

**RESUMOS DE DISSERTAÇÕES DE MESTRADO E TESES DE DOUTORADO
APRESENTADAS NA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - USP
DE JANEIRO A MARÇO DE 2006**

BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**ESTUDO DE RNAs REGULATÓRIOS EM *LEISHMANIA* POR GENÉTICA
REVERSA**

Karina da Costa Nogueira

Orientadora: Profa.Dra. Angela Kaysel Cruz

Dissertação de Mestrado apresentada em 26/01/2006

O seqüenciamento do genoma de *Leishmania* levou à identificação de genes tendo como base a predição de proteínas que esses genes codificam. Entretanto, seqüências que não possuem uma fase aberta de leitura mas que codificam RNAs como produto final foram ignoradas durante o processo de anotação. Há um grande número de ncRNAs descrito em vários organismos, são transcritos que não codificam proteínas, mas que funcionam como RNAs, representando uma classe de moléculas com função estrutural ou catalítica. Nós investigamos três potenciais moléculas de ncRNAs de *Leishmania*, *ODD1*, *ODD2* e *ODD3*; seus transcritos têm estrutura secundária que formam grampos conservados similares aos descritos para os microRNAs. Partindo de fragmentos isolados de cosmídeos recombinantes, nós construímos clones ade-

quados à expressão de cada um dos genes *ODD* isoladamente em *Leishmania*, os vetores plasmidiais empregados foram px63NEO ou pGEMT_neoKO. Os recombinantes foram analisados e transfectados em *Leishmania* para se obter transfectantes que superexpressassem os genes *ODD* a partir da molécula circular; os transfectantes foram cultivados sob pressão por droga de seleção (G418) para manter as cópias do episomo e a expressão de seus genes. Esses novos transfectantes foram investigados quanto a mudanças fenotípicas e modificações dos níveis de potenciais mRNAs alvo (identificados por RT-PCR por Márcia Graminha). Mudanças no fenótipo não foram observadas para os genes *ODD1* e *ODD2*. Por outro lado, o superexpressor de *ODD3* apresenta-se sobre efeito citostático claro em cultura axênica, sua morfologia mostra-se alterada sob microscopia de varredura e há modificações drásticas de sua ploidia. Nossos resultados preliminares indicam haver modificação do nível de um dos mRNAs identificados como alvo de *ODD3*.

**CARACTERÍSTICAS DE VIRULÊNCIA, MORFOLÓGICAS E GENOTÍPICAS DE
AMOSTRAS CLÍNICAS DE *HISTOPLASMA CAPSULATUM***

Rodrigo Anselmo Cazzaniga

Orientador: Profa.Dra. Claudia Maria Leite Maffei

Dissertação de Mestrado apresentada em 03/02/2006

Histoplasma capsulatum var. *capsulatum* é um fungo que apresenta dimorfismo térmico, tem forma sexuada perfeita definida (*Ajellomyces capsulatus*), e que ao ser inalado pelo homem ocasiona uma doença respiratória que pode ter regressão espontânea ou

evoluir para um acometimento sistêmico. Indivíduos imunodeprimidos são mais susceptíveis a este patógeno, que é encontrado naturalmente em substratos ricos em nitrogênio e fósforo (como as fezes de morcegos), em diferentes regiões geográficas, principalmente no sul e meio oeste dos EUA, na América Central e na América do Sul.

No Brasil, onde certamente há inúmeros reservatórios naturais do fungo, este vem adquirindo relevante importância em saúde pública. Motivados pela

alta frequência de Histoplasmose disseminada observada nos últimos 5 anos no HC-FMRP/USP, principalmente em pacientes com AIDS, buscamos neste trabalho estudar aspectos da biologia celular, molecular e poder patogênico de 20 amostras clínicas de *H. capsulatum* var. *capsulatum* mantidas em micoteca.

Como o período de estocagem pode alterar as características morfológicas, antigênicas e de virulência desse fungo, a maioria das amostras foram reativadas por passagem em animal, mas a análise das características macro e micromorfológicas sugere que não ocorreu uma boa recuperação da capacidade reprodutiva dessas amostras uma vez que 85% delas apresentaram textura com preponderância de elementos vegetativos (cotonosa, aveludada e membranosa) e 45% apresentaram pouca produção de micro ou macroconídios, mesmo crescendo em ágar-batata que estimula a conidiogênese pela carência de nutrientes. Os conídios, responsáveis pela infectividade das amostras quando inalados por mamíferos, são estruturas de resistência que possuem melanina em sua parede, componente importante também para a virulência do fungo na fase leveduriforme, uma vez que permite às leveduras melanizadas escape da ação de reativos ativos do oxigênio liberados por macrófagos parasitados. Observamos que frente à compostos fenólicos (L-DOPA), as leveduras de *H. capsulatum* foram capazes de sintetizar melanina, embora em pequena quantidade, detectada pela pouca alteração da cor das colônias e pela distribuição irregular de grânulos eletrodensos desse pigmento na superfície da parede celular de leveduras, documentada por microscopia de transmissão eletrônica.

A virulência das amostras também foi avaliada em camundongos BALB/c inoculados endovenosamente com 5×10^6 leveduras através de curvas de sobrevivência e análise histopatológica. Pela mortalidade, as vinte amostras foram divididas em três grupos de virulência: Grupo 1 composto por 11 isolados que ocasionaram a morte de 50% dos animais entre 5 e 10 dias pós-infecção e 100% de morte aos 20 dias, Grupo 2 composto por 5 amostras que levaram à mor-

te 50% dos animais entre 20 e 30 dias pós-infecção, e Grupo 3 com 4 amostras que causaram a morte de 50% dos animais apenas em períodos superiores a 40 dias pós-infecção. O padrão de resposta tecidual não foi alterado pela virulência da amostra, mas observamos uma disseminação mais rápida e mais intensa com as amostras mais virulentas.

Por fim, a variabilidade genética dessas amostras foi avaliada por cariotipagem e seqüenciamento das regiões ITS do gene 5.8S rDNA. A separação eletroforética dos cromossomos de 18 amostras, feita por PFGE revelou amostras com 3 e 5 cromossomos, cujos tamanhos variaram de 2,43 Mpb a 8,27 Mpb. O mapeamento das bandas cromossômicas permitiu a construção de um dendograma de similaridade que mostrou a existência de 16 diferentes cariótipos (A a P), com identidade total de 2 amostras nos grupos A (amostras 1391/2002 e 1436/2004) e H (amostras 856/2002 e 1986/2005). Após amplificação, os resultados do seqüenciamento e alinhamento das regiões ITS1 e ITS2 indicaram que a seqüência de nucleotídeos das 20 amostras em estudo não são idênticas, com variações pontuais em 7 posições da região ITS1 e em 14 posições da região ITS2, do total de 504 pb seqüenciados. Essas variações permitiram classificar as amostras em 7 tipos moleculares distintos, alguns apresentando subdivisões internas. O tipo molecular mais frequente foi o III, apresentado por 45% das amostras. Considerando que as variações de nucleotídeos observadas possivelmente são decorrentes de pressões seletivas, construímos uma árvore filogenética pelo método de máxima verisimilhança, que mostrou grande correlação evolutiva entre os 20 isolados, com pequenas divergências individuais.

Concluimos que embora não tenhamos observado relação direta entre os diferentes parâmetros observados (características morfológicas, genotípicas e de virulência), as amostras de *H. capsulatum* isoladas de pacientes da região de Ribeirão Preto apresentaram diferentes comportamentos fenotípicos e genotípicos que podem suscitar diferenças na relação parasito-hospedeiro.

ESTUDO SOBRE A INTERAÇÃO DO VÍRUS COXSACKIE B5 COM CÉLULAS INTESTINAIS

Francisco Fábio Marques da Silva

Orientador: Prof.Dr. Eurico de Arruda Neto

Tese de Doutorado apresentada em: 08/02/2006

Os enterovírus são adquiridos por via per-oral, replicam-se no intestino e disseminam-se sistemicamente, causando infecções em múltiplos órgãos e tecidos.

dos causando diversas manifestações clínicas. Os eventos iniciais da replicação viral na porta de entrada podem ser importantes para a patogênese e eventos tardios da infecção pelos enterovírus. O vírus Coxsackie B5 é um patógeno humano que pertence a família *Picornaviridae*, gênero enterovírus, sendo vírus de RNA. O mecanismo pelo qual estes vírus penetram no interior das células é pouco conhecido. Analisamos os eventos iniciais da infecção pelos vírus Coxsackie B5 (CoxB5). Para isto, observamos os efeitos de drogas que inibem a formação de vesículas revestidas por clatrina e cavéola. CoxB5 não consegue penetrar nas células CaCo-2 na presença de clorpromazina (com-

posto que inibe a endocitose mediada por clatrina) mas o faz na presença de PMA/Nistatina (compostos que inibem a endocitose mediada por cavéola). Também observamos que o CoxB5 produz alterações no citoesqueleto nos períodos tardios da infecção, havendo um desarranjo dos filamentos intermediários e de actina. Entretanto, há uma clara reorganização dos microtúbulos consequente da replicação do CoxB5 em células CaCo-2, que foi predominante na região cortical das células. Também observamos que não existe colocalização do CoxB5 e o citoesqueleto mas que existe uma intensa colocalização com motores moleculares baseados em microtúbulos (dineína e cinesina).

CRIAÇÃO DE UMA ENDO-XILANASE TERMOESTÁVEL ATRAVÉS DA EVOLUÇÃO MOLECULAR *IN VITRO*

Roberto Ruller

Orientador: Prof. Dr. Richard J. Ward

Tese de Doutorado apresentada em 13/03/2006

Xilanases (1,4- β -D xilano-hidrolases EC 3.2.1.8) são endo-xilanases que hidrolisam aleatoriamente ligações β -1,4 glicosídicas de xilose da estrutura da xilana (polissacarídeo da hemicelulose da parede celular vegetal) liberando xilooligossacarídeos. Xilanases podem ser usadas alternativamente no lugar de organoclorado durante o branqueamento da polpa de papel no processo Kraft. Para o uso industrial desta enzima é importante que a mesma seja termoestável, e neste sentido a pesquisa tem focado grande esforço para um aumento da atividade catalítica desta enzima em temperaturas elevadas. Com o intuito de entender as bases moleculares da termoestabilidade das xilanases, nós escolhemos uma endo-xilanase do grupo G/11 de *Bacillus subtilis* linhagem 168 como modelo para um estudo estrutural engenharia de proteínas combinando técnicas de evolução dirigida com análise termodinâmica baseado em técnicas espectroscópicas.

O gene para xilanase do grupo G/11 de *Bacillus subtilis* que codifica um polipeptídeo de 185 resíduos de aminoácidos, foi amplificado por PCR do DNA genômico total de *B. subtilis* usando dois oligonucleotídeos complementares a região não codante 5' e 3' do locus *xylA* da sequência genômica do microorganismo. Após a clonagem no vetor pT7BsXA, a proteína heteróloga foi purificada por cromatografia de troca catiônica após precipitação com etanol e diálise do

sobrenadante da cultura de células de *E. coli* transformadas com o vetor. Géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) corado com prata, espectrometria de massa, raio hidrodinâmico da molécula, juntamente o seqüenciamento N-terminal da proteína (nativa e recombinante), confirmaram a pureza, homogeneidade e o correto processamento pós-traducional da proteína secretada. A proteína recombinante caracterizada teve um pH ótimo em 6,0 e temperatura ótima em 55°C.

O processo de cristalização da molécula foi feito usando técnica de difusão a vapor sendo obtidos monocristais quando a proteína foi equilibrada contra solução-mãe de 1M de tartarato de sódio potássio pH 7.8. Os cristais obtidos foram congelados em 20% de glicerol e os dados de difração de raio-X foram coletados no LNLS (Laboratório Nacional de Luz Sincrotron, Campinas –SP) com um máximo de resolução de 1.8Å.

A região codificadora do gene da xilanase nativa foi submetido a reações de mutagênese aleatório usando “error-prone PCR” (epPCR) e a biblioteca aleatória resultante foi selecionada por marcação com vermelho Congo em placas de ágar contendo 1% de xilano após incubação a 65°C. Das 90 colônias selecionadas, 16 expressaram mutantes termoestáveis de xilanase e a análise da seqüência de aminoácidos destes mutantes mostraram que todos estes eram combinações de 6 mutações pontuais (Q7H, G13R, S22P, S31Y e S179C) que foi denominada de geração 1 (G1). Os genes dos 6 mutantes de G1 foram submetidos a um segundo ciclo de epPCR e após a varredura de

aproximadamente 9.000 clones a 75°C, 7 novos mutantes termoestáveis foram isolados (geração 2 ou G2) (Q7H/S179C, Q7H/S22P, G13R/S179C, Q7H/V150A, N61K/S179C, S22P/H156L/S179C e Q7H/G13R/I107L). Posteriormente, ambas as gerações (G1 e G2) foram submetidas a reação de embaralhamento de DNA e novos mutantes foram identificados e selecionados por termo-seleção (thermo-screening) em placas de 96 poços a 85°C, posteriormente denominada de geração 3 ou G3 (Q7H/H156L/S179C, T3A/Q7H/G13R/S179C, Q7HN61K/P137L/S179C, Q7H/S22P/T126M/H156L/S179C, Q7H/G13R/S22P and Q7H/G13R/S22P/S179C). Os melhores mutantes das 3 gerações foram expressados em *E.coli*, purificados e caracterizados monitorados por mudanças na estru-

tura secundária por desnaturação térmica. O mapeamento das substituições de aminoácidos das principais mutações obtidas na estrutura cristalina da xilana nativa de *Bacillus subtilis* revelaram que muitos dos mutantes estão localizados de dois agrupamento (um principal denominado de domínio dedos e outro na α -hélice única da molécula. Após análise bioquímica e biofísica dos principais mutantes, o mutante quádruplo (Q7H/G13R/S22P/S179C) foi escolhido como o melhor mutante ($T_{\text{ótima}}$ em 75°C e termotolerância por mais de 5 minutos a 90°C). Estes resultados sugerem que embora haja múltiplos fatores físico-químicos estejam envolvidos na determinação da termoestabilidade proteica, o contexto estrutural através da qual estas forças agem também são altamente importantes.

BIOQUÍMICA

RNA REGULADORES DE LINFÓCITOS DE CAMUNDONGOS INOCULADOS COM CÉLULAS B16-F10 DE MELANOMA MURINO

Joana Maria Murad

Orientador: Prof.Dr. Fernando Luiz De Lucca

Tese de Doutorado apresentada em 21/02/2006

Os recentes estudos sobre o genoma humano revelaram dados surpreendentes, entre os quais podemos destacar a identificação de um número de genes codificadores de proteínas bem menor do que o esperado por geneticistas e biólogos moleculares. Verificou-se ainda que apenas 1,4% do genoma humano estava envolvido na produção de transcritos codificadores de proteínas. Esses resultados tem despertado um grande interesse sobre os transcritos não codificadores de proteínas (noncodings RNAs ou ncRNAs), os quais representam 98% dos transcritos produzidos pela célula humana e admite-se que poderão desempenhar um papel relevante nos estudos do genoma funcional. Deste modo nosso projeto vem suprir uma grande lacuna existente no estudo dos ncRNA, ou seja, na RNômica.

Tem sido revelado também que os ncRNAs regulam importantes funções celulares e, por esse

motivo, são denominados de RNAs reguladores. O nosso Laboratório tem investigado a indução da síntese de RNAs reguladores em linfócitos ativado durante o processo de imunização com células tumorais e com peptídeos sintéticos do HIV-1. Demonstramos que os RNAs reguladores obtidos desses linfócitos ativado possuem atividade imunomoduladora, indicando um possível potencial terapêutico destes riboreguladores em câncer e AIDS. A elucidação do mecanismo de ação e a caracterização dos RNAs reguladores responsáveis pela indução de atividade anti-tumoral e anti-HIV constituem etapas fundamentais para se avaliar o verdadeiro potencial terapêutico desses riboreguladores. Os nossos dados preliminares revelaram que os efeitos imunomoduladores dos RNAs reguladores são mediados pela proteína quinase dependente de RNA (PKR) através da ativação do fator de transcrição NF- κ B.

No presente trabalho, utilizaremos o melanoma B16 murino como um modelo de neoplasia experimental para se estudar o efeito do desenvolvimento tumoral na síntese de RNAs reguladores nos linfócitos dos animais portadores de tumor.

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CARBOXIPEPTIDASES PRESENTES NO PERFUSATO DO LEITO ARTERIAL MESENTÉRICO DE RATO

Laura Letícia de Souza

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Brandt de Oliveira

Tese de Doutorado apresentada em 07/03/2006

O leito arterial mesentérico isolado de rato (LAMR) é capaz de liberar endo e exopeptidases que se acumulam na solução de perfusão. Entre estas enzimas a elastase-2 foi descrita como a principal enzima formadora de Ang II no perfusato do LAMR. Além desta endopeptidase, atividades de carboxipeptidases (CPs) foram detectadas neste perfusato, utilizando-se substratos sintéticos e vasoceptídeos, como Ang I e BK. Assim, o objetivo do nosso trabalho foi fazer a caracterização estrutural e bioquímica destas proteínas. Inicialmente, nós isolamos as CPs de outras proteínas presentes no perfusato do LAMR através de cromatografias de afinidade para investigar a participação destas enzimas no processamento local de vasoceptídeos. Observamos que estas enzimas são metaloproteases, pois suas atividades foram completamente inibidas pelo EDTA e o-fenantrolina. Através de microssequenciamento e espectrometria de massa, fizemos a caracterização estrutural das CPs do LAMR e detectamos a presença de três tipos de CPs neste perfusato. Esta análise estrutural mostrou identidade de seqüência destas CPs com as CPA1, CPA2 e CPB pancreáticas de rato e esta identidade estrutural foi confirmada após a realização da clonagem e do sequenciamento dos cDNAs para estas CPs, que mostraram identidade de 99% entre elas. O espectro de massa dos fragmentos tripticos das amostras de CPs tipo A e B gerados por MALDI-TOF permitiu mostrar, por homologia com fragmentos in silico obtidos de banco de dados de proteínas, a existência de formas precursoras de CPA2 e CPB, indicando que as proCPs e as respectivas formas maduras coexistem

neste perfusato. Foi realizada a expressão das CPs recombinantes em sistemas de fusão com GST e Histag, em bactérias, que não puderam ser obtidas com atividade enzimática, mas que foram utilizadas na geração de anticorpos contra a CPA1 e a CPA2 que serviram para a identificação imunológica das CPAs correspondentes. Os testes de especificidade proteolítica frente às angiotensinas, com atividades equivalentes de CPA1 e CPA2 estabelecidas através da hidrólise do substrato sintético ZVF, mostraram que a CPA1 foi mais eficiente na clivagem seqüencial da Ang I, levando à formação de Ang 1-9, Ang II e Ang 1-7. A eficiência catalítica da CPA1 para a conversão de Ang II em Ang 1-7 é cerca de 200 vezes maior do que a determinada para a reação catalisada pela CPA2. Considerando-se este fato e as quantidades relativas destas CPs no perfusato do LAMR, pode-se sugerir que a CPA1 tenha uma participação mais expressiva no metabolismo da Ang neste leito arterial. Avaliamos a expressão do RNAm para as CPs por RT-PCR em diferentes tecidos, inclusive nas artérias aorta e carótida e encontramos uma ampla distribuição tecidual, sugerindo funções regulatórias para estas CPs que são tradicionalmente reconhecidas por suas funções digestivas no suco pancreático. Reunindo as informações obtidas neste trabalho, concluímos que o perfusato do LAMR contém CPs tipos A e B idênticas às CPs pancreáticas, cujas ações sobre os vasoceptídeos Ang I e BK formaram peptídeos ativos como Ang 1-9, Ang II e Ang 1-7, e BK1-8, constituintes dos sistemas renina-angiotensina e caliceína-cininas, respectivamente, envolvidos em diversos eventos fisiológicos e patofisiológicos. A abundância das CPAs e CPB no perfusato do LAMR, aliada às respectivas especificidades proteolíticas, são sugestivas da participação destas proteases em processos regulatórios do sistema cardiovascular.

FATOR DE INÍCIO DE TRADUÇÃO EUCARIÓTICO 5A (eIF5A): PARTICIPAÇÃO NA EMBRIOGÊNESE DE CAMUNDONGOS E ANÁLISE DE SUA LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR

Lucas Tabajara Parreiras e Silva

Orientador: Prof. Dr. Claudio Miguel da Costa Neto

Dissertação de Mestrado apresentada em 21/03/2006

O fator de início de tradução de eucariotos 5A (eIF5A) é uma proteína de 18kDa ubiqüamente encontrada em arquea e eucariotos, que parece estar en-

volvida em diferentes eventos bioquímicos e celulares, tais como proliferação celular, síntese protéica, transporte núcleo-citoplasmático de mRNAs, entre outros. Apesar de recentes estudos terem ajudado a elucidar as funções de eIF5A na síntese de proteínas, crescimento e diferenciação celular, o seu possível papel durante o desenvolvimento embrionário ainda não é relatado na literatura. Paralelamente, por meio de análises de alinhamento de seqüências, nosso grupo identificou uma extremidade N-terminal mais estendida nas proteínas eIF5A de eucariotos, o que poderia ser um sinal para localização subcelular em células eucarióticas, uma vez que tal extensão não é observada nas proteínas de arquea e, em tais organismos, não existem membranas.

Com base no exposto acima, decidimos analisar a participação de eIF5A durante a embriogênese de murinos, bem como a possível contribuição da extensão N-terminal das proteínas de eucariotos para a localização subcelular desta proteína.

Nossos resultados mostraram que a proteína eIF5A e seu mRNA estavam presentes durante to-

das as fases da embriogênese de camundongos pós-implantação uterina, com maior expressão nos dias E10,5; E11,5; E12,5 e E13,5. Esta proteína também se mostrou aparentemente presente em todas as células e tecidos embrionários do estágio E13,5; com marcações acentuadas nas seguintes regiões: ectoderme, órgãos das regiões abdominal e torácica (fígado e coração), estomodeu, Sistema Nervoso Central e olho, observadas em experimentos de imunohistoquímica. Estas regiões passam por momentos críticos, tais como desenvolvimento e diferenciação, neste estágio embrionário (E13,5), corroborando com a hipótese de envolvimento de eIF5A em proliferação celular, e também sugerindo uma possível participação específica durante a diferenciação de alguns tecidos e órgãos.

Com relação ao outro objetivo, nossos resultados experimentais e análises de bioinformática, deram suporte à hipótese de que a extensão N-terminal presente em eIF5A de eucariotos contribui para a localização preferencial desta proteína na região perinuclear/nuclear.

CLÍNICA CIRÚRGICA

ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO NERVO ÓPTICO DE RATOS WISTAR APÓS RECUPERAÇÃO DA ANEMIA FERROPRIVA

Aline Santos de Maman

Orientador: Prof. Dr. João José Lachat

Dissertação de Mestrado apresentada em 01/02/2006

A deficiência em ferro tem sido considerada um dos problemas nutricionais de maior prevalência no mundo, atingindo em torno de 2,5 a 5,0 bilhões de pessoas. O ferro é um elemento indispensável para o processo normal de mielinização, portanto, a via de transmissão do sistema sensorial visual pode ser afetada precocemente em casos de deficiência de ferro. O objetivo deste trabalho foi avaliar os resultados da reposição do ferro durante o período pós-lactação até 32 dias de idade, em ratos que foram submetidos a uma dieta deficiente em ferro durante todo o período de lactação.

Os animais foram divididos em três grupos: Controle, Anêmico e Recuperado. No grupo controle as ratas mães receberam uma dieta com 35mg de ferro/Kg durante todo o período de amamentação e seus filhotes receberam a mesma dieta após o desmame. As ratas mães dos grupos anêmico e recuperado receberam uma dieta com 4mg de ferro/Kg durante a amamentação, mas após o desmame (21 dias), os filhotes receberam uma ração deficiente de ferro (4mg de ferro/Kg) no grupo anêmico, e rica em ferro (35mg de ferro/Kg) no grupo recuperado, até o 32º dia pós-natal, quando o sangue foi colhido para avaliação dos seguintes parâmetros: concentração de hemoglobina e porcentagem de hematócrito. Ainda nesse dia, os animais de cada grupo foram profundamente anestesiados e perfundidos por via intracardíaca com uma

solução de salina tamponada (PBS) 0,05M em pH 7.3, seguido por uma mistura fixadora de paraformaldeído a 2% e glutaraldeído a 1% diluídos em tampão fosfato 0,1M em pH 7.3. Posteriormente, os nervos ópticos foram dissecados e imersos em tetróxido de ósmio a 1% durante duas horas a 4°C, desidratados em concentrações crescentes de acetona e incluídos em araldite. Secções transversas foram obtidas, montadas em lâminas histológicas, coradas com azul de toluidina a 1%, analisadas ao microscópio de luz e fotografadas para documentação. O estudo morfométrico foi realizado utilizando um microscópio com uma objetiva de 100X (imersão) e uma ocular equipada com um retículo quadriculado com área total de 10.000 μm^2 . As densidades de vasos sanguíneos, oligodendrócitos, astrócitos e fibras nervosas mielínicas lesadas foram avaliadas e submetidas a testes estatísticos.

O nível sérico de ferro nos ratos anêmicos foi menor que nos grupos controle e recuperado. Na análise morfológica o grupo recuperado apresentou-se similar ao grupo anêmico, com espaço intersticial aumentado e maior quantidade de fibras nervosas mielínicas lesadas. A análise morfométrica mostrou redução das densidades de vasos sanguíneos e oligodendrócitos nos nervos ópticos do grupo anêmico e, após a reposição de ferro, a recuperação completa desses parâmetros não foi atingida. Já a quantidade de astrócitos aumentou no grupo anêmico e manteve esta progressão durante a reposição de ferro. O número de fibras mielínicas lesadas no grupo recuperado reduziu em relação ao grupo anêmico, mas a reposição de ferro no período analisado não foi suficiente para torná-lo similar ao grupo controle.

COMPARAÇÃO ENTRE DOIS MÉTODOS DE AVALIAÇÃO URODINÂMICA EM RATAS

Ana Beatriz Gomes de Souza

Orientador: Prof. Dr. Haylton Jorge Suaid

Dissertação de Mestrado apresentada em 23/02/2006

Introdução: O estudo urodinâmico em ratas pode ser realizado através de sondagem vesical por via uretral ou por cistostomia. O objetivo deste estudo foi comparar estes dois métodos.

Métodos: Foram utilizadas 10 ratas da raça Wistar, peso médio de 250 gramas. O anestésico utilizado foi uretana na dosagem 1,25 mg/kg de peso. As mesmas ratas foram submetidas a todos os procedimentos do estudo de forma sequencial. Inicialmente foram realizados os estudos por sonda uretral (0,64 mm de diâmetro externo) para determinação da pressão vesical (PV1) e tempo de contração (TC1), após isto a mesma sonda foi tracionada (velocidade constante de 0,05 cm/m) até sua exteriorização pelo meato uretral, avaliando-se a pressão uretral máxima (PU1) e o comprimento funcional uretral (CFU1). Fez-se, então, a cistostomia (sonda PE50) para determinação da pressão vesical (PV2). A seguir, realizou-se desnervação cirúrgica da bexiga e realizou-se novo registro cistométrico para se inferir a pressão uretral indireta (PU2). Logo após, foi passada sonda uretral para determinação da pressão uretral máxima (PU3) e do comprimento funcional uretral (CFU2). O sistema de registro das pressões foi constituído de uma

bomba de infusão contínua regulada para 0,1 ml/minuto conectada em Y com o cateter de cistostomia (PE-50) ou cateter uretral (0,64mm) a um polígrafo Narco-Bioystem. A determinação de cada parâmetro estudado foi realizada por três medidas consecutivas e a análise estatística da média desses valores foi feita aplicando-se o método não paramétrico de Wilcoxon.

Resultados: Comparou-se a pressão vesical máxima por sonda uretral e por cistostomia e verificou-se diferença estatística significativa "**p**" = 0,003. Em relação ao tempo de contração vesical nestes dois métodos não houve diferença estatística significativa; "**p**" = 0,128. Ao se comparar o perfil pressórico uretral antes e após a desnervação cirúrgica da bexiga até o colo vesical não houve diferença estatística significativa para ambos os parâmetros estudados: pressão uretral máxima "**p**" = 0,13 e comprimento funcional uretral "**p**" = 0,640. Quando comparado o método de avaliação da pressão uretral por cistostomia ao método do perfil pressórico uretral verificou-se diferença estatística significativa antes "**p**" = 0,002 e após a desnervação vesical "**p**" = 0,002.

Conclusão: Os métodos de avaliação urodinâmica por cateter uretral e por cistostomia são diferentes. A presença do cateter na uretra pode ser um fator obstrutivo, ocasionando aumento das pressões vesicais. A desnervação cirúrgica, até o nível do colo vesical, não compromete a função uretral.

FERIMENTO DIAFRAGMÁTICO: EVOLUÇÃO DO PROCESSO CICATRICIAL E REGENERAÇÃO MUSCULAR

Paulo Cesar Espada

Orientador: Prof. Dr. José Ivan de Andrade

Tese de Doutorado apresentada em 23/02/2006

Lesões isoladas do diafragma, causadas tanto por trauma contuso quanto penetrante na transição toracoabdominal são raras em virtude da posição anatômica do diafragma e de sua movimentação constante. Os pacientes que apresentam lesões isoladas do diafragma geralmente encontram-se assintomáticos na admissão e o exame físico é pouco sensível. Apesar de toda gama de exames, a laparotomia é ainda muito utilizada para o seu diagnóstico. O índice de laparotomia não terapêutica é em torno de 35% e reduz o diagnóstico tardio em apenas 2,9% dos pacientes. A laparoscopia e toracoscopia podem reduzir o número de laparotomia não terapêutica. O tratamento não operatório ou expectante das lesões, nas quais os sinais clínicos e radiológicos não são óbvios, pode ser considerado como uma alternativa terapêutica. Alguns autores reportaram esta lesão em modelo animal e notaram cicatrização em torno de 30 a 120 dias. Com o objetivo de estudar os ferimentos diafragmáticos

causados por agente perfuro-cortante e avaliar uma possível regeneração do músculo diafragmático, dividimos nossa amostra de 60 animais (ratos Wistar) em quatro grupos de 15, sacrificados nas primeiras horas após a lesão (grupo I – 24 horas; grupo II – 48 horas; grupo III – 72 horas; grupo IV – 1 semana). A lesão diafragmática foi realizada por videolaparoscopia. Para análise microscópica feita em imersão, utilizamos a coloração de Hematoxilina-Eosina e Giemsa. A análise estatística utilizada foi o teste de Mood para medianas. Encontramos na borda da lesão predomínio de neutrófilos, eosinófilos, mastócitos e macrófagos nos grupos I e II. Linfócitos, monócitos, vasos, fibroblastos e colágeno aparecem em maior quantidade nos grupos III e IV. O número de vasos aumenta com o decorrer do processo inflamatório e o número de mitoses é maior em 72 horas. A regeneração do músculo diafragmático foi evidente em todos os grupos. Constatamos um aumento significativo do número de regeneração muscular nos grupos III e IV. A evidência de regeneração muscular pode contribuir para o tratamento futuro das lesões diafragmáticas ocultas ou isoladas.

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE A VEIA AUTÓLOGA, PERICÁRDIO BOVINO E O PTFE USADOS COMO REMENDO EM ARTERIOPLASTIA. ESTUDO EXPERIMENTAL EM CÃES

Rosemary Furlan Daniel

Orientador: Prof. Dr. Jesualdo Cherri

Dissertação de Mestrado apresentada 03/03/2006

Introdução: A endarterectomia da artéria carótida é uma das cirurgias vasculares mais realizadas em todo o mundo. Sua indicação em doença aterosclerótica extracraniana é consenso por ser um tratamento efetivo das estenoses da artéria carótida. A discussão está na escolha da técnica para o fechamento da arteriotomia e na escolha do melhor remendo.

Objetivo: O objetivo deste trabalho foi comparar os tipos de remendos (veia autóloga- jugular externa, pericárdio bovino e PTFE) utilizados em arteriotomias da artéria femoral de cães.

Material e Método: Foram selecionados 10 cães e divididos em 2 grupos de 5 animais: Grupo I-

foi utilizado remendo de pericárdio bovino e veia autóloga e Grupo II- foi utilizado remendo de PTFE e veia autóloga. Através de uma inguinotomia os remendos foram suturados à artéria femoral (arterioplastia) sendo que o remendo de veia autóloga foi utilizado em todos os animais sendo considerado como controle. Os animais foram acompanhados por 12 meses e submetidos à avaliação clínica, arteriográfica e ultrassonográfica “color-doppler”. No final do seguimento as peças (remendo e artéria femoral) foram retiradas e analisadas por meio da microscopia óptica.

Resultados: Não houve diferença significativa na avaliação clínica e arteriográfica nos dois grupos. Os dados obtidos nos exames ultrassonográficos foram analisados usando-se os testes não paramétricos de Mann-Whitney, Wilcoxon e Friedmann e não apresentaram diferenças. Comparando-se o aspecto geral

das neóntimas nos cortes transversais das peças (microscopia óptica), não houve diferenças entre o pericárdio bovino e o PTFE quando comparados com a veia autóloga (controle).

Conclusão: O pericárdio bovino quando utilizado na forma de remendo em arterioplastias, mostrou-se eficaz na artéria femoral de cães.

ESTUDO ANATÔMICO VISANDO A SEGURANÇA DA ABERTURA ESPECULAR NAS ABORDAGENS TRANSESFENOIDAIS

Adriano Scaff Garcia

Orientador: Prof. Dr. Benedicto Oscar Colli

Dissertação de Mestrado apresentada em 09/03/2006

A abordagem transesfenoidal é a via mais utilizada no tratamento cirúrgico das lesões selares. Complicações desta via têm sido descritas, dentre elas, a perda visual pós-operatória. Estudos demonstram que dentre as causas estão a lesão direta causada pela remoção de tumores aderidos aos nervos ópticos, quiasma e tratos ópticos; a compressão direta das vias ópticas pelo tamponamento selar excessivo; a tração caudal como consequência da abertura da sela túrcica abaixo dos nervos ópticos e o vasoespasmó pós manipulação cirúrgica. Além disso, a abertura especular excessiva nos acessos transfenoidais, ocasionando lesão nervosa direta, também é descrita como causa de perda visual. No intuito de criar uma boa visualização cirúrgica da parede anterior do seio esfenoidal, a abertura especular muitas vezes torna-se traumática, visto o pequeno espaço entre o corneto médio e o septo nasal, local onde será inserido o espéculo. Durante a abertura e exposição, fraturas dos canais ópticos e ápices orbitais poderão acontecer, ocasionando desta forma, lesões diretas das vias ópticas.

Este estudo tem o objetivo de medir qual é a abertura especular máxima, otimizando a visualização cirúrgica, sem que haja compressão ou lesão dos nervos ópticos, ápices orbitais e canais ópticos nas cirurgias transfenoidais. As distâncias entre os nervos

ópticos foram comparadas utilizando-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis análise de variância (ANOVA), e as medidas entre o corneto médio e o nervo óptico contralateral e a maior largura do corneto médio foram comparadas utilizando-se o teste não paramétrico de Wilcoxon para amostras pareadas.

Houve grande variabilidade individual na largura dos cornetos médios que podem ser grandes o suficiente para impedir a passagem do espelho nasal. Assim, a escolha da narina para a introdução do espéculo deve ser efetuada verificando-se, previamente ou no início do procedimento cirúrgico, o tamanho dos cornetos médios. As distâncias médias entre os nervos ópticos ao nível dos óstios do seio esfenoidal, 0,5 cm e 1,0 cm posterior (dentro do seio esfenoidal) foram medidas em 22 espécimes. Também foram medidas a distância entre a porção pósteromedial dos cornetos médios e o ponto de intersecção entre os nervos ópticos contralaterais e a parede anterior do seio esfenoidal (local da abertura especular) e a largura dos cornetos médios (maior obstáculo à abertura e exposição da parede anterior do seio esfenoidal).

Os resultados das medidas entre os nervos ópticos indicam que aberturas especulares acima de 2,5 cm apresentam maiores chances de lesões dos nervos ópticos e a medida em que o espéculo avança dentro do seio esfenoidal esta distância reduz-se a 1,5 cm. O deslocamento do espéculo para o lado oposto durante a abertura, devido à resistência oferecida pelo corneto médio, pode levar a lesão dos nervos ópticos com aberturas ainda menores.

AVALIAÇÃO DA EXCREÇÃO HEPATOBILIAR E DO REFLUXO ENTEROBILIAR EM RATOS SUBMETIDOS ÀS DERIVAÇÕES BILIODUODENAL E BILIOJEJUNAL

Robson Azevedo Dutra

Orientador: Prof. Dr. José Sebastião dos Santos

Tese de Doutorado apresentada em 30/03/2006

As derivações bilioduodenal (DBD) e biliojejunal (DBJ) parecem ser igualmente efetivas no tratamen-

to da obstrução biliar extra hepática mas, mesmo estando pérvias, podem ser acompanhadas de episódios de colangite. O objetivo deste trabalho foi comparar os efeitos da DBD e da DBJ em relação a parâmetros bioquímicos, histológicos do fígado e do trânsito hepatobiliointestinal. Foram utilizados 72 ratos machos Wis-

tar, onde 54 animais com 15 dias de obstrução biliar (OB) foram distribuídos em 3 subgrupos com 18 animais cada: OB, OB1 e OB2, sendo os dois últimos subgrupos submetidos, respectivamente, à DBD e à DBJ e avaliados, em média, 90 dias após os procedimentos. Os ratos remanescentes serviram de controle (IS). Em todos os animais foram dosadas as bilirrubinas totais (BT) e frações, a fosfatase alcalina (FA) e as aminotransferases (AST e ALT) e realizou-se biópsia hepática para análise histológica semi-quantitativa. A excreção hepática e a permeabilidade da via biliar foram estudadas após infusão intravenosa de DISIDA-^{99m}Tc. O trânsito gastrointestinal e o refluxo enterobiliar (REB) foram avaliados mediante administração de Fitato-^{99m}Tc por via orogástrica. No grupo OB, os valores médios das BT, da FA e da AST e ALT foram maiores que os valores registrados no grupo IS ($p < 0,0001$). Esses valores, após DBD e DBJ não foram diferentes daqueles observados no grupo IS ($p = 0,21$). Houve regressão da proliferação ductal, mas o infiltrado inflamatório e a fibrose nos espaços portais persistiram na maioria dos animais, de forma leve e moderada, sem diferença entre DBD e DBJ. A percentagem da radiatividade emitida pelo fígado e vias biliares, após administração de Fitato-^{99m}Tc por via orogástrica, aos 15 minutos, foi, em média, de 5,55% para o DBD e de 0,34% para o DBJ ($p = 0,13$) e, nas 4

horas, foi de 0,34% para DBD e de 1,53% para DBJ ($p = 0,81$). Os valores médios, em segundos, da atividade hepática máxima (T_{max}), após infusão intravenosa de DISIDA-^{99m}Tc, no grupo IS, foram de 106,16 seg, menor do que 790 seg, no grupo OB ($p = 0,002$). Os valores encontrados nos grupos DBD e DBJ foram de 186,16 seg e 219,83 seg, respectivamente ($p > 0,05$). Todavia, quando comparado com o grupo IS, o grupo DBJ apresentou valor maior de T_{max} ($p = 0,025$). Os valores médios do tempo para eliminação da metade do elemento radiativo pelo fígado ($T_{1/2}$), em segundos, foram de 266,66 seg, 446,66 seg e 551,66 seg para os grupos IS, DBD e DBJ, respectivamente, sem diferença entre os grupos DBD e DBJ, mas com retardo no $T_{1/2}$ para o DBJ em comparação ao grupo IS ($p = 0,017$). O tempo para o aparecimento do elemento radiativo no intestino delgado foi menor para o grupo IS (105 seg) em relação a DBD (171,66 seg) e a DBJ (166,66 seg) ($p = 0,005$). Em conclusão, as duas modalidades de derivação biliar induziram ao REB, sendo que, na DBJ, houve retardo na excreção hepatobiliar e no esvaziamento gástrico. Desta forma, a DBD que além de ser mais fisiológica e de fácil execução, produziu menor efeito no trânsito gastrointestinal e no fluxo hepatobiliar e portanto representa, quando tecnicamente viável, uma boa opção para o tratamento da obstrução biliar extra hepática.

CLÍNICA MÉDICA

ESTUDO CINTILOGRÁFICO DA DEGLUTIÇÃO NA DOENÇA DE CHAGAS

Fernanda Rodrigues Gomes

Orientador: Prof. Dr. Roberto Oliveira Dantas

Dissertação de Mestrado apresentada em 16/01/2006

Introdução: As constantes interações patológicas entre faringe e esôfago em diversas doenças podem interferir no transporte do bolus alimentar. Na doença de Chagas acredita-se que essas interações possam de alguma forma alterar também o transporte orofaríngeo, porém em níveis diferentes.

Objetivos: O estudo teve como propósito avaliar alterações da deglutição em doentes com esofa-

gopatía chagásica, independente da presença ou ausência de disfagia, pelo método cintilográfico.

Material e Métodos: Os participantes do estudo foram selecionados a partir da doença pré-existente e da presença ou não de disfagia, sendo excluídos os pacientes chagásicos que não apresentavam esofagopatía. Foram avaliados ao todo 41 sujeitos, divididos em dois grupos, Grupo I (GI), 21 voluntários assintomáticos (idade média de 55,90 anos) e Grupo II (GII), 20 pacientes com doença de Chagas (idade média de 55,05 anos), portadores de megaesôfago chagásico de grau I, II ou III. Durante a avaliação cintilográfica, os

participantes do estudo deglutiram uma pasta de alimento de 10 ml de refeição de prova de consistência pastosa (“pasta”) a qual foi adicionado um marcador de radioatividade de fitato-coloidal ligado ao tecnécio ^{99m}Tc , na consistência pastosa, com densidade de 2,6 g/100ml. A partir deste exame, os dados da avaliação foram analisados em computador através do protocolo de aquisição da Gama-Câmara (Vison DST) e obtiveram-se dados sobre o trânsito e resíduo na boca, trânsito, depuração e resíduo em faringe e esôfago, sendo esse último dividido em esôfago proximal, medial e distal.

Resultados: A diferença não foi estatisticamente significativa quando os GRUPOS I e II foram

comparados em relação ao trânsito oral e faríngeo, resíduo faríngeo e depuração faríngea, no entanto houve diferença estatística entre o GRUPO I e o GRUPO II na porcentagem de resíduos oral, respectivamente, 7,28% e 11,25%. Quando os grupos foram comparados em relação à fase esofágica não detectou diferença estatística.

Conclusões: Nos pacientes com Doença de Chagas, a cintilografia conseguiu detectar diferença significativa na porcentagem de resíduo oral quando comparado ao grupo controle ($P < 0,05$). Em relação ao tempo de trânsito e depuração oral e faríngea e resíduo faríngeo não houve diferenças estatísticas.

ANÁLISE DO TESTE DE RESISTÊNCIA GENOTÍPICA DO HIV-1 COMO MÉTODO AUXILIAR NA TERAPIA ANTI-RETROVIRAL DE RESGATE EM CONDIÇÕES REAIS DE ASSISTÊNCIA

Roberto da Justa Pires Neto

Orientador: Prof. Dr. Benedito A. Lopes da Fonseca
Tese de Doutorado apresentada em 19/01/2006

A infecção pelo HIV/aids é um dos mais importantes problemas de saúde pública em todo o mundo. Além do enorme contingente de portadores oficialmente notificados, milhões de indivíduos no mundo convivem com o HIV de forma assintomática, muitos destes sem conhecer seu estado de portador. O HIV apresenta grande heterogeneidade biológica devido ao fato de o mesmo possuir genoma com elevado potencial de variabilidade, foco de atenção de pesquisadores no mundo todo. Apesar dos significativos avanços no combate a aids, obtidos com o advento da terapia anti-retroviral, limitações existem e novos problemas surgiram. Dentre eles, a emergência de cepas virais resistentes aos medicamentos anti-retrovirais que surge a partir de mutação única ou acúmulo de mutações nos genes da transcriptase reversa e/ou protease. A resistência do HIV às drogas anti-retrovirais representa preocupante ameaça ao sucesso no controle da infecção pelo HIV obtido com a terapia anti-retroviral. Esta ameaça forçou pesquisadores a desenvolverem métodos laboratoriais capazes de detectar a presença de resistência do HIV a uma determinada droga. Estes métodos são denominados de testes de resistência do HIV aos anti-retrovirais. O objetivo deste estudo foi avaliar, em condições reais de assistência, o emprego do teste de resistência genotípica do HIV-1 como método auxiliar na terapia anti-retroviral de resgate

de pacientes em situação de falha à essa terapia. Foram avaliados 112 portadores do HIV-1 em situação de falha terapêutica. Parte destes pacientes foi submetida a resgate terapêutico guiado por teste de resistência genotípica do HIV-1. Verificou-se que a disponibilização de teste de resistência genotípica do HIV-1 para a rede pública foi viável, sendo o teste utilizado de forma ampla e universal e atendendo a critérios estabelecidos. O acesso ao teste de resistência genotípica do HIV-1 foi, de maneira geral, satisfatório e auxiliou na terapia de parcela significativa de pacientes portadores de infecção pelo HIV/aids, possibilitando tratamento de resgate mais adequado. O acesso ao teste de resistência genotípica do HIV-1 na rede pública foi, em parte, comprometido pela demora entre a solicitação e a liberação do resultado final. O perfil de resistência do HIV-1 às drogas anti-retrovirais foi variável e esteve relacionado com o grau de exposição prévia. Sexo masculino, antecedente de boa adesão à terapia anti-retroviral, uso prévio de até quatro drogas e não-exposição prévia às drogas da classe dos inibidores da transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeos foram fatores relacionados a uma melhor resposta à terapia anti-retroviral de resgate guiada por teste de resistência genotípica do HIV-1. Em estudo comparativo, a terapia de resgate guiada por teste de resistência genotípica do HIV não foi superior à terapia de resgate convencional do ponto de vista da durabilidade. Estratégias devem ser desenvolvidas para o uso mais racional do teste de resistência genotípica do HIV-1 na rede pública.

ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-LABORATORIAIS DOS PACIENTES COM SARCOMA DE KAPOSI ASSOCIADO À AIDS SEGUIDOS NA UNIDADE ESPECIAL DE TRATAMENTO DE DOENÇAS INFECCIOSAS DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FMRP-USP E A AVALIAÇÃO DE ESQUEMA DE QUIMIOTERAPIA COM ETOPOSIDE E HIDROXIURÉIA

Carolina Cipriani Ponzi

Orientador: Prof. Dr. Benedito A. Lopes da Fonseca
Dissertação de Mestrado apresentada em 20/01/2006

O Sarcoma de Kaposi é uma neoplasia que, antes do advento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, acometia principalmente indivíduos de ascendência judaica ou mediterrânea. Atualmente, é a neoplasia mais frequentemente associada à aids, e muitos estudos vêm sendo realizados com o intuito de definir suas características clínicas e epidemiológicas bem como seus fatores prognósticos e terapia de escolha. O presente estudo, realizado na UETDI do HC-FMRP-USP tem por objetivo avaliar as características clínicas, epidemiológicas e laboratoriais dos pacientes com SK-AIDS, bem como avaliar o uso de etoposide e hidroxiuréia, associados à terapia anti-retroviral de alta potência, para o tratamento desta neoplasia. Durante 54 meses, avaliou-se 35 pacientes, dos quais 91,4% eram do sexo masculino e cuja idade variou entre 21 e 57 anos (mediana de $40 \pm 9,5$ anos). A contagem de linfócitos TCD4⁺ no início do estudo variou entre 1,8 e 784 células por milímetro cúbico (mediana de 74 células por milímetro cúbico) e a carga viral inicial variou entre 2,14 e 6,27 log (mediana de 4,16 log). Onze pacientes receberam etoposide e hidroxiuréia como tratamento, cinco receberam es-

quema ABV, 7 receberam apenas HAART e 12 receberam esquemas com múltiplas drogas citotóxicas. Houve um abandono de seguimento durante o estudo. Doze pacientes acabaram evoluindo para óbito, dos quais, quatro pacientes eram do grupo de estudo. Em relação aos efeitos adversos observados, os efeitos hematológicos foram os mais freqüentes, em todos os grupos analisados. Entretanto, o único efeito adverso com relação estatística significativa associada ao grupo de estudo foi a anemia ($p 0,0416$). Em relação à imunofluorescência para o HHV8, observou-se positividade em 92,8% das amostras coletadas, dado condizente com a literatura. Concluiu-se que, apesar da associação estatisticamente significativa com anemia, o uso de etoposide e hidroxiuréia para o tratamento de SK-AIDS, em conjunto com a HAART, é alternativa segura, tanto do ponto de vista hematológico como do ponto de vista infeccioso, e pode constituir alternativa viável para o tratamento desta patologia. Ainda, a sorologia para o HHV8 não constitui ferramenta diagnóstica para o SK-AIDS, visto que este é realizado de forma clínica e anatomo-patológica, mas pode constituir método relativamente sensível para a detecção da infecção por este vírus em pacientes com aids (aproximadamente 90% de sensibilidade em nossa casuística, dado condizente com a literatura), e pode servir como método de rastreamento de pacientes que estejam sob risco de desenvolvimento de SK-AIDS.

CLONAGEM E EXPRESSÃO DO FVIII DE COAGULAÇÃO HUMANO

Virginia Proença Picanço

Orientador: Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas
Tese de Doutorado apresentada em 20/01/2006

No Brasil existem cerca de 7000 hemofílicos cadastrados que são tratados, na sua maioria, com concentrados de fator VIII obtidos a partir do plasma humano. Este tipo de tratamento é caro e muitas vezes não disponível na quantidade necessária. Produzir o fator VIII de coagulação por técnicas de engenharia recombinante é desejável com base no pressuposto de menor custo e maior segurança, visto que seriam pro-

duzidos praticamente isentos de agentes patogênicos, ao contrário do produto obtido do plasma humano.

Este trabalho teve como objetivo modificar, introduzir e expressar o fator VIII de plasma humano em linhagens celulares para obter altos níveis de expressão *in vitro*. Inicialmente, foram realizadas duas construções plasmidiais, uma para a cadeia leve e outra para a pesada do FVIII, em vetores de expressão de células de mamíferos. Células CHO, Hek-293 e HepG2 foram transfectadas com as construções plasmidiais. O padrão de expressão foi analisado por RT-PCR e por microscopia de fluorescência. As análises

de expressão por RT-PCR e imunocitoquímica sugerem que todas as linhagens celulares utilizadas são capazes de expressar as cadeias leve e pesada do FVIII humano, mas em nenhuma destas linhagens foi detectado atividade de FVIII. Isto sugere que a quantidade da proteína secretada não seja suficiente para detecção ou que a montagem do FVIII ativo foi deficiente. Posteriormente, cinco construções plasmidiais contendo o FVIII sem o domínio B foram construídas com diferentes promotores (CMV, EF1 α , hAAT, fviii). A expressão foi analisada em células 293T, CHO e Hepa1.6. O vetor contendo o promotor EF1a apresentou os maiores níveis de expressão de FVIII em todas as linhagens celulares (293T= 184,4 ng/mL; Hepa1.6= 133,6ng/mL; CHO=38,4 ng/mL).

Neste trabalho, também foram utilizados vetores lentivirais contendo, além dos promotores universais CMV e EF-1 α , promotores específicos de fígado, HAAT e F8p, para observar a especificidade dos promotores em linhagens celulares de fígado e 293T como controle. Em todas as construções realizadas foi utilizado o cDNA do FVIII sem o domínio B. Todos os promotores foram clonados *upstream* do FVIII Δ B dentro do vetor lentiviral 1054. As linhagens 293T, HepG2, Hepa1.6 e Sk-Hep foram transduzidas com o vetor lentiviral, as células positivas foram selecionadas e expandidas. O vetor mais efetivo para a produção de FVIII foi aquele com o promotor CMV (1,85 IU/mL para 293T IU/mL; 3,15 IU/mL para HepG2; 5,03 IU/mL para SkHep, 0,91 IU/mL para Hepa1.6). Os sistemas mais eficientes para a produção de FVIII foram as linhagens Sk-Hep e HepG2 transduzidas com o vetor com o promotor CMV. O número de cópias dos vetores lentivirais integrados foi determinado por Real Time PCR. O número variou de 1 cópia por célula 293T transduzida com o vetor contendo o promotor EF1-alpha a 68 cópias por célula SkHep transduzida com o vetor contendo o promotor fviii. O FVIII foi produzido mais eficientemente nas células transduzidas com o vetor contendo os promotores universais (CMV e EF1), quando comparado com os outros promotores. E apesar do baixo número de cópias integradas dos vetores (com os promotores CMV e EF1- α), estes

apresentaram um alto nível de FVIII ativo. Isto pode indicar uma eficiência da transcrição sob controle dos respectivos promotores, uma eficiência de secreção de FVIII ou uma combinação de ambos. A maior produção de FVIII por cópia de vetor integrado foi observado em SkHep, sob o controle do promotor CMV.

Para melhor caracterização do FVIII recombinante secretado pelas linhagens, foi realizado Western blot para análise da proteína. O FVIII foi coletado do sobrenadante das culturas celulares e analisado por SDS-PAGE e imunodeteção. As linhagens celulares transduzidas com nossos vetores apresentaram FVIII processado corretamente nas cadeias leve e pesada, apresentando apenas uma pequena fração de FVIII não-processado (170 kDa), indicando que a clivagem intracelular de FVIII nas cadeias leve e pesada pode não ter sido totalmente completa.

Paralelamente, experimentos utilizando a droga Hyper-IL6, com o intuito de ativar a proliferação de hepatócitos e vetores lentivirais contendo a proteína EGFP, foram realizados *in vitro* e *in vivo*, com o intuito de avaliar se durante a proliferação de hepatócitos há um aumento da transdução lentiviral. Os camundongos que receberam 4 μ g de Hyper-IL6 e 10⁹ ou 10⁸ partículas virais apresentaram uma maior quantidade de cópias integradas no fígado (estatisticamente significativa).

Este estudo mostrou que é possível obter altos níveis de FVIII recombinante em cultura de células. Estabelecer linhagens celulares de mamíferos transformadas com construções lentivirais contendo o FVIII que expressem a proteína em níveis elevados, será um passo fundamental para novos avanços na terapêutica da hemofilia e na caracterização dos processos envolvidos na biossíntese do fator VIII. Isto permitirá, também, estabelecer no Brasil a metodologia para a produção de fatores de coagulação por meio de tecnologia de DNA recombinante.

Este trabalho também estudou a aplicação de vetores lentivirais *in vivo* (terapia gênica) e sugere ainda que estes vetores, num futuro próximo, podem ser testados em camundongos hemofílicos para obtenção de níveis plasmáticos de FVIII.

ESTUDO DO EQUILÍBRIO CORPORAL EM ADULTOS E IDOSOS SAUDÁVEIS COM A UTILIZAÇÃO DE PLATAFORMA MÓVEL

Maira Magaly Nepomuceno do Vale

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Ferriolli

Dissertação de Mestrado apresentada em 24/01/2006

O equilíbrio corporal decorre da ação de três sistemas sensoriais: vestibular, visual e proprioceptivo. A manutenção do equilíbrio na posição ereta torna-se

mais difícil em situações com diminuição da base de sustentação e da mudança do centro de gravidade e da posição vertical do corpo. O objetivo do estudo foi medir a oscilação corporal em adultos e idosos saudáveis utilizando uma plataforma móvel computadorizada. Essa plataforma foi desenvolvida a fim de possibilitar aos sujeitos estímulos homogêneos e repetitivos. Foram feitas medidas das oscilações corporais nos sentidos ântero-posterior e látero-lateral, em 53 voluntários normais (20 adultos, 33 idosos). O teste foi realizado com duração de um minuto, nas condições com olhos abertos e com olhos fechados. Em ambos os grupos, não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias das medidas de oscilação corporal no sentido ântero-posterior e látero-lateral, nem na condição com olhos abertos nem na com olhos

fechados. Entretanto, no grupo de idosos pode-se observar uma tendência a ocorrer o contrário, em ambas as condições, uma vez que os valores de p encontrados são muito baixos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias de adultos e idosos, nem na condição com olhos abertos nem na com olhos fechados. Entretanto, pode-se observar uma tendência a ocorrer o contrário na condição com olhos fechados, no sentido ântero-posterior, uma vez que o valor de p encontrado é muito baixo. No grupo de adultos, como no grupo de idosos, houve um incremento na oscilação corporal com o fechar dos olhos, nos dois sentidos. Nos dois grupos, esse incremento foi maior no sentido látero-lateral. O incremento foi maior no grupo de idosos que no de adultos, nos dois sentidos.

AVALIAÇÃO PROSPECTIVA DA COLONIZAÇÃO BACTERIANA EM CATETES DE HEMODIÁLISE

Lilyan Walkyria Caleiro de Freitas

Orientador: Prof. Dr. José Fernando de C. Figueiredo
Dissertação de Mestrado apresentada em 25/01/2006

A hemodiálise por meio de cateteres venosos tem permitido a realização de diálise em situações emergenciais nos casos de insuficiência renal aguda ou temporária nos nefropatas crônicos, enquanto não se dispõe de fistulas arteriovenosas em condições de uso. Essa forma de diálise, no entanto, está associada a complicações infecciosas relacionadas à colonização bacteriana do cateter o que limita o seu uso prolongado e exige cautela no acompanhamento dos pacientes.

Objetivos: 1) Estudar a ocorrência de bacteremia e colonização relacionada a cateteres em pacientes em hemodiálise empregando cateteres de duplo lúmem; 2) Investigar possíveis fatores de risco associados à colonização bacteriana dos cateteres. 3) Avaliar eventuais impactos clínicos dos episódios de infecção relacionada aos cateteres de hemodiálise.

Casuística e Métodos: Foram acompanhados, de janeiro a dezembro de 2004, por meio de culturas do sangue periférico colhidas semanalmente, 29 pacientes que faziam hemodiálise no Serviço de Nefrologia de Ribeirão Preto (SENERP), utilizando cateter de duplo lúmem. Os pacientes foram incluídos no estudo logo após a implantação do cateter e foram acompanhados durante todo o período de permanên-

cia do mesmo. As hemoculturas foram monitoradas por sistema automatizado contínuo BACT/ALERT (Organon Teknica) e as bactérias foram isoladas e identificadas de acordo com as recomendações do CLSI. Os cateteres retirados por qualquer motivo tiveram suas pontas removidas e foram avaliados microbiologicamente empregando a técnica de Maki. A ocorrência de hemocultura positiva ou a colonização do cateter foram analisadas de acordo com a idade, o sexo, o sítio de implantação do cateter, o tempo de permanência do mesmo e a ocorrência de sinais ou sintomas de bacteremia. Resultados: foram analisadas 290 amostras de hemoculturas, provenientes de 29 pacientes que tiveram, no período do estudo, 55 cateteres implantados. Dessas, 13,79% evidenciaram crescimento bacteriano e os microrganismos mais frequentemente isolados foram *Staphylococcus epidermidis* (64,51%), *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus sp*, *Corynebacterium sp* (6,45%) e *Streptococcus viridans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas fluorescens* (3,23%). Vinte pacientes (68,9%) apresentaram pelo menos uma hemocultura positiva durante o seguimento. A mediana do tempo para a infecção do cateter foi de 24,5 dias. Com relação aos 55 cateteres implantados, 28 (50,9%) deles resultaram em colonização, o que correspondeu a 23,4 episódios por 1000 cateteres-dia. Em 7 pacientes houve concordância entre os isolados na ponta do cateter

e do sangue, o que resultou em 9,2 episódios de bacteremia por 1000 cateteres-dia. De 40 episódios de hemoculturas positivas, originados de 20 pacientes diferentes, em 15 deles (75%) não foram detectados sinais ou sintomas indicativos de bacteremia. Conclusões: A alta incidência de hemoculturas positivas no

presente trabalho, a sua correlação com a positividade da cultura da ponta do cateter, aliados à ocorrência de numerosos episódios de bacteremia assintomáticos, justificam a proposta de coleta rotineira de hemoculturas para o monitoramento da colonização bacteriana em cateteres de hemodiálise

DETERMINAÇÃO DO EFEITO DA HAPLOINSUFICIÊNCIA DO GENE *C/EBP α* NA GÊNESE DA LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA DO MODELO TRANSGÊNICO *hCG-PML-RAR α*

Bárbara Amélia Aparecida Santana

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Magalhães Rego
Tese de Doutorado apresentada em 01/02/2006

A Leucemia Promielocítica Aguda (LPA) caracteriza-se pela infiltração de células leucêmicas na medula óssea (MO) e sangue periférico (SP), as quais apresentam um bloqueio da diferenciação celular no estágio de promielócitos. A maioria dos casos de LPA está associada a translocação t(15;17), levando à fusão dos genes: Receptor do Ácido Retinóico α (RAR α) e Leucemia Promielocítica (PML), localizados nos cromossomos 17 e 15, respectivamente. A expressão do gene de fusão PML-RAR α (PR) é essencial para origem da LPA. Camundongos transgênicos (CT) que expressam o PR desenvolvem uma forma de leucemia muito semelhante à LPA humana. *C/EBP α* é um fator de transcrição essencial para a granulopoese normal. Em camundongos, a inativação do *C/EBP α* ocasiona a ausência de granulócitos maduros e morte rápida após o nascimento devido ao comprometimento do metabolismo de glicogênio. Para verificar a importância dos níveis de expressão do *C/EBP α* no processo leucemogênico, foram estudados camundongos resultantes do cruzamento entre CT hCG (catepsina G humana) PR e camundongos *C/EBP α ^{+/-}* haploinsuficientes. Camundongos PR *C/EBP α ^{+/-}* desenvolveram LPA após um longo período de latência, mas a penetrância da doença foi 14,9%, comparada com 8,2% em CT PR ($p=0,02$). A morfologia e as contagens diferenciais das células mielóides da MO, do SP, e do baço, e o imunofenótipo do baço foram similares para camundongos tipo selvagem (TS), *C/EBP α ^{+/-}* e PR e PR *C/EBP α* não leucêmicos. Camundongos leucêmicos PR e PR *C/EBP α ^{+/-}* apresentaram um padrão semelhante de infiltração da MO, do SP e do baço por células mielóides imaturas. Suspensões celulares do

baço de camundongos leucêmicos PR e PR *C/EBP α ^{+/-}* foram infiltradas por células CD117⁺ CD34⁺ e CD117⁺ CD11b⁺. Portanto, células leucêmicas de camundongos PR e PR *C/EBP α ^{+/-}* caracterizam-se pela co-expressão assíncrona de CD34, CD117 e CD11b. Ensaios clonogênicos realizados em meio semi sólido de metilcelulose não demonstraram diferenças relevantes entre os genótipos na fase pré-leucêmica, mesmo após a administração de doses farmacológicas de ATRA (All-Trans Retinoic Acid). A fim de comparar os padrões de expressão entre células leucêmicas PR e PR *C/EBP α ^{+/-}*, realizou-se experimentos de *macroarrays*. RNA total de células leucêmicas foi obtido de MO total e seu cDNA foi hibridizado à membranas com 588 oncogenes murinos conhecidos. Um total de 9 genes foram aparentemente reprimidos em CT PR *C/EBP α ^{+/-}*, mas a validação por PCR em tempo real não confirmou os resultados do *macroarray*. Isso sugere que o perfil de expressão gênica da MO total pode ocultar possíveis diferenças que somente poderiam ser detectadas em amostras de RNAm dos promielócitos. Utilizando técnicas imunomagnéticas separou-se e caracterizou-se citologicamente células com o seguinte fenótipo: CD34⁺, CD117⁺, CD16/32⁺ e CD11b⁺, a partir de amostras de MO e baço de camundongos leucêmicos e não leucêmicos. Controles morfológicos das células isoladas acima revelaram grande semelhança com promielócitos. Resultados de PCR em tempo real mostraram uma relação inversa entre a expressão dos genes *C/EBP α ^{+/-}* e PML-RAR α nos promielócitos isolados de amostras de camundongos PR *C/EBP α ^{+/-}* leucêmicos e não leucêmicos. Em conclusão, nossos dados sugerem que a proteína de fusão PML-RAR α age como um produto dominante negativo sobre a expressão do gene *C/EBP α* em um grupo específico de células mielóides imaturas e contribui para a patogênese da LPA.

ESTUDO DA IMUNOGENICIDADE DE DIFERENTES PLASMÍDEOS RECOMBINANTES QUE EXPRESSAM AS PROTEÍNAS prM/E DO VÍRUS DENGUE-4

Danielle Malta Lima

Orientador: Prof. Dr. Benedito A. Lopes da Fonseca
Tese de Doutorado apresentada em 03/02/2006

A imunização com DNA plasmidial, expressando regiões imunogênicas da proteína E, constitui uma nova estratégia na elaboração de uma vacina tetravalente contra o vírus dengue. Desde a década de 1970, a Organização Mundial de Saúde tem patrocinado diversos estudos para a obtenção de vacinas para dengue. Até o presente momento nenhuma vacina eficiente e segura está disponível à população.

Neste trabalho foram construídos plasmídeos recombinantes para a expressão dos genes responsáveis por codificar o peptídeo sinal e as proteínas prM e E do vírus Den-4 (H-241). Os genes das proteínas prM e E foram amplificados pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), a partir do genoma do vírus dengue-4 obtido de células C6/36 infectadas *in vitro*. Após a amplificação, estes genes foram então inseridos em um plasmídeo de expressão e, foi realizada a seleção dos clones recombinantes, que foram denominados: pCID4/CL4, pCID4/CL6, pCID4/CL10, pCID4/CL10N, pCID4/CL11, pCID4/CL12, contendo os genes de interesse. Estes plasmídeos foram analisados com relação ao desenvolvimento de uma resposta imune específica. Camundongos BALB/c foram imunizados por via intramuscular com 100 µg de dose de cada um dos 6 clones recombinantes e do plasmídeo pCI. Foram realizadas três imunizações com intervalos de 15 dias entre elas; 15 dias após a 3ª imunização, os animais foram sacrificados e a resposta imune foi avaliada. No intervalo de cada inoculação, o sangue destes animais foi coletado através de

punção do saco retroorbitário, processado para separação do soro e estocado a -70°C. Após as três imunizações, o baço dos animais imunizados foi dividida e as células foram cultivadas na concentração de 1×10^6 células/pocinho, para a realização dos ensaios de dosagem de anticorpos neutralizantes, de citocinas [INF- γ e IL-2 (padrão Th-1) e IL-4 e 10 (padrão Th-2)] por ELISA e ensaios de linfoproliferação. Todos os animais inoculados com os clones recombinantes produziram anticorpos neutralizantes, contra o vírus dengue-4. Todos os plasmídeos recombinantes apresentaram índices de proliferação perante o estímulo específico, porém os candidatos vacinais pCID4/CL10 e pCID4/CL10N foram os que apresentaram maiores índices de proliferação com relação aos outros plasmídeos recombinantes e com relação ao grupo-controle negativo (pCI).

Todos os plasmídeos recombinantes induziram a produção da citocina IFN- γ , com relação ao estímulo específico. Porém, os candidatos vacinais pCID4/CL10 e pCID4/CL6 foram os que produziram as citocinas INF- γ e IL-2, em níveis mais elevados em comparação aos outros plasmídeos recombinantes e ao grupo-controle negativo (pCI). Com relação aos níveis de IL-10 os candidatos vacinais pCID4/CL10, pCID4/CL10N, foram os que induziram melhores níveis desta citocina em comparação aos outros plasmídeos recombinantes. Os resultados sugerem que os plasmídeos recombinantes vacinais pCID4/CL10N e pCID4/CL10 foram capazes de estimular uma resposta imune específica contra estímulo específico. Também foi observada proteção após o desafio (50% e 80%). Dessa forma, estes plasmídeos recombinantes vacinais podem fazer parte de uma preparação para uma vacina de DNA recombinante tetravalente.

PARTICIPAÇÃO DO FATOR NUCLEAR-KB E DE MAP (MITOGENIC-ACTIVATED PROTEIN) QUINASES NA EVOLUÇÃO DA LESÃO RENAL EM RATOS COM NEFRECTOMIA SUBTOTAL

Joana Carla da Silva Regueira Costa

Orientadora: Profa. Dra. Terezila Machado Coimbra
Dissertação de Mestrado apresentada em 08/02/2006

Um dos modelos mais utilizados para o estudo da insuficiência renal crônica consiste da redução do número de nefros pela nefrectomia cirúrgica. O assim

chamado modelo da nefrectomia subtotal ou 5/6 se caracteriza por perda progressiva da função renal, hipertensão arterial, proteinúria e alterações estruturais (expansão progressiva da matriz mesangial, glomerulosclerose, fibrose) semelhantes àsquelas observadas em algumas doenças humanas. Essas alterações estão associadas a um aumento dos níveis renais de angiotensina II e hipertensão glomerular.

A fibrose intersticial caracteriza-se pelo acúmulo de fibroblastos e de componentes da matriz extracelular (MEC) no compartimento intersticial. É um processo complexo e envolve a interação de células e citocinas. As células renais sob a influência de citocinas podem proliferar e sofrer modificações nos seus fenótipos e nas suas funções tornando-se potencialmente capazes de produzirem mais colágenos e outros componentes da MEC.

Estímulos extracelulares e intracelulares controlam a proliferação e a diferenciação das células, podendo contribuir para a evolução de determinadas lesões. Existem também evidências que mostram que as ativações do fator nuclear NF- κ B e de MAP quinases podem estar relacionadas com a progressão da lesão renal em alguns modelos experimentais de nefropatias. Ativações dessas vias de sinalização podem resultar no aumento da produção de substâncias como moléculas de adesão, fatores quimiotáticos, citocinas e enzimas que estão relacionadas com respostas inflamatórias e proliferativas das células. Vários estudos têm mostrado o envolvimento da angiotensina II na ativação dessas vias.

Esse estudo analisa a participação do fator nuclear- κ B (NF- κ B) e de MAP (*Mitogenic-Activated*

Protein) quinases na evolução da lesão renal em ratos com nefrectomia subtotal. Sessenta e cinco ratas *Wistar* foram submetidas à nefrectomia subtotal ou à operação fictícia com manipulação dos pedículos renais (*Sham*), sendo parte dos animais tratados com enalapril. O tratamento com enalapril foi iniciado 7 dias após o processo cirúrgico. A pressão arterial e a albuminúria foram determinadas 15 e 90 dias após as cirurgias. Os animais foram também submetidos a avaliação da função renal, pelo *clearance* de inulina, 15 e 90 dias após as cirurgias. O rim esquerdo foi removido para estudo histológico e de avaliação imunohistoquímica. A avaliação imunohistoquímica foi realizada utilizando os seguintes anticorpos: anti-ED-1 (reage com antígenos presentes no citoplasma de macrófagos), anti-fibronectina, anti-NF- κ B, anti-p-ERK e anti-p-JNK.

Os animais submetidos à nefrectomia subtotal desenvolveram hipertensão e alterações de função (queda da taxa de filtração glomerular e albuminúria) e de estrutura renal (glomerulosclerose e alterações túbulo-intersticiais). O enalapril conferiu proteção renal nos ratos com nefrectomia subtotal, reduzindo as alterações renais funcionais e estruturais. Os estudos de imunohistoquímica evidenciaram aumento da expressão de fibronectina, NF- κ B, JNK, ERK e do número de macrófagos no córtex renal e nos glomérulos renais dos ratos com nefrectomia subtotal. Esse aumento foi prevenido pelo tratamento com enalapril.

Conclusões: os resultados mostram que o efeito protetor do enalapril na evolução da lesão renal nos ratos com nefrectomia a 5/6 está relacionado com a redução do processo inflamatório e das ativações das vias do NF- κ B e MAP quinases.

EXPRESSÃO DE QUIMIOCINAS EM PACIENTES COM LEUCEMIAS AGUDAS

Beatriz Maria de Carvalho Paixão

Orientador: Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior
Dissertação de Mestrado apresentada em 09/02/2006

O grande aumento do número de células observado nos tecidos neoplásicos ocorre devido à perda da homeostase dos tecidos que é determinada pelo equilíbrio entre a proliferação e a apoptose. As principais causas deste desequilíbrio são as mutações do tipo fusões gênicas, deleções, inserções e substituições. No desenvolvimento do câncer, as quimiocinas

exercem um papel importante. Citocinas quimioatrativas ou quimiocinas são uma superfamília de proteínas secretoras subdivididas entre quatro grupos baseados na posição relativa de seus resíduos de cisteína. Em humanos existem aproximadamente 50 tipos diferentes de quimiocinas. A produção de quimiocinas em câncer está diretamente relacionada com a natureza e extensão da infiltração de leucócitos. No entanto, não estão totalmente determinadas quais são as quimiocinas características de um determinado tipo de câncer humano. Identificando-se que, a produção de

quimiocina é maior em cânceres em relação a tecidos normais, é possível determinar que quimiocinas circulantes possam ser úteis ao tumor além de poderem ser utilizadas como marcadores prognósticos. Podemos relacionar a expressão diferencial de quimiocinas e seus receptores a processos de invasão e acúmulo de células leucêmicas em diversos tecidos. Em Leucemia Mielóide Aguda (LMA), podemos encontrar diferentes padrões de expressão de quimiocinas ao longo dos diferentes subtipos classificados de acordo com a FAB. Em Leucemia Linfóide Aguda (LLA) a migração e o tráfego de células precursoras malignas estão envolvidos com produção diferencial de quimiocinas específicas. O estudo das quimiocinas vem sendo importante para o entendimento dos processos que regulam a migração e disseminação dos clones malignos. Os mecanismos envolvidos com a regula-

ção e tráfego de células leucêmicas não estão totalmente esclarecidos. Nosso trabalho demonstrou, através de análises qualitativas (RT-PCR), semi-quantitativas (RT-PCR) e quantitativas (Q-PCR), a expressão diferencial de 5 genes: Paxillina (PXN), o receptor Interleucina 8 receptor beta (IL8RB), e seu ligante Interleucina 8 (IL8), o receptor de quimiocina da família CXC (CXCR4), e seu ligante CXCL12, em 23 amostras de pacientes portadores de leucemias agudas em comparação com 10 amostras de tecidos controles normais. Dos genes analisados, CXCR4 foi o que apresentou um melhor padrão de expressão diferencial entre amostras normais e tumorais, sendo mais expresso em pacientes com leucemia, e entre LMA e LLA, sendo mais expresso dentro das LLAs.

O gene IL8 se mostrou com expressão elevada em praticamente todas as amostras analisadas.

EFEITO DA INGESTÃO DE LÍQUIDOS E ALIMENTOS NA AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CORPORAL DE IDOSOS DESNUTRIDOS

Karla Helena Coelho Vilaça

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar Moriguti

Dissertação de Mestrado apresentada em 20/02/2006

A desnutrição é o distúrbio nutricional mais comum em idosos e está associada ao aumento da mortalidade, da suscetibilidade às infecções e à redução na qualidade de vida. A determinação do estado nutricional de idosos requer métodos acurados e precisos de mensuração dos compartimentos corporais. Alguns fatores, como o consumo de alimentos e líquidos, são tidos como influenciadores do resultado final da análise da composição corporal por alterar o volume de água corporal total do indivíduo. No entanto, a quantidade de líquido, o tempo após a ingestão e quanto isso pode afetar a mensuração no idoso ainda não foram estabelecidos. Assim sendo, o objetivo do presente estudo foi verificar se houve mudança na massa corporal magra (MM) e na massa gorda (MG) de idosos eutróficos e desnutridos uma hora após o consumo de alimentos e líquidos. Participaram do estudo 41 homens com idade acima de 60 anos, selecionados no Ambulatório de Geriatria do Hospital das Clínicas da FMRP-USP, no Centro de Saúde Escola da FMRP-USP (CSE) e em instituições asilares de Ribeirão Preto-SP. Os grupos foram divididos entre eutróficos e des-

nutridos através do questionário Mini Avaliação Nutricional e as variáveis MM e MG foram avaliadas por impedância bioelétrica (BIA) e absorcimetria de duplo fóton (DEXA). Não houve diferença significativa quando comparamos as variáveis em jejum e uma hora após a alimentação, tanto no grupo de eutróficos como no grupo de desnutridos. Em relação aos grupos, as variáveis: peso, IMC, MM e MG (DEXA/BIA) dos eutróficos foram estatisticamente menores em comparação aos desnutridos. Em relação aos métodos utilizados, comparamos os resultados da MM entre a BIA e a DEXA na população estudada e encontramos uma boa correlação nos idosos eutróficos ($r=0,91$; $p<0,0001$) e nos idosos desnutridos ($r=0,88$; $p<0,0001$), bem como nos resultados de MG quando comparamos os métodos nos idosos eutróficos e desnutridos ($r=0,85$, $p<0,0001$; $r=0,71$, $p<0,0003$, respectivamente). Nossos achados indicam que a ingestão de uma refeição leve, não influencia as medidas de composição corporal pelos métodos de DEXA e BIA pelo equipamento monofrequencial em idosos eutróficos ou desnutridos uma hora após o consumo. A BIA produziu resultados estatisticamente similares ao DEXA, o que sugere uma forte associação entre os dois métodos de análise e nos deixa a opção de um recurso de avaliação do estado nutricional mais econômico, fácil e prático de realizar.

EFEITO DA REABILITAÇÃO VESTIBULAR SOBRE A QUALIDADE DE VIDA DE IDOSOS PORTADORES DE LABIRINTOPATIAS DE ORIGEM VASCULAR E METABÓLICA

Erika Barioni Mantello

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar Moriguti

Dissertação de Mestrado apresentada em 21/02/2006

A tontura é um sintoma que acomete a população mundial, sendo observada maior prevalência em idosos devido ao processo de deterioração funcional dos sistemas auditivo e vestibular com o envelhecimento e também devido à alta sensibilidade destes sistemas a problemas clínicos situados em outras partes do corpo humano, comumente relacionados à etiologia vascular e metabólica. A Reabilitação Vestibular (RV) tem se mostrado uma importante e efetiva estratégia no tratamento de indivíduos com desordens do equilíbrio corporal, proporcionando uma acentuada melhora na qualidade de vida. O objetivo deste trabalho foi avaliar prospectivamente o efeito da RV como forma de tratamento das labirintopatias de origem vascular e metabólica sobre a qualidade de vida de indivíduos idosos. O estudo foi delineado como um ensaio clínico prospectivo, longitudinal, observacional, com a participação de 40 indivíduos idosos de ambos os gêneros, com faixa etária entre 60 e 84 anos, divididos em 2 grupos conforme o diagnóstico médico, tontura de origem vascular ou metabólica. Os pacientes passaram por anamnese, aconselhamento, avaliação da qualidade de vida (escala de quantificação da tontura e Dizziness Handicap Inventory brasileiro) e a RV propriamente dita que se baseou no protocolo de Cawthorne e Cooksey. A análise estatística dos dados

foi feita através do teste t-Student, para comparações de amostras pareadas, usando um teste de hipótese bilateral; os coeficientes de Pearson e de Spearman foram usados no estudo de correlações. Observou-se que o idoso portador de labirintopatia de origem metabólica ou vascular, possui idade média de 70,2 anos, diagnóstico prevalente no grupo metabólico de diabetes mellitus e no grupo vascular de hipertensão arterial sistêmica. Pelas escalas utilizadas podemos observar que os aspectos avaliados por meio do DHI (físico, emocional, funcional e geral) e escala de quantificação de tontura, melhoraram após a intervenção terapêutica pela Reabilitação Vestibular nos idosos portadores de labirintopatias de origem vascular e metabólica. Contudo não se observou diferença significativa nas escalas do DHI e quantificação da tontura pós RV entre os grupos metabólico e vascular. Observou-se ainda, neste estudo, correlação significativa entre a escala de quantificação da tontura com o DHI pré e pós-tratamento. Pelas questões abordadas no DHI houve um incremento na qualidade de vida de todos os idosos em estudo. O período de terapia mediante RV variou de quatro a dez sessões terapêuticas. Assim, levando em consideração os dados epidemiológicos do envelhecimento no Brasil e sabendo que a grande parte dos idosos com afecções otoneurológicas tem origem vascular e metabólica, conclui-se que a RV baseada nos protocolos de Cawthorne e Cooksey pode ser utilizada de modo benéfico nesta população, trazendo inclusive impacto positivo na qualidade de vidas destes indivíduos.

AVALIAÇÃO DO METABOLISMO PROTÉICO EM IDOSOS BRASILEIROS INDEPENDENTES UTILIZANDO A GLICINA MARCADA COM ¹⁵N

Karina Pfrimer

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Ferrioli

Dissertação de Mestrado apresentada em 22/02/2006

O metabolismo protéico em idosos, analisado pela medida da velocidade de reciclagem, é um im-

portante fator para a análise da manutenção da massa muscular e das atividades de vida diária. Dados coletados em idosos apontam uma redução da síntese protéica com o envelhecimento. Outros relatam ser esta mantida e a degradação aumentada. Esta investigação teve por objetivo avaliar o metabolismo pro-

téico de idosos saudáveis e independentes utilizando a glicina, marcada com o isótopo ^{15}N . Sete idosos saudáveis foram estudados. Foram feitas avaliações clínicas, nutricionais e bioquímicas em todos os voluntários, sendo excluídos aqueles portadores de doenças ou usuários de medicamentos que interferissem no metabolismo protéico. Foi oferecida uma dose oral de 200 mg de ^{15}N -Glicina e coletadas amostras de sangue e urina (basal, antes do consumo da glicina, quatro horas e meia e nove horas após a ingestão da glicina). Foram quantificados amônia, uréia e nitrogênio total e as amostras analisadas por espectrometria de massa, para a determinação do enriquecimento

isotópico (^{15}N). Os voluntários tinham $65,4 \pm 2,8$ anos (média \pm desvio padrão), quatro mulheres e três homens, com IMC de $22,73 \pm 2,4$ Kg/m². Total de nitrogênio excretado de $3,31 \pm 0,7$ gN/9horas e a ingestão de $7,76 \pm 1,0$ gN/9horas, o fluxo de nitrogênio foi de $30,36 \pm 6,3$ gN/9horas, o balanço nitrogenado de $4,46 \pm 1,0$ g/N. Os valores encontrados nesta pesquisa foram similares aos da literatura para idosos e menores que os referidos para jovens. Este estudo estabeleceu os valores do metabolismo protéico em idosos saudáveis, ingerindo alimentação típica (arroz e carne moída), o que permitirá posteriores estudos de intervenção.

EVOLUÇÃO PÓS-ENTERECTOMIA DO QUADRO ERITROCITÁRIO, BIOQUÍMICO RELACIONADO AO METABOLISMO DO FERRO E MONITORAÇÃO DA FERREMIA APÓS A INGESTÃO DE DIFERENTES COMPOSTOS E DOSES DE FERRO NESTES PACIENTES

Fabiola Rainato Gabriel

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Dutra de Oliveira
Dissertação de Mestrado apresentada em 23/02/2006

Em ressecções intestinais, ocorre uma diminuição da superfície absorptiva e alterações na motilidade, resultando em má-absorção e má-nutrição. Dentre as deficiências nutricionais, a carência de ferro merece destaque. Os objetivos foram verificar a evolução do quadro eritrocitário e bioquímico relacionado ao metabolismo do ferro, pós-enterectomia; monitorar a ferremia, após a ingestão de diferentes compostos e doses de ferro nestes pacientes. Realizou-se na Unidade Metabólica do HCFMRP-USP/RP e dividiu-se em duas etapas. Na primeira (1^a), coletou-se os dados eritrocitários e bioquímicos de 37 pacientes, pós-cirurgia. Na segunda (2^a) participaram 13 pacientes voluntários de ambos os sexos. Os compostos de ferro avaliados foram: Sulfato ferroso (SF); Ferro EDTA (EDTA); Fração Celular Desidratada (FCD). Os pacientes foram distribuídos ao acaso, entre os grupos: Dose Farmacológica - DFA (120 mg) e Dose Fisiológica - DFI (5mg) e entre os compostos de ferro. Também, montou-se um grupo controle (C) de indivíduos sem enterectomia, recebendo a FCD (5 mg). Os indivíduos (n: 7) que receberam a DFA, participaram 2

dias de teste. Os que receberam (n: 6) DFI, submeteram a 3 dias e o grupo C (n:7), a 1 dia, com intervalo de um mês entre um composto e o outro. Os voluntários permaneceram por 8 horas em jejum. As amostras foram coletadas em 0,25, 0,5, 1 e 2 horas. (1^a) Os dados eritrocitários e bioquímicos foram ajustados a um modelo de efeitos aleatórios. (2^a) Foram calculadas as curvas de ferremia e a soma da área sob a curva, ajustadas um modelo linear de efeitos mistos ($p < 0,05$). (1^a) Evidenciou-se que, 48,65% dos pacientes pós-enterectomia, tende a valores mais baixo de ferritina e 78% a frequência de concentração de hemoglobina abaixo da normalidade. Houve um aumento gradativo ($p < 0,05$) do ferro sérico e alteração dos dados eritrocitários ($p < 0,05$). (2^a) Os níveis séricos do SF de 120 mg foram superiores ($p < 0,005$). Os resultados das áreas sob a curva demonstram diferença significativa entre SF 120 x C ($p = 0,0065$) e SF 5 x C ($p = 0,0067$). Pudemos concluir que, vários pacientes pós-enterectomia apresentaram em algum momento, alterações eritrocitárias e bioquímicas caracterizando um quadro de anemia microcítica e hipocrômica. Os diferentes compostos de ferro resultaram níveis séricos diferentes. O SF (120mg de ferro elementar) foi o composto mais biodisponível, com níveis séricos maiores em relação às outras doses e compostos.

EFEITO DA APLICAÇÃO DE EXERCÍCIOS RESPIRATÓRIOS EM PACIENTES COM SÍNDROME DE HIPOVENTILAÇÃO ALVEOLAR POR OBESIDADE

Aurélia de Freitas Anibal Vilar

Orientadora: Profa. Dra. Geruza Alves da Silva

Dissertação de Mestrado apresentada em 23/02/2006

A síndrome de hipoventilação alveolar por obesidade (SHAO), caracteriza-se por obesidade, sonolência diurna e hipoventilação alveolar (hipóxia, $\text{PaO}_2 < 70$ mmHg e hipercapnia, $\text{PaCO}_2 > 43$ mmHg). Existe associação da apnéia obstrutiva do sono na SHAO e, quando presente, faz agravar o quadro clínico da hipoventilação alveolar. A perda de peso nestes pacientes pode melhorar as alterações ventilatórias, porém geralmente ocorre em longo prazo. Os objetivos do presente estudo foram comparar a resposta gasométrica (PaO_2 , PaCO_2 e SatO_2), identificar os índices de esforço físico (Escala de Borg) e avaliar o sono (índice de apnéia e hipopnéia - IAH, número de despertares e dessaturação mínima de oxigênio) pré e pós-treinamento muscular respiratório nos pacientes com SHAO. Foram selecionados dez pacientes com diagnóstico de síndrome de hipoventilação alveolar

por obesidade, 6 do sexo feminino, idade de $50 \pm 9,4$ anos (média \pm D.P.) e índice de massa corporal (IMC) $42,6 \pm 9,9$ Kg/m². Apresentavam valores gasométricos pré-treinamento, $\text{PaO}_2 = 65,3 \pm 7,4$ mmHg, $\text{PaCO}_2 = 46,9 \pm 5,1$ mmHg e $\text{SatO}_2 = 91,9 \pm 3,3\%$. Após realizarem o treinamento muscular respiratório não expressaram perda de peso significativa pelo IMC ($p = 0,8196$), mas atingiram melhora significativa de PaO_2 ; PaCO_2 e SatO_2 ($p = 0,0013$; $p = 0,0023$ e $p = 0,0195$ respectivamente), obtendo ainda melhora do índice de esforço físico ($p = 0,0020$). Quanto aos dados do sono comparados pré e pós-treinamento muscular respiratório, não demonstraram diferença significativa para o IAH ($p = 0,4044$), dessaturação mínima de oxigênio ($p = 0,5230$) e número de despertares ($p = 0,8860$). Os exercícios respiratórios possivelmente melhoram os níveis de hipoxemia e hipercapnia e aumentam a resistência muscular respiratória observada pelo escala de Borg. Não houve alteração na qualidade do sono, baseada no IAH, no número de despertares e na dessaturação mínima de oxigênio.

INFLUÊNCIA DA INTERLEUCINA 12 ENDÓGENA NA PATOGÊNESE DA GLOMERULONEFRITE MESANGIAL AGUDA EM CAMUNDONGOS INDUZIDA POR ANTI-SORO ANTICÉLULAS MESANGIAIS

Eloisa Modesto Russo

Orientador: Prof. Dr. Márcio Dantas

Dissertação de Mestrado apresentada em 02/03/2006

Alguns estudos vêm demonstrando que a interleucina-12 tem participação na fisiopatologia de algumas formas de glomerulonefrites experimentais, mas os seus efeitos intraglomerulares ainda são pouco conhecidos. Este estudo teve como objetivo avaliar a influência da IL12 na evolução da glomerulonefrite mesangial aguda (GMA) induzida em camundongos pelo anti-soro de carneiro anticélulas mesangiais (SAM), modelo experimental este recentemente descrito.

Materiais e Métodos: SAM foi administrado na dose de 150 μL /dia por 3 dias consecutivos, pela via intravenosa, em camundongos IL12 *knockout* (grupo IL12^{-/-}-SAM) e em camundongos C57BL/6, sua linhagem de origem, IL12 positivos (grupo IL12^{+/+}+SAM). Outros camundongos IL12^{+/+} e IL12^{-/-} receberam soro de carneiro não imunizado (SC) passando

a compor os grupos IL12^{+/+}SC e IL12^{-/-}SC, respectivamente. Os camundongos foram avaliados após 7 e 14 dias do início do experimento através da albuminúria [índice (concentração urinária de albumina mg/mL)/concentração urinária de creatinina (mg/mL)], creatinina sérica, análise histológica, análise morfométrica (área do tufo glomerular e número de células/tufo glomerular) e da análise imunohistoquímica, pela qual foi avaliada a expressão no tufo glomerular de α -smooth muscle actin (score), colágeno IV, laminina, o número de células PCNA positivas (*proliferating cell nuclear antigen*) e o número de células MAC-2 positivas (macrófagos). Os resultados estão apresentados como mediana (primeiro quartil; terceiro quartil). Foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney U Test para comparação entre grupos independentes.

Resultados: os camundongos dos grupos IL12^{+/+}SC e IL12^{-/-}SC apresentaram tecidos renais nos parâmetros da normalidade e dosagens indetectáveis de albuminúria. Nos grupos IL12^{+/+}SAM e IL12^{-/-}SAM

a relação entre a excreção urinária de albumina/creatinina no D7 foi de 48 (39,0; 61,5) e de 75, respectivamente ($p=0,07$) e no D14 foi de 68,0 (49,0; 96,5) e de 176,5 (160,5; 205,0), respectivamente ($p<0,05$). A creatinina sérica (mg%) no D7 foi de 0,40 (0,25; 0,45) e de 0,70 (0,35; 0,90) nos grupos IL12+/+SAM e IL12-/-SAM, respectivamente ($p=0,08$), e no D14 de 0,5 (0,4; 0,6) e de 0,7, respectivamente ($p<0,05$). O número de células/tufo glomerular no D7 foi de 31,3 (30,5; 32,4) no grupo IL12+/+SAM e de 26,1 (21,9; 29,4) no grupo IL12-/-SAM ($p<0,05$) e, no D14, de 33,5 (31,5; 35,1) e de 26,9 (25,6; 30,5), respectivamente ($p<0,05$). O grupo IL12-/-SAM sempre apresentou o número de células/tufo glomerular, no D7 e D14, semelhante ao seu grupo controle IL12-/-SC. O número de células glomerulares PCNA positivas no D7 foi de 2,16 (2,02; 2,34) e de 0,60 (0,28; 1,20) nos grupos IL12+/+ e IL12-/-, respectivamente ($p<0,05$), ambos tratados com SAM, enquanto que no D14 não houve diferença estatística

entre estes dois grupos. O número de macrófagos/tufo glomerular no grupo IL12+/+SAM foi de 0,64 (0,08; 1,08) no D7, com tendência de maior número ($p=0,066$) em relação ao seu grupo controle IL12+/+SC, de 0,12 (0,04; 0,22), mas esta tendência não ocorreu no D14 quando o número de macrófagos glomerulares do grupo IL12+/+SAM, que foi de 0,10 (0,06; 0,28), não diferiu do grupo IL12+/+SC. Por outro lado, o grupo IL12-/-SAM apresentou, no D14, tendência de maior número de macrófagos intraglomerulares em relação ao grupo IL12+/+SAM, porém sem atingir significância estatística ($p=0,059$) e apresentou diferença estatística em relação ao IL12-/-SC ($p<0,05$). Em conclusão, os resultados da albuminúria e creatinina sérica mais elevados no D14, sugerem que a evolução da GMA neste modelo experimental mostrou-se mais prolongada na ausência da interleucina-12, associada à menor proliferação celular e tendência para infiltração de macrófagos mais tardia nos camundongos IL12-/-.

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM CREATINA EM PARÂMETROS RESPIRATÓRIOS E NA CAPACIDADE MÁXIMA DE EXERCÍCIO DE RATOS PORTADORES DE MIOPATIA POR CORTICOSTERÓIDES

Luciana Gomes Menezes

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Baddini Martinez
Dissertação de Mestrado apresentada em 02/03/2006

O presente estudo teve como objetivo estudar os efeitos da suplementação com creatina sobre a capacidade máxima de exercício e parâmetros respiratórios de ratos com miopatia induzida por altas doses de esteróides. Foram estudados 44 ratos Wistar machos submetidos a um teste de exercício máximo incremental. Eles foram então aleatoriamente distribuídos em quatro grupos: GI, tratado com solução salina subcutânea (SC) e intraperitoneal (IP); GII, tratado com salina SC e creatina (250 mg/kg/dia) IP; GIII, tratado com dexametasona SC (7,5 mg/kg/dia) e salina IP e GIV, tratado com dexametasona SC e creatina IP. Após 18 dias de tratamento, um novo teste de exercício máximo e análise do padrão respiratório em condições de repouso e após estimulação com doxapran (2 mg/kg IP) foram realizados. Após o tratamento, o peso corporal diferiu de maneira significativa entre todos os grupos (GI: $230 \pm 12,9$ g X GII: $259,6 \pm 6,5$ g X GIII: $148,6 \pm 2,8$ g X GIV: $177,2 \pm 2,8$ g), assim como o consumo máximo de oxigênio (GI: $4,77 \pm 0,14$ l/kg/h X GII: $5,73 \pm 0,23$ l/kg/h X GIII: $2,86 \pm 0,27$ l/kg/h X GIV:

$4,00 \pm 0,16$ l/kg/h). A frequência respiratória de GIII foi significativamente superior a dos demais grupos, tanto em condições basais (GI: $111,8 \pm 2,4$ ipm X GII: $110,9 \pm 5,3$ ipm X GIII: $150,6 \pm 0,1$ ipm X GIV: $136,4 \pm 0,1$ ipm) como também após o uso de doxapran (GI: $140,5 \pm 2,7$ ipm X GII: $139,5 \pm 7,0$ ipm X GIII: $196,2 \pm 7,0$ ipm X GIV: $178,2 \pm 2,4$ ipm). O peso médio do músculo gastrocnêmio diferiu de maneira significativa entre todos os grupos (GI: $1,66 \pm 0,15$ g X GII: $1,87 \pm 0,14$ g X GIII: $0,77 \pm 0,10$ g X GIV: $0,96 \pm 0,13$ g), mas diferenças significantes no peso diafragmático de GIII só foram observadas em comparação a GI e GII (GI: $0,65 \pm 0,06$ g X GII: $0,8 \pm 0,13$ g X GIII: $0,29 \pm 0,05$ g X GIV: $0,42 \pm 0,09$ g). O diâmetro mínimo médio das fibras tipo I, IIa e IIb do GIII do gastrocnêmio diferiu de maneira significativamente inferior dos valores de todos os grupos. Quanto às fibras diafragmáticas, a única diferença significativa encontrada foi entre o diâmetro mínimo médio das fibras tipo IIb do GIII. Os resultados sugerem que a creatina protegeu os ratos contra os efeitos nocivos das altas doses de dexametasona sobre a composição corporal e desempenho máxima de exercício, mas mostrou efeitos apenas modestos nas mudanças do padrão respiratório induzidas pelo esteróide.

PSEUDOMONAS AERUGINOSA RESISTENTE A MÚLTIPLOS ANTIMICROBIANOS: AVALIAÇÃO DO SEU MECANISMO DE DISSEMINAÇÃO NA UNIDADE DE EMERGÊNCIA DO HCFMRP-USP COM BASE NA ANÁLISE DE FATORES DE RISCO DOS PACIENTES E NA GENOTIPAGEM DAS AMOSTRAS

Denissani Aparecida Ferrari dos Santos Lima

Orientador: Prof. Dr. José Fernando de C. Figueiredo
Dissertação de Mestrado apresentada em 03/03/2006

O objetivo de nosso estudo foi avaliar o mecanismo de disseminação intra-hospitalar de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a múltiplos antimicrobianos, isoladas na Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (UE-HCFMRP-USP), com base na análise de fatores de risco e na genotipagem das amostras. As cepas bacterianas analisadas em nosso estudo foram isoladas no período de janeiro de 2000 a junho de 2004. A partir de um total de 193 amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, provenientes de 126 pacientes internados na UE-HCFMRP-USP foram incluídas no estudo, 63 amostras isoladas a partir do sangue (22 amostras) e da urina (41 amostras), por serem mais indicativas de infecção hospitalar. Para avaliação dos fatores de risco, foram comparados, por meio de análise univariada, os resultados dos dados clínicos e epidemiológicos obtidos dos pacientes fonte das amostras bacterianas, multi-resistentes e sensíveis (n=43). A análise genotípica das amostras resistentes e sensíveis foi realizada

por meio de PFGE. Os fatores de risco avaliados ocorreram em proporções semelhantes entre as duas populações, portadoras de amostras MDR e sensíveis de *Pseudomonas aeruginosa*. Não houve diferença entre as duas populações em relação aos locais em que os pacientes estavam internados quando as amostras foram isoladas, em relação ao tempo de permanência nestes locais, em relação ao regime de tratamento com antimicrobianos, e ao levarmos em conta a duração total da internação e a evolução clínica final dos casos. A genotipagem evidenciou um único clone do microorganismo, que foi isolado de diferentes sítios e locais ao longo de todo o período do estudo e comprovou que a sua disseminação se deu por transmissão cruzada. Com base nos resultados obtidos conclui-se que a ausência de fatores de risco específicos nos pacientes, o modo de dispersão da bactéria no período e o perfil genotípico único apontaram para a sua disseminação por transmissão cruzada, por meio de profissionais da saúde. As mudanças verificadas na UE-HCFMRP-USP no período do estudo, em decorrência de seu novo papel como Hospital de referência terciária para a cidade de Ribeirão Preto e região, possivelmente contribuíram para o surgimento da cepa, sua persistência e disseminação no ambiente hospitalar.

MELHORIA DA ESPECIFICIDADE DA ULTRA-SONOGRAFIA NA CARACTERIZAÇÃO DE NÓDULOS MAMÁRIOS ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE MÉTODOS QUANTITATIVOS

Gustavo de Freitas Caetano

Orientador: Prof. Dr. Valdair Francisco Muglia
Dissertação de Mestrado apresentada em 03/03/2006

A ultra-sonografia é um método adjuvante frequentemente utilizado para avaliar anomalias mamárias que são encontradas pelo screening mamográfico ou durante um exame clínico das mamas. Apesar de sua alta sensibilidade, comprovada por inúmeros autores, o método possui uma baixa especificidade, com lesões de diferentes etiologias se apresentando com

as mesmas características ecográficas. Isto tem levado a procura de avanços na técnica ultra-sonográfica e a outros métodos diagnósticos auxiliares.

Este presente estudo prospectivo teve como objetivo a utilização de técnicas de reconhecimento de padrão de textura para auxiliar o diagnóstico de câncer de mama através da caracterização automatizada de nódulos em exames ultra-sonográficos dos casos que foram considerados inconclusivos.

Foram desenvolvidos algoritmos computacionais para realizar a extração de características e a quanti-

ficação de atributos de textura de nódulos presentes nas imagens de 31 pacientes, sendo 19 lesões benignas e 12 malignas. A caracterização foi feita baseada em quantificação espectral (transformada Wavelet) dos padrões apresentados nas imagens. A proposta foi aumentar a especificidade do método de inspeção visual, agregando-se as informações quantitativas, sem perda significativa de sensibilidade. Este trabalho faz parte de um sistema computadorizado ao auxílio ao diagnóstico (CAD – Computer Aided Diagnosis) em desenvolvimento no Centro de Ciências das Imagens e Física Médica (CCIFM). Assim, caso as imagens indeterminadas pelo exame mamográfico também não consigam ser determinadas pelo exame ultra-sonográfico, o sistema colaborará permitindo informações adicionais ao exame ultra-sonográfico.

Após comparação com os diagnósticos finais obtidos, verificou-se que a utilização do algoritmo obteve, com base na estatística de concordância (esta-

tística-c), um valor de c (equivalente à área sob a curva ROC) igual a 0,695. Este valor é maior do que o obtido com base nas análises efetuadas pelos radiologistas (0,645), o que mostra que a análise computadorizada pode ser utilizada na avaliação de lesões mamárias indeterminadas.

Foi possível observar que o desempenho da análise qualitativa, desenvolvida por três radiologistas experientes, foi bastante heterogênea. Este fato confirma uma justificativa do emprego do CAD, que é sua utilização para fornecer uma segunda opinião sem estar sujeita a subjetividade que pode ser influenciada por fatores como estresse e cansaço individual.

Os resultados obtidos permitem supor que a utilização deste algoritmo com a ultra-sonografia de mama pode contribuir para a melhoria da especificidade do método. Além disso, o algoritmo pode diminuir o componente subjetivo existente na interpretação dos exames.

REANIMAÇÃO CARDIOPULMONAR INTRA-HOSPITALAR NA UNIDADE DE EMERGÊNCIAS DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

José Carlos dos Santos

Orientador: Prof. Dr. André Schmidt

Dissertação de Mestrado apresentada em 06/03/2006

A parada cardiorrespiratória intra-hospitalar apresenta características peculiares, em relação ao atendimento extra-hospitalar, pouco conhecidas para hospitais brasileiros. Este estudo analisou as principais características clínicas e demográficas dos pacientes com parada cardiorrespiratória em hospital terciário de emergências, bem como sua evolução imediata e tardia, na tentativa de ampliar o conhecimento sobre dados que possam auxiliar a melhoria do atendimento prestado. Utilizou-se o modelo Utstein para registrar prospectivamente as características do atendimento de 811 pacientes ($58,2 \pm 19,9$ anos; 64,2% do sexo masculino) que apresentaram parada cardiorrespiratória entre 1º de fevereiro de 2002 e 31 de janeiro de 2003. As manobras de reanimação foram implementadas em 315 (TENT - 38,8%; $56,6 \pm 19,5$ anos; 64,4% sexo masculino) com sobrevida imediata de 38,7%, sobrevida para alta hospitalar de 4,8% e so-

brevida com um ano de seguimento de 2,9%. A comparação com o grupo de 496 pacientes em que as manobras não foram iniciadas (NTENT - 61,2%; $58,8 \pm 20,0$ anos; 64,1% sexo masculino) mostrou diferenças em relação ao tempo de internação (NTENT - $10,2 \pm 17,6$ dias x TENT - $4 \pm 8,9$ dias), causa imediata do evento (NTENT – hipotensão - 53,6% x TENT - hipotensão - 38,8% e insuficiência respiratória - 31,1%), presença de monitorização do ritmo cardíaco (NTENT – 58,8% x TENT - 70,8%), intubação endotraqueal (NTENT – 72% x TENT - 62,2%) e o uso de aminas vasoativas (NTENT – 51,2% x TENT - 40%), bem como quanto ao ritmo cardíaco inicial (NTENT – assistolia 45,8%; atividade elétrica sem pulso 4,8%; fibrilação ventricular / taquicardia ventricular sem pulso 0,8% x TENT – assistolia 32,7%; atividade elétrica sem pulso 27,6%; fibrilação ventricular/ taquicardia ventricular sem pulso 15,6%). Dos pacientes submetidos às manobras de reanimação, 122 apresentaram recuperação da circulação espontânea (RCE - $56,5 \pm 17,7$ anos; masculino: 56,6%) e suas características foram comparadas com aqueles que não apresentaram recuperação da circulação (NRCE -

57,7±20,7 anos; masculino: 69,4%), sendo encontrado diferenças para o tempo de internação (NRCE - 3,5±5,6 dias x RCE - 4,8±12,5 dias), para a causa imediata (NRCE - hipotensão 42% x RCE - hipotensão 33,6%; insuficiência respiratória 33,6%), presença de monitorização do ritmo cardíaco (NRCE 78,2% X RCE 86,9%), intubação endotraqueal (NRCE 56,5% X RCE 71,3%) e o uso de aminas vasoativas (NRCE 39,9% X RCE 36,9%), bem como para o ritmo cardíaco ini-

cial (NRCE - assistolia 36,2%; atividade elétrica sem pulso 22,8%; fibrilação ventricular / taquicardia ventricular sem pulso 13,5% x RCE - assistolia 27%; atividade elétrica sem pulso 35,2%; fibrilação ventricular/ taquicardia ventricular sem pulso 18,9%). O conhecimento destes dados permitiu uma análise crítica do serviço, apontando para a necessidade de revisão do processo do atendimento e da documentação dos eventos como método rotineiro de qualidade.

INFUSÃO DE GLICOSE E TIAMINA EM RATOS TRATADOS COM DOSE AGUDA DE ETANOL

Guilherme Vannucchi Portari

Orientador: Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior

Dissertação de Mestrado apresentada em 24/03/2006

Postula-se que o metabolismo do etanol gera substâncias de alta reatividade como o acetaldeído e radicais livres, que promovem o estresse oxidativo pelo excessivo consumo de substâncias do sistema antioxidante.

Embora não haja consenso na literatura, o uso intravenoso de glicose em casos de intoxicação aguda por álcool é prática rotineira visando restabelecer a sobriedade do paciente através de um possível aumento do metabolismo do etanol.

Apesar de se acreditar em um possível benefício do uso de glicose na intoxicação aguda por etanol, recentes estudos têm apontado que a hiperglicemia causa autooxidação da glicose, glicação de proteínas, e a ativação do metabolismo de polióis. Estas mudanças aceleram a geração de espécies reativas de oxigênio e aumento na oxidação de lipídios, DNA e proteínas em vários tecidos, pela produção de produtos finais de glicação avançada (AGEs - *Advanced glycation end products*).

Recentemente estudos têm apontado para um possível papel antioxidante da tiamina frente ao estresse oxidativo.

Este trabalho teve como objetivo a padronização de uma técnica para dosagem de etanol por cromatografia gasosa a fim de se estudar os efeitos sobre o metabolismo desse álcool em ratos agudamente alcoolizados e submetidos a 3 tratamentos distintos que consistiram na administração de etanol na dose de 5g/kg peso, administração de etanol e posterior infusão

endovenosa de glicose (0,06 mL de glicose em solução 50%/100 g de peso) ou administração de etanol e posterior infusão endovenosa de tiamina (0,143 mg/100 g de peso), bem como verificar os efeitos sobre o sistema antioxidante hepático, pela determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), glutathiona reduzida (GSH) e vitamina E.

A padronização da técnica por cromatografia gasosa para dosagem de etanol em sangue e urina foi realizada, obtendo-se bons resultados quanto à, precisão (C.V. entre amostras < 6%), exatidão (variação da recuperação < 15%) e linearidade ($r=0,9991$), o que permitiu analisar a alcoolemia e a excreção urinária dos grupos de ratos com diferentes tratamentos. Nesta determinação também foi possível a detecção de substâncias relacionadas ao metabolismo do etanol como, acetaldeído, acetona e metanol.

Não foram observadas diferenças entre as curvas de etanolemia dos diferentes grupos. Entretanto, verificou-se uma excreção urinária cerca de 4 vezes maior no grupo que recebeu tiamina. Observou-se uma menor produção de substâncias relacionadas com a peroxidação lipídica (TBARS) e um menor consumo de antioxidantes (GSH e vitamina E) nos ratos tratados com tiamina, mesmo tendo-se verificado neste grupo uma manutenção da hiperglicemia até o período final de experimentação.

Desta maneira, conclui-se que o tratamento com glicose no quadro de intoxicação aguda por etanol foi ineficaz na diminuição da etanolemia além de representar maior potencial de dano oxidativo. Em contraste, a tiamina mostrou-se eficaz principalmente no que diz respeito à manutenção do sistema antioxidante hepático.

FARMACOLOGIA**PARTICIPAÇÃO DAS QUIMIOCINAS MIP-1 α E MIP-2 NO RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS NA INFLAMAÇÃO DE ORIGEM IMUNE. MECANISMOS ENVOLVIDOS NA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS PARA A CAVIDADE PERITONEAL INDUZIDA POR KC E MIP-2****Cleber Douglas Lucinio Ramos**

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha

Tese de Doutorado apresentada em 20/01/2006

Neste presente estudo, investigamos o envolvimento da quimiocinas MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, KC e MIP-2, tão bem como os receptores para quimiocinas CC e CXC na migração de neutrófilos induzida por OVA em camundongos imunizados. O desafio i.p. com OVA em camundongos imunizados induziu recrutamento de neutrófilos de maneira dose e tempo dependente. A migração de neutrófilos induzida por OVA foi acompanhada pelo aumento da expressão de RNAm para MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, KC, MIP-2, CCR1 e CXCR2. Além disso, a produção de MIP-1 α , RANTES, KC e MIP-2, mas não de MIP-1 β foi verificada no lavado peritoneal de camundongos imunizados e desafiados com OVA. OVA faliu em induzir migração de neutrófilos em camundongos MIP-1 α ^{-/-} imunizados ou em camundongos WT tratados com α -MIP-2. Entretanto, o tratamento com anticorpos α -RANTES, α -MIP-1 β ou α -KC não inibiu o recrutamento de neutrófilos induzido por OVA em camundongos imunizados. MIP-1 α induz migração de neutrófilos através da indução da síntese de TNF α , and LTB₄, pois: a liberação desses mediadores foi detectada no lavado peritoneal de camundongos WT imunizadas, mas não em camundongos MIP-1 α ^{-/-}; a administração de MIP-1 α em camundongos WT induziu migração de neutrófilos de maneira dose dependente, sendo inibida pelo tratamento com α -TNF α , ou pelo uso de camundongos deficientes para o TNFR1 (p55^{-/-}), ou pelo tratamento com MK 886 (inibidor da 5-lipoxigenase); e ao contrario de camundongos WT, MIP-1 α faliu em induzir a produção de LTB₄ em camundongos p55^{-/-}. Os resultados também demonstram que MIP-1 α liga-se ao receptor CCR1 para induzir migração de neutrófilos, desde que, em contraste com camundongos CCR5^{-/-}, OVA e MIP-1 α faliu em induzir recrutamento de neutrófilos em camundongos CCR1^{-/-}.

Com o intuito de estudarmos a participação de quimiocinas CXC chemokines na migração de neutrófilos induzida por OVA, camundongos BALB/c naíve ou imunizados foram pré-tratados com repertaxina (antagonista do CXCR2). Os resultados demonstram que repertaxina foi efetiva em inibir a migração de neutrófilos induzida por OVA e MIP-2. Assim como MIP-1 α , os resultados mostram que a migração de neutrófilos induzida pela MIP-2 depende da produção de TNF α and LTB₄, uma vez que o pré-tratamento dos camundongos com α -TNF α ou MK886 significativamente inibiu o recrutamento de neutrófilos induzido por esta quimiocina. Seguidamente, testamos a hipótese de que MIP-2 estaria induzindo migração de neutrófilos dependentemente da liberação de MIP-1 α . Deste modo, que MIP-2 faliu em induzir recrutamento de neutrófilos em camundongos MIP-1 α ^{-/-}. Confirmando este resultado, o anticorpo α -MIP-1 α foi efetivo em inibir a migração de neutrófilos induzida por MIP-2. Além disso, MIP-2 induziu a produção de MIP-1 α , TNF α e LTB₄ e, este efeito foi bloqueado pelo tratamento dos camundongos com α -MIP-1 α .

Na segunda parte deste estudo, investigamos os mecanismos envolvidos no recrutamento de neutrófilos induzido por KC e MIP-2 para a cavidade peritoneal de camundongos. Primeiramente, observamos que a administração i.p. de KC ou MIP-2 induz migração de neutrófilos de maneira dose e tempo dependente. Os resultados indicam que o acúmulo de neutrófilos induzido por estas quimiocinas é dependente da produção e liberação de TNF α e LTB₄, pois o pré-tratamento dos camundongos com α -TNF α ou MK886 inibiu significativamente a migração de neutrófilos induzida por KC e MIP-2. Confirmando o envolvimento do TNF α , MIP-2 e KC induziram reduzida migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos p55^{-/-}, quando comparados com os camundongos WT. Além disso, a migração de neutrófilos induzida por KC, mas não por MIP-2 foi significativamente inibida pelo tratamento com IL-1ra (antagonista do

receptor da IL-1), sugerindo o envolvimento desta citocina na migração de neutrófilos induzida por KC.

A migração de neutrófilos induzida por MIP-2 e KC é dependente de macrófagos residentes peritoneais, desde que a administração destas quimiocinas em camundongos pré-tratados com tioglicolato induziu exarcebada migração de neutrófilos quando comparado com camundongos controle. Confirmando a dependência de macrófagos, a administração i.p. com o sobrenadante de macrófagos estimulados *in vitro* com KC ou MIP-2 induziu significativa migração de neutrófilos em camundongos naive. Além disso, significativa concentração de IL-1 β , TNF α e LTB $_4$ foi verificada nestes sobrenadantes. Surpreendentemente, a administração de KC e MIP-2 em camundongos depletados de mastócitos residentes peritoneais induziu

uma potencializada migração de neutrófilos quando comparada com os camundongos controle.

Em resumo, nossos resultados demonstram que a migração de neutrófilos observada no modelo de imunização e desafio com OVA é mediada pela interação entre MIP-2/CXCR2, induzindo a produção de MIP-1 α , que por sua vez, agindo via CCR1, induz a liberação sequencial de TNF α e LTB $_4$. Com relação a migração de neutrófilos induzida por MIP-2 e KC, os resultados sugerem que estas quimiocinas induzem recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos dependentemente de macrófagos residentes, e liberação de TNF α e LTB $_4$. Interessantemente, observamos também que mastócitos controlam negativamente a migração de neutrófilos induzida por estas quimiocinas.

MEDIAÇÃO ESPINAL DA VIA DESCENDENTE FACILITATÓRIA DA NOCICEPÇÃO

João Walter de Souza da Silveira

Orientador: Prof. Dr. William Alves do Prado

Dissertação de Mestrado apresentada em 17/02/2006

Embora a maioria dos estudos envolvendo o controle descendente da dor tenha focado o controle inibitório de processos nociceptivos espinais, estudos mais recentes apontam para a existência de mecanismos descendentes facilitatórios paralelos. Loci comuns em várias áreas encefálicas dão origem a vias que levam à facilitação ou inibição da transmissão nociceptiva espinal. A existência de múltiplos neurotransmissores liberados de diferentes tipos de neurônios no corno dorsal, torna complexo o estudo da modulação espinal da nocicepção. Além disso, é sabido que um único neurotransmissor pode mediar tanto a facilitação quanto a inibição através da ativação de múltiplos subtipos de receptores acoplados a diferentes mecanismos de transdução intracelular, ou então, de um único tipo de receptor localizado em diferentes classes de neurônios alvos funcionalmente diferentes. O objetivo desse estudo foi avaliar a mediação espinal da via descendente facilitatória da nocicepção. Para tanto, foi feita administração intratecal de antagonistas antes de incisão na pata direita de ratos. Duas horas após a incisão, os animais foram sacrificados e suas medulas retiradas para realização de imunohistoquímica c-Fos. Numa primeira etapa, vimos que antagonista de receptores serotoninérgicos, mas não coli-

nérgicos muscarínicos nem α -adrenérgicos, impediu parcialmente, o aumento do número de células c-Fos-imunorreativas (IR-Fos) nas lâminas I/II e V do corno dorsal da medula espinal especialmente no lado ipsilateral, desencadeado pela incisão. Numa segunda etapa, vimos que a metiotepina (antagonista de receptores serotoninérgicos 5-HT $_{1a/b/d}$, 5-HT $_{2a/c}$, 5-HT $_{5a}$, 5-HT $_6$ e 5-HT $_7$) inibiu o aumento da IR-Fos desencadeado pela incisão, nas lâminas I/II e V do corno dorsal e no corno ventral, bilateralmente, e na lâmina X. Já a ketanserina (antagonista de receptores serotoninérgicos 5-HT $_{2a/c}$) inibiu na lâmina V contralateral, na lâmina X e no corno ventral ipsilateral, de forma semelhante ao LY 278,584 (antagonista de receptores serotoninérgicos 5-HT $_3$) que também inibiu nas lâminas I/II no lado contralateral. Analisando nossos resultados em conjunto com dados já existentes na literatura, sugerimos que mecanismos facilitatórios descendentes se utilizam principalmente de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT $_{1a}$ presentes em interneurônios inibitórios na medula espinal. Efeitos facilitatórios descendentes são mediados por múltiplos subtipos de receptores serotoninérgicos na lâmina V no lado contralateral à incisão. Muito provavelmente refletindo a importância da facilitação descendente no desenvolvimento de hipernocicepção secundária na pata contralateral. No corno ventral, é provável que os receptores serotoninérgicos 5-HT $_3$, 5-HT $_{2a}$ e 5-HT $_7$ sejam os responsáveis pelos efeitos serotoninérgicos descendentes facilitatórios nesse nível.

NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL ENVOLVIDA NA MODULAÇÃO DO SISTEMA CARDIOVASCULAR DE RATOS: UMA VIA RECEPTOR NMDA/ ÓXIDO NÍTRICO

Leonardo Resstel Barbosa Moraes

Orientador: Prof. Dr. Fernando M. de Aguiar Corrêa
Tese de Doutorado apresentada em 17/02/2006

Tem sido atribuída à porção ventral do córtex pré-frontal medial (vCPFM) a capacidade de influenciar a atividade cardiovascular em ratos. Essa influência do vCPFM sobre a atividade cardiovascular parece ser apenas modulatória, uma vez que sua destruição ou inativação não altera os valores basais da pressão arterial e frequência cardíaca.

A modulação do sistema cardiovascular exercida pelo vCPFM pode ser observada sobre a atividade do barorreflexo. Dentre vários neurotransmissores presentes no vCPFM, envolvidos com respostas cardiovasculares, o L-glutamato (L-glu) aparece como candidato a neuromodulador da atividade do barorreflexo. Além disso, pouco se sabe sobre a influência da neurotransmissão glutamatérgica do vMPFC sobre o sistema cardiovascular.

Nossos dados mostram que o sistema glutamatérgico do vCPFM modula tonicamente a atividade parassimpática do barorreflexo, sem alterar o compo-

nente simpático, através de receptores NMDA. Além disso, a administração de L-glu no vCPFM de ratos não anestesiados causa aumento da pressão arterial, como consequência do aumento da frequência cardíaca, dependente da atividade simpática cardíaca. Da mesma forma que a modulação da atividade do barorreflexo, as respostas cardiovasculares desencadeadas pela administração de L-glu no vCPFM também são dependentes de receptores NMDA.

A síntese de óxido nítrico pela isoforma neuronal da oxido nítrico sintase (nNOS) está associada a ativação de receptores NMDA no sistema nervoso central. Com base nesse dado, nós observamos que tanto a modulação do barorreflexo quanto as respostas cardiovasculares causadas pela ativação de receptores NMDA dependem da síntese de óxido nítrico via nNOS.

Em resumo, nossos resultados sugerem que o sistema glutamatérgico presente no vCPFM, interagindo com o sistema nitrérgico através de receptores NMDA, está envolvido com a modulação cardíaca, mais especificamente facilitando tonicamente o componente parassimpático do barorreflexo e aumentando a atividade simpática cardíaca.

EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM A CLOMIPRAMINA NA MEDIAÇÃO DE RESPOSTAS AVERSIVAS PELO ÓXIDO NÍTRICO

Fabício de Araújo Moreira

Orientador: Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães
Tese de Doutorado apresentada em 31/03/2006

O óxido nítrico (NO) é um neurotransmissor gasoso, sintetizado pela sintase do óxido nítrico (*Nitric Oxide Synthase*, NOS). A distribuição dessa enzima no sistema nervoso central pode ser avaliada por meio de uma técnica denominada NADPH-diaforase. A sua expressão é significativa em estruturas encefálicas implicadas na elaboração de comportamentos aversivos e relacionadas a transtornos psiquiátricos como ansiedade generalizada e pânico. Uma dessas estruturas é a matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral (MCPDL), onde a injeção de doadores de NO induz

reações aversivas em ratos. Além disso, em ratos expostos a um predador, há um aumento na expressão da proteína Fos em neurônios positivos para a NADPH-diaforase nessa e em outras estruturas, sugerindo que esses neurônios estão ativos frente a essas situações. Tais estudos sustentam a hipótese de que o NO possa ser um dos neurotransmissores responsáveis pela elaboração de reações de natureza aversiva. Porém, não está claro se os seus efeitos são atenuados pela ativação de receptores que modulam essas reações, a exemplo dos receptores de serotonina e benzodiazepínicos, ou pela administração de fármacos utilizados no tratamento dos transtornos de ansiedade e do pânico. Portanto, o primeiro objetivo deste estudo foi testar a hipótese de que a reação de fuga induzida pelo NO na

MCPDL poderia ser inibida por agonistas de receptores de serotonina ou benzodiazepínicos. Testou-se também a hipótese de que a clomipramina, uma droga inibidora da re-captção de serotonina e de noradrenalina e utilizada no tratamento do transtorno do pânico, intensificaria os efeitos aversivos dos agonistas de serotonina. O segundo objetivo foi testar a hipótese de que a ativação de neurônios positivos para NADPH-diaphorase, induzida pela exposição a um predador, poderia ser inibida pelo tratamento com a clomipramina. A injeção na MCPDL do agonista de receptores 5HT_{2A/2C} de serotonina (DOI, 8 nmol) ou do benzodiazepínico midazolam (80 nmol), mas não do agonista

5HT_{1A} (8-OH-DPAT, 8 ou 16 nmol), inibiu a reação de fuga induzida pela injeção local do doador de NO SIN-1 (150 nmol). Esses efeitos não foram modificados pelo tratamento crônico (21 dias) com a clomipramina (10 mg/kg/dia). A exposição de ratos a um gato induziu respostas defensivas e um aumento na expressão de Fos em neurônios positivos para a NADPH-diaphorase, efeitos parcialmente atenuados pelo tratamento com a clomipramina (20 mg/kg/dia). Em conclusão, os presentes resultados mostram que a participação do NO em respostas aversivas pode ser modulada por receptores de serotonina e benzodiazepínicos, e por um fármaco de ação panicolítica.

FISIOLOGIA

ASPECTOS MORFO-FUNCIONAIS DA REDE NEURAL PARA CONTROLE DA SECREÇÃO DE HORMÔNIO LIBERADOR DE GONADOTROFINAS (GNRH): EXPRESSÃO DE ÓXIDO NÍTRICO SINTASE, RECEPTORES PARA ANGIOTENSINA II E PARA ESTRÓGENO (A E B)

Adriana Santos Moreno

Orientador: Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci
Tese de Doutorado apresentada em 24/01/2006

Os neurônios produtores de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) representam a via final comum da rede neural que integra sinais endógenos e ambientais para regular a secreção de gonadotrofinas pela adeno-hipófise. O estrógeno (E₂) e a progesterona (P₄) exercem retro-alimentação negativa sobre a secreção de hormônio luteinizante (LH) na maior parte do ciclo ovariano e retro-alimentação positiva na fase de proestro para gerar o pico pré-ovulatório de LH. Vários neuropeptídeos e neurotransmissores inibitórios e excitatórios alteram a atividade dos neurônios GnRH direta ou indiretamente para o controle da secreção de GnRH durante o ciclo estral, entre eles estão a angiotensina II (A II) e óxido nítrico (NO). Considerando que neurônios GnRH não expressam NOS (óxido nítrico sintase), mas são frequentemente circundados por neurônios NOS e evidências recentes so-

bre a interação de AII e NO, este estudo investigou se: neurônios GnRH e NO do órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT) e área preóptica medial (MPOA) expressam receptores para angiotensina (ATRs); neurônios NOérgicos expressam receptores para estrógeno (ER α ou ER β); neurônios que expressam AT₁ também expressam ER α ou ER β . Ratas Wistar, na tarde do proestro, receberam microinjeções de AII conjugada com Alexa Flúor 488 no ventrículo lateral e 2 minutos após foram sacrificadas. Os cérebros foram congelados e submetidos a imunofluorescência para GnRH ou NOS. As duplas marcações foram analisadas em microscópio confocal para confirmação de co-localização. Em outros grupos, ratas Wistar, na tarde do proestro, foram perfundidas e os cérebros submetidos à técnica de dupla imunofluorescência para NOS e ER α , NOS e ER β , AT₁ e ER α ou AT₁ e ER β .

Nossos resultados mostraram que: 1) Parte dos neurônios GnRH e NOS do OVLT e MPOA expressam ATRs; 2) Não há expressão de ER α no OVLT; 3) Neurônios NO expressam ER α e ER β na MPOA

e ER β no OVLT. 4) Há co-expressão de ER α e AT $_1$, bem como ER β e AT $_1$ em neurônios da MPOA e ER β e AT $_1$ no OVLT.

Os dados sugerem que a AII pode atuar diretamente em neurônios GnRH e talvez indiretamente (via transináptica) devido à presença de ATRs em neurônios ao redor destes. Em adição, a expressão de ATRs em neurônios NOS corrobora nossos resulta-

dos prévios que NO pode ser um mediador da ação da AII sobre os neurônios GnRH. As co-expressões de ER/AT $_1$ e ER/NO podem caracterizar uma via transináptica para controle da liberação de GnRH/LH que integra o mecanismo de retro-alimentação do E $_2$ sobre a secreção de LH. Portanto, a participação da AII e do NO na rede neural para o controle dessa secreção pode ser modulada pelo E $_2$.

PARTICIPAÇÃO DE MECANISMOS SEROTONINÉRGICOS DO NÚCLEO PARABRAQUIAL LATERAL NA MODULAÇÃO DAS RESPOSTAS NEUROENDÓCRINAS E RENAIIS ENVOLVIDAS NO CONTROLE DA HOMEOSTASE DOS LÍQUIDOS CORPORAIS

Lisandra Oliveira Margatho

Orientador: Prof. Dr. José Antunes Rodrigues

Tese de Doutorado apresentada em 27/01/2006

Neste estudo investigamos os efeitos de micro-injeções bilaterais do agonista serotoninérgico 5HT $2a$ /HT $2c$ DOI (hidroclorato de dimetoxi-4-iodoanfetamina) ou antagonista serotoninérgico metisergida no núcleo parabraquial lateral (NPBL), sobre a excreção cumulativa de sódio, potássio, volume, osmolalidade urinária em resposta à expansão isotônica do volume do líquido extracelular (EVEC) em ratos.

Sete dias antes dos experimentos, cânulas de aço inoxidável foram implantadas bilateralmente no NPBL. Os resultados obtidos indicaram que os ratos pré-tratados com metisergida (2,0 ou 8,2 nmol) no NPBL, apresentaram, em resposta à EVEC (NaCl 0,15M, 2ml/ 100g peso corporal), uma atenuação do aumento na excreção de sódio, potássio e volume urinário, normalmente observada em resposta à EVEC nos primeiros 20 min do início da coleta de urina. Os ratos pré-tratados com DOI (2,8 ou 14,0 nmol) no NPBL, apresentaram, em resposta à EVEC, um incremento na excreção de sódio, potássio e volume urinário nos primeiros 20 min da coleta de urina.

Esses resultados sugerem que a metisergida reduz o aumento na excreção de água e eletrólitos em resposta à EVEC, no entanto, estes resultados também apresentam uma informação adicional sobre o papel dos mecanismos serotoninérgicos do NPBL no controle da homeostase dos líquidos corporais, como mostrado previamente pela facilitação da ingestão de sódio após o bloqueio dos mecanismos serotoninérgi-

cos do NPBL (Menani e cols, 1996; 1998).

Paralelamente, foram conduzidos experimentos com o objetivo de se avaliar a participação do NPBL na mediação das alterações da concentração plasmática do peptídeo natriurético atrial (ANP), vasopressina (AVP) e ocitocina (OT), normalmente observados em resposta à EVEC. Os resultados obtidos a partir da dosagem de OT e ANP plasmáticos sugeriram que em animais que receberam injeções de metisergida (8,2 nmol) no NPBL houve uma atenuação na concentração plasmática de OT e ANP, normalmente observada em resposta à EVEC e um aumento da concentração plasmática da AVP, em comparação aos valores obtidos nos animais controles. DOI (14,0 nmol) no NPBL induziu um incremento na concentração plasmática de OT e ANP e a concentração plasmática de AVP não foi modificada em resposta à EVEC, em comparação aos valores obtidos nos animais controles.

Em adição, avaliamos a imunorreatividade a proteína c-Fos e a marcação citoplasmática para a ocitocina, vasopressina, serotonina (5HT) e tirosina hidroxilase (TH) em diferentes regiões do sistema nervoso central. Os resultados demonstraram a participação de grupos celulares específicos (vasopressinérgicos-ocitocinérgicos) do núcleo paraventricular (NPV) e supraóptico (NSO), grupos celulares serotoninérgicos do núcleo dorsal da rafe (NDR) e catecolaminérgicos do núcleo do trato solitário (NTS) em resposta ao mesmo paradigma experimental descrito anteriormente. Os ratos que receberam injeções de DOI (14,0 nmol) no NPBL e submetidos à EVEC, apresentaram aumento significativo no número de neurônios imunorreativos (ir) à proteína c-Fos-OT na subdivisão medial

magnocelular do NPV (PaMM) e no núcleo acessório comissural anterior (AC) em comparação aos ratos controles. Os resultados também mostraram aumento no número de neurônios ir-c-Fos-AVP em ratos que receberam injeções de metisergida (8,2 nmol) no NPBL na subdivisão lateral magnocelular do NPV (PaLM) e no NSO em comparação aos ratos controles em resposta à EVEC. Além disso, os ratos que receberam injeções de DOI no NPBL e submetidos à EVEC, apresentaram redução no número de neurônios ir-c-Fos-5HT no NDR em comparação aos animais tratados com veículo. Os ratos que receberam injeções de metisergida, apresentaram, em resposta à EVEC, aumento significativo no número de neurônios ir-c-Fos-TH no NTS, em comparação ao veículo.

Nesse estudo identificamos também os grupos neuronais que apresentaram aumento na imunorreatividade à proteína c-Fos em resposta ao estímulo agudo da EVEC isotônica e que se projetam diretamente

ao NPBL, utilizando para isso o marcador retrógrado de vias, Fluorogold (FG). As áreas prosencefálicas que foram ativadas em resposta à EVEC e projetaram-se para o NPBL foram: amígdala central (ACe), PVN e o núcleo da estria terminal (BST) em comparação aos seus respectivos controles. As estruturas do tronco cerebral ir-c-Fos-FG em resposta à EVEC foram: NTS, NDR e locus coeruleus (LC). Nossos resultados também mostraram o padrão de imunorreatividade tripla n o NDR: proteína c-Fos-FG-5H. Os resultados obtidos mostraram que os neurônios serotoninérgicos do NDR são ativados pela EVEC e conectam-se diretamente ao NPBL. Concluindo, os presentes resultados sugerem que o sistema serotoninérgico presente no NPBL constitui um dos responsáveis pela regulação neuroendócrina do volume dos líquidos orgânicos modulando a excreção de água e eletrólitos, bem como a liberação de AVP, OT e ANP em resposta à EVEC isotônica.

FUNÇÃO CARDIOVASCULAR DE RATOS SUBMETIDOS À HIPÓXIA CRÔNICA INTERMITENTE

Daniel Breseghello Zoccal

Orientador: Prof. Dr. Benedito H. Machado

Dissertação de Mestrado apresentada em 16/02/2006

Ratos submetidos à hipóxia crônica intermitente (HCI) apresentam um moderado aumento da pressão arterial média (PAM), cujos mecanismos não estão bem esclarecidos. No presente estudo, foi verificado que ratos expostos a uma FiO_2 de 6% por 40 segundos, a cada 9 minutos, 8 horas por dia, durante 35 dias (grupo HCI) apresentaram um aumento significativo na PAM (115 ± 2 vs 104 ± 1 e 105 ± 1 mmHg) e na frequência cardíaca (383 ± 6 vs 357 ± 6 e 350 ± 5 bpm) quando comparados com ratos mantidos nas câmaras controles em normóxia (grupo CH) ou no biotério de manutenção (grupo CB), respectivamente. A atividade da NOS, avaliada pela taxa de conversão da L-[^{14}C]-arginina em L-[^{14}C]-citrulina em “punches” do NTS, RVLM e PVN, não foi diferente entre os grupos experimentais. A análise espectral da pressão arterial sistólica e do intervalo de pulso mostrou que a modulação simpática para o sistema cardiovascular não foi alterada após a HCI. Além disso, os bloqueios ganglionar e $\alpha 1$ -adrenérgico produziram reduções semelhantes na PAM e na resistência vas-

cular, respectivamente, nos grupos experimentais. A avaliação do débito cardíaco pelo método da termodiluição mostrou uma redução significativa de aproximadamente 30% desse parâmetro no grupo HCI em relação aos grupos CH e CB. Além disso, a resistência periférica total, calculada pela razão PAM/DC, foi significativamente maior no grupo HCI. A análise do miocárdio mostrou que o grupo HCI também apresentou um aumento da massa ventricular direita e esquerda quando comparado com os grupos CH e CB. Outra importante observação foi o aumento de aproximadamente 2 vezes na concentração plasmática de corticosterona no grupo HCI em comparação aos grupos controles, enquanto que nenhuma alteração foi observada em relação as concentrações plasmáticas de ANP e OT. Esses resultados mostram que o aumento da PAM em ratos submetidos à HCI é mais dependente de influências hormonais sobre a resistência vascular, como a corticosterona, do que um aumento da atividade simpática. A hipertrofia cardíaca e a redução do DC indicam que a função cardíaca está afetada neste modelo experimental, o que poderia explicar, pelo menos em parte, porque os ratos HCI não apresentam níveis da PAM ainda mais elevados do que aqueles observados.

AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA DE RATOS TRATADOS AGUDA OU CRONICAMENTE COM AMIODARONA

Valter Jovinião de Santana Filho

Orientador: Prof. Dr. Rubens Fazan Junior

Dissertação de Mestrado apresentada em 17/02/2006

A amiodarona (AM) é um agente antiarrítmico, comumente utilizado para o tratamento de arritmias ventriculares e supra ventriculares. AM possui efeitos hemodinâmicos complexos e não completamente conhecidos. O presente estudo objetivou avaliar os efeitos da administração, aguda ou crônica, de AM sobre a pressão arterial (PA), frequência cardíaca (FC), débito cardíaco (DC) e resistência periférica total (RPT), em ratos anestesiados. Ratos Wistar (300 ± 25 g) foram anestesiados com uretana (1 g/kg) e implantados com cânulas de polietileno na artéria e veia femoral, e jugular direita. Também foi introduzido um sensor de temperatura, pela carótida direita, até a aorta ascendente. Sob registro contínuo da PA e FC os ratos tiveram o DC medido antes e 1, 3, 10 e 30 min após AM (50 mg/kg i.v.) ou veículo. A resistência periférica total (RPT) foi calculada pela razão PAM/DC. Para o estudo crônico, um grupo de ratos recebeu AM (100 mg/kg/dia) na água de beber, durante 6 semanas, enquanto um grupo controle recebia apenas água. Antes de iniciar, e no último dia de tratamento, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (2,5 mg/kg) para avaliação eletrocardiográfica. Dois dias após a segunda avaliação eletrocardiográfica, os animais foram anestesiados com uretana e instrumentados para avaliação hemodinâmica conforme descrito anteriormente. O DC e RPT foram mensurados em triplicata

sendo, em seguida administrado prazosin e mesurado novamente em triplicata o DC e RPT enquanto a PA e FC avaliada continuamente. Na avaliação do tratamento agudo nos ratos que receberam AM houve uma redução acentuada da PA com uma recuperação parcial. Quanto a FC, observou-se uma bradicardia no primeiro minuto após AM, que perdurou até o final do experimento. Comportamento semelhante à FC apresentou a $+dP/dt(max)$ e o DC que sofreram uma redução imediata, após AM, permanecendo até o final do experimento. A RPT caiu no primeiro minuto, mas 10 minutos após AM, já havia recuperado e, ao final do experimento, tendeu a se elevar. Nos animais que receberam veículo não foi observada nenhuma alteração nos parâmetros estudados. Quanto ao tratamento crônico, foi observado ao exame eletrocardiográfico, aumento dos intervalos P_R e Q_T nos animais tratados com AM. Na avaliação hemodinâmica não foram observadas alterações no período basal entre os grupos. Porém, após administração de prazosin, houve uma queda de menor magnitude na PAM e RPT nos animais tratados com AM enquanto que na FC, a queda foi maior nesses animais, quando comparados aos não tratados. Com isso conclui-se que a AM, administrada agudamente, tem um efeito depressor da atividade cardíaca (bradicardia e redução do DC) que persiste por pelo menos 30 minutos, e também, determina uma vasodilatação periférica (queda da RPT) que desaparece em alguns minutos. E quando administrada cronicamente a AM causa uma bradicardia e uma redução do tono simpático vascular.

REGULAÇÃO NEUROENDÓCRINA DO PICO DE PROLACTINA DO ESTRO

Raphael Escorsim Szawka

Orientadora: Profa. Dra. Janete A. Anselmo Franci

Tese de Doutorado apresentada em 02/03/2006

As concentrações plasmáticas de prolactina (PRL) apresentam variações rítmicas características durante o ciclo estral, influenciadas principalmente pelas flutuações nas concentrações plasmáticas de estradiol. Um pico pré-ovulatório de PRL ocorre na tarde de proestro e um pico secundário deste hormônio foi recentemente descrito na tarde de estro. A secreção de PRL é tonicamente inibida pela dopamina

de origem hipotalâmica. Por outro lado, aumentos agudos na liberação deste hormônio dependem da ação estimulatória de fatores liberadores de PRL. Ainda, neurotransmissores como a noradrenalina e a serotonina parecem ser importantes na geração de picos de PRL. Estudos prévios deste laboratório demonstram que o núcleo noradrenérgico locus coeruleus (LC) participa na gênese do pico de PRL do proestro e dos picos de PRL induzidos por esteróides ovarianos em ratas ovariectomizadas. Portanto, considerando-se a complexa regulação da secreção de PRL, este trabalho teve por objetivo avaliar a participação de diferen-

tes componentes neuroendócrinos na gênese do pico de PRL do estro. Para tanto, inicialmente foi confirmada a ocorrência fisiológica do pico de PRL do estro e, a partir de então, avaliou-se: 1) o efeito da lesão do LC no pico de PRL do estro e nas concentrações de noradrenalina na área pré-óptica medial (APOM), hipotálamo médio basal (HMB) e núcleo paraventricular (PVN); 2) a atividade dos neurônios do LC durante o estro, determinada por dupla marcação imunohistoquímica para Fos e tirosina hidroxilase (TH); 3) a liberação de noradrenalina na APOM durante o ciclo estral, determinada por microdiálise; 4) a taxa de turnover /dopaminérgico e serotoninérgico da APOM e HMB durante o estro e 5) o efeito da ovariectomia no pico de PRL do estro. Os resultados destes estudos demonstraram que a lesão do LC no estro reduziu as concentrações de noradrenalina na APOM, HMB e PVN e bloqueou o pico de PRL deste dia. Ainda, demonstrou-se um aumento da imunorreatividade à Fos nos neurônios do LC às 14:00 h do estro, sugerindo um aumento de atividade do núcleo neste período. O estudo de microdiálise demonstrou aumentos marcantes na liberação de noradrenalina na APOM durante as tardes de proestro e estro, precedendo tem-

poralmente os picos de secreção de PRL, o que sugere uma ação estimulatória da neurotransmissão noradrenérgica da APOM na gênese dos mesmos. Observou-se também um aumento no turnover /dopaminérgico na APOM e HMB ocorrendo simultaneamente com o pico de PRL do estro, sugerindo a participação da dopamina hipotalâmica na regulação deste pico. Por outro lado, não se verificou alteração no turnover /serotoninérgico durante o mesmo período. A ovariectomia na manhã do proestro, embora tenha reduzido as concentrações de estradiol e progesterona, não modificou o pico de PRL do estro, sugerindo que a secreção de esteróides ovarianos no proestro não deve ser importante na geração deste pico. Os dados em conjunto indicam que a deflagração do pico de PRL do estro parece não depender diretamente das concentrações de esteróides ovarianos, mas sim, da ativação de projeções noradrenérgicas do LC para o hipotálamo e do aumento da liberação de noradrenalina na APOM. Ainda, as altas concentrações de PRL durante o pico poderiam estimular a atividade dopaminérgica do hipotálamo, contribuindo para a redução da sua própria secreção por um mecanismo de retroalimentação negativa.

ESTUDO MORFOFUNCIONAL DO NERVO DEPRESSOR AÓRTICO DE RATOS DIABÉTICOS

Jussara Marcia do Carmo

Orientador: Prof. Dr. Hélio César Salgado

Tese de Doutorado apresentada em 06/03/2006

O objetivo do presente estudo foi investigar os aspectos morfológicos e funcionais do nervo depressor aórtico (NDA) de ratos, aos 5, 15 e 120 dias após a instalação do diabetes induzido pela estreptozotocina (STZ), e analisar possíveis correlações entre estes aspectos funcionais e morfológicos.

A atividade do NDA foi registrada, simultaneamente, com a pressão arterial (PA), sob anestesia do pentobarbital sódico. A função barorreceptora foi estudada por meio da curva de PA versus atividade do NDA, ajustada por meio de uma regressão logística sigmoide, onde foram obtidos o ganho (inclinação da curva) e a pressão arterial média (PAM) correspondente a 50% da atividade máxima do barorreceptor (PAM₅₀); também, por meio da análise espectral cruzada entre a PA e atividade do NDA, foi calculada

a função de transferência (razão da potência entre a PAM e a atividade do NDA) a qual representa o ganho do barorreceptor. A análise espectral cruzada foi aplicada durante oscilação de 0,3 Hz na PA, induzida por meio da retirada e reinfusão de sangue na artéria femoral, a fim de simular a modulação simpática sobre o tônus vascular. A análise espectral cruzada foi aplicada, também, durante as oscilações espontâneas (0,75-3 Hz) da PA decorrentes da respiração.

Os níveis glicêmicos se apresentaram mais elevados nos ratos diabéticos quando comparados aos controles aos 5, 15 e 120 dias. Os níveis de PAM dos diabéticos se apresentaram mais baixos do que os controles aos 5 dias, 15 dias e 120 dias. O mesmo ocorreu para a frequência cardíaca, aos 5 dias, 15 dias e 120 dias. A PAM₅₀ dos animais diabéticos foi menor aos 5 e 120 dias.

O ganho do NDA foi semelhante quando calculado pelo percentual basal nos animais diabéticos e controles aos 5 e 120 dias. A magnitude da função de

transferência, obtida por meio da análise espectral cruzada entre a PA e a atividade do NDA foi semelhante entre diabéticos e controles durante as oscilações induzidas de 0,3 Hz quando a atividade foi normalizada em função da atividade basal do NDA, aos 5 dias, 15 dias e 120 dias; e, também, quando da normalização pelo máximo da atividade do NDA aos 5 e 120 dias. Resultados semelhantes foram encontrados durante as oscilações espontâneas da PA decorrentes da respiração (~1,7 Hz), quando a atividade foi normalizada em função da atividade basal do NDA aos 5, 15 e 120 dias; e, também, quando da normalização pelo máximo da atividade do NDA aos 5 dias e 120 dias. Os resultados da análise espectral nas diferentes fases (5, 15 e 120 dias) mostraram que a sensibilidade do NDA, avaliada por meio da curva de PAM vs atividade do NDA e da análise espectral cruzada, não sofreu alteração com o diabetes.

Os aspectos morfológicos mostraram que a área fascicular foi semelhante entre diabéticos e controles aos 5 dias e aos 15 dias, porém diferente aos 120 dias. A área da bainha de mielina foi semelhante entre os diabéticos e os controles aos 5 dias. Esta medida foi significativamente menor nos animais dia-

béticos quando comparado aos controles aos 15 dias e 120 dias. Não foi observada correlação entre os parâmetros funcionais e morfológicos nos protocolos estudados. Porém, a correlação foi positiva entre a área de mielina (mm^2) e o diâmetro axonal (mm) nos 3 protocolos.

Conclui-se, por meio de 2 diferentes métodos de análise da sensibilidade do barorreceptor, que a atividade do NDA não foi alterada pelo diabetes em diferentes períodos (5, 15 e 120 dias). Entretanto, os dados morfológicos das fibras mielinizadas demonstraram alteração a partir do 15º dia de evolução do diabetes. Estes resultados sugerem que a função barorreceptora se encontra preservada, provavelmente, devido ao fato de que as pequenas fibras mielinizadas são mais resistentes aos efeitos deletérios do diabetes, em contraste com as grandes fibras mielinizadas, as quais parecem ser mais sensíveis a alterações metabólicas, tais como hiperglicemia. Conclui-se, também, que não existe correlação entre os parâmetros funcionais analisados por meio do registro multifibras e os dados morfológicos no NDA, embora exista correlação entre a área de mielina e o diâmetro axonal nos animais controles e diabéticos.

CONTROLE DO APETITE E DA SACIEDADE AO SÓDIO: EFEITOS DO ESTRESSE DE IMOBILIZAÇÃO E RESPOSTAS NEUROENDÓCRINAS INDUZIDAS PELA DEPLEÇÃO DE SÓDIO EM RATOS

Daniel Badauê Passos Junior

Orientador: Prof. Dr. José Antunes Rodrigues

Tese de Doutorado apresentada em 31/03/2006

O controle do apetite e saciedade por sódio constitui função fisiológica essencial para a manutenção do balanço hidro-eletrolítico corporal. Nesta tese objetivamos elucidar a interação de estruturas encefálicas da lâmina terminal [órgão subfornicial (SFO), núcleo preóptico mediano e órgão vasculoso da lâmina terminal], com os núcleos dorsal (DRN) e mediano da rafe (MRN) neste controle. A ingestão de sódio foi evocada pela associação de furosemida (20 mg/kg, sc) com dieta baixa em sódio. Neste modelo, observamos o efeito do estresse de imobilização (IMO) sobre a ingestão induzida de sódio. Nestas condições, investigamos a atividade angiotensinérgica pela administração de captopril (5 e 50 mg/kg, ip). Avaliou-se a

ingestão de sódio e água, natriurese, assim como as concentrações plasmáticas de sódio, ocitocina (OT), peptídeo natriurético atrial (ANP) e vasopressina (AVP). Neste protocolo, microinjetamos no (i) SFO, o antagonista de receptores AT1 de angiotensina II, ZD7155 (2 e 5 nmol/0,2µL/rato); (ii) no DRN, o agonista ou o antagonista de receptores 5-HT1a, respectivamente o 8-OH-DPAT (7,5 nmol/0,2µL/rato) e WAY 100635 (2 nmol/0,2µL/rato); e (iii) no MRN, o ZD 7155 (5 nmol/0,2µL/rato). Avaliamos a ingestão espontânea e induzida de sódio após a administração sistêmica aguda e crônica do 8-OHDPAT (25, 50, 125 e 250 µg/kg). Utilizando técnicas de imuno-histoquímica para FOS, e “fluorogold”, um traçador neuronal retrógrado, injetado no DRN, identificamos neurônios da lâmina terminal, que estão ativados e projetam axônios para o DRN após a ingestão induzida de sódio. Os resultados demonstraram que a IMO inibiu a in-

gestão induzida de NaCl 0,3 M ($P < 0,001$). Dose baixa de captopril reverteu a inibição provocada pela IMO, enquanto dose alta bloqueou a ingestão induzida de sódio ($P < 0,001$). Durante o dia da depleção de sódio, observou-se redução da ingestão de água ($P < 0,01$), com elevação da excreção de água ($P < 0,01$) sem alterar a carga excretada de sódio. Ela também reduziu as concentrações plasmáticas de sódio, OT, ANP e AVP. Observou-se expressiva ingestão de sódio após a rerepresentação de NaCl 0,3 M. Neste momento, observamos um significativo aumento das concentrações plasmáticas de OT ($P < 0,001$). ZD7155 microinjetado no SFO reduziu o efeito da ingestão induzida de sódio, enquanto a mesma droga no MRN não interferiu na ingestão do eletrólito, mas elevou a ingestão de água ($P < 0,01$). 8-OH-DPAT no DRN promoveu o consumo exagerado de NaCl 0,3 M ($P < 0,05$),

enquanto o antagonista não modificou a resposta. O tratamento agudo sistêmico com 8-OH-DPAT elevou a ingestão de sódio em ratos normo-hidratados e cronicamente reduziu a ingestão induzida de sódio. A imuno-histoquímica mostrou que neurônios localizados na lâmina terminal são ativados durante a saciedade e se projetam para o DRN. Em suma, estes resultados demonstram que os ajustes neuroendócrinos, renais e comportamentais dependem de uma complexa rede de integração de sinais neuroquímicos, onde os núcleos mesencefálicos serotoninérgicos, DRN e MRN são importantes sítios integrativos implicados na inibição da ingestão de sódio e água. Ademais, a redução das concentrações plasmáticas de OT e ANP, assim como de AVP, demonstrou a necessidade de evitar a perda de sódio e a retenção de água durante a depleção.

PARTICIPAÇÃO DO LOCUS COERULEUS NA INDUÇÃO DE OVÁRIOS POLICÍSTICOS INDUZIDOS PELO ESTRESSE EM RATAS

Marcelo Picinin Bernuci

Orientadora: Profa. Dra. Janete A. Anselmo Franci
Dissertação de Mestrado apresentada em 31/03/2006

A função ovariana está sob controle, entre outros, dos hormônios hipofisários e da inervação simpática periférica. Alterações na homeostasia destes sistemas regulatórios têm sido relacionadas ao desenvolvimento de patologias ovarianas, como a síndrome dos ovários policísticos (SOP), uma das maiores causas de infertilidade feminina. O ovário possui também conexões com vários núcleos cerebrais incluindo o núcleo noradrenérgico locus coeruleus (LC), o qual está intimamente relacionado ao controle da função do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. Por outro lado, estresses crônicos são capazes de interferir na homeostasia deste sistema e causar alterações morfo-funcionais no ovário de ratas, resultando em deficiências na função reprodutiva. Desde que o LC é responsivo ao estresse, nós investigamos se o estresse por frio por oito semanas seria capaz de induzir a formação de cistos e se a ativação do LC por este modelo de estresse estaria relacionada à formação destes. Ratas com ciclo estral regular foram submetidas à lesão eletrolítica do LC (grupo estresse-lesão) ou cirurgia fictícia (grupo estresse-sham), ou então sem nenhuma manipulação central (grupo estresse). Após sete

dias, os animais foram submetidos ao estresse por frio (4°C -3 horas/dia/8 semanas). Os animais do grupo controle foram mantidos em temperatura ambiente. Após este período os animais foram sacrificados na tarde da fase do estro do ciclo estral, quando os ovários e uma amostra de sangue foram colhidos. Os ovários foram processados para análise morfológica e o número de óvulos nas tubas uterinas foi contado. As concentrações plasmáticas de estradiol, progesterona, testosterona, LH e FSH foram determinadas por radioimunoensaio. As diferenças estatísticas foram analisadas por meio do teste de análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls. Os animais estressados apresentaram ciclos estrais de maior duração. Em consequência, estes animais apresentaram no período estudado um menor número de ciclos estrais completos. O número de óvulos encontrados no interior das tubas uterinas dos animais submetidos ao estresse foi inferior ao observado nos animais não estressados e estressados com lesão do LC. O estresse reduziu o número de folículos pré-antrais normais e folículos antrais periovulatórios, induziu a formação de folículos antrais com hipertrofia das células da teca, um acúmulo de folículos antrais de pequeno tamanho e o aparecimento de cistos foliculares. Não houve diferença entre as concentrações plasmáticas de LH, FSH e progeste-

rona de todos os grupos estudados. Já as concentrações de estradiol e testosterona foram significativamente superiores às encontradas nos animais controle e lesados. A lesão do LC preveniu as alterações morfológicas e hormonais encontradas nos animais es-

tressados. Estes dados sugerem que 8 semanas de estresse crônico e intermitente por frio é capaz de induzir a formação de cistos ovarianos e que este efeito parece ser mediado pelos neurônios noradrenérgicos do LC.

GENÉTICA

ESTUDO DA SEGREGAÇÃO MEIÓTICA EM PORTADORES DE TRANSLOCAÇÕES ROBERTSONIANAS

Maria Silvana Juchniuk de Vozzi

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Regina Martelli

Dissertação de Mestrado apresentada em 13/02/2006

A infertilidade masculina e as anormalidades cromossômicas estão intimamente relacionadas, sendo que 10 a 15% dos homens inférteis apresentam aberrações cromossômicas. Os portadores de translocações podem apresentar infertilidade secundária, com diferentes graus de oligoastenoteratozoospermia ou produção elevada de espermatozóides cromossomicamente anômalos. Podem produzir de 3,4 a 40% de espermatozóides anormais e embora sejam fenotipicamente normais, contribuem para o desequilíbrio genético em sua descendência. O efeito intercromossômico, possível influência dos cromossomos envolvidos em rearranjos sobre outros pares cromossômicos, também tem sido descrito em pacientes com translocações Robertsonianas, podendo modificar o risco de cromossomopatias para a descendência de um casal infértil. O objetivo deste trabalho foi analisar, por meio da técnica de FISH em espermatozóides, os mecanismos de segregação e o efeito intercromossômico em amostras de dois homens inférteis, portadores de

translocação robertsoniana. O primeiro (PE1) apresentava duas linhagens cromossômicas, com cariótipo 45, XY, der(13;13)/45,XY,der(13;14) e o segundo (PE2) 45,XY, der(13;14) cromossomos. A hibridação com as sondas LSI 13q14, Tel 14q (protocolo 1) e WCP13 *spectrum green* e WCP14 *spectrum orange* (protocolo 2) evidenciou maior proporção de gametas não equilibrados na amostra PE1, correspondente a 71,2% dos espermatozóides, sendo que a proporção de gametas não equilibrados representou 35,4% dos núcleos analisados de PE2. O protocolo 1 mostrou-se mais eficiente quanto à taxa de hibridação porém o protocolo 2 foi mais informativo para PE2, possibilitando a diferenciação entre os gametas normais e equilibrados da segregação alternada. No paciente PE1 o mecanismo de segregação adjacente foi o mais frequente, a diferença do paciente PE2 que foi o mecanismo de segregação alternada. A frequência de dissomias dos cromossomos sexuais dos dois pacientes avaliados foi superior (0,0528 e 0,0928) à frequência de dissomias dos mesmos cromossomos do controle (0,006), sugerindo que existe um efeito intercromossômico em gametas de pacientes com translocações robertsonianas.

AGRUPAMENTO DE MENINGIOMAS HUMANOS BASEADO NO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA AVALIADA POR cDNA MICROARRAYS

Aline Renata Espanhol

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Aleixo da Silva Junior

Tese de Doutorado apresentada em 14/03/2006

Os meningiomas são os tumores os mais comuns do sistema nervoso central (SNC), contabilizando 26% de suas neoplasias. Embora, frequentemente con-

siderados como benignos 20% destes apresentam características histológicas agressivas com estatística significativa em relação à morbidade e mortalidade dos pacientes.

Ainda que as medidas terapêuticas adjuvantes possam prolongar a sobrevida em vários pacientes, é importante ressaltar que seu efeito é ainda limitado e que a maioria dos tumores primários do SN não é passível de cura. Supomos que esforços para aperfeiçoarmos os métodos já existentes, ou até mesmo a inclusão de novos métodos na caracterização fina destas neoplasias poderia contribuir com a patologia clínica.

A tecnologia dos cDNA *microarrays* associada a análise bioinformatizada dos dados, permite o agrupamento tanto de amostras, no caso os tumores, como de genes diferencialmente expressos. É um método de muito interesse para patologia clínica e medicina diagnóstica, pois ao mesmo tempo em que podemos classificar um grande número de amostras com base estatística e matemática, podemos também guardar a precisão do detalhe molecular, acessando a seqüência nucleotídica de cada gene diferencialmente expresso.

Isto posto, levantamos a seguinte hipótese de trabalho; meningiomas humanos dos diferentes graus têm um conjunto de genes que se expressam em níveis diferentes ao ponto de permitirem agrupamento segundo o grau de agressividade.

Desta forma, o principal objetivo deste estudo foi a avaliação dos perfis de expressão gênica diferenciais entre os diferentes graus de meningiomas

(graus I, II e III) de acordo com *World Health Organization* (WHO) comparados com meninge normal (controle).

O algoritmo de agrupamento hierárquico *Cluster & Tree View* (não supervisionado) além de possibilitar traçarmos assinaturas de hibridação características de cada grau de meningiomas e de meninge normal, permitiu-nos apontarmos seis genes induzidos em meningioma de grau I, dois genes reprimidos em meningioma de grau II e oito genes induzidos em meningioma de grau III.

Já o algoritmo estatístico SAM possibilitou-nos doze genes de expressão induzida em meningiomas de grau I, vinte e quatro genes induzidos em grau II e três genes em grau III.

Além disso, analisamos o conjunto de genes diferencialmente expressos (dados do programa SAM) pelo algoritmo de Venn (diagrama de Venn) possibilitando evidenciarmos três genes exclusivamente expressos pelos meningiomas de grau III, três genes de expressão compartilhada pelos meningiomas de grau I e II, sete genes de expressão compartilhada pelos meningiomas de grau II e III e quatro genes de expressão compartilhada por todos os graus.

Estes dados, confirmam a hipótese anteriormente formulada, mostrando que os diferentes graus de meningiomas apresentam expressão diferencial de genes e que a tecnologia dos cDNA *microarrays*, junto com os programas de bioinformática utilizados, foi adequado no agrupamento não supervisionado das amostras dos tumores, o que poderá ter implicação na patologia clínica de classificação de meningiomas.

POLIMORFISMOS GENÉTICOS E PESO AO NASCER

Déborá Gusmão Melo

Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões
Tese de Doutorado apresentada em 24/03/2006

Com o objetivo de verificar uma possível correlação entre os diferentes fenótipos de quatro marcadores genéticos polimórficos (ESD, GSTT1, GSTM1 e do microssatélite da região promotora do gene IGF1) e o peso ao nascer, foram tipadas amostras de mães e RNs de duas maternidades do município de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo. A primeira é composta por 509 duplas de mãe/RN, procedente da Maternidade

do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (HC) e a segunda é composta por 339 duplas, procedente da Maternidade do Complexo Aeroporto (Mater). Para excluir o efeito de outros fatores que sabida ou supostamente interferem no peso ao nascer foram consideradas várias informações dos prontuários médicos das gestantes (idade, número de gravidezes, de abortos e de partos prévios, número de consultas, hábitos de tabagismo e etilismo na atual gravidez, a presença de morbidades durante a gestação e também o tipo sanguíneo) e dos RNs (sexo, peso, comprimento, idade

gestacional, APGAR no primeiro e quinto minuto de vida e presença de alguma anomalia detectada ao nascimento, além do tipo sanguíneo). O peso ao nascer foi cotejado com os fenótipos dos quatro marcadores moleculares, considerando-se concomitantemente os diversos parâmetros pelo Modelo Linear Generalizado. Os resultados obtidos encerram uma antiga dúvida sobre o desequilíbrio da ESD na população brasileira, sugerindo que o desequilíbrio anteriormente relatado é decorrente de artefato técnico, já que não se repetiu com o uso das técnicas moleculares. O presente estudo é o primeiro relato de frequências do *locus* IGF1 em populações sul-americanas, o que dificulta a comparação, no entanto, a alta incidência de *IGF1*21* apenas nas amostras asiáticas sugere que este alelo é um bom marcador para etnia oriental, enquanto a maior frequência de *IGF1*18* nas amostras de afrodescendentes poderá vir a ser considerado característico de populações africanas. O perfil das frequências alélicas e fenotípicas da ESD, GSTM1 e GSTT1 é semelhante ao descrito em outras amostras da população brasileira, sendo compatível com a composição trihíbrida da mesma. A amostra Mater possui menor variância do peso ao nascer, mas exibe semelhança com a amostra HC no que diz respeito às frequências alélicas dos marcadores moleculares. Contudo, do ponto de vista epidemiológico as duas amostras diferem, pois

há maior incidência de morbidades entre as mães e RNs do HC. Embora estatisticamente não significativa, os números indicam menor peso entre os RNs cujas mães são *ESD*2/*2*, quando comparados àqueles cujas mães exibem outros genótipos e esta diferença se torna significativa quando os dados não são ajustados segundo as diferentes variáveis pelo Modelo Linear Generalizado. Em função da raridade genótipo *ESD*2/*2* é necessário ampliar o estudo para confirmar se esta diferença é verdadeira, já que do ponto de vista biológico ela é expressiva. Não foi encontrada associação entre os fenótipos materno e fetal da GSTM1 e GSTT1 e o peso dos RNs, é possível que as associações dos fenótipos GSTT1- e GSTM1- com baixo peso em filhos de mães tabagistas, previamente relatadas na literatura, sejam indiretas, isto é, estes fenótipos talvez estejam associados à idade gestacional que, sabidamente, se associa a baixo peso ao nascer. Alguns alelos do *locus* IGF1 mostraram correlação com peso ao nascer: na amostra Mater observou-se uma forte associação entre RNs homozigotos *IGF1*22/*22* e menor peso ao nascer e esta associação se manteve na amostra total; o genótipo *IGF1*20/*20* nos RNs da Mater exibiu associação com maior peso ao nascer. Estes dados, somados aos da literatura, sugerem fortemente que este marcador module ou esteja ligado a moduladores do peso ao nascer.

ANÁLISES FILOGENÉTICAS DO GRUPO *REPLETA* (GÊNERO *DROSOPHILA*) COM ÊNFASE NO SUBGRUPO *FASCIOLA* UTILIZANDO GENES MITOCONDRIAIS E NUCLEARES

Érica Cristina de Carvalho Silva

Orientadora: Profa. Dra. Maura Helena Manfrin

Dissertação de Mestrado apresentada em 31/03/2006

O grupo *repleta*, um dos maiores e mais complexos grupos de espécies do gênero *Drosophila*, constitui um importante modelo biológico para estudos evolutivos. É subdividido em seis subgrupos, dos quais o subgrupo *fasciola* é o único que tem a maioria de suas espécies encontrada em regiões de matas úmidas das Américas Central e do Sul, sendo composto por 21 espécies, das quais 13 tiveram ocorrência registrada no Brasil. Os objetivos deste estudo foram inferir relações filogenéticas entre espécies do subgrupo *fasciola*, utilizando seqüências de genes mitocondriais (COI e

COII) e nucleares (EF-1 α F1 e *tra*), inferir relações filogenéticas entre representantes dos subgrupos do grupo *repleta*, em uma tentativa de acrescentar informações sobre a origem e evolução desse grupo, e fazer uma análise comparativa entre os dados obtidos com aqueles disponíveis na literatura. Seqüências parciais dos genes COI, COII, EF-1 α F1 e *tra* foram obtidas para todas as espécies do gênero *Drosophila* utilizadas neste estudo. A partir das seqüências gênicas foram realizadas análises filogenéticas, utilizando máxima parcimônia. Todas as hipóteses filogenéticas obtidas sugerem que o grupo *repleta* é monofilético; considerando as relações filogenéticas entre subgrupos do grupo *repleta*, os subgrupos *mercatorum* e *repleta* foram sugeridos como táxons irmãos, assim como os

subgrupos *fasciola* e *hydei*. As relações filogenéticas obtidas a partir da análise das seqüências do gene EF-1 α F1 e das análises simultâneas corroboram a monofilia do subgrupo *fasciola*, e sugerem que *Drosophila moju* representa uma linhagem distinta em relação às demais espécies amostradas neste trabalho. Todas as filogenias indicam que *Drosophila ellisoni* e *D. fascioides* são espécies irmãs, resultado que está de acordo com dados citogenéticos e morfológicos. *Drosophila carolinae*, *D. onca* e *D. senei* tam-

bém são agrupadas em todas as filogenias, com exceção daquela gerada a partir de seqüências parciais do gene EF-1 α F1. Os genes mitocôndrias sugerem que *D. carolinae* e *D. senei* são espécies irmãs, no entanto, dados morfológicos indicam fortemente a proximidade evolutiva entre *D. carolinae* e *D. onca*, como sugerido no cladograma gerado a partir de seqüências parciais do gene *tra*. Tal fato pode ser explicado pela discrepância que pode existir entre filogenias de genes e filogenias de espécies.

GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA

REPRODUTIBILIDADE E VALIDADE DA AVALIAÇÃO DOPPLERVELOCIMÉTRICA NO DIAGNÓSTICO DE MASSAS OVARIANAS

Ana Carolina da Silva Marchesini

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Candido dos Reis
Dissertação de Mestrado apresentada em 19/01/2006

Introdução: a ultra-sonografia é o exame menos invasivo capaz de detectar alterações de pequeno volume na região anexial e o estudo Doppler colorido permite uma avaliação indireta do metabolismo da lesão. No entanto, as neoplasias malignas podem apresentar áreas de tecido ovariano benigno e dificultar o diagnóstico diferencial ultra-sonográfico.

Objetivos: este estudo objetivou avaliar a validade e a reprodutibilidade do estudo Doppler no diagnóstico diferencial das massas anexiais; e verificar se algum parâmetro específico da dopplervelocimetria (PVS, EDV, IP ou IR) teria maior eficácia diagnóstica.

Métodos: foi realizado estudo tipo observacional prospectivo incluindo 15 (21,12%) pacientes com diagnóstico de neoplasia maligna e 56 (78,88%) com diagnóstico de doença benigna do ovário. Para o estudo Doppler as massas eram setorizadas em quatro quadrantes a partir dos cortes longitudinal e transversal. Todos os quadrantes foram insonados individualmente para amostragem dopplervelocimétrica.

Resultados: na avaliação dos quadrantes apenas 46,47% das massas (33 lesões) apresentaram vas-

cularização arterial nos quatro quadrantes. O coeficiente de variação (CV) para os diversos parâmetros do Doppler variou entre os seguintes valores: para o IR de 11,7 a 41,7%, para o IP de 21,1 a 32,9%, para o PVS de 35,0 a 55,4%, e para o VDF de 40,1 a 50,2%. A ultra-sonografia morfológica apresentou sensibilidade de 86,7%, especificidade de 53,6%, VPP de 33,3% e VPN de 93,75%; com área sob a curva igual a 0,69 (IC 95%: 0,57 e 0,81, $p = 0,0009$). Quando se associou a dopplervelocimetria aos achados morfológicos, a sensibilidade do método foi de 93,3%, especificidade de 62,5%, VPP de 40% e VPN de 97,22%; com área sob a curva igual a 0,80 (IC 95% 0,70 e 0,90, $p < 0,0001$). Comparando o método morfológico com o mesmo método acrescido do estudo Doppler, observou-se melhor desempenho do exame utilizando os dois métodos com diferença estatística significativa ($p = 0,0003$).

Conclusões: os resultados permitem concluir que o índice de resistência foi o parâmetro dopplervelocimétrico com menor variabilidade, portanto o mais reprodutível. Apenas uma medida dopplervelocimétrica da massa ovariana não foi representativa das características vasculares da lesão. O estudo Doppler melhorou os parâmetros de sensibilidade e especificidade do exame ultra-sonográfico no estudo de massas ovarianas.

IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE UMA NOVA SERINOPROTEASE ISOLADA DO VENENO DE *B. JARARACUSSU* UTILIZANDO A BIBLIOTECA DE FRAGMENTOS DE ANTICORPOS RECOMBINANTES GRIFFIN.1

André Oliveira Mota Júnior

Orientador: Prof. Dr. José Elpídio Barbosa

Dissertação de Mestrado apresentada em 25/01/2006

Venenos de serpentes são ricas fontes de proteínas e peptídeos ativos. Proteínas de veneno com atividade procoagulante são úteis para o tratamento de complicações trombóticas e hemostáticas e ainda colaboram para o entendimento das reações moleculares. As enzimas trombina- símiles, grupo de glicoproteínas do veneno de serpentes com propriedades pro-coagulantes, são serinoproteases de cadeia única que compartilham alto grau de homologia com a trombina humana. A serinoprotease denominada BjussuSP-I isolada do veneno bruto de *B. jararacussu* apresenta potencial terapêutico como agente desfibrinogenante. Produzir anticorpos contra essa toxina para auxílio co-terápico de acidentes ofídicos ou para compreensão dos mecanismos de ação dessa proteína poderá levar, futuramente, ao desenvolvimento de modelos para novos fármacos. Neste trabalho foi explorado o uso da biblioteca de anticorpos humanos Griffin.1 para o isolamento de fragmento de anticorpos (scFv) contra a toxina BjussuSP-I.

O protocolo adotado para a seleção dos fagos-anticorpos contra BjussuSP-I foi o de imobilização das proteínas em imunotubo. Foram realizados três turnos de seleção e os fagos-anticorpos selecionados do primeiro turno apresentaram maior título de anticorpos específicos para a proteína e foram escolhidos para a produção de fagos-anticorpos monoclonais. Após a padronização de um método de quantificação da atividade

de coagulante, *in vitro*, compatível com as necessidades deste trabalho, puderam-se identificar três clones capazes de inibir a atividade coagulante da toxina. Esses clones foram utilizados para a produção de fragmentos solúveis de anticorpos, porém, devido à ausência de marcadores que facilitam a detecção destes anticorpos, não foi possível purificar os scFv. Visando a obtenção de scFv puro, os sobrenadantes dos clones selecionados foram submetidos a purificação parcial em gel Sephadex- G75, de onde foram eluídas duas frações de proteínas, denominados de F1 e F2. A maior quantidade de moléculas de scFv encontrou-se na fração F1, porém ensaios de atividade coagulante demonstraram que a fração F1 dos clones selecionados não provocavam inibição da atividade coagulante da toxina. Por outro lado as frações F2 dos clones inibiram fortemente. Portanto algum fator do sobrenadante de bactéria provocou inibição da atividade coagulante da toxina BjussuSP-I. Ensaios realizados em seguida, mostraram que essa atividade inibitória presente na fração F2 atua de maneira dose resposta inibindo a atividade coagulante da toxina e de venenos brutos. Esta ação inibitória não é produzida apenas pelos clones selecionados, mas também por cepas de *E. coli* não infectadas. Ainda, a expressão dessa atividade de inibição da fração F2 apresenta diminuição de expressão quando as culturas sofrem indução com IPTG (isopropil-b-D-tiogalactosídeo). A fração F2 também foi capaz de promover aglutinação de eritrócitos de carneiro além de inibir a atividade coagulante da toxina BjussuSP-I. Estas atividades foram suprimidas quando as frações F2 foram incubadas previamente com EDTA e/ou glicoproteína (fetuina).

DESENVOLVIMENTO DE VACINAS DE SUBUNIDADE BASEADAS NA PROTEÍNA Hsp65 E ADJUVANTES FORMULADOS EM MICROESFERAS: AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE E PROTEÇÃO CONTRA TUBERCULOSE EXPERIMENTAL

Sandra Aparecida dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Célio Lopes Silva

Tese de Doutorado apresentada em 30/01/2006

A tuberculose (TB) é uma das doenças infecciosas que mais matam em todo o mundo e apesar da introdução da vacina BCG e de drogas a dissemina-

ção da TB ainda não foi controlada. Assim, a otimização da vacina BCG e/ou o desenvolvimento de novas vacinas profiláticas e terapêuticas é essencial para o combate a essa doença. Dentre as potenciais vacinas recentemente priorizadas pela Organização Mundial da Saúde para iniciar os ensaios clínicos em humanos nos próximos anos, encontra-se a baseada no antígeno Hsp65, desenvolvida por nosso grupo. Embora a vacina de DNA codificando a proteína Hsp65 tenha sido a melhor dentre as formulações avaliadas, ainda é necessário otimizá-la visando o aumento da imunogenicidade e eficácia protetora contra TB. Nesse contexto avaliar o uso das vacinas de subunidade baseadas em antígenos recombinantes também é pertinente porque essas vacinas são seguras, de fácil formulação, administração e produção. Assim, com o intuito de formular uma vacina de subunidade de dose única propôs-se o uso de microesferas biodegradáveis (PLGA) e imunoestimulantes (Poliarginina, KLK ou CpG) para formular novas vacinas baseadas na proteína Hsp65 recombinante. Uma dose única dessas formulações vacinais foi administrada a camundongos isogênicos (*i.m.*) para análise da resposta imune (humoral e celular) induzida e também para avaliação da eficácia protetora contra a infecção experimental por *M. tuberculosis* H37Rv. Nossos resultados mostraram que as formulações contendo a proteína ou a

proteína e os adjuvantes foram capazes de induzir respostas imunes específicas. As formulações Hsp65+Poliarginina e Hsp65+CpG induziram uma resposta de padrão Th1 enquanto a vacina contendo Hsp65+KLK induziu uma resposta mista Th1/Th2. Apesar de ter estimulado esse padrão de resposta a formulação contendo Hsp65+KLK reduziu em 100 vezes a carga bacilar em relação ao grupo controle, bem como, preservou a estrutura do parênquima pulmonar. Além disso a utilização de uma proteína com maior quantidade de LPS na formulação que também contem KLK induziu uma proteção de maior duração, sugerindo que o adjuvante LPS também desempenha importante papel na resposta induzida. Pode se concluir desse trabalho, que é possível formular uma vacina para a administração em dose única baseada na proteína recombinante Hsp65. Assim, como perspectivas futuras, além do estudo mais detalhado sobre os mecanismos envolvidos na proteção, pretende-se otimizar a vacina Hsp65+KLK visando aumentar a duração da resposta induzida por ela. Para isso pretende-se utilizar como estratégia a administração de uma dose de reforço com a proteína e adjuvante, utilizando o conceito de “prime-boost” homólogo de dose única através da combinação de microesferas que liberem o antígeno em diferentes intervalos de tempo durante um período maior.

VACINA DE DNA pVAX-Hsp65 CONTRA A TUBERCULOSE EXPERIMENTAL, VEICULADA POR DIFERENTES CONSTRUÇÕES LIPOSSOMAIS, APRESENTA PROTEÇÃO DEPENDENTE DA DOSE E ROTA DE ADMINISTRAÇÃO

Rogério Silva Rosada

Orientadora: Profa.Dra. Arlete A. M.Coelho-Castelo
Dissertação de Mestrado apresentada em 02/02/06

As vacinas de DNA têm sido amplamente utilizadas nos últimos 10 anos como uma nova estratégia de vacinação para diferentes patologias. Apesar da eficiente indução da resposta imune em modelos experimentais e, em algumas situações, em humanos, a dose de DNA plasmideal utilizada é relativamente alta. Desse modo, estratégias que visem diminuir a dose administrada com a manutenção da resposta imune têm sido alvo de inúmeras pesquisas. A vacina de DNA-Hsp65 de *Mycobacterium leprae* quando veiculada na dose de 300 µg em DNA plasmideal – pcDNA3-Hsp65- pela via intramuscular tem se mostrado alta-

mente eficiente na profilaxia e terapia contra a tuberculose experimental. Nesse trabalho, avaliamos o papel de outra construção também carreadora do gene da Hsp65 de *M. leprae*, o pVAX-Hsp65, aplicada pela rota intramuscular, utilizando-se o plasmídeo nu na dose de 300 µg ou veiculado em diferentes estruturas lipídicas nas doses de 50 µg ou 100 µg. Avaliamos, ainda, o efeito da administração intranasal de tais estruturas na dose de 25 µg. A administração intramuscular do pVAX-Hsp65 na dose de 300 µg, utilizando-se DNA nu, ou de 50 µg, veiculada em diferentes formulações de lipossomas não induziu proteção contra o posterior desafio com *M. tuberculosis*, apesar de induzir produção de citocinas do perfil T_H1. A vacinação com as formulações induziu principalmente, a produção de anticorpos Hsp65 específicos da subclasse IgG2a, enquanto que o DNA nu induziu a produção tanto de

IgG2a quanto IgG1. Quando os animais foram vacinados com duas doses das formulações lipossomais contendo 50 µg, houve uma redução significativa (0,57 log) na unidade formadora de colônia (CFU) de amostras pulmonares, mostrando assim um claro efeito protetor. Inesperadamente, a vacinação pela via intranasal com apenas 25 µg de DNA carregados em lipossomas conferiu uma proteção muito superior a todas as outras estratégias. Tal fenômeno pode ser evidenciado pela redução de 1,02 log na CFU obtida do pulmão e

pela manutenção da arquitetura pulmonar. Esses resultados ressaltam a importância tanto da rota de imunização quanto da dose de DNA empregado nessas vacinas, bem como a forma como é oferecida ao sistema imune para indução de uma imunidade protetora. Além disso, abrem perspectivas para o estudo de novas rotas e formulações para uso de vacinas de DNA contra a tuberculose experimental, com sensível redução na quantidade de DNA plasmídeo utilizado, contribuindo para a biossegurança das mesmas.

EFEITO DO ADJUVANTE NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INDUZIDA POR ANTÍGENOS SECRETADOS POR *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Denise Morais da Fonseca

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Luiza Deperon Bonato
Dissertação de Mestrado apresentada em 22/02/2006

A tuberculose (TB), doença causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, é considerada uma das maiores causas de mortalidade por doenças infecciosas no mundo. Embora exista a vacina BCG (Bacilo de Calmete-Guérin), usada para prevenção da TB, e terapia para os indivíduos que desenvolvem a doença, alguns fatores estão associados com a dificuldade em restringir o elevado número de casos, como: o abandono da quimioterapia, o surgimento de cepas multirresistentes às drogas e a eficácia variável da vacina BCG. Esse contexto levou a necessidade de se desenvolver uma nova vacina contra TB, que seja mais eficiente que o BCG e segura para indivíduos imunocomprometidos. O objetivo deste trabalho foi testar uma estratégia profilática na TB experimental imunizando camundongos com uma solução de proteínas secretadas por *M. tuberculosis* (PFC- Proteínas de Filtrado de Cultura) administrada em presença de motivos CpG, como adjuvante. Camundongos BALB/c receberam 3 imunizações com intervalos semanais, por via subcutânea, com uma solução contendo 50 µg de PFC e 50 µg de CpG 1826. Como controles, grupos de animais receberam PFC emulsificado em adjuvante incompleto de Freund (AIF), PFC e CpG 2041 (não estimulatório) ou apenas PBS. A imunogenicidade das estratégias de imunização foi avaliada 15 dias após a última imunização através da detecção de anticorpos séricos e de citocinas produzidas por células de baço mediante estimulação *in vitro*. Para avaliação da eficácia protetora da preparação vacinal, os animais foram imunizados e, após 60 dias, desafiados por via intratraqueal com uma cepa virulenta de *M. tubercu-*

losis. Setenta dias após o desafio realizou-se o ensaio de proteção através da contagem do número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC), a detecção de citocinas produzidas em homogenato de pulmão e avaliação do fenótipo celular no pulmão. Em relação aos ensaios de imunogenicidade, observamos que a imunização com o antígeno PFC acrescido de CpG 1826, CpG 2041 ou AIF induziu produção significativa de anticorpos IgG1 antígeno-específicos. Entretanto, apenas os animais imunizados com PFC e CpG 1826 sintetizaram níveis significativos do isotipo IgG2a. Esses animais também produziram concentrações mais elevadas de IFN-γ, enquanto a imunização com PFC em AIF induziu produção de IFN-γ, IL-5 e IL-10 por células de baço estimuladas com o antígeno específico *in vitro*. Contudo, após o desafio com *M. tuberculosis*, não verificamos proteção no grupo de animais imunizado com PFC e CpG 1826. No pulmão desses animais, detectamos concentrações mais altas de IFN-γ e menores de TGF-β, além de um alto grau de comprometimento do parênquima pulmonar em relação ao grupo de animais imunizados com PFC em AIF, no qual houve uma redução significativa do número de UFC. Os animais imunizados apenas com o antígeno protéico, em presença de CpG 2041 que não possui efeito estimulatório, não apresentaram alteração na resposta imune induzida e no número de UFC em relação aos animais não imunizados e infectados. Na tentativa de otimizar a eficácia da imunização com PFC e CpG 1826, avaliamos também a via de imunização intranasal. Entretanto, camundongos que receberam PFC e CpG 1826 pela via intranasal apresentaram um aumento significativo no número de UFC. Dentro do contexto dos dados obtidos, discutimos neste trabalho a complexa relação *M. tuberculosis*-hospedeiro e suas consequências no desenvolvimento de vacinas contra a TB.

NEUROLOGIA

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DAS EPILEPSIAS FARMACORRESISTENTES DA INFÂNCIA E ADOLESCÊNCIA: ASPECTOS CLÍNICOS E CIRÚRGICOS

Vera Cristina Terra-Bustamante

Orientador: Prof. Dr. Américo Ceiki Sakamoto

Tese de Doutorado apresentada em 21/02/2006

A epilepsia na população pediátrica é intratável em alguns casos, especialmente quando considerados os quadros sintomáticos associados a anormalidades do exame neurológico. Vários autores têm demonstrado uma resposta favorável ao tratamento cirúrgico, com seguimento a longo prazo, com resultados semelhantes aos observados na população de pacientes adultos. Serão analisados os achados demográficos, os exames de investigação e a resposta ao tratamento cirúrgico de um grupo de pacientes com idade entre zero e 18 anos com crises epilépticas refratárias avaliados no programa de cirurgia pediátrica do Centro de Cirurgia de Epilepsia de Ribeirão Preto.

Foram analisados neste estudo 126 pacientes operados no período de julho de 1994 a dezembro de 2003. Foram considerados aspectos demográficos como a idade da realização da cirurgia, tipo de crise, achados histopatológicos e controle pós-operatório das crises epilépticas. Os pacientes foram analisados de acordo com as normas previamente aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Os dados foram analisados retrospectivamente, considerando-se para o controle das crises a data atual. Não houve diferenças estatisticamente significantes na distribuição por sexo. Crises parciais complexas ocorreram em 34,9% dos pacientes, seguidas das crises tônicas (25,3%) e das crises focais motoras (12,7%). Crises diárias ou estado de mal epiléptico foi observado em 69,8% dos pacientes.

O registro eletrográfico (EEG) revelou uma maior incidência de padrões atípicos difusos, sendo que a análise individual dos pacientes operados no lobo temporal revelou uma grande variabilidade dos achados eletrográficos, com a identificação de um padrão inicialmente difuso e posteriormente localizado no lobo temporal, mesmo em pacientes com esclerose mesial temporal. As etiologias mais encontradas foram as malformações do desenvolvimento cortical (24,6%), seguida dos tumores (15,9%), da esclerose mesial temporal (11,5%) e da Encefalite de Rasmussen (7,5%). Cirurgias no lobo temporal foram realizadas em 29,4% dos casos, sendo o maior grupo. Controle pós-operatório satisfatório foi encontrado em 71,2% dos pacientes, considerando-se os casos com classificação I e II de Engel. Os pacientes submetidos à lobectomia temporal apresentaram a melhor evolução e os pacientes submetidos à calosotomia foram os que apresentaram pior prognóstico cirúrgico. Apenas 27 pacientes apresentaram complicações pós-operatórias, sendo que a complicação mais comum foi piora da hemiparesia pré-existente, seguida de pneumonia pós-operatória.

Em conclusão, o controle de crises no pós-operatório foi bastante semelhante na população alvo deste estudo, quando comparada com os achados da literatura para pacientes adultos, embora uma maior incidência de pacientes com epilepsias extratemporais tenha sido observada. Estes achados sugerem que, assim como em adultos, o tratamento cirúrgico para epilepsia deve ser considerado em crianças e adolescentes, mesmo na presença de alterações eletrográficas atípicas.

CONTRIBUIÇÃO DA IMAGEM FUNCIONAL POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA PARA O ESTUDO DA REORGANIZAÇÃO DO CÓRTEX MOTOR PÓS-AVCI

Sônia Maria Fioravante de Carvalho

Orientador: Prof. Dr. Dráulio Barros de Araújo

Dissertação de Mestrado apresentada em 08/03/2006

A recuperação funcional pós-isquemia cerebral tem sido associada à reorganização cortical, mas os mecanismos que envolvem este processo não estão com-

pletamente esclarecidos. A Imagem por Ressonância Magnética funcional – *functional Magnetic Resonance Imaging* (fMRI) - tem contribuído muito para o conhecimento da neuroplasticidade. O objetivo deste estudo foi estabelecer padrões de ativação cerebral através do mapeamento por fMRI, em pacientes na fase crônica de um AVCI (território da ACM). Sendo assim, 27 pacientes foram submetidos ao exame de fMRI, onde uma tarefa motora foi solicitada (abrir e fechar a mão). Destes, 13 tiveram que ser excluídos, principalmente por apresentar artefatos de movimento, totalizando uma amostra final de 14 pacientes. Para a aquisição das imagens, utilizamos um scanner de 1,5 T Siemens (Magnetom Vision) com seqüências do tipo EPI-BOLD. Os ma-

pas estatísticos foram obtidos através do programa Brain Voyager™, usando o método Modelo Geral Linear. Os resultados demonstram ativação predominante nas áreas motoras contralaterais (M1, AMS e CPM), durante a realização da tarefa motora pela mão parética. A ativação na periferia da lesão, giro do cíngulo, ínsula, putamen e cerebelo também estavam presentes em alguns pacientes. Ainda, um efeito condizente com o de habituação, foi observado em apenas um paciente estudado. Este trabalho nos proporcionou visualizar os padrões de ativação encefálica presentes após AVCI, como também, o melhor conhecimento das dificuldades metodológicas e limitações da fMRI, fornecendo informações para futuras investigações.

MORFOMETRIA DE NERVOS PERIFÉRICOS: COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS MANUAL E SEMI-AUTOMÁTICO NA ANÁLISE DE NERVOS PEQUENOS

André Pelegrino Demétrio da Silva

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Paula Sassoli Fazan
Dissertação de Mestrado apresentada em 23/03/2006

Os métodos quantitativos constituem ferramentas importantes no estudo de neuropatias experimentais. Também, técnicas morfométricas têm sido utilizadas para as definições de parâmetros normais de nervos periféricos, tanto no homem quanto em animais de laboratório, sendo os dados obtidos, importantes nas comparações com os danos causados pelas doenças que acometem o sistema nervoso periférico. A morfometria pode ser realizada de forma manual, automática ou semi-automática. Acredita-se que a técnica manual seja inadequada e imprecisa, em decorrência da chance de erros nas contagens e medidas por causa do grande número de fibras nas amostras, do exaustivo trabalho do pesquisador e da dificuldade nas contagens das fibras pequenas. Por outro lado, o método automático, sem a intervenção do pesquisador, pode falhar nas contagens das fibras pequenas e/ou acrescentar nas contagens, artefatos e outras estruturas que não as fibras nervosas. Acredita-se que o método semi-automático seja uma boa escolha, por permitir uma interação entre o pesquisador e o computador, eliminando os erros dos métodos automático e manual. Os objetivos do presente trabalho foram realizar um estudo comparativo entre as técnicas manual e semi-automática, na morfometria de nervos pequenos, levando em consideração os parâmetros mais comumente utilizados nas descrições de norma-

lidade dos nervos, bem como aqueles mais utilizados nas investigações patológicas. Segmentos proximais e distais foram estudados, pois muitas neuropatias têm seu início nos segmentos distais, acometendo os proximais somente em estágios mais avançados da doença. O nervo depressor aórtico (NDA) de ratos Wistar, adultos jovens, foi preparado com técnicas histológicas para inclusão em resina epóxi e estudado em nível de microscopia de luz. A análise morfométrica dos fascículos e das fibras mielínicas, nos segmentos proximais e distais, foi realizada manualmente, a partir de fotomicrografias, em um sistema analisador de imagens acoplado à uma mesa digitalizadora (Mini-MOP). Para a análise morfométrica semi-automática, as imagens obtidas a partir dos negativos, que geraram as fotomicrografias utilizadas na análise manual, foram digitalizadas em um microcomputador. A análise morfométrica dessas imagens foi realizada com o auxílio de um sistema analisador de imagens computacional (KS-400). As mesmas imagens foram analisadas pelos dois métodos, para que se pudesse compará-los apropriadamente. Nossos resultados mostraram que o NDA é um nervo de proporções pequenas e morfometricamente simétrico ao longo de sua extensão. A simetria longitudinal desse nervo foi demonstrada por ambos os métodos morfométricos. Houve uma discreta variação entre os dados obtidos com os métodos morfométricos manual e semi-automático, sendo que essa variação não alcançou níveis de significância. Nossos dados indicam que, para nervos pequenos, o método manual não introduziu erros

na morfometria. Assim, essa técnica pode ser utilizada nesses casos, com a vantagem de ser uma técnica barata e que não requer equipamentos sofisticados para a execução das análises. Entretanto, como houve uma

variação entre os dados obtidos com as duas técnicas, embora não significativa nessa amostra pequena, sugerimos que nervos maiores sejam analisados com cautela.

OFTALMOLOGIA

ENDOFTALMITES CAUSADAS POR ESTAFILOCOCOS COAGULASE NEGATIVO PRODUTORES DE BIOFILME: FREQUÊNCIA, RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS COMUMENTE USADOS NO TRATAMENTO E PROGNÓSTICO VISUAL

Ricardo Marcelo Jacob Noronha

Orientador: Prof. Dr. Erasmo Romão

Tese de Doutorado apresentada em 17/01/2006

A endoftalmite é caracterizada por uma resposta inflamatória ocular a invasão dos tecidos ou fluidos intra-oculares por bactérias, fungos ou mais raramente parasitas. É uma doença grave e geralmente ocorre como complicação após cirurgia ocular ou traumas oculares. As bactérias podem encontrar-se organizadas no organismo hospedeiro, podendo estar envoltas por uma camada protetora formada de mucopolissacarídeos denominada biofilme. A presença deste pode resultar na dificuldade do controle de infecções por dificultar a ação dos antibióticos e do sistema imune do hospedeiro.

Objetivos: Verificar a frequência de positividade de bactérias produtoras do biofilme entre os Estafilococos coagulase negativo isolados de pacientes com endoftalmite; verificar se a produção do biofilme estava associada com maior resistência à terapia antimicrobiana comumente usada no tratamento das endoftalmites e se a produção do biofilme estava associada com pior prognóstico visual nesses pacientes.

Material e métodos: Participaram do estudo

107 pacientes (n=107). Para cada paciente, havia uma amostra da bactéria causadora da endoftalmite no banco de estoque de bactérias do laboratório de microbiologia. Para verificar a produção do biofilme pelas mesmas, foi usado o método de Christensen (teste do tubo). Os resultados foram analisados e comparados com os dados clínicos contidos nos prontuários de cada paciente. A análise estatística foi realizada por meio do Teste Exato de Fisher.

Resultados: Bactérias produtoras do biofilme foram encontradas em 47,66% dos casos. Sensibilidade à vancomicina foi encontrada em todos os casos em que esta droga foi testada, independente da presença do biofilme. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,60$) com relação ao prognóstico visual final entre os casos produtores e não produtores do biofilme.

Conclusão: No presente estudo a presença do biofilme não causou maior gravidade da endoftalmite e também não induziu um pior prognóstico visual após o tratamento. Novos estudos, utilizando outros métodos para detecção do biofilme, deverão ser realizados para comparação e melhor compreensão sobre como agem as bactérias produtoras do biofilme nos casos de endoftalmite bacteriana.

NEUROPROTEÇÃO DA RETINA DOS OLHOS DE COELHOS ALBINOS (RAÇA NOVA ZELÂNDIA) SUBMETIDOS À VITRECTOMIA COM SUBSTITUIÇÃO DO VÍTREO POR ÓLEO DE SILICONE

Mila Wiermann Paques

Orientador: Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos

Tese de Doutorado apresentada em 03/02/2006

Neuroproteção consiste na estratégia de se tratar uma doença pela prevenção da morte neuronal. O objetivo deste estudo, utilizando-se um modelo expe-

rimental de lesão crônica da retina, que envolve a realização de vitrectomia via pars plana (VVPP) e injeção de óleo de silicone (IOS), na câmara vítrea de coelhos albinos (Nova Zelândia), é testar os efeitos neuroprotetores de: cetamina (i.m.; 50 mg/kg), lamotrigina (v. o.; 25 mg/kg), cetoprofeno (i. m.; 10 mg/kg) e suas associações. Quarenta coelhos (de 2,0 a 2,5 Kg) foram submetidos à VVPP e IOS em um de seus olhos. Após a cirurgia, os coelhos foram divididos aleatoriamente em 8 grupos. Os coelhos do Grupo I receberam injeção intramuscular diária de solução salina tamponada (operados-salina). As retinas dos olhos contralaterais dos coelhos do Grupo I foram utilizadas como controle, formando mais um grupo (Grupo II, controles-salina). Os coelhos do Grupo III receberam injeção intramuscular diária de cetamina, enquanto que os do Grupo IV receberam lamotrigina por via oral; os do Grupo V, cetoprofeno por via intramuscular; os do Grupo VI cetamina + lamotrigina por via oral; os do Grupo VII receberam cetamina + cetoprofeno por via intramuscular; os do Grupo VIII lamotrigina + cetoprofeno por via oral; e os coelhos do Grupo IX cetamina + lamotrigina + cetoprofeno por via oral. Todos os coelhos foram tratados por 4 semanas, quando então foram sacrificados. Foram feitas análises qualitativas e quantitativas das retinas coradas com H.E. (hematoxilina-eosina) usando microscópio Zeiss Axiophot e o programa KS 400. As mesmas retinas foram preparadas para o método de TUNEL e analisadas em microscópio de fluorescência, utilizando filtro para FITC (fluoresceína isotiocianato), a fim de detectar a presença de apoptose. A análise qualitativa demonstrou edema mais extenso e desorganização celular nas retinas dos coelhos do Grupo I, quando comparadas com os demais grupos. O mesmo ocorreu, de forma menos expressiva, nas retinas dos coelhos dos Grupos IV (operados-lamotrigina), V (operados-cetoprofeno) e VIII

(operados-lamotrigina+cetoprofeno). O método de TUNEL mostrou apoptose nas camadas da retina dos coelhos do Grupo V. As densidades celulares (células/mm²) na camada nuclear externa (CNE), camada nuclear interna (CNI) e camada de células ganglionares (CCG) da retina de coelhos do Grupo I foram significativamente menores ($p<0,05$) quando comparadas com as retinas dos coelhos do Grupo II. Houve uma graduação, dentre os agentes neuroprotetores, na proteção da retina. Na CNE, a ordem da maior para menor proteção foi a seguinte: cetamina (96%), cetoprofeno (82%), cetamina + lamotrigina + cetoprofeno (80%), cetamina + lamotrigina (74%), lamotrigina + cetoprofeno (69%), cetamina + cetoprofeno (67%) e lamotrigina (56%). A CNI mostrou esta ordem: cetamina (100%), cetamina + lamotrigina + cetoprofeno (99%), lamotrigina + cetoprofeno (91%), cetoprofeno (90%), cetamina + lamotrigina (89%), cetamina + cetoprofeno (67%) e lamotrigina (52%). Na CCG: cetamina + lamotrigina (96%), lamotrigina + cetoprofeno (87%), cetamina (72%), cetoprofeno (49%), cetamina + lamotrigina + cetoprofeno (48%), lamotrigina (41%), cetamina + cetoprofeno (37%). Pode-se concluir que a VVPP e IOS foi associada à morte e desorganização de células da retina de coelhos albinos. A presença de núcleo picnótico, edema intracelular, desorganização celular, menor número de células da CNE, CNI e CCG, edema extracelular e desorganização da matriz nas CPE e CPI além de vacuolização do citoplasma nas células ganglionares evidenciaram a necrose e outras lesões celulares nos Grupos I, IV, V e VIII enquanto que o Grupo V não mostrou proteção contra apoptose, sugerindo que a morte celular após VVPP e IOS envolve mecanismos apoptóticos e de necrose. Após todas as análises, verificou-se que a cetamina, lamotrigina, cetoprofeno e suas associações, foram capazes de proteger a retina contra esses efeitos.

VANCOMICINA LIPOSSOMAL PARA TRATAMENTO DE ENDOFTALMITE EXPERIMENTAL EM COELHOS

Luciana de Sá Quirino Makarczyk

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Jorge

Tese de Doutorado apresentada em 07/02/2006

Os antibióticos utilizados para o tratamento de endoftalmites possuem curto tempo de meia-vida e alguns pacientes necessitam de re-injeções. Lipos-

somos como carreadores de antibióticos são uma recente aplicação em oftalmologia e estudos farmacocinéticos apontam um efeito de liberação prolongado das drogas encapsuladas após injeção intravítrea. No presente trabalho, estudamos a eficácia clínica, microbiológica e toxicidade da vancomicina lipossomal. Para as análises clínica (n=30 olhos) e microbioló-

gica (n=54 olhos), os coelhos previamente infectados com inóculo intravítreo de *Staphylococcus epidermidis* ($1,0 \times 10^7$ unidades formadoras de colônias [UFCs]/0,1 mL), foram divididos em três grupos: 1. tratado com vancomicina lipossomal (1,0 mg/0,1mL) 24 horas após inoculação, 2. tratado com a forma aquosa do antibiótico (1,0 mg/0,1mL) 24 horas após inoculação e 3. grupo controle. A análise clínica foi realizada por meio de análise comparativa dos sinais inflamatórios e infecciosos oculares e a eficácia microbiológica foi avaliada de forma quantitativa (número de UFC/ 0.1mL) utilizando-se materiais vítreos obtidos. A toxicidade ocular foi estudada por meio de análises histopatológica (n=8 olhos) e eletroretinográfica (n=10 olhos). Para ambos estudos, nos olhos direitos de coelhos não

infectados foi administrado 1,0 mg/0,1mL de vancomicina lipossomal e os olhos esquerdos foram utilizados como controle. Vancomicina encapsulada em lipossomos mostrou efeitos clínicos similares comparando-se com a forma aquosa. A formulação lipossomal levou a uma mais rápida esterilização das culturas vítreas em relação à aquosa. A vancomicina lipossomal não é tóxica às estruturas oculares, o que foi demonstrado pelos estudos histopatológicos e eletroretinográficos, apesar do encapsulamento do antibiótico aumentar sua permanência intravítrea. A vancomicina encapsulada em lipossomos pode, portanto, no cenário clínico, servir para tratar as endoftalmites bacterianas agudas e diminuir o número de re-injeções deste antibiótico.

PADRÃO DE FIXAÇÃO EM DOENÇA DE STARGARDT. UM ESTUDO LONGITUDINAL

André Márcio Vieira Messias

Orientador: Prof. Dr. Antonio Augusto Velasco e Cruz
Tese de Doutorado apresentada em 17/02/2006

Objetivo: Determinar as características espaciais e cronológicas do desenvolvimento de fixação excêntrica em pacientes com doença de Stargardt.

Métodos: O local de fixação encontrado na análise do exame de campimetria é equivalente ao lócus de fixação na retina. Os locais de fixação foram determinados com perimetria de Tubingen, medindo-se o deslocamento da mancha cega com o auxílio de um software especialmente desenvolvido para essa finalidade. A amostra foi composta por 349 olhos de 175 pacientes com diagnóstico de doença de Stargardt, nos quais foram realizados 725 campos visuais durante o seguimento clínico.

Resultados: Fixação excêntrica foi encontrada desde a primeira consulta em 116 olhos (33%), enquanto 80 olhos (23%) apresentaram transição entre fixação excêntrica em 2,8 anos de seguimento é de 50%. A análise da posição do novo lócus de fixação mostrou que em 78% dos casos foi preferida a região abaixo do escotoma no campo visual, ou seja, na porção superior à mácula. No restante da amostra, 10% fixaram à esquerda do escotoma no campo visual, 9% à direita e 3% acima. Após escolher um novo lócus de fixação, 67% dos olhos o mantiveram na mesma área.

Conclusões: Apesar do escotoma central, pacientes podem manter fixação central durante diferentes intervalos de tempo. Em aproximadamente 3 anos, tais pacientes passam a fixar excentricamente. A maioria deles apresentou novo lócus de fixação abaixo do escotoma central, o que é considerado favorável para a estratégia fisiológica de leitura.

ESTUDO CLÍNICO-ECOGRÁFICO DA VITREOSQUISE POSTERIOR EM UVEÍTE POSTERIOR FOCAL NECROSANTE

Daniel da Rocha Lucena

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Jorge
Tese de Doutorado apresentada em 10/03/2006

Objetivos: determinar a prevalência da vitreosquise posterior nos olhos com uveíte posterior focal

necrosante, correlacioná-la com a localização e o tamanho das lesões e com o *haze* vítreo, e caracterizar as formas de apresentação da vitreosquise posterior.

Pacientes e métodos: foram examinados pacientes com idade entre 10 e 45 anos e diagnóstico de uveíte posterior focal necrosante atendidos no Am-

bulatório de Oftalmologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo no período de março de 2003 a novembro de 2005. Foram realizadas oftalmoscopia binocular indireta e ecografia ocular modo B com sonda de 10Hz.

Resultados: 131 pacientes foram incluídos no estudo. A prevalência de vitreosquise posterior foi de 73,28%. Lesões maiores do que 2DD e *haze* vítreo maior do que 2+/4+ foram associados significativamente com o desenvolvimento de vitreosquise posterior. Nenhuma associação foi encontrada entre a localização da lesão e o desenvolvimento de vitreosquise pos-

terior. Foram caracterizados 3 tipos de vitreosquise posterior: o tipo I, caracterizado por descolamento de vítreo posterior (DVP) parcial; o tipo II caracterizado por DVP total; e o tipo III caracterizado por DVP “pseudototal”, quando o folheto externo da vitreosquise posterior se desprende totalmente do corpo vítreo, permanecendo aderido à membrana limitante interna da retina.

Conclusões: a prevalência da vitreosquise posterior foi de 73,28%, e o seu desenvolvimento foi relacionado positivamente com o tamanho da lesão e o *haze* vítreo. Foi possível caracterizar a vitreosquise posterior em tipos I, II e III.

ORTOPEDIA

EFEITOS DO ULTRA-SOM PULSADO DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE A CICATRIZAÇÃO POR SEGUNDA INTENÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS TOTAIS EM RATOS

Adriana Clemente Mendonça de Ávila

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Henrique Barbieri
Tese de Doutorado apresentada em 30/01/2006

Os efeitos da baixa intensidade de irradiação ultra-sônica pulsada sobre a cicatrização por segunda intenção em lesão total circular de pele com 1cm de diâmetro produzidas na região dorsal de ratos foram estudados. Sessenta ratos machos da linhagem Wistar com peso médio de 300g foram usados e divididos em dois grupos de 30 animais cada de acordo com o tratamento: Grupo 1, irradiação simulada (equipamento aplicado desligado); Grupo 2, irradiação efetiva (frequência fundamental de 1,5 MHz, frequência de repetição de pulso de 1KHz, largura de pulso de 200 μ s, intensidade de 30mW/cm² (SATA), 10 minutos de aplicação em dias alternados). Cada grupo foi dividido em três subgrupos, de acordo com o período pós-operatório de irradiação ultra-sônica, de 3, 7 e 14 dias, e a cicatrização foi avaliada através de análise macroscópica, histológica e morfométrica. Sob o aspecto macroscópico as lesões cicatrizadas apresentaram-se com maior maturação no 14º dia no grupo 2. A

análise histológica envolveu o uso de dois processos diferentes de coloração (Tricrômico de Masson e Sirius red) e mostrou que o processo de cicatrização foi mais avançado em todas as fases no grupo 2 em comparação ao grupo 1, bem como a organização das fibras colágenas, no entanto não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos. A área da epiderme foi menor no grupo 2 aos 14 dias, provavelmente demonstrando uma aceleração no processo de maturação da cicatriz, a área da derme foi praticamente similar no grupo 1, não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos. Houve um decréscimo significativo ($p < 0,05$) no número de células inflamatórias no grupo 2 (2196.56 ± 234.93 cel/mm²) quando comparado ao grupo 1 (2611.68 ± 432.82 cel/mm²), associado a um aumento da formação de novos vasos desde o período mais precoce de 3 dias. Os autores concluíram que a irradiação ultra-sônica de baixa intensidade não apresenta efeitos deletérios e estimula moderadamente a cicatrização cutânea por segunda intenção em condições experimentais, como nesta investigação, com potencial para aplicação clínica em situações similares em humanos.

ÍNDICE FUNCIONAL DO CIÁTICO NAS LESÕES POR ESMAGAMENTO DO NERVO CIÁTICO DE RATOS. AVALIAÇÃO DA REPRODUTIBILIDADE DO MÉTODO ENTRE EXAMINADORES

Vanessa Vilela Monte-Raso

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Henrique Barbieri
Tese de Doutorado apresentada em 31/01/2006

Foi avaliada a reprodutibilidade entre examinadores do método de avaliação do Índice Funcional do Ciático (IFC), medido por um programa de computação desenvolvido para este fim. Foram empregados 20 ratos Wistar, cujo nervo ciático direito era abordado sob anestesia geral e esmagado num segmento de 5 mm proximal à sua trifurcação com um dispositivo especial, com carga fixa de 5 kgf por 10 minutos. Impressões das pegadas dos animais foram obtidas na fase pré-operatória e, depois, semanalmente, da 1ª à 8ª semana pós-operatória, em uma pista de marcha. As impres-

sões eram digitalizadas, armazenadas e avaliadas, pela medida de parâmetros pré-determinados, por quatro examinadores, seguindo sempre a mesma seqüência de marcação dos parâmetros. Os resultados foram submetidos à análise estatística, que mostrou haver um alto índice de correlação entre examinadores na avaliação pré-operatória e nas 3ª, 4ª, 5ª, 7ª e 8ª semanas (igual ou maior que 0,82), com queda casual na 6ª semana, mas manteve significativa como as demais ($p_F < 0,01$). Na 1ª e 2ª semanas, o índice de correlação foi próximo de zero, mostrando a pouca reprodutibilidade do método nesse período, em que a variabilidade entre os animais não diferiu da variabilidade entre os examinadores ($p_F = 0,24$ e $0,32$, respectivamente), devido à pouca definição das impressões das pegadas.

ANESTESIA PARA ANEURISMECTOMIA DE AORTA ABDOMINAL INFRA-RENAL: EXPERIÊNCIA COM 104 CASOS CONSECUTIVOS NO HC-FMRP-USP

Breno José Santiago Bezerra de Lima

Orientador: Prof. Dr. Luís Vicente Garcia
Dissertação Mestrado apresentada em 07/02/2006

Introdução. A morbi-mortalidade durante e após anestesia para aneurismectomia de aorta abdominal é alta, pois esta doença acomete pacientes após a sétima década de vida e que possuem várias doenças concomitantes.

Objetivos. Analisar e discutir as condutas anestésicas utilizadas nos períodos pré e intra-operatório no Serviço de Anestesiologia do HCFMRP-USP.

Casuística e Método. Foram analisados os prontuários de 104 pacientes submetidos à aneurismectomia de aorta no tocante às condutas utilizadas pelos anestesiológicos para a condução destes casos.

Resultados. Apenas um paciente possuía menos de 40 anos de idade, 76,80% estavam na sétima ou oitava década de vida e 88,46% eram do sexo masculino. A hipertensão arterial acometeu 70,19% dos pacientes e 26,92% possuíam coronariopatia. Pacientes com obesidade foram a minoria (26,92%). O ecocardiograma pré-operatório demonstrou que a grande maioria dos pacientes apresentava função ventricular normal. A cirurgia foi realizada em regime de

urgência em 7,69% dos casos. A anestesia geral exclusiva foi realizada em 17 pacientes e associada com a peridural em 57 pacientes, com a raquianestesia em 11 e com a raqui-peri combinadas em 19. O tempo cirúrgico variou de 120 a 510 minutos enquanto que o tempo de clampeamento aórtico variou de 30 a 165 minutos. Houve um óbito no período intra-operatório e a causa foi choque hipovolêmico e 10 óbitos até o vigésimo dia pós-operatório. Sessenta e seis pacientes receberam concentrado de papa de hemácias durante o período intra-operatório, mas só em 43,27% desses casos a indicação esteve suportada por exame laboratorial. Oitenta pacientes foram extubados ainda na sala de cirurgia, enquanto que os demais (23) permaneceram intubados no período pós-operatório e 19 necessitaram de suporte ventilatório que teve tempo que variou de 3 a 96 horas com média de 42,31 horas. Apenas quatro pacientes fizeram pós-operatório imediato no Centro de Terapia Intensiva enquanto que os demais permaneceram na Sala de Recuperação Pós-Anestésica.

Conclusão. Não existe um protocolo único para a realização de anestesia para aneurismectomia de aorta no HCFMRP-USP e a técnica anestésica utilizada não influenciou o morbi-mortalidade.

REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA PELA BIOMEMBRANA DE LÁTEX NATURAL E SUA PROPRIEDADE ANGIOGÊNICA

Ricardo Violante De Souza

Orientador: Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade
Dissertação de Mestrado apresentada em 10/02/2006

A regeneração de defeitos ósseos pode ocorrer de maneira parcial ou total, com uma técnica conhecida como *regeneração óssea guiada* (ROG). Esta técnica consiste na separação de tecidos diferentes (mineralizados e não-mineralizados) através de uma barreira membranosa sendo criando um espaço voltado para o tecido ósseo (tecido mineralizado) que possibilite seu lento desenvolvimento sem ser afetado pela rápida formação de outros tecidos não mineralizados como por exemplo o tecido cicatricial (não-mineralizado). Biomateriais ósteo-indutores, ósteo-condutores ou osteogênicos buscam favorecer a reorganização do tecido ósseo, importante para o sucesso da ROG. A biomembrana de látex (BML) extraída da seringueira *Hevea brasiliensis* tem se mostrado indutora na cicatrização de úlceras de perna, pé diabético, prótese timpânica e esofágica. Os autores buscam avaliar a eficácia da biomembrana na ROG

no modelo de calvária de rato. Foram anestesiados 18 ratos Wistar, machos, submetidos à cirurgia de calvária, sendo criados dois defeitos ósseos circulares de 5 mm de diâmetro, um em cada osso parietal, denominados sítios controle à esquerda e experimental à direita, nos quais foram cobertos com o tecido de origem e a biomembrana respectivamente. Após 30 dias os animais foram sacrificados e as calotas cranianas dissecadas, fixadas, radiografadas e digitalizadas e as áreas dos defeitos ósseos analisadas no programa *Image J*®, além de serem submetidas à análise histológica. Os resultados foram avaliados pelo teste T de Wilcoxon. A formação óssea no sítio experimental foi superior ao sítio controle em 15 animais ($p < 0,01$), com o fechamento completo em quatro sítios. Histologicamente, observou-se uma grande quantidade de vasos no sítio experimental o que parece corresponder ao fator estimulador para osteogênese, fato não observado nos sítios controles. Os resultados sugerem que a biomembrana de látex, por sua potente atividade neoangiogênica, constitui-se num importante biomaterial indutor da ROG.

CONFIABILIDADE INTRA E INTEREXAMINADORES DO LIMIAR DE DOR POR PRESSÃO (LDP) E SUA CORRELAÇÃO COM A PALPAÇÃO MANUAL (PM) DE ESTRUTURAS DO SISTEMA MASTIGATÓRIO DE CRIANÇAS COM E SEM RELATO DE DOR OROFACIAL RELACIONADA À DISFUNÇÃO TEMPOROMANDIBULAR (DTM)

Thaís Cristina Chaves

Orientadora: Profa. Dra. Débora Bevilaqua Grossi
Dissertação de Mestrado apresentada em 23/02/2006

A dor orofacial pode ter seu surgimento na infância. No entanto, em crianças a avaliação da dor induzida por pressão, método amplamente utilizado para avaliar a Disfunção Temporomandibular (DTM), pode ser menos confiável do que em adultos. Assim, torna-se importante a verificação de técnicas mais adequadas e confiáveis para avaliar a dor nessa faixa etária. Portanto, o objetivo deste estudo foi verificar a confiabilidade intra e interexaminadores do Limiar de Dor por Pressão (LDP) e da Palpação Manual (PM) e a correlação entre essas técnicas em crianças com e sem relato de dor orofacial relacionada a DTM, bem

como verificar diferenças nos valores de LDP e intensidade de dor relativos a PM entre estes grupos de crianças. Foram selecionadas aleatoriamente a partir de uma amostra de 600 crianças, 27 que apresentaram relato de dor nos músculos mastigatórios ou na articulação temporomandibular (ATM) e 73 que não relataram dor, a partir da aplicação de uma versão adaptada de um índice anamnésico. Em cada sessão de avaliação foram registradas três medidas consecutivas de LDP e as medidas relativas a intensidade de dor a PM através da aplicação de uma Escala Facial de Dor (EFD) de 6 e 4 categorias. Dois examinadores previamente treinados aplicaram a algometria (velocidade de aplicação de $0.5 \text{ kg/cm}^2/\text{seg}$) e a PM (pressões de aproximadamente 0.7 kg/cm^2 e 1.5 kg/cm^2) nas estruturas do sistema estomatognático das crian-

gas. Para análise dos dados foi utilizado o Coeficiente de Correlação Intraclasse (ICC) para avaliação dos níveis de concordância das variáveis contínuas e o Kappa ponderado para as variáveis categóricas. Para análise da variabilidade foi calculado o Coeficiente de Variação. Foram verificados níveis excelentes ($ICC > 0.75$) de confiabilidade intra e interexaminadores para o LDP para a maioria das estruturas avaliadas para as crianças que não relataram dor orofacial e níveis excelentes e moderados para as crianças que relataram dor. O procedimento de descartar a primeira medida de três mensurações elevou os valores de ICC em ambos os grupos. Para as avaliações obtidas em diferentes dias tal procedimento reduziu os valores de ICC nas crianças que relataram dor. Foram observados níveis de kappa entre moderados, razoáveis e leves para a PM em ambos os grupos, piores valores de confiabilidade interexaminadores e piores valores de confiabilidade intra-examinador com a aplicação da EFD de 4 categorias em relação a aplicação da EFD de 6 categorias. Ambas as técnicas foram capazes de diferenciar crianças com e sem classificação de DTM de acordo com o índice anamnésico aplicado, mas apenas a PM foi capaz de diferenciar crianças com e sem relato de dor orofacial. Foi observada fraca correlação negativa entre as técnicas, ape-

sar dos maiores níveis de correlação constatados nas crianças que relataram dor ($-0.38 < r < -0.62$) em relação às crianças que não relataram dor ($-0.23 < r < -0.46$). Os resultados desse estudo demonstraram que para avaliações conduzidas em diferentes dias em crianças que apresentam relato de dor orofacial a média de três medidas consecutivas de LDP seja utilizada em detrimento da média de duas medidas consecutivas. A algometria para obtenção do LDP demonstrou maiores níveis de confiabilidade que a técnica de PM e como a PM demonstrou níveis aceitáveis apenas para a confiabilidade intra-examinador, em avaliações conduzidas em dias diferentes e por examinadores distintos recomenda-se o uso da Algometria para obtenção do LDP. A maior correlação observada entre o LDP e a PM, no grupo de crianças que relataram dor, sugere que menores variações fisiológicas ou, limiares na dor, são melhor traduzidas em termos de percepção de intensidade de dor em crianças que relatam dor. Como o relato de dor pode ser considerado o “*padrão-ouro*” para avaliação da dor, o estudo de crianças que relatam dor, mas não procuraram atendimento clínico especializado e, portanto, podem apresentar níveis de dor subclínicos, pode auxiliar no entendimento dos fatores envolvidos no desenvolvimento de dor orofacial ao longo do tempo.

AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS CORPOS VERTEBRAIS E DISCOS INTERVERTEBRAIS NA COMPOSIÇÃO DA LORDOSE LOMBAR

Luiz Henrique Fonseca Damasceno

Orientador: Prof. Dr. Helton L. A. Defino

Tese de Doutorado apresentada em 28/03/2006

Foi avaliada a participação dos corpos vertebrais e discos intervertebrais na lordose lombar e, a contribuição destes nas curvaturas lombares de diferentes magnitudes. Foram avaliadas as radiografias lombares em perfil de 350 adultos assintomáticos (143 homens e 207 mulheres, idade média 29 anos). Foram mensuradas a curvatura lombossacra (L1S1), a curvatura lombolombar (L1L5), a angulação de cada corpo vertebral e cada disco intervertebral por meio de uma variação do método de Cobb. A participação percentual dos corpos vertebrais e dos discos intervertebrais na curvatura lombossacra também foi determinada. Comparações entre os sexos e as faixas etárias foram realizadas. Os indivíduos foram divididos em três subgru-

pos populacionais, de acordo com a magnitude da lordose lombossacra, de modo a separar os indivíduos pertencentes aos extremos da curva de distribuição. Os componentes da curvatura lombar (corpos vertebrais e discos intervertebrais) foram comparados nestes três subgrupos. A medida da curvatura lombossacra no grupo inicial foi $-60,9^\circ$ (-33° a -89°). Os corpos vertebrais eram cifóticos em L1 ($2,15^\circ$), tendiam ao neutro em L2 ($-0,36^\circ$) e eram progressivamente lordóticos de L3 ($-1,56^\circ$) a L5 ($-9,23^\circ$). Os discos intervertebrais eram progressivamente lordóticos (variando de $-4,99^\circ$ em L1-L2 a $-15,58^\circ$ em L5-S1). Os corpos vertebrais e discos intervertebrais apresentaram participação progressivamente maior no sentido crânio-caudal. Os discos intervertebrais participaram com cerca de 80% da curvatura lombossacra, sendo que os elementos mais caudais (corpos vertebrais L4 e L5 e discos intervertebrais L4-L5 e L5-S1) corresponderam a mais

de 65% da curvatura lombossacra. Os indivíduos mais idosos apresentaram medidas das curvaturas lombares maiores cerca de 4° em comparação aos indivíduos mais jovens, havendo diferença significativa para as medidas dos corpos vertebrais L2 e L5 e o disco intervertebral L3-L4, sendo maiores as medidas nos indivíduos mais idosos. As medidas das curvaturas lombares e dos corpos vertebrais L2 e L4 apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os sexos, sendo as medidas maiores nos indivíduos do sexo feminino. A curvatura lombossacra apresentou média de -46,9° no subgrupo lordose menor; -61,59° no subgrupo lordose intermediária e; -74,13° no subgrupo lordose maior. A curvatura lombolombar apresentou média de -33,28° no subgrupo lordose menor; -45,34° no subgrupo lordose intermediária e; -56,96° no subgrupo lordose maior. Os corpos vertebrais e os discos intervertebrais apresentaram medidas absolutas menores no subgrupo lordose menor do que as dos subgrupos lordose intermediária e lordose maior, mas a participação dos discos intervertebrais na curvatura lombossacra no subgrupo lordose menor (88%) foi maior que nos subgrupos lordose intermediária (81%) e no subgrupo lordose maior (75%). Complementarmente, os corpos intervertebrais apresentaram maior participação nos subgrupos lordose maior e lordose intermediária. Individualmente, os corpos vertebrais apresentaram maior participação no subgrupo lordose maior, exceto pelo corpo vertebral L5 que apresentou maior participação no subgrupo lordose menor. A maior participação percentual dos discos intervertebrais no subgrupo lordose menor era devida à inclinação cifótica dos corpos vertebrais mais cefálicos (especialmente L1 e L2) no subgrupo lordose menor do que nos demais subgrupos, que, por um efeito compensatório, causava uma maior participação discal nas curvaturas menores. Os demais subgrupos apresentavam os corpos vertebrais cefálicos com inclinação muito mais lordótica do que o observado no subgrupo lordose menor. Concluímos que os discos intervertebrais são os principais responsáveis pela curvatura lombar e que a contribuição dos corpos vertebrais e discos intervertebrais na lordose lombar difere entre indivíduos com curvaturas de diferentes magnitudes. Apesar de ocorrer um aumento gradual do acunhamento lordótico do corpo e disco a cada nível vertebral conforme aumenta a medida da lordose, as vértebras mais cefálicas provocam uma diferença na contribuição percentual entre discos intervertebrais e corpos vertebrais nas curvaturas de tamanhos diferentes.

participação nos subgrupos lordose maior e lordose intermediária. Individualmente, os corpos vertebrais apresentaram maior participação no subgrupo lordose maior, exceto pelo corpo vertebral L5 que apresentou maior participação no subgrupo lordose menor. A maior participação percentual dos discos intervertebrais no subgrupo lordose menor era devida à inclinação cifótica dos corpos vertebrais mais cefálicos (especialmente L1 e L2) no subgrupo lordose menor do que nos demais subgrupos, que, por um efeito compensatório, causava uma maior participação discal nas curvaturas menores. Os demais subgrupos apresentavam os corpos vertebrais cefálicos com inclinação muito mais lordótica do que o observado no subgrupo lordose menor. Concluímos que os discos intervertebrais são os principais responsáveis pela curvatura lombar e que a contribuição dos corpos vertebrais e discos intervertebrais na lordose lombar difere entre indivíduos com curvaturas de diferentes magnitudes. Apesar de ocorrer um aumento gradual do acunhamento lordótico do corpo e disco a cada nível vertebral conforme aumenta a medida da lordose, as vértebras mais cefálicas provocam uma diferença na contribuição percentual entre discos intervertebrais e corpos vertebrais nas curvaturas de tamanhos diferentes.

SAUDE NA COMUNIDADE

EPIDEMIOLOGIA DE FATORES SOCIAIS RELACIONADOS À SAÚDE BUCAL RELATADOS PELAS MÃES OU RESPONSÁVEIS POR CRIANÇAS HIV+/AIDS ATENDIDAS NO HCRP

Patrícia Lima Balbo

Orientador: Prof. Dr. Antonio Luiz Rodrigues Júnior
Dissertação de Mestrado apresentada em 13/03/2006

A entrada da mulher na causalidade da aids provocou o aumento da transmissão vertical. A assistência aos casos de aids pediátrica deve considerar o atendimento odontológico, para prevenir, promover e recuperar a saúde bucal destas crianças. O objetivo deste estudo foi abordar, de maneira descritiva/exploratória, os fatores sociais associados ao cotidiano das mães ou cuidadoras responsáveis, no que se refere aos cui-

dados bucais, de crianças HIV+ atendidas no HCRP. Foi realizado um estudo transversal, através de uma amostra de conveniência composta por mães/cuidadoras de crianças HIV+ que faziam acompanhamento no ambulatório da UETDI do HCRP, de maio a outubro de 2005, totalizando 50 voluntários. Uma sessão de aconselhamento sobre saúde bucal foi realizada, com todas as mães/cuidadoras individualmente, cujas informações foram coletadas através de um questionário, numa entrevista estruturada, coletando dados sobre qualidade de vida, nível socioeconômico e aspectos relacionados com a percepção, promoção e

cuidados de saúde bucal. Estas informações somente foram usadas para a finalidade da pesquisa após a sessão de aconselhamento sobre saúde bucal e após o consentimento livre e esclarecido. Foi usada a metodologia do WHOQoL-bref, para avaliar os domínios de qualidade de vida (Físico, Psicológico, Social e Meio ambiente); o método CCEB foi empregado para obter uma categorização socioeconômica; e uma “Escala Odontológica”, que foi construída com a finalidade de mensurar os conhecimentos sobre saúde bucal deste estudo (Percepção, Promoção, Cuidados), à semelhança dos indicadores compostos. A análise estatística dos dados foi realizada pelo método multivariado de agrupamentos (análise de clusters), usando os domínios do WHOQoL-bref e da “Escala Odontológica”; o método de Cronbach foi usado para a verificação da consistência interna dos instrumentos; tabelas e medidas descritivas foram usadas. Do ponto de vista

da qualidade de vida, foram encontrados dois grupos distintos: o grupo com melhores níveis de qualidade de vida relatou ter menos dificuldade no atendimento odontológico, uma maior parcela de residentes em casa própria e, dentre as informantes que já haviam levado seus filhos ao dentista, foi encontrado uma menor proporção de integrantes da categoria socioeconômica mais baixa (D+E). A “Escala Odontológica” gerou seis grupos sendo que um dos grupos sempre se destacou por apresentar melhores níveis de satisfação com a saúde, de qualidade de vida, de percepção de necessidades e também foram os que receberam mais orientações relacionadas à saúde bucal. Os resultados deste estudo remetem à necessidade de se conhecer as demandas dos indivíduos HIV+, para adequar os serviços odontológicos dentro de programas multiprofissionais de assistência à saúde.

RESUMO DE TESE DE DOUTORADO APRESENTADA NA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - USP EM MAIO DE 2005

CLÍNICA MÉDICA

DIAGNÓSTICO DE HANTAVÍRUS POR DETECÇÃO GENÓMICAS COM ESTUDO FILOGENÉTICO E PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA N RECOMBINANTE

Marcos Lázaro Moreli

Orientador: Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo
Tese de Doutorado apresentada em 18/05/2005

Hantaviruses são zoonoses distribuídas mundialmente, associadas a roedores (família *Muridae*) e transmitidas ao homem pela inalação de partículas virais contidas nas excretas destes roedores. Os Hantavírus são causadores de duas doenças principais: a Febre Hemorrágica com Síndrome Renal, de baixa letalidade, que ocorre na Ásia e Europa e a Síndrome Pulmonar e Cardiovascular por Hantavírus (SPCVH) que ocorre nas Américas, associada a roedores da subfamília *Sigmodontinae*. *Hantavirus* são um gênero na família *Bunyaviridae*. São envelopados, com 80 a 110 nm, possuindo RNA de fita simples

e polaridade negativa, divididos em 3 segmentos, o grande (L), o médio (M) e o pequeno (S), que codificam respectivamente a polimerase viral, as glicoproteínas de superfície (G1 e G2) e a proteína do nucleocapsídeo (N). Vários Hantavírus tem sido identificados em países da América do Sul, incluindo o Brasil, onde são conhecidas as espécies, Juitituba (JUQ), Araraquara (ARA), Castelos dos Sonhos (CAS), Anajatuba (ANJ) ou Rio Mearim (RIME). A SPCVH é problema de saúde pública na região de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, onde já se notificou 37 casos desde 1998, com alta letalidade. O diagnóstico de infecções por Hantavírus no país tem sido feito por ELISA, detectando anticorpos contra a proteína N dos vírus Sin Nombre e Andes. Um método alternativo ao ELISA é a RT-PCR. Como parte

deste trabalho, selecionou-se *primers* em regiões de alta similaridade entre distintos Hantavírus, para utilização em RT-PCR. Por esta técnica, o gene N de *Hantavirus* foi detectado em 8 de 9 amostras séricas de pacientes com SPCVH (88,9%) e em todas as 9 amostras por uma *nested*-PCR (100%). Seqüenciou-se nucleotídios dos *amplicons* da RT-PCR e da *nested*-PCR evidenciando alta similaridade destas seqüências com o gene N do Hantavírus ARA (94,8% a 99,1%). A RT-PCR e a *nested*-PCR mostraram-se métodos úteis ao diagnóstico de infecções por *Hantavirus*, prestando-se seus produtos a estudos filogenéticos. Também, selecionou-se *primers* para amplificação por RT-PCR dos genes G1 e G2. De 10 pacientes que tiveram *amplicons* de G1, G2 e N seqüenciados, fez-se análise filogenética. Para tanto, seqüências foram primeiramente alinhadas pelo programa ClustalW, versão 1.7, editadas com o programa BioEdit *Sequence Alignment Editor*, versão 7.02 e a análise filogenética feita com o programa POY 3.0.1.1 baseada em máxima parsimônia utilizando algoritmo de otimização direta para seqüências não alinhadas para análise individual e simultânea dos genes de N, G1 e G2. A edição de árvores foi feita no programa WinClada versão 1.00.08 e mostrou 3 grupos distintos de vírus da América do Sul. O do vírus Andes (AND), o de outros vírus Argentinos, Pergamino (PRG), Maciel (MAC), Lechiguana, Hu39694 e o do vírus Araraquara (ARA), que se agrupou com as seqüências de fragmentos genômicos

obtidos dos pacientes. A proximidade filogenética mostra que o Hantavírus causador de SPCVH na região de Ribeirão Preto foi o ARA. Também, seqüenciou-se todo o segmento S do ARA, e com este buscou-se expressar o gene da proteína N. Para tanto, selecionou-se vários *primers* e com eles, produziu-se *amplicons* de ~500, ~1400, ~1500 e ~1700 pb, que foram clonados e seqüenciados. O segmento S inteiro de ARA possui 1858 nucleotídios (nt) e a sua região codificadora de N, 1287 nt. Comparou-se filogeneticamente o gene inteiro de N com o de outros Hantavírus, tendo este se mostrado-se mais similar aos vírus MAC e PERG. Expressou-se o gene de N com novos *primers* e um *amplicon* com tamanho esperado foi diretamente clonado no vetor de expressão pET 200D, cujo o plasmídeo foi utilizado para transformar colônias de *Escherichia coli* BL21 Star™ DE3. Esta bactéria, induzida com IPTG, produziu altos teores de uma proteína detectável em *WesternBlot* por anticorpos de soros de pacientes convalescentes de SPCVH. Avaliou-se o grau de solubilidade e purificou-se esta proteína N por coluna de afinidade Ni-NTA, quantificou-se o produto e utilizou-se o mesmo em ELISA juntamente com controle negativo (*Escherichia coli*, contendo plasmídeo sem gene de N). O ELISA foi testado em 24 amostras de soros utilizando a proteína N recombinante de ARA como antígeno, sendo que 17 destas foi detectado anticorpos IgG contra Hantavírus e pode ser utilizado rotineiramente no diagnóstico da SPCVH.