controle e com Psicose. A ativação dos receptores κ 2A no hipocampo pelos antiepiléticos pode explicar nossos achados do grupo Epilepsia comparado ao Controle, corroborando a literatura acerca do AD2A na epilepsia e em relação aos antiepiléticos. O AD2C mostrou diferença entre os grupos ($p = 0,0016$), sem significância nas variáveis de controle e significativa maior expressão do mRNA de AD2C no grupo Epilepsia comparado ao Controle e Psicose. O AD2C é encontrado em áreas que

processam informações sensoriais e controlam atividades motoras e emocionais relacionadas, o que pode explicar nossos resultados. Parece ser importante na patologia relacionada à ELT e merece ser estudado. A não diferença entre Epilepsia e Depressão para AD2A e AD2C, parecem confirmar uma relação bi-direcional ou um mecanismo patogênico comum entre epilepsia e depressão, enquanto a menor expressão de AD2A e AD2C nos psicóticos parece indicar diferenças nos mecanismos adrenérgicos ligados a psicose e epilepsia. D2 mostrou diferença entre os grupos ($p = 0,0125$) com resultado significativo para a variável Subtipo de Diagnóstico Psiquiátrico ($p = 0,0239$), provavelmente devido a cronicidade da doença e a quantidade de episódios depressivos apresentados pelos sujeitos. Quanto maior a frequência das crises ($p = 0,0381$) maior a expressão do D2 no grupo Epilepsia e no Depressão comparados ao Controle. Estes achados sugerem a participação deste receptor na depressão comórbida na ELT; corroboram que o monitoramento dopaminérgico límbico pode ser útil para desenvolver novos antidepressivos e propõem pesquisas futuras sobre D2 em epiléticos. A participação de 5-HT2A na ELT é indicada, pois, sua maior expressão no grupo Epilepsia em relação ao Controle foi significativa ($p = 0,0273$). Quanto maior a frequência das crises epiléticas maior a expressão do 5-HT2A ($p = 0,0433$). Não encontramos resultados significativos referentes aos receptores D4, 5-HT1A, 5-HT2C e NK1. Nossos resultados mostraram a possibilidade da aplicação do TacMan *real time* PCR no estudo de receptores de neurotransmissores, sugeriu a importância dos receptores estudados na ELT e comorbidades psiquiátricas, e que outras estruturas límbicas, como a amígdala, sejam focos de investigação.

IMPACTO PROGNÓSTICO DA EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DO p53 E p63 E O PAPEL DO HPV NO CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL

Lucinei Roberto de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Ribeiro-Silva
Tese de Doutorado apresentada em 30/05/2008

O Brasil está entre os países com os maiores índices de carcinoma epidermóide oral (CEO). O gene *p63* é um análogo do supressor tumoral *p53* e a influência da expressão de ambos no prognóstico do CEO ainda necessita ser melhor investigada. O envolvimento do papilomavírus humano (HPV) no CEO é outro fator ainda não elucidado. Nosso estudo objetivou avaliar os pacientes com CEO no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP, assim como também investigar a relação entre a pre-

sença do HPV e a imunexpressão das proteínas *p53* e *p63* com alguns parâmetros relevantes ao prognóstico deste tumor. Os seguintes dados foram obtidos dos prontuários médicos de 424 pacientes: idade, gênero, localização e tamanho da lesão primária, história pregressa, consumo de tabaco e álcool, exposição actínica, traumatismo por prótese, recidivas, metástases, diferenciação tumoral, tratamento, sobrevivência e óbitos. Cento e vinte e seis pacientes foram selecionados para o estudo da sobrevivência, 106 para o estudo imunohistoquímico, 45 para a investigação IHQ com amostras pareadas (AP) e 87 para a reação em cadeia da polimerase para detecção do HPV e análise multivariada. Os tumores tiveram predominância em pacientes masculinos na 6ª década

da de vida, havendo após esta faixa etária um aumento dos casos no gênero feminino e menor sobrevida. A língua foi a região mais acometida, e as lesões em lábio inferior demonstraram maior atraso na procura pelo tratamento e relatos de exposição actínica desprotegida. As recidivas ocorreram em 30% dos pacientes, 28,8% tiveram metástases e 13,2% foram a óbito. Os tumores bem diferenciados foram predominantes (47,7%), e a sobrevida livre da doença (SLD) e a sobrevida global (SG) em cinco anos foram 19% e 24,3%, respectivamente. A imunoposição de *p63* (87,8%) nos tumores foi maior que a de *p53* (52,8%), mas os tumores *p53* positivos estiveram significativamente associados aos casos de metástases. Os tumores *p53* negativos e com forte intensidade de imunoposição de *p63* demonstraram melhor SG. No estudo com AP, os tumores com elevada imunoposição de *p63* demonstraram melhor sobrevida e as neoplasias *p53* negativas tiveram melhor SLD. A maioria dos casos

demonstrou um padrão concordante de imunoposição nas AP (73,3% para *p53* e 53,3% para *p63*, respectivamente). O HPV foi encontrado em 18 (10,4%) amostras de CEO, correspondendo a 17 (19,5%) pacientes. Foram encontradas amostras positivas em 10 (11,5%) tumores primários e em 8 (9,2%) AP. Foram identificados os subtipos de HPV 16 e 18 em 4 (22,2%) e 3 (16,7%) das amostras positivas, respectivamente. Em 6 (33,3%) amostras foi encontrada a presença de ambos os subtipos e em 5 (27,8%) amostras não foi identificado. As amostras HPV positivas foram significativamente associadas aos pacientes não fumantes. Diferenças significativas relacionadas ao prognóstico do CEO na análise multivariada foram encontradas para idade, localização tumoral e *p53*. A imunoposição de *p53* e a baixa intensidade da imunoposição de *p63* demonstraram relação com pior prognóstico. Uma associação do HPV à carcinogênese oral foi observada nos pacientes não fumantes.

EXPRESSÃO DE METALOTIONEINAS E FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL NA ONCOGÊNESE EXPERIMENTAL DA MEDULA ESPINHAL EM RATOS

Júlio César Fernandes da Silva

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia

Tese de Doutorado apresentada em 25/06/2008

Introdução: Evidências clínicas e experimentais demonstraram que as metalotioneínas (MT) e o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) estão envolvidos na carcinogênese do cólon, fígado e outros órgãos.

Materias e métodos: A expressão de MT, uma proteína de baixo peso molecular com propriedades antioxidantes foi estudada em modelo de carcinogênese experimental do sistema nervoso através do uso de N-etil-N-nitrosourea (ENU) e correlacionada com a expressão de VEGF. Os animais foram eutanasiados com idade de 4 e 24 semanas ou tão logo surgissem sinais de comprometimento neurológico. Amostras de tecido de medula espinhal normal e de neoplasias intramedulares foram fixadas em formol e incluídas em parafina e analisadas e quantificadas para expressão de MT utilizando anticorpos anti-MT comercialmente disponíveis. A expressão de VEGF foi anali-

sada em amostras correspondentes e a marcação dos vasos quantificada.

Resultados: Todas as neoplasias mostraram imunopositividade para VEGF e MT. Os animais controles não tratados apresentaram baixo número de células MT positivas nas regiões analisadas. No grupo que recebeu ENU o número de células MT positivas foi significativamente maior do que nos não tratados. A marcação imuno-histoquímica para MT nos animais tratados foi observada na região subpial tanto no núcleo quanto no citoplasma de células de tecido nervoso aparentemente normal. Nos animais controle a marcação para MT foi fraca e restrita ao citoplasma. A administração de ENU resultou em aumento significativo no número de vasos marcados na região subpial da medula espinhal em relação aos controles.

Conclusões: Os resultados fornecem evidência que indicam aumento na produção de MT e VEGF associada ao modelo de gênese experimental de gliomas. O padrão de marcação encontrado pode estar relacionado com células-tronco mutantes envolvidas no processo de oncogênese da medula espinhal.

HETEROTOPIA ENCEFÁLICA PULMONAR EXPERIMENTAL

Paulo Roberto Veiga Quemelo

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cesar Peres

Tese de Doutorado apresentada em 30/06/2008

A heteropia encefálica no pulmão é um achado raro, geralmente associado a defeitos de fechamento do tubo

neural (DFTN), cujos mecanismos envolvidos ainda não estão totalmente esclarecidos. Desta maneira, o nosso primeiro objetivo foi tentar induzir a heteropia em modelo de DFTN produzido por ácido retinóico, que se mostrou ineficiente para este propósito, apesar de os fetos apresentarem inúmeros defeitos. Assim, para contornar as dificul-

dades encontradas nesse método, foi desenvolvido um modelo experimental cirúrgico. Foram utilizados 24 camundongos prenhes, divididas nos grupos E17 e E18, indicativos do dia gestacional (DG) em que foi realizada a coleta dos fetos. A cirurgia foi realizada no 15º DG, sendo retirado um feto por histerectomia, cujo tecido encefálico foi removido, picotado e implantado no pulmão dos irmãos. O exame histológico dos troncos fetais mostrou que a Implantação Encefálica Pulmonar (IEP) foi efetiva com reação imunohistoquímica (IHQ) positiva para GFAP em ambos os grupos (E17 e E18). Posteriormente, foi utilizado o mesmo modelo cirúrgico citado anteriormente, com algumas modificações para a coleta do material, que ocorreu durante o período pré-natal (18ºDG) e 8º dia pós-natal, chamados de grupos experimentais E18 e P8, respectivamente. Como controle, foi utilizado o encéfalo de fetos normais que foram coletados no mesmo período dos grupos experimentais, chamados de CE18 e CP8. Foi realizada a reação IHQ para NeuN, PCNA, Bcl2, Integrina β 1 e VEGF em todos os grupos. Os resultados indicam que o índice de marcação (IM) para NeuN

foi maior em P8 do que E18, da mesma forma que o tecido encefálico dos animais controle (CP8 < CE18), indicando que a maturação neuronal continuou. No entanto, ocorreu redução da proporção dos neurônios em ambos os grupos IEP, que pode ser explicada pelo IM maior para o anticorpo Bcl2 encontrado em ambos os grupos experimentais E18 e P8, quando comparado com os grupos controles CE18 e CP8. Apesar do IM para Bcl2 indicar apoptose de uma parte desse tecido, os fragmentos pareciam bem preservados, com presença de mitoses e tecido em proliferação com reação IHQ positiva para PCNA, mesmo após doze dias do procedimento. Os fragmentos implantados eram vascularizados e com reação IHQ positiva para VEGF. A reação IHQ também se mostrou positiva para Integrina β 1 no tecido heterotópico encefálico, o que indica ancoragem e interação desse tecido. Assim, o modelo experimental mostrou-se eficiente, com total interação com o tecido pulmonar e pleural. A partir desse modelo podem-se desenvolver outros estudos para compreender melhor os mecanismos de implantação e interação celular.

SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

PESO AO NASCER E PRESSÃO ARTERIAL EM ADULTOS JOVENS

Celeste Maria Bueno Mesquita

Orientadora: Profa. Dra. Heloísa Bettiol

Dissertação de Mestrado apresentada em 07/04/2008

Modelo do estudo: estudo de coorte, longitudinal, de base populacional em que se estudou o peso ao nascer (PN) e a sua associação com a pressão arterial (PA) em adultos jovens.

Objetivos: avaliar a prevalência de alteração de pressão arterial (APA) e a média de PA em adultos jovens, segundo o sexo; avaliar a associação entre PN e restrição do crescimento intra-uterino (RCIU) e a PA em adultos jovens, ajustada por características ao nascer e indicadores de adiposidade do adulto, segundo o sexo.

Métodos: Foram estudados 2063 jovens nascidos de parto único hospitalar em Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, excluindo-se nascidos vivos cujas mães não residiam no município. Foram utilizadas informações da coorte ao nascer (PN, RCIU, escolaridade, tabagismo durante a gestação e situação conjugal da mãe) e aos 23/25 anos (PA, índice de massa corporal-IMC, circunferência da cintura-

CC, cor, escolaridade, tabagismo e altura). A PA foi aferida três vezes, considerou-se a média das duas últimas aferições e o ponto de corte para definir APA foi ≥ 130 mmHg para PA sistólica (PAS) e/ou ≥ 85 mmHg para PA diastólica (PAD). Foram construídos quatro modelos com PAS e PAD como variáveis dependentes, com as seguintes variáveis explanatórias ao nascer e indicadoras de adiposidade no adulto: PN e IMC; RCIU e IMC; PN e CC; RCIU e CC, ajustadas para as demais variáveis independentes.

Resultados: A prevalência de APA foi de 41% para homens e 6,4% para mulheres. A PAS média foi 126,8mmHg e PAD média de 74,1mmHg para homens; a PAS média foi 109,6mmHg e a PAD média foi 68,0mmHg para mulheres. PN e RCIU não se associaram à pressão arterial na análise não ajustada. Ao ajustar por IMC e demais variáveis, 1 kg de aumento no PN reduziu a PAS em 2mmHg em homens e 3mmHg em mulheres; RCIU se associou com PAS 2,8mmHg mais alta em homens e 2,6mmHg em mulheres, comparados com os que não tinham RCIU; a PAD se associou negativamente com PN e positivamente com RCIU somente em mulheres. Ao ajustar por CC e demais variáveis, para 1 kg de

aumento no PN a PAS reduziu-se em 2mmHg para homens e mulheres; RCIU se associou positivamente com PA (aumento de 2,9mmHg em homens e 2,3mmHg em mulheres); PAD associou-se negativamente com PN (redução de 1mmHg) somente em mulheres e não se associou com RCIU em ambos os sexos.

Conclusões: Fatores relacionados ao crescimento

fetal tiveram efeito sobre a PA em adultos jovens após ajuste para indicadores de adiposidade no adulto (IMC e CC). Crianças de peso de nascimento mais baixo e as que apresentaram RCIU tiveram maiores níveis de PAS na vida adulta, reforçando a hipótese da origem fetal das doenças. A alta prevalência de APA em homens jovens é preocupante quanto ao perfil futuro de doença cardiovascular nessa população.

INFECÇÃO CONGÊNITA PELO CITOMEGALOVÍRUS: INCIDÊNCIA, ASPECTOS CLÍNICOS E FATORES MATERNS ASSOCIADOS EM POPULAÇÃO COM ELEVADA SOROPOSITIVIDADE

Rosângela Maria de Moura Brito

Orientadora: Profa. Dra. Marisa Márcia Mussi-Pinhata
Tese de Doutorado apresentada em 22/04/2008

O citomegalovírus (CMV) é a etiologia viral mais frequente de infecção congênita no mundo, sendo importante causa de deficiência mental e surdez neurossensorial. Não há estudos realizados na América Latina relativos à incidência dessa infecção congênita em amostra representativa da população e sobre fatores maternos associados à sua ocorrência e não há dados disponíveis acerca da apresentação clínica e seguimento em longo prazo dos recém-nascidos infectados para detecção de seqüelas tardias. Os objetivos desse estudo foram estimar a incidência da infecção congênita pelo CMV, tanto sintomática quanto assintomática, nos recém-nascidos atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e na Maternidade do Complexo Aeroporto de Ribeirão Preto (ambos os serviços prestadores de atendimento à população de baixa renda de Ribeirão Preto e região); descrever as características clínicas dos recém-nascidos infectados, bem como sua evolução durante o primeiro ano de vida e identificar fatores maternos associados à ocorrência da infecção congênita. Amostras de urina e/ou saliva de 4439 recém-nascidos, obtidas até duas semanas de vida, foram submetidas à detecção do DNA viral por meio da reação em cadeia de polimerase. A infecção congênita foi confirmada em amostras subseqüentes de urina processadas por reação em cadeia da polimerase e cultura viral em fibroblastos. Confirmou-se infecção congênita por CMV em 50 recém-nascidos (1,12%; IC95%:

0,83-1,48), sendo 3 sintomáticos (6%; IC95%: 1,3-16,5) e 47 assintomáticos (94%; IC95%: 86,3-99,5). Desses, 45 (90%) foram acompanhados e 5 (10%) não retornaram para acompanhamento. Durante o período de 12 a 36 meses de seguimento, foi diagnosticada surdez neurossensorial bilateral em uma das 47 crianças assintomáticas ao nascer e retardo de desenvolvimento neuropsicomotor e da fala em uma das 3 crianças que haviam sido classificadas como sintomáticas ao nascer. As demais crianças apresentaram desenvolvimento neuropsicomotor normal. Para a identificação dos fatores maternos associados à infecção, foram incluídas 49 mães de crianças infectadas e 98 mães de crianças não infectadas num modelo de estudo tipo caso-controle. Observou-se que idade materna ≤ 20 anos (OR: 4,8 IC95%: 1,22-18,92), prestação de cuidados a crianças < 3 anos de idade (OR: 2,24 IC95%: 1,02-4,89) e baixa escolaridade (OR: 3,70 IC95%: 1,28-10,72) foram associados à incidência da infecção congênita. Concluiu-se que a incidência de infecção congênita por CMV foi semelhante à de outros países com elevada soroprevalência. Evidenciou-se a necessidade de acompanhamento dos recém-nascidos infectados, ainda que assintomáticos, para a detecção de seqüelas tardias. Mães jovens, as com baixa escolaridade ou que prestem cuidados a crianças menores de 3 anos constituem grupos de risco para a transmissão vertical do CMV nessa população, devendo ser consideradas como um público alvo para medidas de prevenção. A relação custo benefício da triagem neonatal para o CMV deve ser avaliada, bem como a disponibilização de recursos para o seguimento dos recém-nascidos infectados visando o diagnóstico e tratamento precoces de possíveis seqüelas.

EVOLUÇÃO DOS RECÉM-NASCIDOS PRÉ-TERMO PORTADORES DE PERSISTÊNCIA DO CANAL ARTERIAL. EXPERIÊNCIA DO HCFMRP-USP EM PERÍODO DE DEZ ANOS

Paulo Henrique Manso

Orientador: Prof. Dr. Francisco Eulógio Martinez
Dissertação de Mestrado apresentada em 29/04/2008

O canal arterial (CA) é estrutura imprescindível para a vida fetal. Após o nascimento, entretanto, sua persistência é patológica. Vários fatores contribuem para que haja

aumento da incidência de canal arterial persistente em recém-nascidos prematuros (RNPTs). Até o momento, há duas maneiras principais para o fechamento do CA nos RNPTs: o tratamento através de medicamento, sendo a indometacina a droga mais usada, e o tratamento cirúrgico. Ambos métodos possuem vantagens e desvantagens, e a literatura corrente ainda não definiu método mais adequado. Os objetivos deste estudo foram descrever a evolução dos RNPTs portadores de CA atendidos no HCFMRP-USP num período de 10 anos, tentando identificar fatores preditivos para broncodisplasia, hemorragia intracraniana e óbito. Foram estudados 401 pacientes através de análise retrospectiva dos prontuários, de onde foram coletados dados referentes ao nascimento (peso, idade gestacional, época do diagnóstico de CA, tipo de tratamento, desfecho). Encontramos igual distribuição entre os sexos, com média de peso ao nascimento de 1160g, e 31,1 semanas de idade gestacional. O achado semiológico mais observado foi o sopro em precórdio, em 86% dos casos, seguido pela palpação de pulsos amplos, em 42%. A suspeita de CA foi feita em média no sexto dia de vida. Com relação ao tipo de tratamento

instituído, 270 pacientes receberam indometacina, 49 foram submetidos a tratamento cirúrgico, e 82 não receberam tratamento. Houve insucesso ao primeiro tratamento com indometacina em 68% dos casos. Um segundo ciclo de indometacina teve taxa de insucesso de 78%, e o terceiro ciclo da medicação, quando realizado, teve taxa de insucesso de 73%. Na análise de regressão logística multivariada, apenas o peso ao nascimento foi fator preditivo para insucesso ao tratamento com indometacina ($p=0,009$). A broncodisplasia pulmonar foi diagnosticada em 58% dos pacientes. Foram considerados fatores preditivos para aparecimento de broncodisplasia pulmonar o CRIB score ao nascimento ($p<0,001$), o peso ao nascimento ($p=0,001$), assim como o uso de surfactante ($p<0,001$) e o tratamento inicial com indometacina ($p=0,03$). Hemorragia intracraniana ocorreu em 37% dos casos. O único fator preditivo para este desfecho foi relação PCA/peso ($p=0,008$). Óbito intra-hospitalar ocorreu em 13,9% dos pacientes. O CRIB score ($p<0,001$) e a relação PCA/peso ($p=0,001$) foram fatores preditivos para este tipo de desfecho.

ESTUDO DE LESÃO EM DNA E DA EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À HIPÓXIA E À APOPTOSE RADIOINDUZIDA EM CULTURA DE CÉLULAS REH E U-343

Viviane Marques Bighetti

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Scrideli

Dissertação de Mestrado apresentada em 09/05/2008

A radioterapia (RT) é importante recurso adjuvante no tratamento dos tumores do sistema nervoso central (SNC) e apesar das novas tecnologias desenvolvidas nesta área como, radioterapia tridimensional e a radioterapia com feixe modulado - "IMRT", os gliomas mantêm um prognóstico reservado em parte devido à sua radiorresistência. Relacionam-se a radiorresistência tumoral os mecanismos de morte celular e de reparo ao dano causado no DNA e mecanismos de hipóxia. Estudos para uma melhor compreensão desses fatores são necessários para o desenvolvimento de novos recursos terapêuticos. Utilizamos radiação γ , (γ -Co⁶⁰) com dose única por fração de 2Gy e 6Gy em uma linhagem de glioma (U-343) radiorresistente e em li-

nhagem de LLA (REH) radiosensível. Analisamos o comportamento de morte celular radioinduzida nos tempos "T0h, T12h, T24h, T48h, T72h e T7dias" após irradiação e o dano ao DNA nestes mesmos tempos, com o "teste do cometa". A expressão gênica para as CASPASES 3, 8 e 9, FAS, BCL-2 e HIF-2a pela técnica de PCR quantitativa em tempo real (RQ-PCR). Nossos dados sugerem que a morte celular radio-induzida não é exclusivamente por apoptose e deste processo, o FAS mostrou um aumento progressivo apontando à via extrínseca como a principal via de ativação deste processo. O gene de hipóxia HIF-2a não apresentou alteração nos diferentes tempos de estudo para ambas as linhagens, entretanto, a expressão do HIF-2a foi significativamente maior na linhagem U-343. A elevada expressão do HIF-2a na U-343 pode relacionar-se com a radiorresistência da linhagem. Há a necessidade de mais estudos para outros genes relacionados à hipóxia para melhor esclarecimento deste mecanismo de radiorresistência.

AVALIAÇÃO DO CATABOLISMO PROTÉICO DE CRIANÇAS NO PÓS-OPERATÓRIO DE CIRURGIA CARDÍACA

Monica Akissue de Camargo Teixeira Cintra

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Carvalho Panzeri Carlotti

Dissertação de Mestrado apresentada em 19/05/2008

O estado nutricional influencia a recuperação de crianças com cardiopatias congênitas submetidas à cirurgia cardíaca. Entretanto, vários fatores podem contribuir para

a inadequação do suporte nutricional no pós-operatório, com potenciais conseqüências adversas, elevando a morbidade e mortalidade destes pacientes. É de extrema importância conhecer o comportamento metabólico destas crianças para melhor adequação da sua terapia nutricional e o balanço nitrogenado é um bom instrumento para esta monitorização. Os objetivos do presente estudo foram: 1) avaliar o catabolismo celular pelos balanços de nitrogênio, potássio, fósforo e magnésio, e pela excreção urinária de creatinina em recém-nascidos e lactentes jovens no período pós-operatório de cirurgia cardíaca e 2) avaliar a eficácia da terapia nutricional pela evolução destes parâmetros e das medidas antropométricas no decorrer do tempo. Participaram do estudo 14 crianças. A mediana da idade foi de 42,5 dias de vida e a mediana do peso foi de 3,4 kg. As crianças foram avaliadas no período pós-operatório por no mínimo 3 dias quando foram colhidas amostras de sangue de 12/ 12 horas para realização de sódio, potássio, cálcio iônico, cloro, fósforo inorgânico, magnésio, uréia, creatinina, e urina de 24 horas para a dosagem creatinina e balanço diário de nitrogênio, potássio, fósforo e magnésio. Onze crianças foram submetidas à circulação extracorpórea. Doze pacientes tiveram insuficiência renal aguda no período de estudo e 2 necessitaram de diálise peritoneal por 1 a 2 dias No primeiro dia pós-operatório, todos os pacientes apresentaram balanço negativo de proteína e fósforo. O anabolismo foi associado com maior aporte protéico e energético se comparado com o ca-

tabolismo (1,1 versus 0,1 g/kg/d e 53,3% versus 17,6 % GEE, respectivamente) ($p < 0,0001$). Nos dias de anabolismo, os balanços de potássio e fósforo também foram maiores se comparados com os dias de catabolismo. Houve uma correlação positiva significativa entre a ingestão protéica e o balanço de proteína ($p < 0,0001$), potássio ($p = 0,001$) e fósforo ($p < 0,0001$). Houve também uma correlação positiva significativa entre a ingestão calórica e o balanço de proteína ($p < 0,0001$), potássio ($p = 0,0002$), fósforo ($p < 0,0001$) e magnésio ($p = 0,0085$). A excreção urinária de creatinina correlacionou-se positivamente com a taxa de aparecimento da uréia ($r = 0,40$; $p < 0,0005$) e negativamente com o balanço de proteína ($r = -0,31$; $p = 0,0078$). Coincidentemente com o diagnóstico de infecção, 2 pacientes apresentaram balanço negativo de proteína e aumento concomitante da excreção de creatinina, mesmo na presença de insuficiência renal aguda. Em conclusão, a ingestão de $\geq 1,1$ g/kg/dia de proteína e de $\geq 53,3\%$ do GEE associou-se ao anabolismo em crianças no pós-operatório de cirurgia cardíaca para correção de cardiopatias congênitas. Os balanços de fósforo e potássio foram bons marcadores de quebra celular e a evolução dos valores da excreção de creatinina podem constituir “sinais de alerta” para o catabolismo protéico, mesmo na presença de alteração da função renal. A avaliação antropométrica não é um bom parâmetro para se avaliar o suporte nutricional no pós-operatório de cirurgia cardíaca pela presença de edema nesta população.

PREVALÊNCIA DE MUTAÇÕES NOS GENES PROP1 E POU1F1 EM PACIENTES COM HIPOPI- TUITARISMO ANTERIOR CONGÊNITO

Úrsula Christiane Moreira Santiago

Orientador: Prof.Dr. Sonir Roberto Rauber Antonini
Dissertação de Mestrado apresentada em 21/05/2008

A deficiência de hormônios hipofisários, denominada hipopituitarismo, pode ser isolada ou múltipla, congênita ou adquirida. O hipopituitarismo congênito geralmente é de origem genética, compromete a adenohipófise e afeta múltiplas linhagens hormonais. Mutações em genes codificados de fatores de transcrição hipofisária têm sido demonstradas em pacientes com hipopituitarismo congênito. Entre esses fatores de transcrição, o PROP1 atua na diferenciação das linhagens somatotrófica, tireotrófica, lactotrófica e gonadotrófica. O fator de transcrição POU1F1 (ortólogo humano do gene Pit1) está envolvido na diferenciação das linhagens somatotrófica, tireotrófica e lactotrófica. O conhecimento das bases moleculares da deficiência dos hormônios da adenohipófise resulta em implicações diretas na prática clínica. Pacientes com mutações no gene PROP1 podem apresentar hiperplasia hipofisária temporária sem indicação de correção cirúrgica. Quanto ao hipogonadismo,

torna-se passível de reconhecimento e tratamento precoces. Em pacientes com mutação no gene POU1F1, a triagem rotineira para deficiência de gonadotrofinas e de ACTH é desnecessária. Além disso, o aconselhamento genético das famílias afetadas é otimizado. No presente estudo, realizou-se uma análise descritiva da prevalência de mutações nos genes PROP1 e POU1F1 em pacientes com hipopituitarismo anterior congênito, acompanhados nos Ambulatórios de Endocrinologia do HC-FMRP-USP. O gene PROP1 foi analisado em 14 pacientes com deficiência congênita de GH que apresentavam fenótipo compatível. Entre esses pacientes, 6 também foram elegíveis para o estudo do gene POU1F1. A análise genética foi realizada em DNA genômico e consistiu de amplificação das regiões de interesse por PCR e sequenciamento automatizado. Dos 14 pacientes estudados, 13 apresentaram deficiência hipofisária múltipla. Além da deficiência de GH, as deficiências de ACTH (50%) e de TSH (43%) foram as mais prevalentes. A redução do volume da adenohipófise foi observada em 71 % dos pacientes. Ao diagnóstico, a idade cronológica média foi de 9,6 (1,7-17,1) anos. A média do escore de desvio padrão da estatura (EDP) foi de $-3,6 \pm 1,4$ (-6,7 a -0,6) e a média de atraso da idade

óssea de 3,3 anos. Após o início do tratamento com GHr, a média de VC foi de 8,9, 6,9 e 6,2 cm/ano, respectivamente, nos 3 primeiros anos de tratamento. Ao final desse estudo, 4 pacientes haviam finalizado o crescimento estatural, sendo que em 2 deles a estatura final encontrava-se dentro da normalidade (estatura superior a -2 DP). A análise do gene PROP1 revelou no éxon 1, a presença do polimorfismo c.27 C>T/p.A9A (rs1135320) em 12 entre 14 pacientes (85,7%) e em 39 controles de 50 (78%). No éxon 2 foi encontrado o polimorfismo c.152 G>C/p.G51A (rs 223378) em um paciente (7,1 %) e em nenhum dos 37 controles estudados. No

éxon 3 foi identificado o polimorfismo c.424 G>A/p.A142T (rs1800197) em 5 pacientes em 13 (46%) e em 20 controles de um total de 50 indivíduos (40%). A análise do gene POU1F1 evidenciou, no éxon 6, a presença da mutação C.811 G>C/p.R271W, em heterozigose, em um paciente que apresentou atraso neuropsicomotor e déficit pondero-estatural desde o primeiro semestre de vida. Essa mutação levou à deficiência de GH, PRL e a uma grave e precoce deficiência de TSH, pouco comum em pacientes com hipopituitarismo congênito. O genitor, um irmão e três irmãs não apresentaram alterações na análise do éxon 6 do respectivo gene.

SAÚDE MENTAL

EFEITOS DO ESCITALOPRAM SOBRE A IDENTIFICAÇÃO DE EXPRESSÕES FACIAIS

Wolme Cardoso Alves Neto

Orientadora: Prof. Dra. Cristina Marta Del-Ben
Dissertação de Mestrado apresentada em 16/05/2008

Os inibidores seletivos da recaptura de serotonina (ISRS) têm sido utilizados com sucesso para o tratamento de diversas patologias psiquiátricas. Sua eficácia clínica é atribuída a uma potencialização da neurotransmissão serotoninérgica, mas pouco ainda é conhecido sobre os mecanismos neuropsicológicos envolvidos nesse processo. Várias evidências sugerem que a serotonina estaria envolvida, entre outras funções, na regulação do comportamento social, nos processos de aprendizagem e memória e no processamento de emoções. O reconhecimento de expressões faciais de emoções básicas representa um valioso paradigma para o estudo do processamento de emoções, pois são estímulos condensados, uniformes e de grande relevância para o funcionamento social. O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da administração aguda e por via oral do escitalopram, um ISRS, no reconhecimento de expressões faciais de emoções básicas. Uma dose oral de 10 mg de escitalopram foi administrada a doze voluntários saudáveis do sexo masculino, em modelo duplo-cego, controlado por placebo, em delineamento cruzado, ordem randômica, 3 horas antes de

realizarem a tarefa de reconhecimento de expressões faciais, com seis emoções básicas – raiva, medo, tristeza, asco, alegria e surpresa – mais a expressão neutra. As faces foram digitalmente modificadas de forma a criar um gradiente de intensidade entre 10 e 100% de cada emoção, com incrementos sucessivos de 10%. Foram registrados os estados subjetivos de humor e ansiedade ao longo da tarefa e o desempenho foi avaliado pela medida de acurácia (número de acertos sobre o total de estímulos apresentados). De forma geral, o escitalopram interferiu no reconhecimento de todas as expressões faciais, à exceção de medo. Especificamente, facilitou a identificação das faces de tristeza e prejudicou o reconhecimento de alegria. Quando considerado o gênero das faces, esse efeito foi observado para as faces masculinas, enquanto que para as faces femininas o escitalopram não interferiu com o reconhecimento de tristeza e aumentou o de alegria. Além disso, aumentou o reconhecimento das faces de raiva e asco quando administrado na segunda sessão e prejudicou a identificação das faces de surpresa nas intensidades intermediárias de gradação. Também apresentou um efeito positivo global sobre o desempenho na tarefa quando administrado na segunda sessão. Os resultados sugerem uma modulação serotoninérgica sobre o reconhecimento de expressões faciais emocionais e sobre a evocação de material previamente aprendido.

EFEITO AGUDO DO DIAZEPAM NO PROCESSAMENTO DE EMOÇÕES EM VOLUNTÁRIOS SAUDÁVEIS: AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E POR NEUROIMAGEM

César Augusto Queiroz Ferreira

Orientadora: Prof. Dra. Cristina Marta Del-Ben

Dissertação de Mestrado apresentada em 21/05/2008

O reconhecimento de informações com valência emocional, oriundas do meio ambiente, é crucial para a adaptação e para o funcionamento social. Em particular, o reconhecimento de expressões faciais tem sido considerado fundamental para o processamento das emoções básicas. Estudos de neuroimagem e com pacientes com lesões cerebrais sugerem que o processamento de diferentes expressões faciais parece ser controlado por circuitos neurais parcialmente distintos. Outras evidências advêm de estudos que avaliam os efeitos de drogas psicoativas na percepção de expressões emocionais. Com relação às drogas ansiolíticas, existem evidências de que o diazepam prejudicaria o reconhecimento de expressões faciais e, em particular, de raiva e medo. No entanto, existem evidências de prejuízo global do reconhecimento das expressões emocionais com dose única de 15 mg de diazepam, o que pode ser atribuído aos efeitos sedativos provocadas por doses mais altas desse benzodiazepínico, ao invés de uma modulação específica do reconhecimento de expressões faciais. Além disso, os estudos desenvolvidos até o momento adotaram paradigmas complexos, que envolvem combinações de emoções em diferentes gradações, o que poderia interferir no desempenho dos voluntários na tarefa. Além disso, até o momento, apenas um estudo avaliou, por meio de ressonância magnética funcional, os efeitos de benzodiazepínicos sobre as ativações neuronais provocadas por expressões faciais evidenciando que o lorazepam atenuaria a ativação da amígdala. Portanto, o objetivo deste estudo foi verificar o efeito da

administração oral de uma dose única de 10 mg de diazepam na identificação de expressões faciais de emoções básicas (raiva, asco, medo, tristeza, surpresa e alegria), levando-se em consideração o desempenho (acurácia) em tarefa de reconhecimento explícito de expressões faciais e na modulação da resposta hemodinâmica da amígdala, para faces de medo e raiva, por meio da técnica Bold (*Blood Oxygen Level Dependent*) de ressonância magnética funcional, em estudo de delineamento cruzado (cross-over), duplo-cego, placebo controlado e ordem randômica. A amostra foi composta por 12 voluntários saudáveis, do sexo masculino, com idade variando entre 19 e 31 anos (média = 24,83 DP = 3,16). Os dados foram analisados por meio de ANOVA de medidas repetidas, com correções de Huynh-Feldt e o teste de Bonferroni foi utilizado para as análises *post hoc*. Independentemente da modulação farmacológica, emoções positivas (alegria) foram reconhecidas mais facilmente do que emoções negativas. Além disso, algumas expressões, como asco, tristeza e surpresa, foram reconhecidas mais facilmente em faces femininas do que em faces masculinas. Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos nas medidas subjetivas, mas houve uma diferença significativa na tarefa de reconhecimento de expressões faciais de emoções básicas. O diazepam, na dose de 10 mg, prejudicou seletivamente o reconhecimento de expressões de medo em relação ao placebo, não se encontrando prejuízo para o reconhecimento das demais expressões. Na ressonância magnética funcional, o diazepam promoveu uma atenuação da amígdala direita para as expressões faciais de medo, sem efeitos sobre as respostas hemodinâmicas a faces de raiva. Esses resultados sugerem um papel do sistema gabaérgico no processamento de emoções de medo.

SAÚDE NA COMUNIDADE

VIOLÊNCIA CONTRA A MULHER: A PERCEPÇÃO DOS MÉDICOS DAS UNIDADES BÁSICAS DE SAÚDE DA CIDADE DE RIBEIRÃO PRETO, SÃO PAULO

Fernanda Garbelini De Ferrante

Orientadora: Profa. Dra. Elisabeth Meloni Vieira

Dissertação de Mestrado apresentada em 13/06/2008

Este estudo desenvolveu-se como subprojeto de uma investigação denominada: “A interface entre a ocor-

rência e o atendimento de violência de gênero entre mulheres usuárias dos serviços públicos de saúde de Ribeirão Preto”. A violência contra a mulher é um fenômeno complexo e muito prevalente no Brasil, atingindo todas as classes, raças, etnias e culturas. Mulheres nesta situação frequentemente buscam os serviços de saúde para tratar sintomas

associados à violência. Entretanto, os profissionais de saúde apresentam uma série de dificuldades. Desenvolvemos este estudo, entendendo que a violência de gênero é reconhecida como um problema de saúde pública por afetar a integridade física e mental da mulher, e que existe necessidade de acolher essa mulher no serviço de saúde. O estudo teve por objetivo de verificar a percepção dos médicos atuantes nas Unidades Básicas e Distritais de Saúde sobre a violência praticada contra mulheres por parceiros íntimos. Realizamos uma pesquisa de cunho qualitativo com 14 médicos ginecologistas e clínicos gerais, utilizando como instrumento entrevistas semi-estruturadas. Realizamos análise de conteúdo temática utilizando como referencial teórico as teorias de gênero. A análise dos resultados permitiu-nos definir os seguintes temas: 1. Percepções dos médicos sobre as relações de gênero; 2. Percepção dos médicos sobre a violência; 3. Papel dos médicos diante da violência doméstica contra a mulher; 4. Conhecimentos e informações sobre a violência doméstica contra a mulher; que foram divididos em várias subcategorias. De acordo com os médicos, a mulher atual conquistou sua liberdade e inde-

pendência sexual, no entanto, a hegemonia masculina ainda é muito presente. Compreendem que a violência de gênero ocorre devido às desigualdades que pautam o sistema social que acabam por justificar os eventos violentos como atitudes educativas e punitivas, aceitas pela posição social ocupada pela mulher. Constatamos que alguns desses profissionais detêm conhecimentos sobre os tipos de violência de gênero, são capazes de identificar e muitas vezes acolher essas mulheres e também conhecem os procedimentos para o atendimento e o encaminhamento. Entretanto, muitas vezes não dão andamento aos casos, ignorando-os, ou porque não acreditam que este fenômeno seja de sua responsabilidade, ou ainda devido a uma série de barreiras pessoais e institucionais que impedem uma adequada atuação. Além disso, verificamos a existência de uma invisibilidade institucional que prejudica a qualidade do serviço prestado. Por fim, destacamos a importância do desenvolvimento de treinamento voltada para o profissional da área da saúde, com o objetivo de prepará-lo para melhor assistir à mulher em situação de violência, condição muito presente em seu cotidiano.

O SERVIÇO SOCIAL E A ESTRATÉGIA SAÚDE DA FAMÍLIA: POTENCIALIDADES DE UMA APROXIMAÇÃO

Bibiana Cristina Granata Benatti

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Maria do Carmo Gullaci Guimarães Caccia-Bava

Dissertação de Mestrado apresentada em 25/06/2008

Com a promulgação da Constituição Federal, em 1988, amplia-se universalmente o direito à saúde e, regulamentado pela Lei nº 8080/90, o Sistema Único de Saúde (SUS), passa a ter a responsabilidade de atender os cidadãos de acordo com suas necessidades, independentemente de contribuição com a Previdência Social ou de pagamento direto pelo atendimento. A instituição dessa nova concepção de saúde trouxe também um novo caráter às práticas assistenciais. A saúde como direito social envolve não apenas a assistência, reabilitação e prevenção de doenças, mas a promoção da saúde, a participação e o controle social. A superação do paradigma biomédico vem requerendo cada vez mais a incorporação de outros saberes e práticas, como a do Serviço Social, interagindo na construção social da saúde e no enfrentamento de seus determinantes sociais. Entretanto, visões mais conservadoras ainda coexistem em ambas as áreas, restringindo as expectativas para o setor Saúde e para o Serviço Social a uma atuação assistencialista. A Assistência Social e a Atenção Básica à Saúde, principalmente por meio da Estratégia Saúde da Família, têm em comum a busca por um maior protagonismo social, o estímulo à emergência de novos atores, que construam solidaria-

mente comunidades pró-ativas e críticas e, potencialmente, mais saudáveis. O presente trabalho buscou comparar os tipos de intervenções apresentadas ao Serviço Social pelos usuários dos vários modelos de prestação da Atenção Básica em Saúde no Distrito de Saúde Oeste de Ribeirão Preto. Utilizando-se das abordagens quanti-qualitativas, inicialmente procedeu ao levantamento das 142 pessoas atendidas pelo assistente social da Unidade de Saúde entre janeiro e março de 2007 para identificação dos atendidos. A maioria desses pacientes era do sexo feminino (73%) e de áreas sem a cobertura da Estratégia Saúde da Família (75%). Após realizou-se entrevistas semi-estruturadas no domicílio de 31 famílias definidas por critérios prévios, sendo 17 delas vinculadas à SF. A categoria empírica construída a partir das entrevistas refere-se ao Serviço Social como agenciador de benefícios assistenciais, indo ao encontro do que aponta Faleiros (2001), quanto à sua origem já como profissional “solucionador de problemas”, ligados à ótica da instituição em que atuam. Demandas pautadas na ação profissional em sintonia com a lógica da Promoção da Saúde, a partir da criação de novas estratégias para superar carências e chegar às “causas das causas”, na perspectiva do fortalecimento da comunidade não foram apresentadas, independentemente do modelo de prestação da assistência, apontando que a viabilização de projetos de emancipação dizem respeito toda uma sociedade e não a apenas uma categoria profissional.