

Resumos de Dissertações de Mestrado e Teses de Doutorado apresentadas na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP de janeiro a março de 2011

Biologia Celular e Molecular

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO GENE *VRP1* EM *Candida albicans*

Marcos Vinícios Salles Dias

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Rodrigues Coelho

Tese de Doutorado apresentada em 02/02/2011

Candida albicans é um fungo comensal que passa a se comportar como patógeno em indivíduos imunocomprometidos, sendo uma das principais causas de mortalidade por infecções fúngicas em hospitais. Esse microorganismo é capaz de crescer em diferentes estados morfogênicos e a transição da forma de levedura para a forma de hifas é um importante fator de virulência. O citoesqueleto de actina têm um papel chave na morfogênese e na formação das hifas. Na análise funcional de novos genes é muito importante saber a localização subcelular da proteína codificada. Desenvolvemos um transposon nesse trabalho derivado do transposon bacteriano Tn5 para gerar fusões com *GFP* em proteínas não caracterizadas de *Candida albicans*. Nós usamos um grupo de 19 genes não caracterizados em *C. albicans*, cujos homólogos em *S. cerevisiae* estão envolvidos na organização do citoesqueleto de actina, como alvo para reações de transposição *in vitro* utilizando o transposon Tn5-CaGFP-SAT1-FLP. Obtivemos uma inserção in-frame no gene *VRP1*. A análise da fluorescência da proteína de fusão *VRP1-GFP* tanto em leveduras quanto em hifas de *C. albicans* mostra uma distribuição pontuada na periferia celular e essa localização é dependente da correta organização do citoesqueleto cortical de actina. Para ampliar a caracterização funcional desse gene nós deletamos ambos os alelos do gene *VRP1* de *C. albicans*. A linhagem homozigota gerada mostra uma série de defeitos morfológicos associados com a desorganização do citoesqueleto de actina. As células leveduriformes têm problemas de citocinese permanecendo unidas em agregados celulares. Em condições indutoras de hifas as células têm uma forte redução da filamentação e uma grande proporção de células de pseudo-hifas tanto em meio líquido quanto em meio sólido. As células da linhagem mutante também exibiram defeitos na endocitose do marcador FM4-64 evidenciado pela fragmentação de vacúolos. Adicionalmente foi observado também defeitos na seleção do sítio de brotamento e sensibilidade ao sal e à componentes que perturbam a membrana ou a parede celular. Através de estudos de expressão gênica verificamos que na ausência de *VRP1* há uma desregulação de algumas vias importantes para a transição levedura-hifa além da ausência de indução dos genes específicos de hifas *HWP1* e *HGC1*. Nossos resultados demonstram que *VRP1p* é uma proteína requerida para o crescimento polarizado e morfogênese em *Candida albicans*.

ANÁLISE GLICOPROTEÔMICA EM LINHAGENS CELULARES: UM MODELO DE MELANOMA MURINO

Talita Diniz Melo

Orientador: Prof. Dr. José César Rosa

Dissertação de Mestrado apresentada em 18/02/2011

Melanoma é um tumor agressivo derivado da transformação de melanócitos devido a mudanças no microambiente dérmico. Neste trabalho foram investigadas, utilizando estratégias proteômicas e glicômicas, TM1 e TM5, duas linhagens celulares de melanoma obtidas a partir de uma linhagem melanocítica, melan-a, submetida a sequenciais ciclos de crescimento com ancoragem impedida, mimetizando a progressão de melanomas. As linhagens celulares melan-a, TM1 e TM5 foram investigadas em quatro níveis distintos, 1) Expressão de proteínas por abordagem de *shotgun proteomics*; 2) N-glicosilação pelo isolamento de N-glicanas através de tratamento enzimático com PNGase F, permetilação e espectrometria de massas; 3) Incorporação metabólica de análogos de N-acetil-glicosamina-azida (GlcNAz) e N-acetil-manosamina-azida (ManNAz) e 4) Fosfoproteoma e a suscetibilidade de TM1 e TM5 a intoxicação por metais. A comparação por *shotgun*

proteomics entre as linhagens identificou a presença de proteínas relacionadas ao ciclo celular, metabolismo de carboidratos, regulação biológica e comunicação celular, em mecanismos chave para o surgimento e progressão de câncer. A incorporação metabólica GlcNAz e ManNAz em oligossacarídeos permitiu a inserção de um grupo químico repórter aos glicoconjugados celulares, representando uma poderosa ferramenta para a visualização das células por microscopia, a caracterização da população das células por citometria de fluxo, componentes secretados pelas células (secretoma) e a possibilidade de enriquecimento das glicoproteínas por método de afinidade como biotina-estreptavidina. Oba-Shinjo et al (2006) mostraram que TM1 e TM5 apresentam significativas alterações em glicoconjugados. A caracterização de N-glicanas a partir do extrato protéico total destas linhagens e a incorporação metabólica de azido-açúcares N-acetilglucosamina (GlcNAz) e N-acetilmanosamina (ManNAz) indicou maior abundância de glicofomas do tipo híbrido/complexo de alta massa molecular em TM5 comparado a TM1 e Melan-a. A citometria de fluxo utilizando Alexa-fluor 488 mostrou que GlcNAz foi incorporado mais eficientemente em TM1 e TM5 comparado as células não tumorigênicas, Melan-a. Entretanto ManNAz, precursor de ácido siálico, foi incorporada na mesma proporção pelas três linhagens celulares. Adicionalmente, glicoproteínas marcadas com azido-açúcar e secretadas para o meio de cultura detectadas através de *dot-blot* indicaram uma marcação mais intensa em TM5 e TM1 respectivamente, sugerindo uma maior secreção de glicoproteínas pelas células de melanoma. Análises do fosfoproteoma, realizada por nosso grupo, indicaram que as células transformadas TM1 e TM5 acumularam um maior número de fosfoproteínas identificadas via seus fosfopeptídeos com função biológica de ligantes a metais. Ensaios de proliferação em Melan-a, TM1 e TM5 submetidas à exposição de diferentes concentrações de Zn, Co e Cu mostraram que TM5 foi mais suscetíveis a intoxicação por metais do que Melan-a.. Dessa forma, as investigações de modificações pós-traducionais como glicosilação e fosforilação de proteínas utilizando estratégia proteômica e incorporação metabólica de azido-açúcares abrem possibilidades para um melhor entendimento do fenótipo maligno adquirido por TM1 e TM5.

A INCORPORAÇÃO DE 5-BROMO-2'-DESOXIURIDINA (BRDURD), EM CROMOSSOMOS POLITÊNICOS DA GLÂNDULA SALIVAR DE *Bradysia hygida* (DIPTERA, SCIARIDAE), INIBE A EXPRESSÃO DOS GENES AMPLIFICADOS: BHB10-1, BHC4-1 E BHC5-2

Juliana Conti Viana

Orientador: Prof. Dr. Jorge Cury de Almeida

Dissertação de Mestrado apresentada em 04/03/2011

Trabalhos publicados, durante as últimas décadas, a respeito dos diferentes papéis exercidos pela 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdUrd), um análogo da timidina (dThd), em diversos modelos biológicos, têm mostrado que a BrdUrd pode induzir ou inibir a expressão gênica e a diferenciação celular.

Nos Sciaridae, a diferenciação celular, na glândula salivar, envolve um processo de amplificação gênica, que ocorre em sítios específicos dos cromossomos politênicos, ao final do quarto e último estágio larval, levando à formação dos pufes de DNA (Breuer and Pavan, 1955). A injeção de BrdUrd em larvas de *Bradysia hygida*, durante o período de amplificação gênica, leva a um efeito morfológico notável - os pufes de DNA não se expandem, a cromatina, nesses sítios cromossômicos, permanece muito compactada durante o resto do quarto estágio e o processo de transcrição, estudado autorradiograficamente, é severamente prejudicado nestes primórdios (Almeida et al., 2010).

O objetivo do presente trabalho é demonstrar, morfológica e molecularmente, como ocorre o efeito da BrdUrd sobre a diferenciação celular, estudando seu papel no controle da atividade de genes amplificados específicos.

Por imunolocalização indireta, demonstramos que os primórdios dos pufes de DNA, sítios onde ocorre amplificação gênica, incorporam preferencialmente a BrdUrd. Se dThd for injetada com a BrdUrd, na mesma concentração, o análogo não é incorporado e seu efeito sobre a cromatina dos primórdios não aparece. Portanto, concluímos que o efeito da BrdUrd depende dos altos níveis de incorporação nos primórdios dos pufes de DNA.

A atividade de transcrição dos pufes de DNA, em *B. hygida*, depende de que o receptor da 20-OH ecdisona (BhEcR) e RNA polimerase II estejam presentes nestes sítios cromossômicos (Candido-Silva et al., 2008). Portanto, seria interessante investigar o que acontece com estas proteínas, quando os primórdios dos pufes de DNA são impedidos de expandir, pela ação do análogo. Como era esperado, por imunolocalização, não detectamos ou detectamos pequenas quantidades de RNA polimerase II nos primórdios tratados. Este resultado sustenta a demonstração anterior, que mostrou, em estudo autorradiográfico, que a síntese de RNA era muito prejudicada nos primórdios tratados (Almeida et al., 2010).

Entretanto, este é um efeito geral, os pufes de DNA podem abrigar mais de um gene. Neste trabalho, por "Northern blots", mostramos que três genes amplificados específicos, *BhC4-1*, *BhC5-2* e *BhB10-1*, situados em diferentes pufes de DNA, têm sua transcrição praticamente suprimida quando a larva é tratada com a BrdUrd. Por Western blots, este efeito foi confirmado para dois daqueles genes, *BhC4-1* e *BhB10-1* (para os quais dispomos de anticorpos contra seus produtos).

Em nosso sistema, fica claro que o efeito da BrdUrd sobre a diferenciação celular, na glândula salivar, se deve a sua incorporação diferencial nos primórdios dos pufes de DNA, que leva a forte compactação da cromatina destes sítios cromossômicos. Os pufes não se expandem, componentes essenciais para a transcrição de genes situados nestes sítios têm seu acesso dificultado, resultando em falha na transcrição de genes amplificados específicos e ausência de seus produtos finais (as proteínas). É possível que, em outros sistemas, compactação irreversível de regiões da cromatina também esteja envolvida na inibição da diferenciação celular pela BrdUrd.

Ainda está para ser demonstrado se a compactação extrema observada nos primórdios dos pufes de DNA se deve a uma interação modificada entre o DNA que incorporou BrdUrd e proteínas cromossômicas. Nos próximos passos deste trabalho, queremos investigar esta possibilidade, usando anticorpos contra diferentes tipos de histonas.

O PAPEL DA FOSFOLIPASE D NA FORMAÇÃO DE VESÍCULAS RECOBERTAS COM CLATRINA ASSOCIADAS AO COMPLEXO DE GOLGI EM CÉLULAS DO DUCTO DE GLÂNDULA SALIVAR

Lorena Brito de Souza

Orientadora: Profa. Dra. Constance Oliver

Tese de Doutorado apresentada em 25/03/2011

A Fosfolipase D (PLD) hidrolisa a fosfatidilcolina para produzir o ácido fosfatídico (PA) e a colina. A PLD está envolvida em diversas funções celulares, no entanto, a função e a localização intracelular da PLD varia de acordo com o tipo celular. O objetivo deste estudo foi identificar as possíveis funções da PLD em células do ducto intercalar da glândula parótida. O tratamento das células com o álcool primário 1-butanol (1-ButOH) inibe a hidrólise de fosfatidilcolina pela PLD, diminuindo a produção de PA, e o fosfatidil-1-butanol é formado por reação de transfosfatidilação. Em células HSY, a PLD1 e a PLD2 estão localizadas no *Trans-Golgi Network* e apresentam co-localização com as vesículas de clatrina. Quando as células são tratadas com 1-ButOH, as vesículas de clatrina e as isoformas da PLD ficam retidas na região perinuclear. A diminuição dos níveis de PA, devido ao tratamento com 1-ButOH, resulta no acúmulo de proteínas transportadas por vesículas de clatrina, como TGN-46 e CI-MPR6, na região perinuclear. O tratamento das células HSY com 1-ButOH também causa o aumento do volume dos lisossomos que ficam concentrados na região perinuclear e afeta o complexo de Golgi, aumentando as cisternas dessa organela. O tratamento das células HSY com carbacol 10^{-6} M durante 2 min, ativa a PLD, assim como, aparentemente, aumenta a formação de vesículas recobertas por clatrina e de lisossomos. Assim, a PLD está envolvida na formação de vesículas recobertas por clatrina associadas ao complexo de Golgi, assim como na manutenção da estrutura do complexo de Golgi e na manutenção da morfologia dos lisossomos em células do ducto da glândula parótida.

Bioquímica

INFLUÊNCIA DA SALINIDADE E DAS POLIAMINAS EXÓGENAS NAS CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS DA $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ BRANQUIAL DO ERMITÃO *Clibanarius vittatus*

Malson Neilson de Lucena

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Leone

Dissertação de Mestrado apresentada em 11/02/2011

Para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na osmorregulação e excreção de amônia, bem como da regulação da atividade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ branquial em resposta à alteração da salinidade do meio externo, neste trabalho foi realizada a caracterização cinética da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ branquial do ermitão *Clibanarius vittatus* aclimatado a 45‰. A fração microsomal branquial de *C. vittatus* aclimatado a 45‰ foi analisada em gradiente contínuo de sacarose e revelou uma fração com atividade K^+ -fosfatase e duas frações com atividade ATPase. A análise por *Western blotting* revelou a presença de uma única isoforma da subunidade α tanto na preparação do animal recém capturado quanto do animal aclimatado, porém a expressão é 1,8 vezes maior nos animais aclimatados, ao contrário da atividade específica que é maior nos animais recém capturados. A hemolinfa dos animais aclimatados apresentou uma osmolalidade de $1102,5 \pm 22,1$ mOsm kg^{-1} H_2O . Após dez dias de aclimação, as concentrações de Na^+ , K^+ e Mg^{2+} não retornaram aos valores das condições iniciais, enquanto a concentração do íon Ca^{2+} retornou a valores semelhantes aos animais recém capturados. A caracterização cinética da atividade K^+ -fosfatase da enzima, revelou que a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ hidroliza o PNFF ($V = 19,46$ $0,97$ U mg-

1 e $K_{0,5} = 0,99\ 0,05\ \text{mmol L}^{-1}$) através de interações cooperativas ($nH = 1,2$). A modulação da enzima pelos íons magnésio ($V = 21,66\ 1,08\ \text{U mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 0,88\ 0,04\ \text{mmol L}^{-1}$), potássio ($V = 18,38\ 1,38\ \text{U mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 3,55\ 0,18\ \text{mmol L}^{-1}$) e amônio ($V = 17,15\ 4,0\ \text{U mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 20,1\ 1,00\ \text{mmol L}^{-1}$) ocorreu através de interações sítio-sítio. Os íons sódio atuaram como inibidores da atividade K^+ -fosfatase da enzima ($KI = 1,025\ 0,05\ \text{mmol L}^{-1}$) e a ouabaína inibiu cerca de 60% da atividade K^+ -fosfatase, independentemente da presença de íons amônio. A atividade K^+ -fosfatase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ foi estimulada sinergisticamente pelos íons potássio e amônio aumentando a atividade específica em 30%. A hidrólise do ATP pela enzima presente nos microsomas de *C. vittatus* aclimatado a 45% de salinidade ocorreu em sítios de alta afinidade ($V = 46,55\ 3,5\ \text{U mg}^{-1}$) e ($K_{0,5} = 7,07\ 0,01\ \text{mol L}^{-1}$) e também em sítios de baixa afinidade ($V = 108,12\ 2,5\ \text{U mg}^{-1}$) e ($K_{0,5} = 34,1\ 1,7\ \text{mol L}^{-1}$). Em ambos os sítios a estimulação da atividade pelo substrato ocorreu com cooperatividade positiva. A estimulação da atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da enzima pelo Mg^{2+} ($V = 113,6\ 2,9\ \text{U mg}^{-1}$; $K_{0,5} = 0,54\ 0,42\ \text{mmol L}^{-1}$), K^+ ($V = 115,21\ 2,7\ \text{U mg}^{-1}$; $K_{0,5} = 0,79\ 0,01\ \text{mmol L}^{-1}$) e NH_4^+ ($V = 153,45\ 2,8\ \text{U mg}^{-1}$; $K_{0,5} = 6,04\ 0,02\ \text{mmol L}^{-1}$) ocorreu através de interações sítio-sítio. A estimulação por Na^+ ($V = 119,95\ 3,1\ \text{U mg}^{-1}$; $KM = 2,54\ 0,03\ \text{mmol L}^{-1}$) apresentou comportamento michaeliano. A $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ foi estimulada sinergisticamente por K^+ e NH_4^+ em torno de 45%. A ouabaína inibiu cerca de 78% da atividade ATPase total, com $KI = 464,69\ 23,23\ \text{mol L}^{-1}$. A ação de diferentes inibidores sobre as atividades ATPase revelou a presença de $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$, $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ e fosfatases neutras. As poliaminas inibiram a atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal de *C. vittatus*, sendo que a espermidina apresentou uma maior inibição (45%) quando comparada com a da espermina (32%). A presença de poliaminas no meio reacional alterou a afinidade da enzima para o ATP, Na^+ , K^+ , NH_4^+ e para a ouabaína. Este estudo mostrou que a variação da salinidade representa um importante fator na regulação da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ para o ermitão *C. vittatus* e que esta enzima é muito importante não apenas na capacidade de adaptação em meios mais salinos, mas também na excreção de íons amônio, que para estes animais são particularmente mais perigosos por causa do microambiente da concha. Além disso, este estudo revelou que as poliaminas podem também estar envolvidas na regulação da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$.

ENVOLVIMENTO DA PROTEÍNA SET NO CÂNCER EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO: CORRELAÇÃO COM RESISTÊNCIA À APOPTOSE INDUZIDA POR ESTRESSE OXIDATIVO

Felipe Augusto Godoy

Orientador: Prof. Dr. Carlos Curti

Dissertação de Mestrado apresentada em 02/03/2011

Células tumorais apresentam como característica fundamental a resistência em sofrer apoptose, o que reflete não somente na agressividade do câncer, mas também na ineficácia dos tratamentos antineoplásicos. A apoptose é o principal mecanismo de morte celular, em que células cancerosas adquirem várias alterações metabólicas que contribuem para a resistência celular. O câncer epidermóide de cabeça e pescoço (HNSCC) apresenta alta resistência à quimioterapia adquirida, dentre outros fatores, pela fosforilação constitutiva da proteína quinase B/AKT, uma serina/treonina quinase envolvida na proliferação celular, apoptose e metabolismo da glicose. De fato, a via de sinalização PI3K-AKT tem sido descrita como alterada em uma série de cânceres humanos. Neste contexto, investigamos a resposta da expressão da proteína SET (I2PP2A), um inibidor seletivo da fosfatase 2A (PP2A) que indiretamente ativa AKT, ao estresse oxidativo, nos mecanismos moleculares de resistência à apoptose. Para isso, foram utilizadas células da linhagem HN13 (carcinoma de cavidade oral que acumulam SET constitutivamente) e HEK293T (embriônicas renais, superexpressando ou não SET), para avaliação da resposta ao tratamento com o prooxidante tert-butil hidroperóxido (t-BOOH, 50 e 250 μM). Métodos bioquímicos e moleculares foram empregados nos estudos de indução de apoptose que incluíram exposição da fosfatidilserina, fragmentação da cromatina, condensação do DNA e ativação de caspases; estado oxidativo analisado pela geração/acúmulo de EROs e níveis de glutathiona oxidada/reduzida; e mecanismos mitocondriais de morte celular que incluíram liberação de fatores apoptogênicos a partir da mitocôndria (citocromo c, AIF e SMAC/DIABLO) e translocação da proteína pró-apoptótica Bax. HEK293T superexpressando SET e HN13 apresentaram menor susceptibilidade à apoptose e às disfunções mitocondriais em decorrência do estresse oxidativo, quando comparadas à HEK293T, além de acúmulo de EROs e redução da defesa celular antioxidante. O grau de fragmentação da cromatina, o índice de dano no DNA e ativação das caspases também foram menos pronunciados em ambas as células. Análises por *western blotting* das frações celulares com acúmulo de SET demonstraram redução dos níveis de citocromo c, mas não AIF e SMAC/DIABLO liberados da mitocôndria, assim como uma redução na translocação e nos níveis de expressão de Bax. Os resultados obtidos sugerem o envolvimento da proteína SET na resistência à apoptose em HNSCC induzida por estresse oxidativo, mediado por mecanismos mitocondriais da sinalização apoptótica.

Clínica Cirúrgica

NEUROPROTEÇÃO HIPOTÉRMICA PRÉ, INTRA E PÓS-ISQUÊMICA NA ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL EM RATOS: ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Roberto Alexandre Dezena

Orientador: Prof. Dr. Benedicto Oscar Colli

Tese de Doutorado apresentada em 28/01/2011

Introdução: A isquemia cerebral é uma doença de alta prevalência, com desfecho clínico imprevisível, e com profilaxia e tratamento ainda limitados. Na atividade neurocirúrgica, as duas situações em que a isquemia cerebral ocorre com maior frequência são o vasoespasmio arterial, que ocorre após hemorragia subaracnóideia, e nas microneurocirurgias vasculares, especialmente naquelas em que são realizadas clipagens vasculares temporárias. Dentre todas as formas de neuroproteção a hipotermia tem se mostrado a mais promissora em estudos experimentais. Pode ser aplicada em diferentes momentos do processo isquêmico (pré, intra ou pós-isquemia), sendo a modalidade préisquêmica pouco explorada na literatura. O objetivo deste estudo foi avaliar comparativamente o efeito da hipotermia pré, intra e pós-isquêmica na isquemia focal temporária por oclusão da artéria cerebral média em ratos. **Material e Métodos:** Foram utilizados 74 ratos machos adultos da linhagem Wistar, divididos em 6 grupos, com 10 animais cada: controle (C), Sham (S), Controle-Isquêmico (CI), Hipotermia Pré-Isquêmica (IH1), Hipotermia Intra-Isquêmica (IH2), Hipotermia Pós-Isquêmica (IH3). Todos os animais dos grupos isquêmicos foram submetidos à isquemia de 60 minutos, com um período reperfusional de 24 horas. A hipotermia utilizada foi do tipo leve (32 -34°C). No grupo IH1 a hipotermia foi iniciada 30 min antes da oclusão arterial e mantida durante toda a isquemia; no grupo IH2 a hipotermia foi mantida somente durante a isquemia; no grupo IH3 a hipotermia foi mantida por 6 horas, sendo iniciada no exato momento da reperusão. Após a eutanásia os cérebros foram perfundidos, fixados e cortados em secções coronais de 10 micrômetros, em toda a extensão da área isquêmica, as quais foram coradas pela técnica *Luxol Fast Blue*. A morfometria foi realizada pelo programa KS400, Carl Zeiss, obtendo-se medidas diretas separadas de cada hemisfério, das áreas em azul (fibras mielinizadas) e em vermelho (corpos neuronais), bem como a área total de cada secção. Medidas derivadas (área isquêmica média, e volumes isquêmicos parcial e aproximado) de cada animal, foram obtidas nos grupos submetidos à isquemia. **Resultados:** Os parâmetros da homeostase dos animais permaneceram dentro dos limites aceitáveis para este tipo de experimento. Em relação às áreas de fibras mielinizadas (azul) não houve diferença significativa entre os grupos C vs. S ($p=0,39$, Mann-Whitney-Wilcoxon), CI vs. IH3 ($p=0,85$, Mann-Whitney-Wilcoxon), e IH1 vs. IH2 ($p=0,63$, Mann-Whitney-Wilcoxon); ocorreu diferença estatística entre os grupos C vs. CI ($p=0,0001$, Mann-Whitney-Wilcoxon), CI vs. IH1 ($p=0,01$, Mann-Whitney-Wilcoxon), e CI vs. IH2 ($p=0,03$, Mann-Whitney-Wilcoxon). Em relação às áreas de corpos neuronais (vermelho), não houve diferença significativa entre os grupos C vs. S ($p=0,48$, Mann-Whitney-Wilcoxon), CI vs. IH3 ($p=0,27$, Mann-Whitney-Wilcoxon), e IH1 vs. IH2 ($p=0,68$, Mann-Whitney-Wilcoxon); ocorreu diferença estatística entre os grupos C vs. CI ($p=0,0001$, Mann-Whitney-Wilcoxon), CI vs. IH1 ($p=0,009$, Mann-Whitney-Wilcoxon), e CI vs. IH2 ($p=0,03$, Mann-Whitney-Wilcoxon). A análise estatística das áreas isquêmicas médias, e dos volumes isquêmicos parciais e aproximados não mostrou diferença significativa na comparação entre os grupos CI vs. IH3 ($p=0,57$, Mann-Whitney-Wilcoxon), e IH1 vs. IH2 ($p=0,79$, Mann-Whitney-Wilcoxon); mostrou diferença significativa entre os grupos CI vs. IH1 ($p=0,0001$, Mann-Whitney-Wilcoxon), e CI vs. IH2 ($p=0,0011$, Mann-Whitney-Wilcoxon). **Conclusões:** As hipotermias pré-isquêmica e intra-isquêmica mostraram-se neuroprotetoras de forma semelhante, o que não ocorreu com a hipotermia pós-isquêmica.

EFEITO DA OXIGENAÇÃO HIPERBÁRICA NO INTESTINO DISTAL DE RATOS SUBMETIDOS À RADIAÇÃO IONIZANTE. ESTUDO EXPERIMENTAL

Rodrigo Ribeiro Aprilli

Orientador: Prof. Dr. Omar Feres

Dissertação de Mestrado apresentada em 04/03/2011

A radioterapia (RAD) em tumores pélvicos, frequentemente, causa lesões actínicas tardias em órgãos vizinhos. A oxigenoterapia hiperbárica (OHB) tem sido usada como alternativa terapêutica dessas lesões. O objetivo do presente estudo é testar um modelo experimental de lesões actínicas no intestino distal de ratos e o possível efeito protetor da OHB nas lesões radioinduzidas, quando aplicada concomitante com a radiação ionizante. Foram utilizados 24 ratos (Wistar), divididos em quatro grupos de seis animais: G1, grupo controle; G2, animais irradiados com dose total de 42 Gy; G3, animais irradiados com 42 Gy e que receberam oxigenação hiperbárica a 2 ATA, durante 90 min; G4, animais submetidos à oxigenação

hiperbárica a 2 ATA durante 90 min. Os animais foram avaliados clinicamente durante 28 dias após o término do tratamento e, em seguida, foram submetidos à eutanásia. O intestino distal de cada animal foi ressecado para avaliação macro e microscópica e para estudo iminohistoquímico. Os dados obtidos foram avaliados com o programa GraphPad Prism5, aplicado teste não paramétrico ANOVA one way e pós teste de Tukey, para um valor de $p < 0,05$. **Resultados:** os animais do grupo G3, perderam peso durante o tratamento; todos os animais do grupo G2 apresentaram lesões mucosas macroscópicas após 28 dias; os animais dos outros três grupos não apresentaram lesões macroscópicas. Lesões mucosas microscópicas foram observadas nos espécimes dos animais tratados com radiação ionizante; nos animais que receberam apenas oxigenação hiperbárica e nos que receberam oxigenação hiperbárica e radiação ionizante, as lesões foram menos intensas. Pela avaliação imunohistoquímica observou-se que os espécimes retirados dos animais do grupo G3, o número de células marcadas com CD34+ foi maior. **Conclusão:** o modelo experimental mostrou-se útil para causar lesões radioinduzidas, e a oxigenação hiperbárica aplicada concomitante com a radiação ionizante é capaz de reduzir as lesões actínicas tardias.

Clínica Médica

ATIVIDADE BIOLÓGICA DE TROPOMIOSINA RECOMBINANTE DE *ASCARIS LUMBRICOIDES* EM PACIENTES COM ASMA E/OU RINITE ALÉRGICOS A BARATA *PERIPLANETA AMERICANA*

Ana Carolina Alves Feliciano de Souza Santos

Orientadora: Profa. Dra. Luiza karla de Paula Aruda

Dissertação de Mestrado apresentada em 20/01/2011

Os diferentes parasitas intestinais, incluindo *Ascaris lumbricoides*, possuem diferentes efeitos no desenvolvimento de alergia e asma. Tropomiosinas têm sido identificadas como moléculas indutoras de resposta IgE e associadas a reatividade cruzada de IgE para invertebrados, incluindo baratas, ácaros, camarão, outros crustáceos e moluscos, *A. lumbricoides* e outros parasitas. Recentemente relatamos a identificação e produção recombinante de tropomiosina de *Ascaris lumbricoides*. O objetivo do presente estudo foi investigar se tropomiosina recombinante de *A. lumbricoides* apresenta atividade biológica e comparar com a reatividade de tropomiosina de barata (rPer a 7). Comparar a resposta de anticorpos IgE para tropomiosina de parasita (*A. lumbricoides*), com a resposta para tropomiosina de barata (*Periplaneta americana*), em pacientes com asma e/ou rinite alérgica. Frequência de teste cutâneo positivo para tropomiosinas recombinantes de *A. lumbricoides* e *Periplaneta americana* (rPer a 7) foi obtida de 40 pacientes alérgicos a barata com asma e/ou rinite, com idades entre 12 e 75 anos. Todos os pacientes apresentavam teste cutâneo positivo para extrato comercial de *P. americana*. Testes cutâneos foram realizados com alérgenos recombinantes na concentração de 10 mcg/ml. Alérgenos recombinantes foram expressos em *Pichia pastoris*. Em soro, foi realizado quantificação de IgE total e de anticorpos IgE para *A. lumbricoides* e barata *P. americana* por ImmunoCap, quantificação de anticorpos IgE para tropomiosinas de *A. lumbricoides* e de barata *P. americana* (alérgeno Per a 7) por ELISA quimérico. A média geométrica da IgE total entre os pacientes foi de 623 UI/mL (média 879 UI/mL), variando de 48 UI/ml a 3.738 UI/ml. Testes cutâneos para tropomiosina de *A. lumbricoides* e tropomiosina de *P. americana* (rPer a 7) foram positivos em 20 (50%) e 23 (57%) dos pacientes, respectivamente. Houve concordância entre os resultados de testes cutâneos com tropomiosinas de *A. lumbricoides* e de *P. americana* ($p < 0,0001$). Observamos excelente concordância para os métodos reatividade cutânea IgE, e presença de anticorpos IgE séricos na avaliação da sensibilidade a tropomiosina recombinante de *A. lumbricoides* (Kappa=0,75; intervalo de confiança 95% (0,55 - 0,95). De forma semelhante, houve concordância excelente (Kappa=0,89; IC 95% 0,76 - 1,00) entre os métodos para avaliar sensibilidade a tropomiosina recombinante de *P. americana*. Portanto, tropomiosina recombinante de *A. lumbricoides* mostrou boa atividade biológica, quando comparada com rPer a 7 e extrato comercial de *P. americana*. Aproximadamente 50% dos pacientes alérgicos a barata com asma e/ou rinite apresentaram reatividade para tropomiosina, indicando que estudos de alérgenos adicionais podem ser necessários para finalidade diagnóstica e terapêutica.

EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS DE PANCREATITE ALCOÓLICA CRÔNICA EM RATOS SUPLEMENTADOS COM VITAMINA E

Thais Helena Monteiro

Orientador: Prof. Dr. Hellio Vanucchi

Dissertação de Mestrado apresentada em 28/01/2011

O infiltrado inflamatório, a perda maciça de células acinares e a fibrose se destacam como alterações da pancreatite alcoólica crônica, o que é reflexo da expressão gênica. O a-tocoferol regula a expressão de vários genes, entre eles

moduladores de proteínas extracelulares e de inflamação. O presente trabalho teve como intuito avaliar o efeito da suplementação com vitamina E sobre a expressão gênica pancreática de marcadores inflamatórios, em ratos com pancreatite alcoólica crônica induzida por dieta líquida contendo etanol (com ou sem suplementação de α -tocoferol), ciclosporina A e ceruleína, por meio da técnica quantitativa de PCR em tempo real. Além disso, foram realizadas determinações de α -tocoferol plasmático e hepático, lipídeos totais hepáticos, e análise histopatológica do pâncreas e fígado dos animais submetidos aos diferentes tratamentos (Grupo 1: Controle; Grupo 2: Pancreatite alcoólica crônica; Grupo 3: Pancreatite alcoólica crônica e suplementação com vitamina E). Os animais que receberam suplementação com vitamina E apresentaram maiores valores de α -tocoferol plasmático e hepático [(G1: $14,27 \pm 1,5$ mmols/L plasma; $125,47 \pm 18,5$ nmols/g fígado; $5,1 \pm 0,8$ nmols/mg lipídeo hepático); (G2: $21,64 \pm 3,0$ mmols/L plasma; $126,54 \pm 10,5$ nmols/g fígado; $2,8 \pm 0,7$ nmols/mg lipídeo hepático); (G3: $43,91 \pm 6,1$ mmols/L plasma*; $1595,90 \pm 802,7$ nmols/g fígado*; $17,3 \pm 8,8$ nmols/mg lipídeo hepático*)] (* $p < 0,01$). O pâncreas dos animais do Grupo 1 apresentou histologia normal, ao passo que nos Grupos 2 e 3 apresentou focos de destruição tecidual leve a moderada, presença de infiltrado de células mononucleares (linfócitos e plasmócitos) e proliferação de tecido conjuntivo de sustentação, mostrando um quadro ainda em estágios iniciais de pancreatite alcoólica crônica. O fígado do Grupo 1 apresentou histologia normal, e dos Grupos 2 e 3, esteatose macro e microvesicular em grau variável, entre 30 a 60%. A análise de PCR quantitativo em tempo real mostrou aumento de expressão de todos os 13 genes biomarcadores do processo inflamatório nos Grupos 2 e 3, provocado pela pancreatite alcoólica crônica, em relação ao Grupo 1 ($p < 0,01$). A suplementação com vitamina E na presença de pancreatite no Grupo 3, em relação ao Grupo 2, diminuiu o número de transcritos para 5 genes (α -SMA, COX-2, IL-6, MIP-3 α , TNF- α) ($p < 0,01$), aumentou o número de transcritos para 1 gene (Pap) ($p < 0,01$), e não modificou os 7 genes restantes (Col1a1, IL-4, IL-8, IL-10, MCP-1, Mif, MMP-2) ($p > 0,05$). A suplementação com vitamina E apresentou efeitos anti-inflamatórios e benéficos na expressão gênica pancreática de alguns biomarcadores do processo inflamatório em ratos com pancreatite alcoólica crônica, comprovando sua participação em alguns mecanismos da resposta inflamatória no pâncreas.

ADESÃO AO TRATAMENTO MEDICAMENTOSO E STATUS VITAMÍNICO DE PORTADORES DE SÍNDROME DO INTESTINO CURTO DEPENDENTES DE TERAPIA NUTRICIONAL PARENTERAL

Iahel Manon de Lima Ferreira

Orientadora: Profa. Dra. Selma Freire de Carvalho Cunha
Dissertação de Mestrado apresentada em 01/02/2011

A Síndrome do Intestino Curto (SIC) ocorre quando o paciente dispõe de menos de 200 centímetros do delgado funcional associado à perda acentuada de capacidade de digestão e absorção. Alguns pacientes não conseguem suprir as suas necessidades de macro e microelementos, desenvolvendo subnutrição energética, passando a depender da nutrição parenteral (NP). O objetivo do estudo foi comparar os níveis séricos de ácido fólico e das vitaminas A, B12, C, E em dois momentos distintos e avaliar a adesão ao tratamento medicamentoso em pacientes com SIC acompanhados pela Unidade Metabólica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. O estudo foi conduzido com todos os portadores de SIC ($n=10$) elegíveis de acordo com os critérios de inclusão, que permaneceram hospitalizados para a realização de ciclos NP e que fizessem uso de suplementação vitamínica domiciliar. Na alta hospitalar, os pacientes foram convidados a participar do estudo, sendo realizada a primeira amostragem para determinação do status vitamínico e preenchimento do protocolo de avaliação geral e clínica. Na readmissão hospitalar, foi realizada a segunda amostragem para determinação do status vitamínico, a avaliação da adesão ao tratamento medicamentoso pelo Teste de Morisky, as avaliações da ingestão alimentar e a avaliação sócio-econômica. Houve ainda a inserção de um grupo controle ($n=9$) para posterior comparação dos dados obtidos. Mesmo após ciclo de NP, os níveis séricos das vitaminas A, C e E foram menores nos portadores de SIC quando comparados com o Grupo Controle. Antes do início de novo ciclo de NP, houve redução dos níveis séricos da vitamina E, embora o ácido fólico e a vitamina B12 mantiveram-se constantes. Os pacientes em geral apresentaram um baixo nível sócio-econômico e em relação ao uso de medicamentoso, 40% dos pacientes apresentaram uma elevada adesão ao tratamento, sendo esta classificada como não-adesão intencional. Embora o consumo alimentar tenha sido adequado às recomendações, todos os pacientes apresentavam subnutrição energética. A oferta de vitaminas e minerais por meio da nutrição parenteral em âmbito hospitalar não se mostrou adequada para elevar os níveis das vitaminas A, C e E à faixa de normalidade durante o período da internação. A oferta de vitamina E em âmbito domiciliar não foi suficiente para manutenção do nível sérico, uma vez que a concentração que já estava baixa reduziu ainda mais. O estudo forneceu subsídios para propor mudanças na tanto na suplementação em âmbito hospitalar quando em âmbito domiciliar para pacientes com SIC dependentes de NP.

FENÓTIPO ÓSSEO EM INDIVÍDUOS HETEROZIGOTOS PARA UMA MUTAÇÃO NO GENE *GHRHR*

Miburge Bolivar Gois Júnior

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Albuquerque de Paula

Tese de Doutorado apresentada em 02/02/2011

Baixa densidade mineral óssea tem sido descrita na deficiência de GH (DGH). Mutações homozigóticas no gene do receptor do hormônio liberador do hormônio do crescimento (*GHRHR*) são causas frequentes da DGH isolada (DIGH). Anteriormente demonstramos que indivíduos com DIGH com uma mutação homozigótica no gene *GHRHR* apresentou baixo T-score do *Stiffness*, mensurado pelo ultrassom quantitativo de calcâneo (USQ), em relação a indivíduos homozigotos normais da mesma região. Heterozigose para a mutação no gene *GHRHR* não está associada à redução na estatura em adultos ou nos níveis séricos do IGF-I, porém está associado à redução do peso corporal, índice de massa corpórea (IMC), massa magra e aumento da resistência insulínica, todos estes, potenciais fatores interferentes na resistência óssea. Hipotetizamos que heterozigose para esta mutação pode estar associada à baixa qualidade óssea. Foram avaliadas a qualidade óssea por mensuração do *Stiffness* através do USQ e dois marcadores bioquímicos ósseo: um de formação, osteocalcina plasmática ng/ml e outro de reabsorção, *CrossLaps* urinário total, corrigido pela creatinina urinária em 76 indivíduos homozigotos normais, 68,4% mulheres (N/N) e 64 indivíduos heterozigotos, 64,1 % mulheres, para uma mutação no gene *GHRHR* (MUT/N), todos da mesma região da cidade de Itabaianinha no nordeste do Brasil. O USQ de calcâneo foi realizado com rigorosa padronização e os sujeitos foram posicionados usando o Achilles Insight Device (Lunar/GE, Madison, WI). Mensuramos o IGF-I e osteocalcina pelo método IRMA e *CrossLaps* por ELISA. Os dados foram expressos em média (DP) através do modelo de regressão linear para comparar variáveis entre os grupos N/N e MUT/N. Não foram encontradas diferenças na idade $44,7 \pm 1,5$ vs. $44,6 \pm 14,1$ anos e altura $157,8 \pm 9,8$ vs. $157,6 \pm 10,2$ cm, porém o peso $65,7 \pm 14,1$ vs. $59,7 \pm 11,6$ Kg, $p=0,007$ e IMC $26,3 \pm 4,9$ vs. $24,0 \pm 4,4$ $p=0,001$ foram menores no grupo MUT/N. Não foram encontradas diferenças nos níveis séricos do EDP IGF-I $-0,73 \pm 1,36$ vs. $-0,98 \pm 1,54$ DP, glicose $93,7 \pm 9,76$ vs. $93,6 \pm 11,6$ mg/dl, T-score $0,09 \pm 1,5$ vs. $0,07 \pm 1,3$, Z-score $0,61 \pm 1,4$ vs. $0,61 \pm 1,3$, *Stiffness* $96,6 \pm 23,8$ vs. $96,3 \pm 19,3$ e osteocalcina $23,6 \pm 11,5$ vs. $25,5 \pm 11,3$ ng/ml, mas a insulina $4,01 \pm 2,7$ vs. $2,72 \pm 2,3$ $\mu\text{U/ml}$ $p=0,01$, HOMA_{IR} $1,00 \pm 0,6$ vs. $0,69 \pm 0,5$ $p=0,01$ e o *CrossLaps* $350,5 \pm 280,1$ vs. $220,1 \pm 150,2$ $\mu\text{g/mmol}$, $p=0,01$ foram menores no grupo MUT/N. O presente estudo, baseado nos parâmetros representados, sugere que a qualidade óssea nos indivíduos heterozigóticos não é prejudicada e futuros estudos devem ser estimulados para investigação do risco de fratura nessa população.

ESTRESSE OXIDATIVO PROTÉICO E SUAS ASSOCIAÇÕES COM ESTADO INFLAMATÓRIO E DISLIPIDEMIA EM PACIENTES TRATADOS POR DIÁLISE PERITONEAL E HEMODIÁLISE

Andresa Marques de Mattos

Orientadora: Profa. Dra. Paula Garcia Chiarello

Dissertação de Mestrado apresentada em 17/02/2011

A doença renal em estágio terminal é caracterizada por estresse oxidativo (EO) crônico, que cursa concomitantemente com inflamação e dislipidemia, fatores que contribuem sobremaneira para a ocorrência de doenças cardiovasculares, principal causa de morbi-mortalidade nesses indivíduos. O objetivo do trabalho foi caracterizar e comparar o EO protéico em pacientes tratados por diálise peritoneal (DP) com indivíduos em hemodiálise (HD) e controles saudáveis, e investigar possíveis associações com parâmetros lipídicos, inflamatórios e antioxidantes. O grupo DP foi composto por 19 pacientes e o grupo HD por 21 indivíduos, todos com idade ≥ 18 anos e em tratamento dialítico a pelo menos 6 meses. Um grupo de 17 indivíduos saudáveis foi recrutado para fins de comparação. Para avaliação do estado nutricional dos indivíduos em DP, foram realizadas medidas antropométricas, avaliação de composição corporal por bioimpedância e do consumo alimentar por meio de registro alimentar de três dias. As variáveis bioquímicas analisadas em soro foram: albumina, creatinina, uréia, glicose, vitaminas A, E e C, proteína C reativa (PCR), interleucina 6 (IL-6), frações lipídicas e colesterol total (CT) e produtos finais de glicação avançada (AGEs: advanced glycation end products) e produtos protéicos de oxidação avançada (AOPP: advanced oxidation protein products). O grupo DP apresentou alta prevalência de indivíduos sobrepesos/obesos, com déficit de massa muscular e excesso de gordura corporal, localizada principalmente na região abdominal, embora, o grupo tenha relatado ingestão insuficiente de energia, proteínas e vitaminas A e C. O grupo DP teve a menor média de albumina e vitamina C quando comparado aos grupos HD e controle ($p < 0,01$). Não houve diferença entre os grupos para a vitamina E, e o grupo HD teve a maior média de vitamina A ($p < 0,01$). Os grupos tratados por diálise apresentaram médias de PCR e IL-6 significativamente maiores que o grupo controle, porém, sem diferença entre as modalidades. O EO protéico estava aumentado nos pacientes tratados por diálise, especialmente em HD, que teve a média de AGEs maior do que DP ($p < 0,05$). O perfil lipídico dos pacientes submetidos à diálise foi característico de dislipidemia urêmica, com médias significativamente

te superiores de triglicérides (TG) e inferiores de HDL-c, quando comparados ao grupo controle. No grupo HD+DP, foram verificadas associações positivas entre AGEs e as vitaminas A e C, e entre TG e AOPP. No grupo DP, a PCR se correlacionou positivamente com IMC e circunferência abdominal, e inversamente, com CT. Os resultados deste trabalho indicam aumento do EO protéico, deficiência de vitamina C sérica e presença de inflamação e dislipidemia urêmica nos indivíduos tratados por diálise, situação que contribui para um ambiente de maior risco cardiovascular neste grupo.

ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE DESNERVAÇÃO SIMPÁTICA MIOCÁRDICA E ARRITMIAS VENTRICULARES GRAVES EM PACIENTES COM CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA MEDIANTE EMPREGO DA CINTILOGRAFIA MIOCÁRDICA COM IODO-123 METAIODOBENZILGUANIDINA

Carlos Henrique Miranda

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius Simões

Tese de Doutorado apresentada em 18/02/2011

As arritmias ventriculares graves, potencialmente associadas ao risco de morte súbita, são frequentemente observadas em pacientes com Cardiopatia Chagásica Crônica (CCC) sem grave depressão do desempenho sistólico do ventrículo esquerdo. O precoce comprometimento da inervação autonômica cardíaca é outra característica marcante da CCC. Tem-se lançado a hipótese de que a desnervação autonômica possa participar do mecanismo de taquicardia ventricular e morte súbita nestes pacientes. Contudo, nenhum estudo até o momento demonstrou associação entre arritmias ventriculares graves e desnervação autonômica nesta cardiopatia. Portanto, este estudo tem por objetivo avaliar quantitativamente a associação entre desnervação simpática cardíaca e arritmias ventriculares em pacientes com CCC. **Métodos:** Foram investigados prospectivamente pacientes com CCC e fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) >35% divididos em três grupos de acordo com a presença de arritmias ventriculares: Grupo TVS - com presença de taquicardia ventricular sustentada (TVS) (n=15; 61±8 anos; FEVE: 51±8%), grupo TVNS - com episódios de taquicardia ventricular não sustentada (TVNS) ao Holter, mas não exibindo TVS (n=10; 54±14 anos; FEVE: 51±9%) e grupo não arritmico - sem nenhuma documentação destas arritmias ventriculares descritas acima (n=12; 49±9 anos; FEVE: 61±10%). Os pacientes foram submetidos a cintilografia miocárdica com ¹²³Iodo-metaiodobenzilguanidina (MIBG) para avaliação da inervação simpática e perfusão em repouso com ^{99m}Tc-sestamibi (MIBI) para avaliação da viabilidade miocárdica. Um escore visual semiquantitativo (0= normal, 4=ausência de captação) foi atribuído à captação regional de cada radiotraçador usando modelo de segmentação do ventrículo esquerdo em 17 segmentos. A presença de discordância entre inervação e perfusão foi definida como um segmento com escore de 0 ou 1 para o MIBI e ≥ 2 para o MIBG. Adicionalmente, o intervalo QT foi medido nas 12 derivações do eletrocardiograma. Considerou-se como QTc o intervalo QT na derivação DII corrigido pela frequência cardíaca através de fórmula de Bazett e QTd a diferença entre o maior e menor intervalo QT medidos. **Resultados:** Não foi observada diferença entre os escores de MIBI entre os três grupos p=0,65 (ANOVA). Os escores de MIBG foram maiores no grupo TVS (24±7) em relação ao grupo não arritmico (10±7) p<0,001 e em relação ao grupo TVNS (14±11) p<0,05; mas não foi observada diferença entre o grupo não arritmico e TVNS p>0,05. A presença de mais de quatro segmentos discordantes por paciente associou-se positivamente com a presença de TVS p<0,0001; com sensibilidade de 93% e especificidade de 81%. Não foi observada correlação entre a extensão dos defeitos de perfusão com o intervalo QTc (r=-0,06; p=0,74) e com a dispersão do QT (r=-0,13; p=0,50). Observou-se correlação positiva entre a extensão de miocárdio com desnervação simpática e viável e o intervalo QTc (r=0,45; p=0,02) e a dispersão do QT (r=0,46; p=0,02). **Conclusão:** A quantidade de miocárdio com desnervação simpática e viável é associada com a presença de TVS na CCC e correlaciona-se com alterações eletrocardiográficas da repolarização ventricular. Esses resultados sugerem fortemente que a desnervação simpática pode participar no desencadeamento de arritmias ventriculares em pacientes com CCC e função ventricular relativamente preservada.

CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DE INTEGRAÇÃO DO RETROVÍRUS PMFG-FVIII-P140K EM LINHAGENS CELULARES HUMANAS PRODUTORAS DE FATOR VIII RECOMBINANTE

Marcela Cristina Correa Freitas

Orientadora: Profa. Dra. Aparecida Maria Fontes

Dissertação de Mestrado apresentada em 14/03/2011

A hemofilia A é uma doença caracterizada pela deficiência do fator VIII (FVIII) de coagulação sanguínea e atinge 1 em 5000 homens. Países desenvolvidos, utilizam como terapia o FVIII recombinante (rFVIII), por apresentar maior segurança e consistir uma fonte ilimitada. Estudos realizados em nosso laboratório, utilizando o vetor retroviral pMFG-FVIII-P140K, originaram as linhagens celulares humanas, HepG2FVIIIIdB/P140K (hepática) e Hek293FVIIIIdB/P140K (renal), que foram selecionadas pelo mesmo sistema de seleção, o tratamento *in vitro* com as drogas Benzilguanina e Temozolomide. O presente trabalho teve por objetivo caracterizar e detalhar o padrão de integração do vetor retroviral pMFG-FVIII-P140K nas

duas linhagens celulares humanas, e verificar se o perfil de integração está relacionado ao tipo celular específico ou se este sofre influência da estratégia de seleção a qual as células foram submetidas anteriormente. Foi utilizada a técnica de LM-PCR (ligação-mediada por PCR) que permite localizar o sítio de integração do vetor viral, por meio do sequenciamento do produto de PCR obtido após a digestão com enzimas de restrição e ligação de uma sequência adaptadora (LINKER) ao DNA genômico. Após o sequenciamento as sequências foram submetidas a análises em bancos de dados de genomas (*Human BLAT*, *QuickMap* e *DAVID/EASE*) para caracterização dos respectivos clones. Também foi realizada uma análise da expressão relativa do mRNA relativo ao rFVIII por RT-PCR e da atividade biológica pelo teste de TTPA. Dessa forma foi possível observar que ambas as linhagens modificadas expressam o mRNA relativo ao rFVIII e que as células HepG2 e Hek293 apresentam níveis de secreção da proteína recombinante biologicamente ativa da ordem de 7,9 UI/mL e 2,1 UI/mL, respectivamente. Foram sequenciados um total de 201 clones da HepG2, sendo 123 similares ao genoma humano e dentre estes 73 considerados verdadeiros e 50 ambíguos. Da Hek293 foram sequenciados 221 clones, sendo 179 similares ao genoma humano e dentre estes 64 verdadeiros e 115 ambíguos. Observamos que o vetor retroviral pMFG-FVIII-P140K apresenta um perfil de integração não randômico e diferente entre as células estudadas, uma vez que na linhagem HepG2 houve uma preferência pelos cromossomos 19, 17 e 11, e na Hek293 pelo cromossomo 9. Em relação a regiões genômicas tais como distância de ilhas CpGs e de sítios de ligação de fatores de transcrição não houve diferença no perfil de integração em ambas as linhagens celulares, visto que nas duas células o vetor se inseriu preferencialmente a uma distância de ± 30 -60Kb dessas regiões. Observamos também que houve uma integração dentro de genes codificadores de proteínas da ordem de 52% e 44% nas células HepG2 e Hek293, respectivamente, contudo em ambos os casos mais de 90% dessas inserções ocorreram em regiões intrônicas. Houve 20% de integrações em sítios frágeis do genoma na linhagem HepG2 e 17% na Hek293. Em suma este trabalho mostrou a integração do vetor retroviral pMFG-FVIII-P140K específica para as duas linhagens em estudo. Além disso, pudemos observar que em ambas as linhagens celulares, HepG2FVIIIIdB/P140K e Hek293FVIIIIdB/P140K, existem regiões gênicas dentro dos cromossomos na qual o vetor exibe uma preferência. O perfil de integração caracterizado aqui difere de outros trabalhos da literatura que utilizaram retrovírus derivados de MLV. Isso nos leva a crer que o padrão de inserção descrito pode estar relacionado ao fato de que essas células foram tratadas anteriormente com drogas quimioterapêuticas para seleção de um clone celular com maior nível de produção de rFVIII, levando consequentemente a seleção de um perfil de integração semelhante entre as linhagens celulares, mesmo estas tendo origens teciduais diferentes.

PAPEL DE ALELOS E GENÓTIPOS DE POLIMORFISMOS DOS GENES *IL-18*, *IFN-g*, *TNF-a* E *HLA-G* NA SUSCETIBILIDADE E GRAVIDADE DO CARCINOMA HEPATOCELULAR

Andreza Corrêa Teixeira

Orientadora: Profa. Dra. Ana de Lourdes Candolo Martinelli

Tese de Doutorado apresentada em 25/03/2011

O carcinoma hepatocelular (CHC) é um tumor maligno primário do fígado que ocorre, principalmente, em portadores de doença hepática crônica. O dano celular seguido de regeneração, mediado pela resposta imune, parece ter papel importante na hepatocarcinogênese. Estudos envolvendo promotores de citocinas, motivados pela identificação de *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), assim como polimorfismos no *HLA-G* (*Human Leukocyte Antigen-G*), em particular dos 14 pares de bases (14 pb), têm sido importantes para melhor compreensão da resposta imune no desenvolvimento do câncer. Contudo, a relação desses polimorfismos com suscetibilidade e gravidade do CHC ainda não está esclarecida. Assim, avaliou-se a associação de alelos e genótipos de polimorfismos da região promotora da *IL-18* (-607C/A e -137C/G), *IFN- γ* (+874A/T) e *TNF- α* (-238A/G e -308A/G), e do polimorfismo I/D 14 pb do *HLA-G* com suscetibilidade e gravidade do CHC. Cento e trinta pacientes com CHC e 202 controles saudáveis da mesma área geográfica foram avaliados. A amplificação dos SNPs das citocinas estudadas e da 3'UTR do gene *HLA-G* foi realizada por reação da polimerase em cadeia, com *primers* específicos, sendo os produtos das reações submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida corado pela prata. Para avaliação da gravidade do CHC foram estudados: a) apresentação do tumor; b) tamanho do nódulo; c) critérios de Milão; d) metástase e; e) classificação histológica, segundo Edmondson & Steiner, 1954. A média (\pm DP) da idade dos pacientes à época do diagnóstico de CHC foi de 55,6 \pm 11,2, com 81,5% do sexo masculino. Cirrose esteve presente em 89,2% dos casos. Tumor uninodular foi encontrado em 70,5%, multinodular em 16,3% e infiltrativo difuso em 13,2%. Aproximadamente 70% dos tumores eram <5 cm, 22% entre 5 e 10 cm e, 9% >10 cm. Mais da metade dos casos (55%) preenchiem os critérios de Milão. Metástase foi encontrada em 7,7% dos casos. Sessenta e seis por cento dos pacientes apresentaram classificação histológica graus I e II. Associação significativa foi encontrada entre CHC e os seguintes polimorfismos: alelos *IL-18* -607*A [P=0,0235; OR=1,48; IC95%=1,06-2,08]; *TNF- α* -238*A [P=0,0025; OR=2,12; IC95%=1,32-3,40] *TNF- α* -308*A [P=0,0351; OR=1,82; IC95%=1,07-3,08] e, 14pb*D [P=0,0326; OR=1,46; IC95%=1,04-2,05]. Quando os genótipos foram avaliados, as seguintes associações com CHC foram encontradas: *IL-18* -607AA [P=0,0048; OR=3,03; IC95%=1,40-6,55]; *TNF- α* -238GA [P=0,0011; OR=2,44; IC95%=1,45-4,12]; e *TNF- α* -308GA [P=0,0031; OR=2,51; IC95%=1,39-4,51]. *IL-18* -137G/C e *IFN γ* +874T/A não estiveram associados com suscetibilidade ao CHC. Quando avaliada a gravidade

do CHC, foi encontrada associação entre: alelo *IL-18* -607*C e tumor multinodular {multinodular vs. uninodular; [P=0,0289; OR=2,4; IC95%=1,09-5,28]} e; alelo *IL-18* -137*C e metástase {presente vs. ausente; [P=0,0240; OR=4,00; IC95%=1,32-12,14]}; genótipo *IL-18* -607CC e tumor multinodular {multinodular vs. uninodular; [P=0,0284; OR=3,5; IC95%=1,24-9,86]} e; *IFN-γ*+874AT e infiltrativo difuso {infiltrativo difuso vs. uninodular; [P=0,0443; OR=3,6; IC95%=1,04-12,47]}. Não foi observada associação entre *TNF-α* -238A/G, -308A/G e I/D14 pb e gravidade do CHC. Nossos resultados sugerem que os SNPs *TNF-α* (-238A/G e -308A/G) e *IL-18* -607C/A, e o polimorfismo inserção/deleção dos 14pb do *HLA-G* podem conferir suscetibilidade ao CHC, e os SNPs *IL-18* (-607C/A e -137C/G) e *IFN-γ*+874A/T maior gravidade do CHC.

Farmacologia

ENVOLVIMENTO DO NÚCLEO LEITO DA ESTRIA TERMINAL NOS EFEITOS ANSIOLÍTICOS DO CANABIDIOL

Felipe Villela Gomes

Orientador: Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães

Dissertação de Mestrado apresentada em 26/01/2011

O canabidiol (CBD), um componente não-psicotomomético presente na planta *Cannabis sativa*, induz efeitos ansiolíticos em roedores e humanos após administração sistêmica. Entretanto, poucos estudos foram feitos para identificar as estruturas cerebrais envolvidas nesses efeitos do CBD. Dados prévios do nosso laboratório apontam para um possível envolvimento do núcleo leito da estria terminal (NLET) nos efeitos ansiolíticos do CBD, como evidenciado pelos níveis alterados (reduzidos) de imunorreatividade para proteína c-Fos (marcador de ativação neuronal) em animais tratados com administração sistêmica de CBD no modelo da resposta emocional condicionada (REC) contextual. Os mecanismos de ação pelos quais o CBD produz seus efeitos são ainda pouco compreendidos, mas pode envolver a ativação de receptores 5-HT_{1A}. Assim, o presente trabalho investigou se a administração de CBD diretamente no NLET atenuaria a expressão da REC contextual. Além disso, nós também avaliamos o envolvimento do NLET nos efeitos ansiolíticos do CBD em outros dois modelos animais de ansiedade amplamente utilizados, o labirinto em cruz elevado e o teste do lambem punido de Vogel e, se os efeitos ansiolíticos do CBD envolveriam a ativação local de receptores 5-HT_{1A}. Os resultados mostraram que o CBD reduziu significativamente o tempo de congelamento e atenuou as respostas cardiovasculares induzidas pela re-exposição ao contexto aversivo no modelo da REC contextual. Além disso, o CBD também aumentou a exploração dos braços abertos do LCE, bem como o número de lambidas punidas no teste de Vogel, sugerindo um efeito ansiolítico. Adicionalmente, o CBD não alterou o número de entradas nos braços fechados do LCE e não interferiu no consumo de água ou no limiar nociceptivo, descartando potenciais interferentes nesses dois modelos. Nós também observamos que o pré-tratamento local com WAY100635, um antagonista de receptores 5-HT_{1A}, foi capaz de bloquear os efeitos do CBD injetado no NLET nos três modelos animais utilizados. Logo, estes resultados dão suporte à proposta que NLET está envolvido nos efeitos ansiolíticos do CBD observado após a administração sistêmica, e que este efeito parece envolver a neurotransmissão mediada por receptores 5-HT_{1A}.

MECANISMOS CELULARES ENVOLVIDOS NA VASODILATAÇÃO INDUZIDA PELOS PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS ANP E CNP EM AORTA ISOLADA DE RATOS

Fernanda Aparecida de Andrade

Orientadora: Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack

Dissertação de Mestrado apresentada em 09/02/2011

Os peptídeos natriuréticos ANP e CNP desempenham funções complementares na regulação do balanço eletrolítico e do tônus do músculo liso vascular. A vasodilatação induzida por estes peptídeos têm sido principalmente atribuída à ativação das enzimas guanilil-ciclases particuladas GC-A e GC-B, respectivamente, que levam à produção de GMPc. Há evidências de que o endotélio contribui para o relaxamento vascular induzido pelo ANP e CNP via ativação do receptor NPR-C, que leva à ativação da eNOS e produção de NO. A hipótese do presente estudo é de que diferentes mecanismos de sinalização celular podem ser ativados pelos peptídeos ANP e CNP para promover o relaxamento vascular. Portanto, o objetivo do nosso estudo foi investigar os mecanismos celulares envolvidos no relaxamento desencadeado pelo ANP e CNP em aorta de ratos. Realizamos estudos funcionais de reatividade vascular para identificar os mecanismos de ativação e inibição da ação vasodilatadora do ANP e CNP. O efeito vasodilatador do ANP não foi diferente entre anéis de aorta com e sem endotélio vascular. A incubação com o inibidor não-seletivo da NOS (L-NAME) não alterou o relaxamento induzido pelo ANP. Porém, o efeito deste peptídeo foi reduzido na presença dos inibidores da proteína GK (Rp-8-Br-GMPc) e SERCA

(Tapsigargina) e potencializado na presença do inibidor da fosfodiesterase tipo-V (Dipiridamol). Além disso, o efeito vasodilatador do ANP foi inibido pela pré-contracção dos anéis de aorta com KCl 60mmol/L ou incubação com o bloqueador não-seletivo de canais para potássio (Tetraetilamônio) e o bloqueador seletivo de canais KATP (Glibenclamida). Entretanto, a incubação com os bloqueadores seletivos de canais SKCa (Apamina), KV (4-Aminopiridina) e BKCa (Paxilline), não alterou o efeito do ANP. A contracção induzida pelo BAY-k8644 foi reduzida após pré-incubação de anéis de aorta com ANP. Por outro lado, o efeito vasodilatador do CNP foi reduzido em anéis de aorta em que o endotélio vascular foi removido. A incubação com L-NAME e o "sequestrador" de NO₀ intracelular (Hidroxicobalamina) também reduziu o efeito vasodilatador do CNP. Porém, a incubação com o inibidor seletivo da guanilil-ciclase solúvel (ODQ) não alterou o efeito deste peptídeo. A incubação com o Tetraetilamônio e a pré-contracção com KCl 60mmol/L reduziu o efeito vasodilatador do CNP. Porém, a incubação com os bloqueadores seletivos de canais para potássio não alterou o efeito do CNP. A contracção induzida pelo BAY-k8644 foi reduzida após pré-incubação de anéis de aorta com CNP. Em resumo, nossos resultados demonstram que o efeito vasodilatador induzido pelo ANP envolve a produção de GMPc, ativação da proteína GK, SERCA e de canais para potássio e inibição dos canais de cálcio tipo-L. Por outro lado, o efeito vasodilatador do CNP, envolve ativação da eNOS, produção de NO₀, ativação de canais para potássio e inibição de canais de cálcio tipo-L.

MECANISMOS ENVOLVIDOS NOS EFEITOS ANTIHIPERTENSIVO E ANTIHIPERTRÓFICO CARDÍACO DO DUPLO BLOQUEIO DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA EM RATOS HIPERTENSOS RENAIIS 2R-1C

José Wilson do Nascimento Corrêa

Orientadora: Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack

Tese de Doutorado apresentada em 10/02/2011

Acredita-se que drogas antihipertensivas que promovem bloqueio do sistema renina angiotensina (SRA) induzam efeitos protetores independentes dos seus efeitos de redução da pressão arterial. Se o duplo bloqueio do SRA pode promover o melhor controle da pressão arterial ou induzir efeitos cardioprotetores superiores que a monoterapia, ainda permanece em discussão. Além disso, os mecanismos moleculares desses efeitos benéficos ainda necessitam ser identificados. Neste trabalho, estudamos os efeitos cardíaco e sobre a pressão arterial, do duplo bloqueio do SRA em ratos hipertensos renais 2R-1C e questionamos o papel do SRA nas vias de sinalização da hipertrofia que envolve calcineurina-NFAT e MAP quinase. A hipertensão renovascular (2R-1C) foi induzida em ratos Wistar machos (180-200g). Ratos controle (2R) foram submetidos aos mesmos procedimentos, com exceção da implantação do clipe na artéria renal. Seis semanas após a indução da hipertensão, os animais foram submetidos aos tratamentos por 14 dias (gavagem) com losartan, enalapril ou sua combinação em baixas doses (para avaliar os efeitos do bloqueio do SRA independentes de redução da pressão arterial) ou altas doses (para avaliar os mecanismos moleculares envolvidos no bloqueio do SRA). O bloqueio do SRA com baixas doses de losartan e/ou enalapril promoveu reversão do remodelamento cardíaco, sem normalizar a pressão arterial de ratos 2R-1C. Losartan e enalapril foram igualmente efetivos nesse processo, apesar de ter ocorrido redução adicional da pressão arterial em ratos 2R-1C submetidos ao duplo bloqueio do SRA. Em ratos tratados com altas doses, enalapril ou sua associação com losartan, normalizou todas as alterações da via calcineurina-NFAT avaliadas em 2R-1C. Losartan não impediu a ativação de NFAT, mas corrigiu a expressão protéica reduzida de receptor AT₂ e da enzima ECA₂. Os mecanismos moleculares associados à hipertrofia cardíaca em ratos 2R-1C incluem a "upregulation" da via calcineurina-NFAT, aumento da expressão protéica de receptores AT₁ e redução de MAS, ACE₂ e AT₂. Os efeitos benéficos do duplo bloqueio do SRA estão associados à redução adicional da pressão arterial, normalização da sinalização para Ang II e da via calcineurina-NFAT, além de induzir superexpressão protéica de receptores MAS.

EFEITO VASODILATADOR INDUZIDO PELOS DOADORES DE ÓXIDO NÍTRICO EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RESISTÊNCIA DE RATOS HIPERTENSOS RENAIIS 2R-1C

Alice Valença Araújo

Orientadora: Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack

Tese de Doutorado apresentada em 25/02/2011

O óxido nítrico (NO) é o principal agente vasodilatador endógeno que regula o tônus vascular. Existe um grande interesse no desenvolvimento de compostos químicos que possam servir de veículo para a liberação de NO nos sistemas biológicos, principalmente nas situações em que a produção endógena e/ou a biodisponibilidade de NO está prejudicada, como na hipertensão arterial. Experimentos feitos pelo nosso grupo de pesquisa, demonstraram que o complexo de rutênio [Ru(terpy)(bdq)NO]₃⁺ (Terpy) é capaz de induzir relaxamento vascular em aorta isolada de ratos e que este relaxamento é menos potente em aorta de ratos hipertensos renais (2R-1C) do que em aortas de ratos normotensos (sham). Por outro lado, a administração endovenosa deste doador de NO induz uma queda na pressão arterial que apresenta maior amplitude

nos ratos 2R-1C do que nos Sham. A hipótese no nosso trabalho é de que os mecanismos celulares e moleculares de indução de relaxamento do Terpy sejam diferentes em artérias de condutância e de resistência, o que poderia explicar os diferentes efeitos *in vivo* e *in vitro* em ratos Sham e hipertensos renais do tipo 2R-1C. O nosso trabalho teve como objetivo estudar os efeitos do composto doador de NO (Terpy) e os mecanismos celulares e moleculares ativados no processo de relaxamento vascular em artérias mesentéricas de resistência de ratos normotensos e hipertensos renais 2R-1C, visto que estes vasos são fundamentais para o controle da resistência vascular periférica e, conseqüentemente, para a manutenção da pressão arterial. Realizamos estudos de reatividade vascular, de expressão protéica (western blotting) e de toxicidade (MTT). Os doadores de NO, nitroprussiato de sódio (NPS) e Terpy, induziram relaxamento de forma dependente da concentração em artérias mesentéricas de resistência, e este relaxamento não foi diferente entre artérias de animais Sham e 2R-1C. O Terpy apresenta efeito máximo semelhante ao do NPS, embora seja menos potente. O Terpy induziu relaxamento pela ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) e/ou pela ativação dos canais para potássio. Os subtipos de canais para potássio envolvidos neste relaxamento são K_v , K_{ATP} , SK_{Ca} , BKCa e KIR. Porém, os K_v não participam do relaxamento induzido pelo Terpy em 2R-1C e a participação dos BK_{Ca} é menor nestas artérias quando comparadas com as de ratos Sham. O NPS induziu relaxamento de artérias mesentéricas de resistência pela ativação da enzima GCs e/ou pela ativação dos canais para potássio sensíveis ao cálcio do tipo de alta condutância. A expressão protéica da enzima GCs não foi diferente entre artérias de animais Sham e 2R-1C, assim como a dos canais SK_{Ca} e K_{ATP} . Por outro lado, a expressão protéica dos canais K_v e BKCa está aumentada em artérias de ratos 2R-1C, sugerindo que os subtipos de canais para potássio K_v e BK_{Ca} apresentam sua função prejudicada nos ratos 2R-1C. Além disto, o relaxamento induzido pelos doadores de NO envolve a ativação da proteína quinase G (GK) e da Cálcio-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA). Os doadores de NO, NPS e Terpy, nas concentrações que promovem 100% de relaxamento, não induziram morte celular em células da linhagem ECV 304. Os doadores de NO, Terpy e NPS, induzem relaxamento de artérias mesentéricas de resistência pela ativação da enzima guanilato ciclase solúvel, com conseqüente ativação da proteína quinase dependente de GMPc, pela ativação da Ca-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) e pela ativação dos canais para potássio. No entanto, o Terpy ativa K_v , SK_{Ca} , BK_{Ca} , K_{ATP} , e K_{IR} , e o NPS somente ativa os BKCa.

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS GENÉTICOS NO RECEPTOR DE HIDROCARBONETOS DE ARILA (AHR) E O DESENVOLVIMENTO DA ARTRITE REUMATÓIDE

Jhimmy Talbot

Orientador: Prof. Dr. Paulo Louzada Júnior

Dissertação de Mestrado apresentada em 02/03/2011

Introdução: A artrite reumatóide (AR) é uma artropatia autoimune, de caráter inflamatório, com prevalência em torno de 1% da população. O tabagismo é considerado o principal fator de risco para o desenvolvimento da AR. O receptor de hidrocarbonetos de arila (AhR), um fator de transcrição intracelular ativado por hidrocarbonetos aromáticos componentes da fumaça do cigarro, foi identificado como alvo de regulação da diferenciação de células Th17. **Objetivos:** Avaliar se os polimorfismos genéticos do AhR estariam associados ao desenvolvimento da AR, e se este receptor estaria mais expresso em pacientes com AR. **Pacientes e Métodos:** Nós analisamos sete polimorfismos genéticos por mudança de única base (SNP) por PCR em tempo real utilizando sondas TaqMan em 138 pacientes com AR e 129 indivíduos saudáveis. A expressão do mRNA do AhR em células mononucleares isoladas de pacientes com AR e indivíduos saudáveis foi realizada por PCR em tempo real. **Resultados:** Identificamos que haplótipos formados por SNPs no AhR estariam associados com desenvolvimento da AR, podendo ser fator protetor ou de risco para a doença. Em adição, os pacientes com haplótipos de risco apresentavam doença com índice de atividade elevado, principalmente quando o tabagismo estava presente. De fato, pacientes com AR apresentaram aumento na expressão de AhR (mRNA) em relação a indivíduos saudáveis. **Conclusões:** Em conjunto estes resultados sugerem que o AhR possui um papel importante para o desenvolvimento da artrite reumatóide. Possivelmente mutações neste receptor podem estar relacionadas com alterações na sua atividade e conseqüentemente na diferenciação de células Th17 e a susceptibilidade a AR.

PAPEL DA INDOLEAMINA 2,3 DIOXIGENASE (IDO) NO DESENVOLVIMENTO DA ARTRITE E LEISHMANIOSE EXPERIMENTAL

Henrique de Paula Lemos

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha

Tese de Doutorado apresentada em 03/03/2011

O IFN- γ possui um importante papel no controle de diversas doenças autoimunes e infecciosas, incluindo artrite reumatóide (AR) e leishmaniose cutânea (LC). O IFN- γ é um potente indutor de indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), uma

enzima inicialmente reconhecida pela sua atividade antimicrobiana (principalmente pela depleção de triptofano). Porém, a IDO regula a imunidade do hospedeiro e pode inclusive promover a evasão microbiana da resposta imune, estabelecendo comensalismo ou levando à cronicidade da infecção. No contexto de artrite, tem sido atribuído à IDO um papel imunossupressor, apesar de haver demonstrações contrárias a efeito. Na primeira parte deste trabalho objetivamos avaliar os mecanismos imunoregulatórios da IDO durante o curso da AR, utilizando para tal o modelo murino de AR, a artrite induzida por antígeno (albumina sérica bovina metilada, mBSA) (AIA). Verificamos a exacerbação do edema articular, da migração de neutrófilos para a articulação, da proliferação de linfócitos e da produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-17 e TNF- α) por células dos DLNs de animais imunizados e desafiados com mBSA tratados com o inibidor específico da IDO, 1-metil-D-Triptofano (D-1MT), ou de animais deficientes para o IFN γ R (IFN γ R KO) quando comparados com animais não tratados da linhagem selvagem. Observamos também um aumento da produção de IFN- γ frente ao mBSA por células de DLNs de animais imunizados tratados com D-1MT, evidenciando a incapacidade do IFN- γ em conter a inflamação observada na AIA quando a IDO esta bloqueada. Adicionalmente, células dos DLNs e do baço foram incapazes de expressar a IDO na ausência de sinalização pelo IFN- γ . Em conjunto, esses dados sugerem que o IFN- γ reprime o desenvolvimento da AIA pela indução da atividade da IDO. Ademais, a IDO possivelmente reprime o desenvolvimento da AIA via ativação de general control non-depressing 2 protein kinase (GCN2) e CCAAT/enhancer-binding protein beta homologous protein (CHOP), moléculas que quando ativadas pela depleção do triptofano podem levar a apoptose e/ou inibir a proliferação de células T efectoras. E isto devido ao edema articular e a migração de neutrófilos para a cavidade articular também apresentarem-se aumentados em animais deficientes para GCN2/CHOP. Tendo esses dados mostrando que o bloqueio da IDO na AIA leva ao aumento de IFN- γ e IL-17, citocinas reconhecidamente importantes para o controle de doenças infecciosas, visamos avaliar a se o bloqueio da IDO ser eficiente para o resolução da LC. Para tal, utilizamos o modelo experimental de LC induzido pela injeção de *L. major* na pata de camundongos C57Bl/6. A infecção cutânea por *Leishmania major* estimulou a expressão de IDO nos DLNs da infecção (iDLN), atenuando as funções estimulatórias de células dendríticas sobre a proliferação de células T. O bloqueio da atividade da IDO na LC reduziu a inflamação local e a carga parasitária enquanto aumentou a produção de IL-6 e IL-17 e diminuiu a de IL-10 por células dos iDLN. Esses resultados sugerem que o bloqueio da IDO reduza a inflamação local promovida pela infecção por *L. major* através da promoção de uma resposta imune mais efetiva contra o parasita, cuja rápida eliminação leva a uma resolução mais eficiente da doença. Em resumo, a IDO regula o desenvolvimento tanto da AR quanto da LC experimentais. Na AR a IDO restringe a inflamação, contendo a progressão da doença. Por outro lado, na LC a IDO limita a montagem de uma resposta imune efetiva, favorecendo a persistência e patogênese do parasita. Dessa forma, tais resultados são compatíveis com a sugestão de que drogas indutoras da IDO poderiam ser utilizadas com sucesso para o tratamento da AR, enquanto inibidores da IDO poderiam ser benéficas para o tratamento de infecções por leishmania já estabelecidas.

Genética

DIVERSIDADE DA REGIÃO 3' NÃO TRADUZIDA DO GENE HLA-G EM POPULAÇÕES AMERÍNDIAS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA

Nátalia Fagundes Cagnin

Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões

Dissertação de Mestrado apresentada em 04/03/2011

O gene HLA-G é predominantemente expresso na interface materno-fetal e tem sido associado à tolerância materna ao feto e à inibição de linfócitos T citotóxicos. Este fato despertou interesse sobre vários aspectos da dinâmica populacional deste gene, especialmente sobre a região 3' não traduzida (3'UTR), pois variantes desta região foram associadas a diferentes níveis de expressão gênica. Frequências alélicas e haplotípicas destas variantes em populações ameríndias são escassamente relatadas na literatura. Por este motivo, o presente trabalho destina-se a suprir esta ausência e a testar a hipótese de que é possível evidenciar o efeito de seleção sobre a 3'UTR nos ameríndios. Para tanto, foi considerado como objetivo operacional estimar parâmetros (frequências alélicas, haplotípicas, FST, diversidade genética, desequilíbrio de ligação e testes de neutralidade) derivados de sítios polimórficos nesta região gênica e, em seguida, comparar os valores obtidos em uma amostra da população urbana de Ribeirão Preto com aqueles obtidos em amostras de populações indígenas de cinco tribos (*Tikúna*, *Katukina*, *Kaxináwa*, *Marúbo* e *Yaminawa*) da Amazônia Brasileira. A 3'UTR do gene HLA-G foi sequenciada, a partir do que os fenótipos foram determinados. As frequências alélicas e haplotípicas indicaram diferenças altamente significativas entre as populações urbana e Ameríndias; estas apresentaram menor diversidade gênica e haplotípica. Testes de neutralidade sugeriram que os haplótipos estão sujeitos a uma possível pressão seletiva balanceadora que, considerando a diversidade individual, pode ser devida a uma pressão sobre os sítios 14 pb Inserção/Deleção e +3035.

DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA WEB PARA ARMAZENAMENTO E GERENCIAMENTO DE DADOS QUE AUXILIE NA SELEÇÃO DE GENÓTIPOS ELITE DE *Stryphnodendron adstringens* POR MEIO DE TÉCNICAS DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL

Saulo França Amui

Orientadora: Profa. Dra. Silvana Giuliatti

Tese de Doutorado apresentada em 28/03/2011

O desenvolvimento de sistemas *Web* com bancos de dados biológicos, aliados às ferramentas computacionais, possibilitam a organização estruturada de dados e geram informações precisas que auxiliam diretamente no avanço das pesquisas científicas, por disponibilizarem dados em formatos capazes de serem lidos por computadores e, consequentemente, processados para diferentes tipos de análises. O objetivo deste projeto foi desenvolver um sistema para o armazenamento e gerenciamento de dados capaz de transformá-los em arquivos no formato ARFF, preparando-os para o recurso tecnológico de técnicas de Inteligência Artificial (IA) junto ao *software* WEKA, de modo a auxiliar na seleção de genótipos elites de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão). Para elucidação metodológica de aplicabilidade da IA na seleção de genótipos superiores, foi escolhido o barbatimão; uma árvore endêmica do bioma Cerrado com atividades terapêuticas, dentre elas antimicrobiana. Os atributos foram obtidos a partir dos dados de prospecção (coleta das plantas), composição química (fitoquímica) e resposta microbiológica, cedidos pelo grupo de pesquisa da Universidade de Ribeirão Preto, coordenado pela Prof^ª Dr^ª Ana Maria Soares Pereira. A proposta desta tese foi desenvolver um sistema via *Web* no qual seja possível a adição dos dados, gerando um banco contendo todas as informações obtidas pelo grupo que caracterizem determinado acesso. Os dados inseridos neste banco permitiram a edição de atributos e a apresentação dos dados, para a elaboração de arquivos no formato ARFF, possibilitando a interação com o *software* WEKA por meio de um sistema disponível para uso na *internet*. O sistema desenvolvido proporciona a visualização dos dados em diferentes formas de exibição, oferecendo flexibilidade na obtenção de informações. O modo de visualização dos resultados por meio de mapas interativos, com possibilidade de aplicação de filtros dos atributos, incita um novo conceito de navegação entre os dados do sistema, ampliando as possibilidades de percepção da distribuição das amostras. A interação do sistema aliado às técnicas de IA poderá contribuir para o direcionamento de próximas etapas da pesquisa uma vez que a seleção de atributos determinada por estas ferramentas pode variar expressivamente de acordo com as variáveis aplicadas. Este sistema, inicialmente relacionado à espécie *S. adstringens*, poderá ser utilizado, de forma ampla com outras espécies contribuindo para a seleção de genótipos elites de plantas medicinais que apresentem marcantes efeitos terapêuticos.

ANÁLISE DE POLIMORFISMOS EM TUMORES GLIAIS HUMANOS

Aline Cadurín Custódio

Orientadora: Profa. Dra. Cacilda Casartelli

Tese de Doutorado apresentada em 31/03/2011

Os tumores do sistema nervoso central representam aproximadamente 2% de todos os tipos de cânceres. Embora a incidência dos tumores do SNC seja pequena, comparada com outras neoplasias, estes tumores estão entre as mais graves malignidades humanas, pois afetam o órgão responsável pela coordenação e integração de todas as atividades orgânicas. Os gliomas são os tumores mais comuns do SNC. Apesar do progresso marcante na caracterização da patogênese molecular dos gliomas, esses tumores permanecem incuráveis e, na maioria dos casos, refratários aos tratamentos, devido à sua heterogeneidade molecular. O aparecimento desses tumores ocorrem a partir do acúmulo de alterações genéticas nas células. Para entender o mecanismo molecular de formação e progressão tumoral é indispensável identificar os genes que acumulam essas alterações. Um polimorfismo de base única (SNP - Single Nucleotide Polymorphism) é geralmente definido como uma substituição estável de apenas uma base na molécula de DNA com frequência maior que 1%, em pelo menos uma população. Os SNPs são reconhecidos como importantes ferramentas na genética humana e médica e têm sido amplamente utilizados nos estudos de associação genética de várias doenças complexas, como por exemplo: distúrbios cardiovasculares, psiquiátricos e autoimunes, obesidade, osteoporose, diabetes e câncer. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo analisar polimorfismos entre populações caso e controle na intenção de identificar associações destes genótipos na suscetibilidade aos tumores. A técnica utilizada para a análise de polimorfismos foi de PCR-RFLP onde observamos diferenças nas distribuições genotípicas entre pacientes e controles nos SNPs EGF+61, GSTP-1Ile 105 Val, XRCC1 Arg 194 Trp, Pro 206 Pro, Arg 280 His, Arg 399 Gln, Gln 632 Gln, XRCC2 Arg 188 His, XRCC3 Thr 241 Met e XRCC4 G1394T, onde as variantes EGF G61, Trp194, Val105, Pro206, His280, Gln632, His188, Met241 e XRCC4 T1394 foram observados com maior frequência entre os portadores de gliomas. Dessa forma, estas variantes podem ser fatores de susceptibilidade para o desenvolvimento dos tumores.

Ginecologia e Obstetrícia

ESTUDO DOPPLER DAS ARTÉRIAS ILÍACAS COMUNS, DUCTO VENOSO E VEIA CAVA INFERIOR EM FETOS SAUDÁVEIS ENTRE A 22ª E A 38ª SEMANAS GESTACIONAIS

Francisco Maximiliano Pancich Gallarreta

Orientador: Prof. Dr. Francisco Mauad Filho

Tese de Doutorado apresentada em 25/01/2011

O objetivo deste estudo foi descrever múltiplos parâmetros ultra-som Doppler das artérias ilíacas (AI), do ducto venoso (DV) e da veia cava inferior (VCI) em fetos saudáveis entre a 22ª e a 38ª semanas gestacionais.

Desenho do estudo: Neste estudo prospectivo observacional, exames de ecografia Doppler foram realizados em 45 fetos saudáveis na 22ª, 26ª, 34ª e 38ª semanas gestacionais. O tempo de aceleração, o pico de velocidade sistólica, a velocidade diastólica final, o índice de resistência e o índice de pulsatilidade das AI e a velocidade venosa máxima, velocidade venosa mínima (onda a), índice de pulsatilidade venoso e tempo de aceleração venoso, (TAV - definido como o tempo entre o mínimo e o máximo de velocidade venosa) foram avaliados para o DV e para a VCI, nos períodos de gestação.

Resultados: Nas AIs, o tempo de aceleração não variou de maneira significativa ao longo do período estudado. O pico de velocidade sistólica elevou-se significativamente de 79,70 cm/s na 22ª semana para 101,5 cm/s na 38ª semana, com um pico de 106,2 na 34ª semana, enquanto a velocidade diastólica final de modo similar aumentou de 17,23 cm/s na 22ª semana para 27,39 cm/s na 38ª semana, com um pico de 30,11 na 34ª semana. De modo oposto, índice de resistência decresceu significativamente de 0,78 na 22ª semana para 0,73 na 38ª semana, com um nadir de 0,72 na 34ª semana e o índice de pulsatilidade comportou-se de modo semelhante decrescendo significativamente de 1,39 na 22ª semana para 1,38 na 38ª semana, com um nadir de 1,26 na 34ª semana. O tempo de aceleração venoso aumentou de maneira significativa. No DV de 0,130 s na 22ª para 0,133 na 38ª semana e na VCI de 0,127 s na 22ª para 0,134 na 38ª semana. O pico de velocidade sistólica do DV aumentou significativamente de 85,31 cm/s na 22ª semana para 94,48 cm/s na 38ª semana, com um pico de 99,07 cm/s na 34ª semana, enquanto que na VCI aumentou progressivamente de 35,53 cm/s na 22ª semana para 54,28 cm/s na 38ª semana. A velocidade venosa mínima no DV aumentou significativamente de 41,04 cm/s na 22ª semana para 51,49 cm/s na 38ª semana, com um pico de 52,48 cm/s na 34ª semana, enquanto na VCI não houve variação significativa. O índice de pulsatilidade venoso do DV não variou significativamente tendo valores de 0,64 na 22ª semana e 0,59 na 38ª semana, enquanto que na VCI decresceu significativamente de 2,61 na 22ª semana para 2,20 na 38ª semana.

Conclusões: Houve aumento das velocidades nos três territórios ao longo da segunda metade da gestação, exceto a velocidade venosa mínima na VCI. Os índices de resistência decresceram nos três territórios estudados com exceção do índice de pulsatilidade do DV.

O tempo de aceleração não variou significativamente nas artérias ilíacas e aumentou significativamente nos territórios venosos.

MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NO SORO E FLUIDO FOLICULAR DE MULHERES INFÉRTEIS COM E SEM ENDOMETRIOSE SUBMETIDAS À ESTIMULAÇÃO OVARIANA PARA REPRODUÇÃO ASSISTIDA: ESTUDO PILOTO

Aline Zyman De Andrade

Orientadora: Profa. Dra. Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro

Dissertação de Mestrado apresentada em 01/02/2011

Introdução: O estresse oxidativo parece estar envolvido na etiopatogênese da infertilidade relacionada à endometriose. Evidências recentes sugerem a presença de estresse oxidativo (EO) sistêmico em pacientes portadoras de endometriose. Hipoteticamente o EO pode ser influenciado pela supressão hipofisária induzida pelo análogo do Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (aGnRH) e pela estimulação ovariana controlada (EOC) com gonadotrofinas, o que necessita de uma melhor avaliação.

Embora os mecanismos envolvidos na etiopatogênese da infertilidade relacionada à endometriose não tenham sido totalmente aspirado de cada paciente. O nível total de proteínas foi determinado através dos Kits Labtest.

Os resultados obtidos foram comparados entre os grupos endometriose e controle, endometriose estadio I/II e controle, endometriose estadio III/IV e controle e entre os dois subgrupos de endometriose. Em todas as análises foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados: Os níveis de AOPP foram significativamente maiores nas mulheres com endometriose comparadas às

controles em D1 e D3. O total de hidroperóxidos foram significativamente maiores no soro de mulheres com endometriose comparadas às controles em D2 e D4. Os níveis de GSH foram significativamente maiores no grupo endometriose comparados ao controle em D2, D3 e D4. Os níveis de MDA foram similares entre os grupos em D1, D2, D3 e D4. Os níveis de AOPP foram significativamente maiores no soro das pacientes portadoras de endometriose III/IV comparada às controles em D1, D3 e D4. O total de hidroperóxidos foram significativamente maiores no soro das pacientes portadoras de endometriose I/II comparadas às controles em D1, D2, D3 e D4. Maiores níveis séricos de AOPP foram observados em pacientes com endometriose III/IV comparadas às com endometriose I/II em D3 e D4. Observamos níveis mais elevados de total de hidroperóxidos em pacientes com endometriose III/IV comparados às pacientes com endometriose I/II em D1, D2, D3 e D4. Maiores níveis séricos de GSH foram observados em pacientes com endometriose I/II comparados com endometriose III/IV em D1. Não houve diferença nos níveis séricos de MDA entre os diferentes grupos. Observou-se oxidação protéica, na fase folicular precoce do ciclo menstrual. Após supressão hipofisária, pacientes com endometriose apresentaram maiores níveis de hidroperóxidos, sugerindo um aumento na produção das espécies reativas, o que persiste no dia da captação oocitária. A supressão hipofisária e EOC estão relacionadas a maiores níveis de GSH no soro de mulheres portadoras de endometriose, provavelmente na tentativa de prevenir o EO. Nós ainda observamos menores quantidades de hidroperóxidos no fluido folicular de pacientes com endometriose, associadas a maiores níveis de GSH, às custas das pacientes com endometriose I/II, o que reflete uma tentativa endógena de defesa contra o EO, com neutralização das espécies reativas. As implicações reprodutivas e metabólicas do estresse oxidativo sistêmico e folicular precisam ser avaliadas em futuros estudos, assim como a aplicabilidade de terapias antioxidantes na melhora da fertilidade natural e resultados dos procedimentos de reprodução assistida neste grupo de mulheres.

Imunologia Básica e Aplicada

UTILIZAÇÃO DO VÍRUS DA ESTOMATITE VESICULAR COMO VETOR VIRAL PARA A CONSTRUÇÃO DE UMA VACINA EXPRESSANDO OS GENES ESTRUTURAIS prM/E DO VÍRUS DENGUE-2

Rafael Freitas de Oliveira França

Orientador: Prof. Dr. Benedito Antonio Lopes da Fonseca

Tese de Doutorado apresentada em 14/02/2011

A dengue é considerada como uma das mais importantes arboviroses que afetam países em desenvolvimento. Até o presente momento não há uma quimioterapia específica contra os vírus dengue e as tentativas de combate ao vetor têm se mostrado insuficientes. Aceita-se que o desenvolvimento de uma vacina, que induza imunidade aos quatro sorotipos virais seria a melhor forma de combate à doença. Pesquisas baseadas no desenvolvimento de vacinas para a dengue têm explorado vários aspectos das técnicas de produção de vacinas, desde métodos clássicos como a atenuação viral até a expressão de antígenos recombinantes em vetores de expressão, tais como vírus ou bactérias, porém sem o sucesso desejado. No presente estudo foi desenvolvida uma vacina experimental baseada em vírus da estomatite vesicular recombinante. Para construção de VSV recombinante, os genes das proteínas prM e E em conjunto com o peptídeo sinal do capsídeo foram amplificados pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), a partir do genoma do vírus dengue-2 obtido de células C6/36 infectadas *in vitro*. Após a amplificação, estes genes foram então inseridos em um plasmídeo contendo todos os genes de VSV e a partir deste plasmídeo foram recuperados vírus recombinantes *in vitro* (VSV-DENV-2). Em seguida, os vírus recombinantes obtidos foram testados quanto à expressão das proteínas dos genes prM e E de vírus dengue-2, em culturas de células infectadas, e em relação ao potencial em induzir resposta imune específica em camundongos. Os resultados demonstraram que os vírus recombinantes obtidos foram capazes de expressar a proteína E, porém em baixa quantidade, analisado por imunofluorescência de culturas infectadas com VSV-DENV-2 e marcação das proteínas com radioisótopo, em contrapartida os recombinantes obtidos apresentaram altos títulos virais com expressão de todas as proteínas de VSV. Os testes *in vivo*, evidenciaram baixa indução da resposta de anticorpos, com títulos neutralizantes de 1/20 após duas imunizações com VSV-DENV-2. Em relação ao índice de proteção após desafio, apenas 40% dos animais imunizados com VSV-DENV-2 sobreviveram, já o grupo imunizado com vírus dengue-2 demonstrou sobrevida, estatisticamente significativa, com índice de 100% de proteção. Os dados da expressão de genes relacionados à resposta imune em células do baço demonstram, que os animais imunizados com dengue-2 tipo selvagem, bem como aqueles imunizados com VSV-DENV-2, responderam ao estímulo (dengue-2) com aumento na expressão de genes principalmente aqueles relacionados ao receptor de células T. No entanto os níveis de anticorpos específicos para vírus dengue e índice de proteção nesses animais ficaram aquém do esperado. Nossos dados sugerem que a fraca proteção pode ser devido à fraca produção de proteína pelos vírus recombinantes.

USO DE RNAMHSP65 EM CONJUNTO COM DROGAS CONVENCIONAIS (IMUNO-DROGA) PARA TRATAMENTO DE CEPAS MDR DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Éverton Padilha

Orientadora: Profa. Dra. Arlete Aparecida Martins Coelho-Castelo

Dissertação de Mestrado apresentada em 17/02/2011

Este trabalho teve como objetivo verificar a ação conjunta entre drogas de primeira escolha no tratamento da tuberculose e RNAmhsp65 de modo a diminuir a infecção. Para verificar a eficiência no tratamento, utilizou-se infecção *in vitro* em macrófagos de linhagem J774, dosando a produção de citocinas e a capacidade de lise do *M. tuberculosis* e infecção *in vivo* em camundongos da linhagem balb/c. O RNAmhsp65 foi confeccionado a partir do plasmídeo pcDNA3Ahsp65, e a verificação da ativação celular foi realizada baseada na dosagem de óxido nítrico (NO). O melhor tempo de estímulo *in vitro* foi de 24 horas. Não houve diferença entre as doses de 2 a 20 µg de RNAmhsp65 na diminuição das UFC em células infectadas *in vitro*. Em células dendríticas o estímulo somente com 20 µg de RNAm não mostrou diferença na produção de IL-6 e TNF- α . No entanto, a dose de 10 µg de IL-12 e IL-10 foi maior quando comparada com a dose de 20 µg. Por outro lado a produção de IFN- β se comporta de maneira inversa, sugerindo um papel imunomodulador dependente da dose. Quando comparado o estímulo de 50 µg de RNAmhsp65 e 100 µg de DNA plasmídeo houve maior produção de TNF- α , IL-6 e NO. Para verificar o efeito RNAmhsp65 com os fármacos (Isoniazida e Rifampicina), foi preciso determinar a concentração inibitória mínima (CIM) das mesmas. Nas doses de 5 µg de RNAm com 1 µg de Isoniazida (INH) houve diminuição da UFC *in vitro* após 7 dias. Curiosamente com 10 µg de RNAm associado a INH não mostrou diminuição na UFC no tempo de 72 horas, pois a dose foi eficiente após 7 dias para a MDR744. *In vitro*, a associação de RNA e INH foi eficaz na redução do crescimento micobacteriano da H37Rv também. Na análise *in vivo* o RNA foi administrado via intranasal e o fármaco por gavagem diária. Houve aumento de células CD8⁺ nos pulmões dos animais tratados com RNA e INH. O RNA foi eficaz quando inoculado sozinho, mas não reduziu a UFC quando o tratamento foi em conjunto com o fármaco. A produção de citocinas só mostrou diferença na IL-6 quando a associação foi usada. Após 15 dias do tratamento, a histologia do pulmão mostrou que os animais tratados apenas com o RNAmhsp65 mantiveram uma conservação do parênquima. A infecção com 1×10^5 bactérias mostrou aumento das células CD4⁺ com fenótipo de células Treg. Quando comparado o tratamento de RNAmhsp65 com o tratamento associado houve diminuição das UFC. Finalmente, para determinar o mecanismo de ação do RNAmhsp65 avaliamos qual receptor do tipo Toll era capaz de ligar a esta molécula, pois mostramos que o TLR7 é o ligante do RNAm, que pode, assim, desencadear os efeitos mostrados. Em conjunto, nossos resultados abrem novas perspectivas para verificar o papel entre RNAmhsp65 associadas as drogas para cepas MDR.

AValiação de uma nova estratégia vacinal para a prevenção da rodococose equina

Marcel Montels Trevisani

Orientador: Prof. Dr. Sandro Gomes Soares

Dissertação de Mestrado apresentada em 24/02/2011

Infecções pulmonares de potros jovens por *Rhodococcus equi* resultam em grave pneumonia levando à morte um grande número de animais todos os anos. Até o momento não há nenhuma vacina aceita globalmente para a prevenção da rodococose equina. O único tratamento preconizado é baseado em antibioticoterapia, porém os protocolos clínicos são longos, de alto custo, com efeitos colaterais e tem favorecido a seleção de cepas resistentes aos antibióticos. Diversas estratégias no desenvolvimento de uma vacina segura e eficiente contra a rodococose foram propostas, porém, não induziram um efeito protetor considerável.

O principal fator de virulência do *R. equi* descrito e amplamente estudado é a proteína *vapA*, no entanto, outras proteínas localizadas na ilha de patogenicidade estão presentes em amostras de *R. equi* virulento extraídos de animais infectados. Trabalhos recentes têm demonstrado a presença do gene *vapG* em todas as cepas virulentas e este gene é altamente expresso quando a bactéria reside no interior de macrófagos, tornando-o um possível alvo vacinal. Nosso grupo já possui experiência prévia no uso de linhagem de *Salmonella enterica Typhimurium* atenuada carregando a proteína *vapA*. Baseado nos resultados positivos obtidos, foi construída uma linhagem atenuada de *S. enterica Typhimurium* ?3987 expressando a proteína *vapG*. A administração desta linhagem em camundongos foi capaz de induzir proteção contra *R. equi* virulento. Os resultados observados foram a colonização e persistência da *Salmonella* nos órgãos alvo, a redução da carga bacteriana de *R. equi*, e a indução de um perfil imune protetor semelhante ao observado em animais adultos resistentes. Observou-se o aumento da produção de IL-12p70 e IFN- γ , além da presença de níveis aumentados de IL-4 e a redução dos níveis de TNF- α . Observou-se também o aumento na subpopulação de células T auxiliares (CD4⁺) com perfil de memória, além de aumento na população de linfócitos B totais quando comparado aos grupos controles.

Este conjunto de resultados indica que a imunização com *Salmonella enterica* Typhimurium expressando a proteína *vapG* gera uma resposta imune celular eficiente tornando esta linhagem uma possível candidata a vetor vacinal. Além disso, sugere que outros antígenos do *R. equi* podem ser bons candidatos vacinais, além da proteína *vapA* em uso por diferentes grupos.

SELEÇÃO E PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANOS (SCFV) CAPAZES DE NEUTRALIZAR ATIVIDADES TÓXICAS DA PEÇONHA DE *Micrurus ibiboboca*

Carolina Mendes Fossa

Orientador: Prof. Dr. José Elpidio Barbosa

Dissertação de Mestrado apresentada em 02/03/2011

Entre os acidentes por animais peçonhentos, o ofidismo desperta o maior interesse médico, por sua frequência e gravidade. No Brasil são notificados anualmente cerca de 20.000 acidentes, com letalidade em torno de 0,43% (Ministério da Saúde, 2006). Embora a ocorrência dos acidentes promovidos por serpentes do gênero *Micrurus sp.* seja de 0,6%, todos os casos são considerados potencialmente graves, pois a peçonha possui neurotoxinas que se dispersam rapidamente na circulação sistêmica, difundindo-se pelos tecidos, produzindo bloqueio neuromuscular (pós-sináptico), promovendo paralisia muscular, em casos mais severos insuficiência respiratória aguda. Até o momento, anticorpos heterólogos permanecem como única terapia específica para o tratamento de acidentes com animais peçonhentos, embora sua administração em humanos possa causar reações de hipersensibilidade como choque anafilático e/ou doença do soro. A produção de fragmentos de anticorpos humanos pela tecnologia de "Phage Display" apresenta-se como uma alternativa viável para a produção de anticorpos monoclonais contra a peçonha de *M. ibiboboca*. Esta técnica tem sido amplamente utilizada, pois permite a seleção, *in vitro*, de anticorpos com a especificidade de interesse em meio a um amplo repertório. O objetivo deste trabalho foi produzir fragmentos de anticorpos humanos (scFv) capazes de inibir ações da peçonha da serpente *M. ibiboboca*. As peçonhas utilizadas no trabalho foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan e pelo Serpentário da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Para a produção de anticorpos monoclonais humanos, foi utilizada a biblioteca Griffin. 1 que possui um repertório sintético de anticorpos de aproximadamente 10¹² clones, produzida no MRC (Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK), a qual consiste de uma biblioteca de fagos-anticorpos (scFv) construída através da clonagem das regiões variáveis de cadeia pesada e leve humana em um fagomídeo pHEN2, unidas por um peptídeo. Os fagos-anticorpos específicos para a peçonha de *M. ibiboboca* foram selecionados através da imobilização das proteínas em superfície sólida e utilizados para infectar bactérias *E. coli* TG1, que amplificaram os fagos-anticorpos na presença do fago auxiliar VCSM13. Após quatro turnos de seleção, o ensaio imunoenzimático ELISA policlonal, apontou que os fagos-anticorpos selecionados reconhecem proteínas da peçonha de *M. ibiboboca*. Os fagos-anticorpos selecionados foram utilizados para infectar bactérias HB2151, que produziram fragmentos solúveis de anticorpos (scFv). Estes fragmentos de anticorpos foram analisados através do ensaio imunoenzimático ELISA monoclonal, em que foram identificados 77 clones com especificidade frente à peçonha. Entre eles, quatro clones foram selecionados e purificados utilizando-se coluna de afinidade ao níquel (Ni-NTA Qiagen). Ensaios que analisaram a capacidade dos fragmentos de anticorpos em inibir as atividades tóxicas da peçonha foram realizados, sendo que, os scFvs (clones B3 e D12) inibiram significativamente a atividade hemolítica da peçonha *in vitro*. Outras atividades foram parcialmente inibidas, como a miotoxicidade e cardiotoxicidade, ambas *in vivo*. Na inibição da letalidade, os scFv's (B3 e D12) se mostraram promissores pois foram capazes de aumentar a sobrevivência dos camundongos desafiados com a peçonha.

Neurologia

ALTERAÇÕES EXTRA-HIPOCAMPAIS EM PACIENTES COM EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL

Paula Rejane Bezerra Diniz

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos dos Santos

Tese de Doutorado apresentada em 15/02/2011

A Esclerose Temporal Mesial (ETM) é a causa mais comum de epilepsia do lobo temporal (ELT), caracterizada na imagem por atrofia e gliose do hipocampo e de estruturas diretamente relacionadas com ele, como o pólo temporal, o corpo mamilar e o fórnix. Porém, o dano tecidual não se restringe a estas estruturas, tendo sido descritas alterações temporais posteriores e extra temporais, nos pacientes com ELT. Esta perda tecidual difusa é progressiva e pode ser detectada em

exames de ressonância magnética (RM). Contudo, a avaliação da lesão extratemporal não tem sido feita usando conjuntamente diversas técnicas quantitativas atualmente disponíveis. Para estudar a existência e o mecanismo do dano extratemporal relacionado à ETM nós utilizamos diferentes técnicas de ressonância magnética quantitativa e processamento de imagens comparando os pacientes com ETM e controles normais. Para tanto, foram utilizados exames de 135 pacientes com esclerose mesial temporal e 105 controles normais adquiridos em um equipamento de 1,5 teslas e 36 pacientes e 24 controles normais adquiridos em um equipamento de 3 teslas. Para comparar diferenças volumétricas foi utilizada a metodologia de análise baseada em voxel (VBM, de voxel based volumetry), para avaliar a integridade da mielina e de axônios foi utilizada a transferência de magnetização (MTR, de magnetization transfer ratio) e imagens ponderadas por difusão (DWI, de diffusion weighted imaging), e para investigar a existência de alterações de espessura cortical foi utilizado o método baseado em superfície implementado no pacote FreeSurfer. Para testar a presença de alterações metabólicas foi usada a espectroscopia de prótons e o pacote de *software* LCModel. Na nossa casuística, foi identificada a presença de alterações na substância branca e cinzenta no lobo temporal e em outras regiões do encéfalo. Estas alterações foram mais intensas no lobo frontal, corpo caloso e lobo occipital, regiões relacionadas com circuitos que envolvem o hipocampo, sugerindo que o dano tecidual esteja relacionado com a conectividade hipocampal e se expresse com destruição dos tratos relacionados com estes circuitos.

ALTERAÇÕES NEUROPSICOLÓGICAS EM PACIENTES NA FASE INICIAL DA ESCLEROSE MÚLTIPLA

Sarah Teófilo de Sá Roriz

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos dos Santos

Dissertação de Mestrado apresentada em 11/03/2011

Introdução: a descrição tradicional da Esclerose Múltipla (EM) enfatiza ser esta uma doença desmielinizante inflamatória acometendo a substância branca (SB) do sistema nervoso central. Porém, nas últimas décadas vêm sendo acumuladas evidências de acometimento da substância cinzenta (SC), tanto em estudos anátomo-patológicos como de imagem quantitativa de ressonância magnética (IRM-q). Este comprometimento da SC é mais evidente na fase crônica progressiva da doença, onde a atrofia predomina, sendo as alterações cognitivas entendidas como algo restrito a esta fase. No entanto, como foi provada a existência de dano axonal precoce na EM, nós hipotetizamos que existe comprometimento de funções superiores detectáveis por exames neuropsicológicos mesmo em pacientes com déficit mínimo. **Objetivo:** testar a hipótese de que existem alterações cognitivas precoces na EM mesmo com incapacidade mínima e dano tecidual discreto. **Método:** foram avaliados com bateria neuropsicológica extensiva e exames de IRM-q pormenorizados 17 indivíduos (6 homens e 11 mulheres) com EM recorrente remitente (RR), com diagnóstico clinicamente definido e comprovado por imagem de acordo com os critérios de McDonald. O tempo de doença foi igual ou inferior a cinco anos, contados a partir do diagnóstico e com incapacidade mínima (EDSS menor que 3). Um grupo controle de 17 voluntários normais pareados foi avaliado para comparação. **Resultados:** os pacientes apresentaram disfunção de funções superiores estatisticamente significantes que incluíam dificuldades de atenção, memória, velocidade de processamento de informação, habilidades visuoespaciais, planejamento, abstração verbal, raciocínio numérico, flexibilidade mental, controle inibitório, compreensão verbal e escores de QI (tanto de QI geral, quanto de QI de execução e verbal). Apresentaram-se preservados com relação aos controles: a capacidade de nomeação, a velocidade de processamento motor e o raciocínio lógico. Na IRM-q houve alterações significativas discretas, compatíveis com a fase inicial da doença. **Conclusão:** nossos achados sugerem que existe déficit cognitivo precoce na EMRR, mesmo quando a debilidade é incipiente ou ausente.

Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço

CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO P25 SECRETADA PELO ENDOTÉLIO CORNEANO E AVALIAÇÃO DE SUA UTILIDADE CLÍNICA

Giselle Oliveira Seixas

Orientador: Prof. Dr. Sidney Júlio de Faria e Sousa

Tese de Doutorado apresentada em 24/02/2011

Objetivos: Caracterizar a fração p25 secretada pelo endotélio corneano de coelho, determinar se o endotélio corneano humano a produz e, se a produzir, caracterizá-la. Determinar se a p25 pode ser usada como marcador de susceptibilidade à rejeição do transplante de córnea e descrever a modulação da p25 pelo uso de corticóide subconjuntival em coelhos.

Material e métodos: Foram utilizadas 26 córneas de coelhos tratados com corticóide, 20 de coelhos não tratados e 12 de humanos. Realizadas coletas de amostras de sangue de 30 pacientes submetidos a transplante de córnea, com ou sem rejeição, e de 6 pacientes para o grupo controle não transplantado. A caracterização da p25 de córnea de coelho foi realizada utilizando-se o método de SDS-PAGE - MALDI-TOF. A secreção da p25 de endotélios humanos foi avaliada por fluorografia e posteriormente caracterizada pelo método de SDS-PAGE - MALDI-TOF. Para testar o sangue de pacientes transplantados e controles foi utilizado o western blot. As técnicas de RT-PCR e de fluorografia foram usadas para avaliar a modulação da p25 de córneas de coelho. **Resultados:** A p25 do coelho foi caracterizada como sendo a sintase de prostaglandina D2 (PGDS). A p25 é secretada pelo endotélio da córnea humana e foi caracterizada como a proteína cristalina α B2. Nos western blots de pacientes sem transplantes não foi observada marcação na região da p25, naqueles de pacientes com transplante de córnea houve marcação em alguns exames. Na fluorografia das córneas de coelhos tratados com corticóide, este modulou algumas frações de proteínas de baixo peso molecular secretadas. O método do RT-PCR mostrou que a PGDS estava presente tanto nas córneas de coelhos tratados como dos não tratados. **Conclusões:** A fração p25 da córnea de coelhos foi caracterizada como PGDS. Em humanos ocorre a secreção da fração p25 pelo endotélio corneano que é a proteína cristalina α B2. A p25, neste estudo, não foi adequada para determinar ou para prever a ocorrência de rejeição de transplante de córnea. Foi possível avaliar que não há modulação negativa da p25 pelo uso de corticóide.

USO DA BIOMEMBRANA DE LÁTEX NATURAL COMPARADO AO TRANSPLANTE CONJUNTIVAL AUTÓLOGO NA SUPERFÍCIE OCULAR

Érika Christina Canarim Martha de Pinho

Orientador: Prof. Dr. Sidney Júlio de Faria e Sousa

Tese de Doutorado apresentada em 25/02/2011

A biomembrana de látex é material biocompatível e promotor de neoformação tecidual. Já foi comprovada sua atuação na neoangiogênese e na formação de matriz extracelular provisional, passos fundamentais em qualquer processo de reparo. Foi aplicada com sucesso em pacientes com úlceras crônicas de membros inferiores e em miringoplastias. Em olhos de coelhos, a biomembrana de látex mostrou ser eficaz na reconstrução da superfície ocular, comparada à esclera nua, com recuperação funcional da conjuntiva. Neste estudo, a biomembrana de látex foi comparada ao transplante conjuntival autólogo em coelhos e em humanos. Em coelhos, apresentou aumento do processo inflamatório em 7 dias, com equiparação entre as técnicas em 21 dias, em todos os quesitos histológicos estudados. No processo de reparo da conjuntiva ocular humana, a biomembrana de látex foi aplicada cirurgicamente, após pterigioplastia, em 85 pacientes (**grupo BL**). O grupo controle foi constituído de 42 pacientes submetidos à pterigioplastia com transplante autólogo de conjuntiva (**grupo TC**). Esses grupos foram subdivididos de acordo com pterígio inicial, primário ou recidivado (1 e 2, respectivamente) e foram acompanhados por 12 meses. A biomembrana de látex foi removida na segunda semana do pós-operatório do **grupo BL**, junto com todas as suturas, de ambos os grupos. Não houve diferença estatística entre os grupos em idade, sexo, sintomas pós-operatórios e intercorrências, como simblefaro e granuloma. O **grupo TC** apresentou maior número de casos de formação de afinamento corneano com significância estatística (Exato de Fisher, $p = 0,03$). No 14º dia pós-operatório, o **grupo BL** apresentou 82% dos pacientes com defeito epitelial de ausente a leve sobre a área escleral. Com relação a recidivas do pterígio, não se observou diferença estatística entre **BL** e **TC**, com 40,7% e 30%, respectivamente (Exato de Fisher, $p = 0,318$). Também não se observou diferença estatística nas recorrências, quando avaliados separadamente o pterígio pré-operatório primário e o recidivado (Exato de Fisher, $p = 0,814$ e $p = 0,128$, respectivamente). Nas curvas de sobrevida, obtidas pelo método de Kaplan-Méier, não foi possível observar diferença estatística entre os grupos experimentais (Log-rank, $X^2 = 1,67$, $p = 0,20$). Somente foi possível detectar diferença estatística entre os grupos observando-se a progressão do feixe fibrovascular em 3, 6 e 12 meses, no pós-operatório (Mann-Whitney, $p < 0,001$, $p < 0,001$ e $p = 0,001$, respectivamente), sendo todos os valores do **grupo BL** maiores do que os do **grupo TC**. Isso indica que o **grupo BL** apresentou uma tendência à recorrência do pterígio, com redução do efeito estético e provável maior sintomatologia em longo prazo. Propõe-se que esse método de avaliação do feixe fibrovascular possa auxiliar no estudo de técnicas experimentais diferentes, na cirurgia do pterígio, em virtude da dificuldade de se obter grandes amostras e da inconsistência nos critérios de recidiva. A biomembrana de látex se afigura como um novo recurso terapêutico na reconstrução da superfície ocular, podendo seu uso ser futuramente ampliado para outras patologias conjuntivais. Devido à sua atuação na neoangiogênese e maior formação de feixe fibrovascular, deve ser melhor estudada sua aplicação em reconstrução da superfície pós-tumores e pós-simblefaroplastias.

POLIMORFISMO DO GENE *TP53* (CÓDON 72) EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE GLAUCOMA PRIMÁRIO DE ÂNGULO FECHADO

Marcelo Jordão Lopes da Silva

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Veronese Rodrigues

Tese de Doutorado apresentada em 25/02/2011

Os objetivos deste Estudo são: determinar as distribuições alélicas e genótípicas do polimorfismo do gene *TP53* (códon 72), em pacientes brasileiros com glaucoma primário de ângulo fechado (GPAF), em comparação a controles sadios e verificar a associação alélica (Prolina e Arginina) do gene *TP53* (códon 72) com GPAF, sem e com história de crise aguda por bloqueio pupilar. O diagnóstico de GPAF foi baseado na biomicroscopia, gonioscopia, tonometria, biomicroscopia de fundo do olho e perimetria visual computadorizada. O ácido desoxirribonucléico (DNA) foi amplificado, através da reação em cadeia catalisada pela polimerase. A região do éxon 4, do gene *TP53*, foi amplificada e digerida através da enzima de restrição BseDI. A análise estatística foi realizada pelo teste do Qui-Quadrado (χ^2), com correção de Yates, ou pelo teste exato de Fisher Bicaudal, quando necessário ($p < 0,05$). Foram avaliados 66 pacientes com GPAF e 72 controles normais para este estudo. A média de idade dos indivíduos foi de $65,64 \pm 10,33$ anos; nos 47 pacientes, no grupo com GPAF, com história de crise aguda, a idade foi de $66,2 \pm 8,7$ anos e nos 19 pacientes com GPAF, sem história de crise aguda, foi de $63,9 \pm 14,1$ anos; 43 pacientes (65,1%) eram do sexo feminino; 64 pacientes (97,2%) eram brancos. Nesse estudo concluiu-se que não houve diferença significativa na frequência genotípica para o polimorfismo (PRO/PRO, ARG/ARG e ARG/PRO) do gene *TP53* (códon 72), entre grupo com GPAF e do grupo controle ($p = 0,3984$) e, para os alelos (PRO e ARG), houve diferença significativa entre o grupo com GPAF, com crise aguda, em comparação ao grupo com GPAF, sem crise ($p = 0,0251$). Os resultados indicam associação dos genótipos do polimorfismo do gene *TP53* (códon 72) nos pacientes com GPAF, com história de crise aguda de glaucoma.

VALIDAÇÃO DO PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO MIOFUNCIONAL OROFACIAL COM ESCALAS PARA JOVENS E ADULTOS

Ana Paula Medeiros Magalhães

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Maria de Felício

Dissertação de Mestrado apresentada em 11/03/2011

A avaliação miofuncional orofacial é etapa fundamental no processo de diagnóstico na área de motricidade orofacial (MO), possibilita a compreensão das condições anatômicas e funcionais do sistema estomatognático, permitindo estabelecer o raciocínio terapêutico e definir encaminhamentos. Vários autores escreveram a respeito da necessidade da prática baseada em evidências e recomendaram o uso de protocolos validados para o diagnóstico, bem como para a terapia. Atualmente, três protocolos de avaliação miofuncional orofacial estão validados e publicados. São eles: o “*The Nordic Orofacial Test-Screening – NOT-S*”, o Protocolo de Avaliação Miofuncional Orofacial com Escores - AMIOFE, validado para crianças, o qual caracteriza as condições musculares e funcionais com base nos escores, permitindo definir não apenas a presença ou ausência, mas também o grau de distúrbio miofuncional orofacial (DMO) e o protocolo de Avaliação Miofuncional Orofacial com Escores Ampliados - AMIOFE-A. O AMIOFE já foi usado para diagnóstico e análise da evolução de tratamentos em sujeitos jovens e adultos com desordem temporomandibular (DTM), porém não foi validado para esta população. O objetivo do presente estudo foi analisar a validade de critério, a validade de construto, e a confiabilidade intra e entre - examinadores, assim como valores de sensibilidade (S), especificidade (E), valores preditivos (VP+ e VP-) e prevalência (P) do AMIOFE para jovens e adultos. Participaram 50 sujeitos com DTM (GDTM) e 30 sujeitos sem DTM (CA), todos avaliados e selecionados a partir do exame clínico com o *RDC/TMD*. A validade de critério do protocolo AMIOFE foi analisada pela comparação com o protocolo NOT-S. A validade de construto foi analisada pela: (a) comparação do GDTM ao CA, para verificar a capacidade do AMIOFE em diferenciar sujeitos com e sem DMO; (b) comparação do grupo com DTM antes e após TMO, a fim de analisar a habilidade do AMIOFE para mensurar as mudanças ocorridas em decorrência do tratamento. Para tanto, os dados da avaliação miofuncional orofacial dos dez sujeitos com DTM que receberam terapia miofuncional orofacial (GT) foram comparados na fase diagnóstica e na fase final após 120 dias de tratamento. Dois examinadores, fonoaudiólogos devidamente treinados e calibrados, denominados E1 e E2, realizaram as avaliações. De acordo com os resultados houve correlação negativa significativa entre os protocolos AMIOFE e NOT-S ($r = -0,86$, $p < 0,01$). A validade de construto do AMIOFE foi demonstrada pela capacidade do AMIOFE refletir as condições miofuncionais orofaciais normais e alteradas pelas diferenças observadas entre os escores dos grupos CA e GDTM, nos itens aparência/postura, mobilidade e nas funções de mastigação e deglutição ($p < 0,05$). O AMIOFE foi capaz

de mensurar as mudanças ocorridas entre a FD e a FF do tratamento proposto. A força de concordância medida pelo Kappa Ponderado (K_w) entre-examinadores E1 e E2 variou de “razoável” a “moderada”, e os valores de confiabilidade foi 0,88, considerado “bom” ($r = 0,78, P < 0,01$). A concordância intra-examinador para E2 variou de “razoável” a “moderada” e a confiabilidade para aplicação do AMIOFE foi de 0,92, isto é, “excelente” ($r = 0,84, P < 0,01$). A concordância para a aplicação do protocolo NOT-S, variou de “razoável” a “boa”, e a confiabilidade foi de 0,89 ($r = 0,80, P < 0,01$). Para os demais índices, foram encontrados os seguintes valores utilizando a mediana e os percentis, apresentados respectivamente, S (80,5 - 65,38), E (80,0 - 92,59), VP+ (76,0 - 80,95), VP- (83,7 - 84,74) e P (46,2 - 26,25). De acordo com os resultados concluiu-se que o protocolo AMIOFE é válido, confiável e proporciona um diagnóstico com boa margem de acerto, tanto para os casos positivos como negativos. Sua aplicação clínica e em pesquisas é viável devido à própria construção do protocolo que fornece a indicação do escore a ser atribuído, com base na descrição semântica que o acompanha.

Ortopedia, Traumatologia e Reabilitação

CORRELAÇÃO ENTRE SVO2 E SJO2 DURANTE CIRURGIA CARDÍACA PEDIÁTRICA, COM CIRCULAÇÃO EXTRACORPÓREA EM PACIENTES ANESTESIADOS COM FENTANIL - MIDAZOLAM

Pamela Regina Teixeira Nabarro

Orientadora: Prof^a Dr^a Gabriela Rocha Lauretti

Dissertação de Mestrado apresentada em 07/02/2011

A saturação de oxigênio da veia jugular interna (SjO2) é uma medida objetiva da entrega de oxigênio ao cérebro, qualidade de neuroproteção, detecção de isquemia, e uma administração adequada de cuidados aos pacientes. A baixa correlação entre SjO2 e a saturação venosa mista de oxigênio tem sido mostrada em crianças, de modo que a SjO2 é necessária para avaliar a oxigenação cerebral. Amostras intermitentes de sangue da veia jugular podem fornecer informações úteis para um adequado manejo do paciente. Particularmente, quando o NIRS ou cooximetria jugular não estão disponíveis. Esse estudo retrospectivo compara a SjO2 e SvO2 em alguns dos momentos críticos da cirurgia cardíaca pediátrica. **Materiais e Métodos:** doze pacientes pediátricos com idade de 3 a 120 meses submetidos a cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea e anestesiados com fentanil e midazolam e complementadas com isoflurane, que receberam através de um cateter central 5F posicionado na jugular interna direita e um cateter intravenoso de 22 ou 20 G posicionado na jugular interna esquerda até o anel cricóide e retrógrada avançada. Amostras de sangue de 1ml foram retiradas simultaneamente de 2 cateteres venosos e um arterial a cada 10 minutos e, quando considerado necessário, os dados da SjO2, SvO2 e SaO2 foram registrados seguindo determinados períodos: após inserção dos cateteres arterial e venoso, antes do início da CEC, após o resfriamento completo, após o reaquecimento, e após a administração da protamina. A análise do sangue foi realizada seguindo alpha-stat strategy. O suporte vasoativo após o desmame da CEC foi por milrinone. **Resultados:** Análises de regressão dos dados reunidos não mostraram correlação entre SjO2 e SvO2, mas uma baixa correlação foi observada após administração da protamina. As médias foram similares em todos os períodos, com exceção do momento PROTA, quando SvO2 foi significativamente maior entre a SjO2. Após o desmame da CEC, apenas uma amostra com SjO2 foi observada. Níveis de glicose aumentaram significativamente no sangue da veia central e valores similares foram encontrados no sangue da veia jugular, mas a diferença artério-jugular foi maior que a diferença artério-venosa em todos os períodos. O lactato da veia jugular e da veia central aumentaram similarmente no sangue da veia central. **Discussão:** SvO2 pode não prever a SjO2, e a maior diferença entre SjO2 e SvO2 pode ocorrer após o reaquecimento e após o desmame da CEC.

INFLUÊNCIA DO PREPARO DO ORIFÍCIO PILOTO NA ANCORGEM DOS PARAFUSOS COM DIÂMETRO INTERNO CÔNICO

Gustavo Silva Abrahão

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Shimano

Tese de Doutorado apresentada em 14/02/2011

Objetivo: Avaliamos a influência do diâmetro e do modo de preparação do orifício piloto na resistência ao arrancamento e no torque de inserção dos parafusos pediculares do sistema de fixação vertebral com diâmetro interno cônico. **Métodos:** ensaios mecânicos foram realizados com parafusos pediculares com alma cônica e diâmetro de 4,2mm e 5,2mm inseridos nos pedículos vertebrais lombares de suínos. Foi considerada a maior medida de torque obtida com torquímetro. O orifício piloto foi confeccionado com de broca e sondas (pontaguda e cortante) com diferentes diâmetros. **Resultados:** Testando

o parafuso de 4,2mm a perfuração com orifício igual ou inferior ao menor diâmetro interno do parafuso, aumentou o torque e a resistência ao arrancamento. Perfurações com diferentes instrumentos apresentaram comportamento semelhante. Perfurações com sondas permitiram que orifícios confeccionados com dimensões superiores ao menor diâmetro interno do parafuso apresentassem resistência semelhante a das perfurações com dimensões iguais ao menor diâmetro interno do implante, realizadas com sondas e brocas. **Conclusões:** Nos parafusos de 4,2 mm o diâmetro e o modo de preparação do orifício influenciam o torque e a resistência, nos de 5,2 mm apenas o torque de inserção. Não há correlação entre força de arrancamento e torque de inserção.

INFLUÊNCIA DA ESPESSURA DO OSSO CORTICAL SOBRE A VELOCIDADE DE PROPAGAÇÃO DO ULTRASSOM

Luiz Garcia Mandarano Filho

Orientador: Prof. Dr. Claudio Henrique Barbieri

Dissertação de Mestrado apresentada em 17/02/2011

Foi realizado um estudo experimental *in vitro* para avaliar a influência da espessura do osso cortical sobre a velocidade de propagação do ultrassom. Para tal foram utilizadas 60 lâminas ósseas confeccionadas a partir do fêmur de bovinos, com diferentes espessuras, variando de 1 a 6 mm (10 de cada). As medidas da velocidade do ultrassom foram realizadas por aparelho projetado para este fim, utilizando técnica subaquática e por contato direto com auxílio de gel de acoplamento. Os transdutores foram posicionados de duas maneiras diferentes; oposto entre si, com o osso entre eles, sendo a medida chamada de transversal, e, paralelos na mesma superfície cortical, sendo a medida chama de axial. Os resultados demonstraram que, com o modo de transmissão axial, a velocidade de propagação do ultrassom aumenta conforme a espessura do osso cortical aumenta, independente da distância entre os transdutores, até a espessura de 5 mm, mantendo-se constante após. Não houve alteração da velocidade quando o modo de transmissão foi transversal, como também não houve diferença entre as velocidades quando se comparou as técnicas utilizadas (contato direto e subaquático). Conclui-se que a velocidade de propagação do ultrassom aumenta com o aumento da espessura da cortical óssea, no modo de transmissão axial, até o momento em que a espessura supera o comprimento da onda, mantendo a velocidade constante a partir de então.

CLOSED KINETIC CHAIN UPPER EXTREMITY STABILITY TEST (TEST CKC): CONFIABILIDADE E ANÁLISE CINEMÁTICA

Helga Tatiana Tucci

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

Tese de Doutorado apresentada em 24/03/2011

Testes funcionais são ferramentas clínicas de baixo custo que fornecem dados objetivos do paciente. Porém, para que um teste assegure uma medida acurada ele deve ser confiável. Além disso, a análise biomecânica, a cinemática e a cinética do Closed Kinetic Chain Upper Stability Teste (Teste CKC). O estudo da confiabilidade envolveu 108 indivíduos divididos em 6 grupos: a) homens sedentários sem disfunção no ombro; b) mulheres sedentárias sem disfunção no ombro; c) mulheres ativas esporte-específico para a extremidade superior sem disfunção no ombro; d) homens ativos esporte-específico para a extremidade superior sem disfunção no ombro; e) mulheres sedentárias com síndrome do pinçamento subacromial e g) homens sedentários com síndrome do pinçamento subacromial. A Escala Visual Numérica foi aplicada antes e após o teste para mensurar a dor. Cada voluntário realizou 4 testes, intervalados em 45 segundos. Após uma semana, os procedimentos foram realizados novamente. O número de toques do teste foi obtido pela média das três últimas repetições e a potência e a pontuação foram determinadas através de formulas específicas do teste. A confiabilidade foi analisada pela média das três últimas repetições. A análise cinética e cinemática do Teste CKC foi realizada em grupos sedentários masculino e feminino em 3 distâncias entre mãos. Cada voluntário realizou 3 repetições em cada distância, intervaladas em 45 segundos. Um repouso de 2,5 minutos foi dado entre as distâncias. A confiabilidade foi calculada pelo Coeficiente de Concordância Intraclasse, interpretados como pobres quando <0,40, bons entre 0,40 e 0,75 e excelente quando > 0,75. A comparação da cinética e da cinemática em cada distância foi realizada do modelo linear de efeitos e confiabilidade excelentes e bons foram observados para todos os grupos em todos os itens avaliados. O modelo linear de efeitos mistos mostrou não haver diferença estatisticamente significativa na cinemática dos movimentos escapulares entre as três distâncias avaliadas para o grupo masculino. Entretanto, houve um aumento nos movimentos escapulares de rotação superior e inclinação anterior na distância 1 em relação as demais para a maioria das comparações do feminino. O movimento de rotação externa do úmero foi maior na distância 1 na maioria das comparações, apresentando um aumento

no valor na fase de apoio e uma diminuição na fase de balanço. A força axial aplicada à extremidade superior no grupo masculino foi maior que no feminino e não houve diferença nos valores de força quando comparados entre distâncias dentro do mesmo grupo. Os resultados sugerem que o Teste CKC é uma ferramenta confiável para avaliar a função em pessoas com condições semelhantes às das amostras avaliadas. Entretanto, os resultados cinéticos e cinemáticos sugerem que o teste seja usado com cautela na prática clínica em decorrência do aumento da inclinação anterior da escápula e da força axial imposta à extremidade superior.

Patologia Experimental

PROTEÇÃO E RISCO DO CONSUMO DE DOSES LEVE E MODERADA DE ETANOL NA CARCINOGENESE QUÍMICA INDUZIDA NO EPITÉLIO DO CÓLON

João Felipe Rito Cardoso

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Zucoloto

Dissertação de Mestrado apresentada em 04/03/2011

Tendo em vista o hábito disseminado na população mundial no uso de etanol, nas diferentes formas de bebidas alcoólicas, torna-se crucial o entendimento das suas repercussões na saúde. O alto consumo crônico do etanol vem sendo associado com moderado risco para o desenvolvimento de neoplasias malignas do cólon. O câncer colorretal é a terceira causa de morte relacionada a câncer, estando relacionada a fatores ambientais, como o alcoolismo, de modo que, os estudos da associação do consumo de etanol na carcinogênese experimental mostram-se de extrema importância, principalmente se o consumo de etanol não interfere na metabolização do carcinógeno. Se, por um lado, o consumo crônico do álcool vem sendo associado ao desenvolvimento de neoplasias malignas do cólon, há também a necessidade de avaliar a possível existência de um limiar para o consumo do álcool abaixo do qual não ocorra um aumento do risco para o desenvolvimento do câncer. Estudos demonstram que doses leves e moderadas de etanol teriam efeitos antiinflamatórios e de regeneração, assim, mostrando-se interessante o estudo dessas doses na carcinogênese colorretal. O presente estudo visa estudar a existência de um limiar para o consumo do etanol abaixo no qual não ocorra um aumento do risco para o desenvolvimento do câncer em modelo de carcinogênese do cólon induzida pela Methyl-N-Nitro-N-Nitroso-Guanidine (MNNG) em ratos Wistar. Para tanto, 60 animais foram divididos em 6 grupos experimentais a saber: C (salina); CM (salina + MNNG); G1 (salina + 3g/kg etanol); G2 (salina + 1g/kg etanol); G3 (MNNG + 1g/kg etanol) e G4 (MNNG + 3g/kg etanol). O fígado também foi avaliado para determinação dos níveis de vitamina E por HPLC; GSH e MDA por espectrofotometria. O cólon foi utilizado para avaliação do número de focos de criptas aberrantes (FCA) pela coloração com hematoxilina e eosina; proliferação celular (PCNA) e ciclooxigenase-2 (COX2) por imunohistoquímica. Os testes estatísticos foram aplicados e o nível de significância estabelecido foi $p < 0,05$. O carcinógeno MNNG e o etanol nas doses estudadas não foram capazes de gerar desequilíbrio no balanço oxidante-antioxidante, mas a produção de radicais livres promoveu a redução da vitamina E. A associação induziu uma redução da expressão de COX-2 e PCNA. Os números de FCA nos grupos que receberam a dose leve de etanol apresentou baixos níveis, enquanto que os grupos que receberam doses moderadas apresentaram os maiores níveis comparados com o controle MNNG, demonstrando que a dose leve de etanol pode apresentar um efeito protetor enquanto que a dose moderada pode representar um risco durante a carcinogênese química em ratos.

Saúde da Criança e do Adolescente

APLICABILIDADE, EFICÁCIA E REPERCUSSÕES CLÍNICAS DO CPAP NASAL PROFILÁTICO EM RECÉM-NASCIDOS PRÉ-TERMO, COM PESO DE NASCIMENTO DE 500 A 1750 GRAMAS, NASCIDOS NO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Walusa Assad Gonçalves Ferri

Orientador: Prof. Dr. Francisco Eulógio Martinez

Tese de Doutorado apresentada em 15/02/2011

Objetivo: Avaliar a aplicabilidade, a eficácia e os problemas associados ao uso precoce do CPAP nasal, na sala de parto, e suas repercussões clínicas em recém-nascidos prematuros com peso de 500 e 1750g.

Desenho do estudo: Estudo prospectivo e randomizado, realizado em Unidade de Neonatologia de hospital terciário universitário.

Material e métodos: O consentimento escrito foi obtido antes do nascimento. Se a criança não apresentasse defeitos congênitos grosseiros e pesasse de 500g a 1750g, abria-se o envelope de randomização previamente preparado para cinco faixas de peso: de 500g a 750g, de 751 a 1000g, de 1001 a 1250g, de 1251 a 1500g e de 1501 a 1750g. Segundo a randomização as crianças eram submetidas a dois tratamentos; Rotina: Recepção segundo normas da Sociedade Brasileira de Pediatria ou CPAP: Recepção segundo normas da Sociedade Brasileira de Pediatria e até 15 minutos após o parto, era instalado o CPAP nasal, com 5 cm de pressão em coluna de água, por 72 horas. A análise foi feita por intenção de tratar.

Resultados principais: Foram estudadas 200 crianças. As crianças alocadas nos grupos Rotina (99) e CPAP (101) não apresentaram diferença estatisticamente significativa quanto ao peso de nascimento, respectivamente (1171g vs 1185g), número de pequenos para a idade gestacional (23,2% vs 17,8%), sexo feminino (52,5% vs 41,6%) e Apgar de 1º e 5º minutos. Os dois grupos também não apresentaram diferença estatisticamente significativa quanto ao uso de corticosteroide antenatal (42% vs 49%), hipertensão (23% vs 27%), e infecções maternas (7,1% vs 9%). Houve necessidade de ventilação mecânica na primeira semana de vida em 58,6% crianças do grupo rotina e 58,4% crianças do grupo CPAP (p=1), quando aplicado o CPAP com um tempo mediano de 60 minutos para o grupo rotina e 9 minutos para o grupo CPAP. Foi administrado surfactante em 32,3 % crianças do grupo rotina e 36,3 % crianças do grupo CPAP (p=0,55). Não houve diferença em relação a ocorrência de infecção neonatal (54,5 % vs 52,5%), pneumotórax (9,1% vs 6,9%), pneumonia (39,4% vs 46,5%), hemorragia intracraniana (25,3% vs 27,2%), persistência do canal arterial (32,3% vs 31,7%), enterocolite necrosante (6,1% vs 2,9%), retinopatia (15,21% vs 17,8%), displasia broncopulmonar (27,3% vs 27,7%) e óbito (13,1% vs 15,8%) entre os grupos rotina e CPAP. A recuperação de peso com 10 dias de vida, início de alimentação enteral com 7 dias de vida e sucesso da amamentação foram semelhantes entre os grupos. Também não ocorreu diferença em relação aos aspectos neurodesenvolvimentais, avaliados com 6 meses e 1 ano de vida. Dentre as crianças com peso de 500 a 1000g, 68,1% necessitaram de intubação na sala de parto.

Conclusão: O CPAP aplicado profilaticamente quando comparado com o aplicado na rotina com tempo mediano de 1 hora não foi capaz de reduzir a necessidade de assistência ventilatória e o uso de surfactante na primeira semana de vida. Não foi aplicável em prematuros com peso de 500 a 1000 gramas. A evolução clínica dos dois grupos foi semelhante, durante a internação e no primeiro ano de vida.

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE SATURAÇÃO DE OXIGÊNIO EM RECÉM-NASCIDOS PRÉ-TERMO ASSISTIDOS EM UMA UNIDADE DE CUIDADOS INTENSIVOS NEONATAL

Patricia Fernanda Carrenho Ruiz

Orientador: Prof. Dr. Francisco Eulógio Martinez

Dissertação apresentada 29/03/2011

Introdução: O oxigênio é um medicamento amplamente utilizado nos cuidados ao recém-nascido pré-termo, porém pode estar relacionado à patogênese de várias doenças, em especial quando há exposição à hiperóxia.

Objetivos: Avaliar os níveis de saturação de oxigênio em uma coorte de recém-nascidos pré-termo nas primeiras duas semanas de vida, em relação a características do recém-nascido e da unidade assistencial.

Métodos: Estudo descritivo, que incluiu recém-nascidos pré-termo com idade gestacional de 24 a 34 semanas, que estivessem recebendo oxigenioterapia suplementar nas primeiras duas semanas de vida. Foram gravados os dados do oxímetro de pulso, calculando-se as médias de porcentagem de tempo dentro, acima e abaixo da faixa-alvo, de acordo com características do recém-nascido, como peso ao nascer, idade gestacional, SNAPPE- II, dias de vida, tipo de suporte ventilatório e FiO₂ administrada e características da unidade assistencial, como número de pacientes, turno de trabalho, número de enfermeiras e auxiliares de enfermagem. **Resultados:** A porcentagem de tempo média acima da faixa-alvo foi de 73,02% (DP 24,64%), dentro da faixa-alvo foi de 18,93% (DP 16,24%) e abaixo da faixa-alvo foi de 7,97% (16,80%). As variáveis que estiveram associadas à maior porcentagem de tempo acima da faixa-alvo foram idade cronológica de 2 a 7 dias; uso de CPAP nasal e ventilação mecânica invasiva convencional; frações inspiradas de oxigênio $\leq 0,80$; ocupação da unidade com 10 a 15 pacientes; turno da madrugada; uma ou duas enfermeiras escaladas. Os limites de alarme superior dos oxímetros de pulso estavam ajustados para saturação de 100% em todas as aferições realizadas. **Conclusões:** é necessária a elaboração de um protocolo para o manejo da oxigenioterapia, com a normatização da faixa-alvo de saturação de oxigênio, diretrizes para a oferta do oxigênio e a programação dos alarmes dos oxímetros de pulso. É preciso também a adequação do número de profissionais e a capacitação da equipe.

Saúde na Comunidade

A INFLUÊNCIA DA MORTALIDADE POR CAUSAS EXTERNAS NO DESENVOLVIMENTO HUMANO NA FAIXA DE FRONTEIRA BRASILEIRA

José Marcelo de Castro

Orientador: Prof. Dr. Antonio Luiz Rodrigues Junior

Dissertação de Mestrado apresentada em 25/01/2011

A desigualdade sócio-especial é uma característica distinta do Brasil que se expressa em diferentes formas, seja no acesso à educação, à saúde, à política ou à disponibilidade de renda e bens materiais. Estas desigualdades, muitas vezes, são determinantes para limitar as oportunidades dos indivíduos a uma vida longa, saudável e produtiva. No Brasil observa-se um elevado número de óbitos que ocorrem precocemente, reduzindo a expectativa de vida e impactando negativamente no desenvolvimento humano. Este trabalho tem como objetivo estudar o padrão de mortalidade por causas externas na região da faixa de fronteira brasileira entre os anos de 2000 e 2005, abordando o impacto no desenvolvimento humano, em relação aos determinantes geográficos, demográficos, socioeconômicos e temporais. Para a caracterização, a mortalidade foi estratificada por sexo, faixa etária e agregada em regiões e sub-regiões, utilizando o coeficiente de mortalidade geral-CMG, coeficiente de mortalidade específico e a razão de mortalidade proporcional-RPM e Anos potenciais de vida perdidos-APVP e, para a mensuração do impacto da mortalidade por causas externas no desenvolvimento humano, o valor da perda de produção bruta-VPPB e o índice de desenvolvimento humano-IDH. **Materiais e Métodos.** Este estudo descritivo, do tipo ecológico, considerou como unidades de informação os 588 municípios contidos na faixa de fronteira, agrupados em 3 regiões e 19 sub-regiões. Os dados referentes à mortalidade do capítulo XX do CID-10 foram obtidos no Sistema de Informações sobre Mortalidade-SIM para as causas básicas classificadas entre V01 e Y34 selecionados por municípios de residência. As populações dos municípios e projeções, em intervalos quinquenais, foram obtidas no Ministério da Saúde/DATASUS os dados referentes ao PIB municipal foram obtidos no site do IBG e relacionados aos dados não-espaciais em Sistemas de Informações geográficas-SIG para produção de representações cartográficas. Para a representação do contexto em que se insere o assunto estudado foram calculados indicadores de mortalidade e desenvolvimento. **Resultados:** As causas de óbitos de maior frequência foram aquelas relacionadas à violência e aos acidentes, representadas pelas agressões (armas de fogo e objetos cortantes/penetrantes), acidentes de transporte, lesões e autoprovocadas e afogamento e submersão acidental, principalmente do sexo masculino entre 20 e 49 anos. A exclusão das causas externas do cálculo do IDH mostrou impacto pouco significativo na classificação das sub-regiões, porém com ganhos médios anuais referentes a longevidade chegaram a 4%5 na região Norte reduzindo-se gradativamente na direção da região sul.

PROPOSTA DE UM MODELO DE REGRESSÃO BINÁRIA COM RESPOSTA CONTÍNUA APLICADO À ANÁLISE DOS DADOS DO SINASC: IDENTIFICAÇÃO DE FATORES DE RISCO PARA O BAIXO PESO AO NASCER

Wu Zhuofan

Orientador: Prof. Dr. Edson Zangiacomi Martinez

Dissertação de Mestrado apresentada em 25/01/2011

O presente estudo tem por objetivo estudar a aplicabilidade de modelos de regressão binária com resposta contínua na análise de dados do SINASC (Sistema de Informações de Nascidos Vivos), analisando suas vantagens, limitações e estratégias na estimação de parâmetros ao identificar os fatores de riscos para baixo peso ao nascer. Muitos autores vêm utilizando os dados do SINASC para estudar as variáveis que estão associadas ao baixo peso ao nascer. Estes autores geralmente utilizam o modelo usual de regressão logística, o qual analisa somente respostas binárias (a variável resposta é codificada como 1: baixo peso ao nascer, 0: caso contrário). O modelo de regressão com resposta contínua foi utilizado para estudar as variáveis associadas aos recém-nascidos com maior propensão a um peso ao nascer inferior ao ponto de corte 2500g, ou seja, a resposta é expressa em uma variável contínua. Nesta situação, uma extensão do modelo tradicional foi utilizada visando a possibilidade de obter-se estimativas mais precisas. Para a estimação de parâmetros do modelo de regressão binária com resposta contínua, foi utilizado o método da máxima verossimilhança. Os resultados obtidos a partir da metodologia proposta possui as seguintes vantagens em relação ao modelo usual: (a) o modelo de regressão proposto foi capaz de prever o baixo peso ao nascer com maior precisão; (b) o modelo proposto evita problemas de separação

persistentes em modelos usuais. Desta forma, o modelo estudado poderá oferecer signi...cativas contribuições à Saúde Coletiva, ao trazer uma nova possibilidade de análise de dados desta área

MORTALIDADE PERINATAL NA REGIÃO DE RIBEIRÃO PRETO: EVOLUÇÃO, COMPLETUDE DA INFORMAÇÃO E CARACTERÍSTICAS SEGUNDO CAMPO DE SAÚDE

Denise Machado Barbuscia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Luiz Rodrigues Filho

Dissertação de Mestrado apresentada em 26/01/2011

A mortalidade perinatal é um tema emergente na saúde da criança à medida que os óbitos de menores de um ano concentram-se nos primeiros dias de vida. O objetivo deste trabalho foi descrever a mortalidade perinatal de residentes na área de cobertura do Departamento Regional de Saúde de Ribeirão Preto (DRS XIII) segundo Colegiados: Aquífero Guarani, Horizonte Verde e Vale das Cachoeiras, no período de 2000 a 2007. Trata-se de um estudo longitudinal, descritivo e retrospectivo, com unidades ecológicas. Avaliou-se a completude dos campos da Declaração de Nascido Vivo (DN) e da Declaração de Óbito (DO), a evolução dos coeficientes de mortalidade perinatal (CMP), neonatal precoce (CMNNP) e fetal (CMF) segundo sexo, duração da gestação e Colegiados de residência do DRS XIII - Ribeirão Preto. Descreveu-se o CMNNP específico por peso ao nascer, idade da mãe, tipo de gravidez e de parto e o CMP por causa básica de morte. As características dos óbitos foram discutidas a partir do modelo de campo de saúde nas quatro dimensões de causalidade. Verificou-se bom preenchimento da DN e elevada proporção de ausência de informação na DO, caracterizando preenchimento precário ou regular. O CMP mostrou-se elevado nos prematuros e no sexo masculino. O CMNNP foi maior nas crianças de baixo peso ao nascer e na circunstância de gravidez múltipla. Em 2004, esse indicador foi duas vezes mais elevado para filhos de mães adolescentes do que nas demais faixas etárias. Houve predomínio de óbitos devido a causas originadas no período perinatal (80%), seguido das anomalias congênitas. Entre 2000 e 2007, o CMP calculado para toda a região passou de 18,2 para 14,8 óbitos por mil nascimentos, representando redução de 18,7%. Observou-se maior diminuição do CMP e do CMF nos Colegiados Vale das Cachoeiras e Horizonte Verde. No Aquífero Guarani destacou-se maior queda do CMNNP. Concluiu-se que o CMP do DRS XIII - Ribeirão Preto diminuiu, porém de maneira diferenciado em cada Colegiado. O melhor preenchimento da DO é necessário para que se conheçam os fatores determinantes dos óbitos perinatais da região, principalmente fetais. A análise das características do óbito segundo campo de saúde demonstrou a necessidade de enfatizar ações preventivas da mortalidade perinatal relacionadas ao estilo de vida da mãe, meio ambiente em que a mãe está inserido, biologia humana e organização do serviço de saúde

A ESTRATÉGIA DE SAÚDE DA FAMÍLIA E AS INTERNAÇÕES POR CONDIÇÕES SENSÍVEIS À ATENÇÃO PRIMÁRIA

Agnes Meri Yasuda

Orientadora: Profa. Dra. Aldaísa Cassanho Forster

Dissertação de Mestrado apresentada em 10/02/2011

Introdução: A Estratégia de Saúde da Família que inicialmente era chamada de Programa de Saúde da Família, mantém sua ampliação em todo território nacional, enquanto políticas públicas para avaliação de sua efetividade, eficácia e qualidade vêm sendo institucionalizadas afim de mensurar o impacto desta nova forma de fornecer Atenção Primária (AP). As Internações por Condições Sensíveis à Atenção Primária são um novo instrumento para avaliação da A.P. e da utilização da assistência hospitalar. **Objetivo:** Correlacionar a cobertura da ESF nos municípios do Departamento Regional de Saúde XIII com as proporções de Internações por Condições Sensíveis a Atenção Primária. Avaliar o financiamento destas internações. **Materiais e métodos:** utilizamos o banco de dados do Centro de Processamento de Dados Hospitalares do Departamento de Medicina Social da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP para obter o número de internações totais em cada cidade, o número de ICSAP pela classificação da CID 10, nos anos de 2002 a 2007, em 25 municípios do DRS-13, assim como a fonte pagadora por estas internações. Através do DATASUS obtivemos a porcentagem de cobertura da ESF nestes anos para cada cidade. A análise consistiu em gráficos de proporções de cobertura populacional por equipes de saúde da família, proporções de internações por condições sensíveis a atenção primária no período estudado segundo os municípios da região e aplicação do coeficiente de correlação de Pearson. **Resultado e conclusão:** Nosso estudo encontrou uma taxa de 16% de ICSAP no DRS, com tendência a diminuir, caindo no período de seis anos do estudo, de 16,9 até 14,69%. A relação entre aumento da cobertura da ESF e diminuição da taxa de ICSAP foi

encontrada em 9 cidades, pelo menos em algum dos anos estudados. Uma relação inversa, de queda da cobertura da ESF e queda das internações foi vista em 8 cidades. Quanto ao financiamento, observamos claro predomínio do SUS em 15 municípios. SUS e outras formas de medicina privada foram semelhantes em 5 cidades do departamento regional. Apenas em duas cidades, Jardinópolis e Sertãozinho os convênios e particulares contaram com a maior despesa pelas internações. Através de nosso estudo podemos inferir que existe mesmo uma relação entre a cobertura da ESF e as ICSAP, mas que esta está permeada por diversos outros fatores, e que alta cobertura não se traduz em alta qualidade, sendo necessários mais estudos, voltados para avaliação de qualidade dos serviços para que no futuro estas internações possam ser utilizadas como um indicador de saúde.

PREVALÊNCIA DAS HEPATITES B E C EM USUÁRIOS DO CENTRO DE TESTAGEM E ACONSELHAMENTO DE MARÍLIA, SP, BRASIL

Carina Rejane Fernandes Biffe

Orientador: Prof. Dr. Afonso Dinis Costa Passos

Dissertação de Mestrado apresentada em 28/02/2011

Objetivos: Estudar a ocorrência de hepatites B e C entre os usuários do Centro de Testagem e Aconselhamento (CTA) de Marília/SP, caracterizar a população atendida quanto a algumas variáveis sócio-demográficas e identificar a exposição a fatores de risco conhecidos para as infecções pelo HBV e HCV. **Métodos:** Foram coletadas e analisadas informações das fichas de atendimento no CTA de 1.064 usuários atendidos no período de 2003 a 2008. **Resultados:** A clientela do CTA de Marília/SP foi predominantemente constituída por indivíduos do sexo masculino, jovens, solteiros, com escolaridade entre 8 e 11 anos, residentes em Marília/SP. Um elevado número de usuários (28%) relatou ter procurado bancos de sangue para realização de exames sorológicos. Observou-se presença de HBsAg em 1,1% dos participantes, enquanto 6,5% apresentaram marcadores indicativos de infecção pelo HBV, pregressa ou atual. O Anti-HCV esteve presente em 2,6% dos participantes, principalmente entre usuários de drogas injetáveis, entre os que compartilhavam seringas/agulhas e nos que relataram antecedentes de confinamento em prisões. **Conclusões:** Os resultados deste estudo são importantes para a avaliação do serviço e para o direcionamento das políticas públicas de saúde municipais visando o atendimento dos grupos mais vulneráveis às doenças transmissíveis.

ESTRATÉGIA SAÚDE DA FAMÍLIA E INTERNAÇÕES POR CONDIÇÕES SENSÍVEIS À ATENÇÃO PRIMÁRIA (CSAP): REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA

Leonardo Ferreira Fontenelle

Orientadora: Profa. Dra. Aldaisa Cassanho Forster

Dissertação de Mestrado apresentada em 11/03/2011

Objetivo: Verificar se a adoção da estratégia Saúde da Família (ESF; antigo Programa Saúde da Família, PSF) está ou não associada a menores taxas, chances ou risco de internação por condições sensíveis à atenção primária (CSAP), quando comparada à atenção básica tradicional. **Materiais e métodos:** Estudo de revisão sistemática da literatura científica, usando os termos 'saúde da família' e ('programa' ou 'estratégia') e ('internações sensíveis' ou 'condições sensíveis'), bem como seus correspondentes em inglês. A busca não foi limitada por ano de publicação, mas abrangeu apenas pesquisas originais que tenham testado a associação entre o modelo de atenção básica e as internações por CSAP na população geral. As fontes de dados utilizadas foram os índices MEDLINE, LILACS e IBECs, através da Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) e do PubMed. A qualidade metodológica não foi usada como critério de exclusão, mas sim para explorar as eventuais divergências dos resultados. O instrumento de avaliação foi uma lista com 10 itens a serem verificados, proposta por Downs & Black e adaptada por Nedel et al. **Resultados:** Foram localizadas 82 citações únicas, das quais apenas 4 atenderam aos critérios de inclusão. Os estudos tinham variadas abordagens metodológicas, mas todos encontraram alguma associação inversa entre a ESF e as internações por CSAP. Essa associação variou de acordo com a faixa etária, o sexo, o grupo de CSAP, e o tamanho do município. **Discussão:** A Saúde da Família se mostrou associada a um menor número de internações por CSAP, especialmente no sexo feminino, nos idosos, e para as condições cardiovasculares, as condições respiratórias e o diabetes mellitus. Sugere-se a necessidade de que as análises sejam conduzidas separadamente para cada combinação de sexo, faixa etária e CSAP, e que o controle ou não da análise por aspectos de qualidade da atenção básica seja explicitamente decidido com base num marco conceitual.