

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

BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

A LECTINA KM+ INDUZ A DESGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS PERITONEAIS E PROMOVE O RECRUTAMENTO DE MASTÓCITOS DA MEDULA ÓSSEA PARA A CAVIDADE PERITONEAL

Maria Raquel Isnard Moulin

Orientadora: Profa. Dra. Maria Célia Jamur
Tese de Doutorado 04/10/2006

Os mastócitos são células do tecido conjuntivo com papel nas reações alérgicas e inflamatórias. Estas células se originam na medula óssea e, pela corrente sanguínea, alcançam os espaços perivasculares, de onde migram para os tecidos onde completam a sua diferenciação. A identificação de mastócitos imaturos é dificultada pela ausência de grânulos metacromáticos quando corados com azul de toluidina, característica utilizada para identificação dos mastócitos maduros. Utilizando-se o anticorpo AA4 já foi possível isolar, identificar e caracterizar mastócitos derivados da medula óssea. Não se sabe quais estímulos levam à diferenciação de mastócitos a partir de células precursoras e como as células em maturação são endereçadas para os locais de destino e adquirem funções efetoras. Neste trabalho foi estudado o efeito de lectinas concanavalina A (Con A) e KM+ sobre o recrutamento de mastócitos da medula óssea para a cavidade peritoneal. As lectinas de plantas são impor-

tantes ferramentas em Glicobiologia devido à capacidade que possuem de se ligar a carboidratos. A lectina KM+ ou artocarpina compartilha diversas características bioquímicas e estruturais com outras lectinas bem caracterizadas, como a Con A. Semelhantemente à Con A, a lectina KM+ se liga a monossacarídeos de manose e seus derivados. Demonstramos que KM+ promoveu a ativação de mastócitos peritoneais e, concomitantemente, o recrutamento de mastócitos da medula óssea, aumentando assim o número destas células neste local. A lectina KM+ foi mais eficiente do que Con A em induzir o aumento da população de mastócitos na medula óssea e em recrutar mastócitos imaturos da medula óssea para a cavidade peritoneal. As lectinas KM+ e Con A se ligaram à superfície de mastócitos e causaram a desgranulação de mastócitos peritoneais *in vitro* e *in vivo*, na dose de 10µg/animal. Ambas as lectinas foram eficientes em promover a desgranulação de mastócitos e a liberação de mediadores como a enzima β-hexosaminidase. A lectina KM+ pode proporcionar um modelo para a identificação das interações moleculares responsáveis pelo recrutamento de mastócitos.

O PAPEL DOS GANGLIOSÍDEOS DERIVADOS DO GD_{1b} NA ORGANIZAÇÃO DOS LIPID RAFTS E NA MODULAÇÃO DA SINALIZAÇÃO VIA FcεRI EM MASTÓCITOS

Rodrigo Orlandini de Castro

Orientadora: Profa. Dra. Constance Oliver
Dissertação de Mestrado apresentada em 10/10/2006

Os mastócitos se constituem numa fonte potencial de citocinas e quimiocinas multifuncionais, o que lhes confere uma função imunorregulatória. A

ativação dos mastócitos ocorre através do intercruzamento e a translocação do receptor alta afinidade para a imunoglobulina E (FcεRI), para os *lipid rafts*. Os gangliosídeos derivados do GD_{1b}, reconhecidos pelo anticorpo mAb AA4 são componentes dos *lipid rafts* da linhagem de mastócitos RBL-2H3. Estes gangliosídeos estão associados com a proteína tirosina quinase Lyn responsável pela fosforilação do FcεRI. O presente estudo investiga os mecanismos que envolvem a atuação do complexo FcεRI, Lyn, gangliosídeos derivados do GD_{1b} e outras proteínas, durante eventos iniciais da transdução do sinal. A proteína LAT (marcador de *lipid rafts*) e os gangliosídeos GM1 estão distribuídos na membrana plasmática juntamente com os gangliosídeos derivados do GD_{1b}. Contudo, a proteína Lyn está distribuída na membrana plasmática e no citoplasma enquanto que, as proteínas Syk e Vav estão somente no citoplasma. Ao microscópio eletrônico de varredura as células RBL-2H3 apresentam-se fusiformes e com muitas microvilosidades na superfície, mas quando estimuladas via FcεRI se espalham no substrato e passam a apresentar extensas ondulações na membrana plasmática (*ruffles*). Nestas condições, as proteínas Lyn, Syk, Vav, LAT e os gangliosídeos GM1 estão co-localizados com os gangliosídeos

derivados do GD_{1b} nos *ruffles*. O fracionamento celular em gradiente de sacarose mostrou que as proteínas LAT e os gangliosídeos derivados do GD_{1b} estão presentes nos *lipid rafts* e que, após a ativação via FcεRI as proteínas Lyn, Syk e Vav são recrutadas para os *lipid rafts*. Quando as células RBL-2H3 são cultivadas na presença do mAb AA4 por 24h, os gangliosídeos formam um agregado (*cap*) na superfície celular e a liberação de β-hexosaminidase é reduzida em 75%. Após a ativação, a LAT e os gangliosídeos GM1 são observados no *cap* de gangliosídeos derivados do GD_{1b}. A exposição prolongada ao mAb AA4 causa a desorganização dos *lipid rafts*. A LAT é deslocada para as frações *não-rafts*, enquanto subunidade α-4 de integrina, um marcador para frações *não-rafts*, se desloca para as frações *rafts*. A presença da Lyn, Syk Vav e dos gangliosídeos derivados do GD_{1b} nas frações *raft* é bem reduzida. A agregação dos gangliosídeos resulta numa redução de 42% na fosforilação da subunidade β do FcεRI e na diminuição dos processos de endocitose das células RBL-2H3. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a formação do agregado dos gangliosídeos derivados do GD_{1b} afeta a integridade funcional dos *lipid rafts* e inibe a ativação dos mastócitos via FcεRI.

NOVOS TRANSPOSONS PARA CONSTRUÇÃO DE FUSÕES COM GFP EM *Candida albicans*: UM ESTUDO FENOTÍPICO E DE LOCALIZAÇÃO DA SEPTINA Cdc3

Marcos Vinícios Salles Dias

Orientador: Prof.Dr. Paulo Sérgio Rodrigues Coelho
Dissertação de Mestrado apresentada em 01/12/2006

Candida albicans é o mais prevalente fungo oportunista que causa infecções superficiais ou em mucosas ou infecções sistêmicas em pacientes imunocomprometidos. O recente sequenciamento do genoma diplóide de *C. albicans* e o desenvolvimento de novas metodologias moleculares têm permitido a identificação e a análise de novos fatores de virulência. Neste trabalho desenvolvemos três novos transposons para obtenção de inserções aleatórias de seqüências codificadoras de GFP (*green fluorescent protein*) no genoma ou especificamente em algum gene clonado de interesse para determinação da localização subce-

lular das proteínas de fusão por microscopia de fluorescência. Testamos um dos nossos transposons para uma reação de transposição *in vitro* utilizando como gene alvo *CDC3* que codifica uma septina. Após a transposição, os clones selecionados foram submetidos a uma preparação de DNA plasmidial e digeridos com a enzima *NotI* que flanqueia o inserto. De 96 clones analisados 40 possuíam inserções dentro do gene *CDC3* e destes o sequenciamento revelou 6 inserções *in-frame* em diferentes pontos dentro da seqüência de aminoácidos de Cdc3. Estes alelos foram transferidos para o genoma diplóide de *C. albicans* por recombinação homóloga após digestão dos sítios flanqueadores da enzima *NotI*. Os transformantes obtidos foram submetidos à análise fenotípica e localização subcelular por microscopia de fluorescência em três dife-

rentes condições de crescimento: 30°C (leveduras), 37°C (pseudo-hifa) e 37°C + soro (hifa). Duas inserções individuais próximos à região C-terminal mostraram células com morfologia similar ao tipo selvagem e com a proteína de fusão septina-GFP localizada tipicamente como um anel no gargalo entre a célula mãe e a célula filha. Mas em algumas células nós detectamos uma localização irregular em pontos na extremidade do broto em crescimento. Em contraste outras 4 inserções *in-frame* localizadas no domínio central ou

na região N-terminal de Cdc3p mostraram fenótipos dominantes: brotos alongados em células crescendo a 30°C e citocinese incompleta em células de pseudohifa. Nós não detectamos sinal de GFP nestes mutantes, indicando que a proteína de fusão não estava corretamente localizada ou é instável. Assim, por gerar um grupo de individuais fusões com GFP dentro da seqüência da proteína, nosso transposon serve como uma ferramenta versátil para dissecar função de domínios protéicos e localização subcelular de proteínas.

IMUNOLocalização DE MIOSINA VA FOSFORILADA EM MELANÓCITOS E OUTRAS CÉLULAS

Maria Cristina da Silva Pranchevicius

Orientador: Prof.Dr. Roy Edward Larson

Tese de Doutorado apresentada em 05/12/2006

A miosina Va (MVa) é um motor molecular formado por um domínio cabeça que apresenta atividade ATPásica e se liga a F-actina, um domínio pescoço regulatório que se liga a 4 a 6 calmodulinas e um domínio cauda com funções ainda não bem esclarecidas, mas que apresenta sítios capazes de interagir com organelas e complexos moleculares.

A MVa é fosforilada (MVa-p) pela proteína quinase II dependente de calmodulina (CaMKII) sobre serina¹⁶⁵⁰ (seqüência de camundongo) no domínio cauda globular. No presente estudo, geramos anticorpos monoclonais contra o peptídeo sintético, CL₁₆₄₄RKRTSS(PO₄)IADE₁₆₅₄, contendo a serina¹⁶⁵⁰ fosforilada. Selecionamos clones que secretavam anticorpos monoclonais imuno-específicos à proteína recombinante do domínio cauda globular da MVa (GST-GT), expressa em bactéria e fosforilada pela CamKII *in vitro*, mas não à sua forma não fosforilada. Através de ensaios de imunoprecipitação e/ou Western blot, verificamos a imunoreatividade dos anticorpos monoclonais com a cadeia pesada da MVa-p em homogenizados de células PC12 (*pheochromocytoma* de rato) e melanócitos B16-F10 (camundongo) selvagem para MVa, e de tecidos de cérebro de rato e pintainho. Os resultados demonstraram a presença de MVa-p endógena nestas células e tecidos.

Ensaio de imunocitofluorescência com o mo-

noclonal 9E6 (mAb 9E6) em várias linhagens celulares demonstraram a presença da MVa-p dentro do núcleo, em domínios intercromatínicos parecidos com *speckles* e que contém partículas enriquecidas em fatores de splicing e processamento de RNA. Em confirmação, a profilina I e SC35, duas proteínas associadas com *speckles*, co-localizaram com MVa-p nestas estruturas. Entretanto, anticorpos contra coilina p80 e SMN, marcadores para “Cajal bodies” e “Gems”, outras partículas intercromatínicas, não demonstraram co-localização com MVa-p. Ensaio de pré-adsorção do anticorpo monoclonal com GST-GT fosforilada *in vitro* demonstraram imuno-especificidade nos ensaios de imunocitoquímica. Bloqueio da transcrição pela actinomicina D promoveu um recrutamento maior da MVa-p para os *speckles*. Nas células em mitose a MVa-p foi detectada nos centrossomos nas etapas de metáfase e anáfase, mas não nas outras fases do ciclo celular.

Quando estimulados pelo hormônio α -MSH, os melanócitos B16-F10 tornam-se mais dendríticos e pigmentados. Nestas células verificamos a presença da MVa-p nas extremidades dendríticas e em contato com o substrato.

Os resultados indicam que a MVa é fosforilada por reações endógenas nestas células e nesta forma localiza aos domínios discretos no núcleo (*speckles*), no citoplasma e nos centrossomos (quando não há envelope nuclear intacto). Entretanto, o papel da fosforilação da MVa nestas localidades subcelulares ainda precisam ser esclarecidas.

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO GENE *ECR* NA GLÂNDULA SALIVAR DE *BRADYSIA HYGIDA* (DIPTERA, SCIARIDAE)

Juliana Aparecida Candido da Silva

Orientador: Prof.Dr. Jorge Cury de Almeida

Tese de Doutorado apresentada em 18/12/2006

Em *Bradysia hygida*, a glândula salivar é formada por três regiões morfológicamente distintas, denominadas S1, S2 e S3. No final do 4º estágio larval, nas regiões S1 e S3, ocorre amplificação gênica em cerca de oito sítios cromossômicos. Este processo é disparado pelo hormônio 20-OH ecdisona (20E) e resulta na formação dos pufes de DNA. Os genes amplificados são ativados em dois grupos distintos, sendo a ativação do primeiro grupo dependente de altos níveis de 20E, enquanto a ativação do segundo grupo requer níveis muito baixos do hormônio. Deste modo, glândulas salivares de *Bradysia hygida* constituem um interessante modelo biológico para estudar as funções de hormônio esteróide, e seus receptores, no processo da amplificação gênica e controle da atividade dos genes amplificados.

Em nosso laboratório, foram detectados dois transcritos para o gene *BhEcR* (6,5 e 1,3 kb) na glândula salivar. Neste trabalho, foram clonados e parcialmente caracterizados cDNAs dos dois transcritos. O transcrito menor e notadamente o de maior interesse,

além de seu tamanho pequeno, ele codifica uma pequena proteína que possui o domínio ligante de hormônio (LBD) em uma posição nunca descrita em outros receptores para esteróide: em relação a extremidade N terminal da proteína, do domínio LBD precede o domínio ligante de DNA (DBD).

O cDNA do transcrito maior (6,5 kb), que inclui parte do domínio A/B, os domínios DBD e D inteiros e parte do domínio LBD, nesta ordem, foi clonado em vetor de expressão. A proteína de fusão contendo parte do *BhEcR* (*BhEcR* AB¹/LBD³¹), foi expressa em *Escherichia coli*, cepa JM109, em diferentes condições. Coelhos foram injetados com a proteína *BhEcR* AB¹/LBD³¹ purificada para a produção de anticorpos policlonais. Os anticorpos policlonais foram purificados por cromatografia de imuno-afinidade e utilizados em “Western blots” e em cromossomos politênicos. Em imunoblots de glândulas salivares de larvas em diferentes idades do final do 4º estágio larval, uma banda de cerca de 66 kDa foi detectada. Com este lote de anticorpos, ainda não foi possível detectar o pequeno polipeptídeo, produto do transcrito de 1,3 kb. Nos cromossomos politênicos, vários sítios, em diferentes idades, apresentaram intensa marcação fluorescente, incluindo alguns pufes de DNA do primeiro grupo, em atividade.

BIOQUIMICA

REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA PELO Pi E pH EM FUNGOS FILAMENTOSOS

Carlos José Ono

Orientador: Prof. Dr. Antonio Rossi Filho

Tese de Doutorado apresentada em 30/10/2006

Os fungos filamentosos *Aspergillus nidulans* e *Neurospora crassa* são organismos nutricionalmente versáteis e podem crescer em várias condi-

ções, incluindo variações extremas de pH. Essa versatilidade implica na regulação do pH homeostático, onde essas variações não são amplas, e no monitoramento do pH extracelular, para que sejam sintetizadas permeases e secretadas enzimas que efetivamente funcionem no meio externo, como por exemplo, a secreção de fosfatase ácida em meio ácido e fosfatase

alcalina em meio alcalino. Além disso, o fungo *A. nidulans* está entre os organismos cujo sistema de monitoramento e resposta ao pH está sendo caracterizado. Nesse fungo é conhecida a existência de genes alcalinos (expressados preferencialmente em pH alcalino e cuja transcrição não seria ativada em pH ácido) e de genes ácidos (expressados preferencialmente em pH ácido e cuja transcrição não seria ativada em pH alcalino).

A via de sinalização pelo *pacC* media muitos eventos metabólicos envolvidos no sensoriamento do pH extracelular, como em *A. nidulans*, sendo consagrado que o mesmo dirige a resposta em pHs neutro a alcalino. O gene *pacC* codifica para um fator de transcrição tipo zinc-finger cuja transcrição é auto-induzida em meio de cultivo com pH alcalino. Os genes *pal* (*A*, *B*, *C*, *F*, *H* e *I*) são membros putativos de uma cascata de sinalização, com função presumida de promover a ativação proteolítica de PacC. Portanto, o modelo vigente determina que a versão íntegra de PacC (PacC⁷²) é ativada em pH alcalino através de dois passos proteolíticos, nos quais remove-se o domínio C-terminal. A conversão de PacC⁷² a PacC⁵³ é PalB e pH-dependentes, enquanto a conversão de PacC⁵³ a PacC²⁷ é pH independente. Assume-se que a forma processada PacC²⁷ seja, talvez, a forma funcional de

PacC em pH alcalino. Este modelo implica que a inativação de algum dos genes *pal* resultaria a uma expressão aumentada de PacC⁷² independente do pH extracelular. Para testar esta hipótese expressamos parte da PacC (contendo a região de zinc-finger) em *E. coli*, sendo purificada em coluna de imunoafinidade e aplicada em coelho para obtenção de anticorpos policlonais. Anti-PacC foi purificado e ligado quimicamente a uma resina sepharose hidrazida e utilizada para sua purificação por cromatografia de imunoafinidade. Os resultados mostram que o processamento proteolítico de PacC ocorre no mutante *palB7* em condição ácida de crescimento, o mesmo ocorrendo em pH alcalino, onde a versão íntegra deveria ser abundante.

O gene *nuc-1* foi inativado por RIP, sendo estudado sua expressão diferencial através de uma Biblioteca Subtrativa, observando-se que este gene está relacionado com diferentes processos metabólicos. Mostramos que o gene *nuc-1* também pode estar envolvido na expressão da proteína “heat-shock” de choque térmico codificada pelo gene *hsp70*. Esta proteína chaperone facilita a formação da conformação nativa de proteínas transportadas através do retículo endoplasmático, com concomitante glicosilações específicas dessas proteínas destinadas para a secreção, por exemplo, as fosfatases Pi-repressíveis.

CICATRIZAÇÃO INDUZIDA POR UMA FRAÇÃO ANGIOGÊNICA PURIFICADA DO LÁTEX NATURAL DA SERINGUEIRA *HEVEA BRASILIENSIS*

Vanessa Beatriz Mauricio

Orientador: Prof.Dr. Joaquim Coutinho Netto

Dissertação de Mestrado apresentada em 06/12/2006

A cicatrização é um processo dinâmico e interativo envolvendo mediadores solúveis, vasos sanguíneos, matriz extracelular e células parenquimais. A angiogênese ocorre durante o crescimento e o reparo tecidual em tecido adulto, assim como durante o desenvolvimento. A angiogênese está associada a quase todos os estágios da cicatrização, tal fato é também muito importante para o crescimento tumoral e revascularização de tecidos submetidos à isquemia. Outro processo envolvido neste evento é o aumento da permeabilidade vascular (precede a angiogênese), que permite as diversas citocinas e fatores de crescimen-

to a alcançarem o tecido lesado. Assim, tem sido sugerido que o látex extraído da seringueira *Hevea brasiliensis* possui atividade angiogênica, o que nos levou a trabalhar no sentido de iniciar a purificação do(s) componente(s) ativo(s) presente(s) no material e a caracterizá-lo(s), de forma a demonstrar sua atividade angiogênica e seus efeitos sobre a permeabilidade vascular e cicatrização. O extrato obtido a partir do látex (soro) tratado com NH₄OH (2 a 7%) foi submetido a uma primeira etapa de purificação em coluna de DEAE-celulose (5,0 X 50cm) e eluída com tampão bicarbonato de amônio / cloreto de sódio em concentrações crescentes. Desta cromatografia foram obtidas três frações denominadas, FrHb1, FrHb2, FrHb3; as quais foram dialisadas e liofilizadas. O efeito destas frações na permeabilidade vascular foi analisado através do teste de Miles, a atividade angiogênica foi

analisada usando a membrana cório-alantóica de embriões de galinha *Galus domesticus*. A atividade destas frações na aceleração do reparo tecidual foi demonstrada em úlceras dérmicas realizadas em orelhas de coelhos *New Zealand*. A fração FrHb1 apresentou-se como a mais ativa no aumento da permea-

bilidade vascular, demonstrando também evidente efeito angiogênico e estimulou de forma significativa a aceleração do reparo tissular nos modelos utilizados e nas condições do estudo. Desta forma, sugerimos que a fração FrHb1 pode ter importância na cicatrização das úlceras dérmicas de difícil cicatrização.

ESTUDOS DE FOSFATASES ÁCIDAS E ALCALINAS PRODUZIDAS PELO FUNGO RHIZOPUS MICROSPORUS VAR. RHIZOPODIFORMIS EM CULTIVOS SUBMERSOS E SUBSTRATO SÓLIDO

Altino Barbosa Junior

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli

Dissertação de Mestrado apresentada 12/12/2006

Fosfatases são enzimas presentes em organismos eucariotos e procariotos e que hidrolisam ésteres e anidridos do ácido fosfórico. Essas enzimas são classificadas em: i) fosfatase alcalina, ii) fosfatases ácidas de alta massa molecular, iii) fosfatases ácidas de baixa massa molecular, iv) fosfatases ácidas púrpuras e v) proteíno-fosfatases. Fitase é uma fosfatase ácida que converte o fitato em mioinositol e ácido fosfórico. Adição desta enzima em rações animais resulta numa melhor digestibilidade, reduzindo custos e protegendo o meio ambiente. O objetivo deste trabalho foi a produção, purificação e a caracterização de fitases e de ácidas e alcalinas fosfatases a partir de *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*, o qual foi isolado de solo brasileiro, em nosso laboratório. O fungo produziu altos níveis destas enzimas, além de amilases e xilanases.

Condições ótimas de produção de fosfatases em fermentação estado sólido (FSS) e em fermentação submersa (FSbm) foram determinadas. As atividades fosfatases foram quantificadas usando o substrato p-NPP em tampão tris-HCl 100 mM pH 8,0 (forma alcalina) e ácido succínico 100 mM pH 5,0 (forma ácida), e ácido fitico em tampão ácido succínico 100 mM pH 5,0, para fitases. A atividade enzimática foi expressa em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$, e o crescimento em mg proteínas totais ou mg de ergosterol. Comparando-se a fermentação líquida (Fsbm) e a fermentação substrato sólido (FSS), os maiores níveis fosfatásicos intra

e extracelulares foram produzidos após 24-48 horas de crescimento, usando farelo de trigo ou farelo de soja, ou a mistura dessas duas fontes juntas, com água (1:1 p/v), com 70% umidade relativa, a 40°C. Os resultados sugerem que as condições ótimas do ensaio foram em pH 8,0 para a forma alcalina ou pH 5,0 para as formas ácidas e fitase; com temperatura ótima de 60°C e de 80°C, respectivamente. As enzimas apresentaram alta termoestabilidade e foram ativadas pelos íons Mn^{++} e Mg^{++} .

As fosfatases alcalinas intra e extracelulares e a fosfatase ácida extracelular foram purificadas usando cromatografia de DEAE-Celulose, seguida por cromatografia Concanavalina A-sepharose. A fosfatase ácida intracelular foi purificada usando a coluna de afinidade Fosfonato de Diazobenzil-L-histidina. Suas massas moleculares foram, aproximadamente, 105 kDa (ácida), 120 kDa (alcalina) em coluna de filtração Sephacryl S-250; e 52,5 kDa e 57,5 kDa em SDS-PAGE, respectivamente. Aparentemente, as fosfatases ácida e alcalina possuem estruturas homodiméricas. Os parâmetros cinéticos estimados foram: V_{max} de 2,06 U/mg prot. e K_m 0,362 mM (fitase FSS) e V_{max} de 0,163 U/mg prot. e K_m 0,057 mM (fitase FSbm); V_{max} 0,06 U/mg prot. e K_m 0,004 mM (ácida intra) e V_{max} 0,338 U/mg prot. e K_m 0,009 mM (ácida extra); V_{max} 5,893 U/mg prot. e K_m 0,277 mM (alcalina intra) e V_{max} 4,843 U/mg prot. e K_m 0,217 mM (alcalina extra).

As fosfatases produzidas por *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* foram promissoras em aplicações industriais e biotecnológicas, considerando suas temperaturas ótimas, termoestabilidades e facilidade de produção. Além do mais, as fosfatases ácidas foram dotadas com atividade fitase e por possuir uma ótima afinidade por mais de um substrato.

CLÍNICA CIRÚRGICA

ALTERAÇÕES MITOCONDRIAIS DO FÍGADO REMANESCENTE PÓS-HEPATECTOMIA A 70%

Ailton José Barbosa

Orientador: Prof.Dr. Orlando de Castro e Silva Júnior
Tese de Doutorado apresentada em 24/10/2006

No presente estudo analisou-se a função mitocondrial do remanescente hepático após ressecção hepática a 70% e os possíveis benefícios da bioestimulação a LASER em tempos pré-fixados. Este estudo foi realizado em duas etapas, na 1ª etapa, foram utilizados 96 ratos da linhagem Wistar, divididos em 16 grupos (n=6, em cada grupo), dentro dos critérios aprovados pela comissão de ética da FMRP-USP em experimentação animal. Os animais foram submetidos a hepatectomia parcial (HP) a 70%, posteriormente colhido o remanescente hepático (RH) em tempos seriados de eutanásia (C=O', 2', 5', 10', 15', 30', 1h, 2h, 4h, 6h, 12h, 1dia, 2dias, 3 dias, 6 dias, 15 dias) e parâmetros os estados 3, 4, RCR, PM e Swelling. Na segunda etapa utilizou-se enviados para estudos da respiração mitocondrial. Foram usados como 30 ratos divididos em 5 grupos (n=6) dentro dos padrões anteriores, desenvolvendo a mesma técnica. Mediante os resultados obtidos na 1ª etapa, selecionou-se os tempos C=O', 2', 4h, 6h e 24h para usar a bioestimulação a LASER num comprimento de onda de 660 nm com

potência de 30 mw, em cinco pontos distintos no RH por 30 segundos, na dose 22,5 J/cm³ em cada um deles. Os resultados dos vários grupos foram analisados e comparados por testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. As diferenças foram significantes para $p < 0.05$. Com relação ao estado 3, o LASER provocou uma significativa diminuição da respiração mitocondrial após quatro horas, o que não ocorreu após seis horas de hepatectomia. O LASER não alterou o estado 4 da respiração mitocondrial em relação ao controle e mesmo reduzindo os níveis de RCR não causou desacoplamento mitocondrial. Concluiu-se que, a sobrecarga metabólica do RH na fase aguda da regeneração hepática, foi significativa no intervalo entre quatro e seis horas, tendendo a uma estabilização subsequente. Numa análise global, o LASER, na dose utilizada e nas condições experimentais do presente estudo não induziu lesão adicional ao FR e parece ter retardado o surgimento do estresse metabólico hepatocelular do fígado remanescente. Na seqüência, outros estudos deverão ser programados para se estabelecer com melhor precisão os eventos metabólicos que ocorrem pós - hepatectomia parcial e a possível ação da luz LASER sobre o fígado, após as ressecções hepáticas parciais.

ESTUDO DESCRITIVO DAS VÍTIMAS FATAIS DE TRAUMA ATENDIDAS CONSECUTIVAMENTE EM UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE URGÊNCIAS NO BRASIL – AVALIAÇÃO DO MOMENTO DO ÓBITO COMO PARÂMETRO DE QUALIDADE DO ATENDIMENTO

César Augusto Masella

Orientador: Prof.Dr. Sandro Scarpelini
Dissertação de Mestrado apresentada em 06/11/2006

A análise da distribuição do tempo entre a admissão e a morte dos pacientes vítimas de trauma pode ser útil na avaliação da qualidade da assistência intra-

hospitalar. Usando um banco de dados de vítimas de trauma de um hospital universitário brasileiro, nós comparamos o tempo transcorrido, do momento da admissão do paciente até o evento do óbito, com relatos prévios da literatura.

Métodos: Foi realizada a análise retrospectiva dos dados demográficos, momento da morte e gravidade do trauma de todas as vítimas fatais de trau-

ma, admitidas em um hospital universitário, entre 2000 e 2001. Médias e teste do Qui Quadrado foram aplicados quando indicados. Valores de “p” menores que 0,05 foram considerados como significativos.

Resultados: Em 2 anos, 238 óbitos ocorreram no hospital estudado e em 224 destes foi possível colher os seus dados clínicos e demais parâmetros, constituindo este grupo a base deste estudo. 192 pacientes (85,7%) eram do sexo masculino 32 (14,3%) do sexo feminino. A distribuição dos mecanismos de trauma foi: ferimento penetrante em 67 casos (29,9%) e trauma fechado em 157 casos (70,1%). A distribuição do momento do óbito foi: Mortos ao Chegar (DOA) = 17 (7,6%), $\leq 1h = 13$ (5,8%), $>1 \leq 6h = 26$ (11,6), $> 6 \leq 24h = 36$ (16,1%), $> 24 \leq 72h = 25$ (11,2%), e $> 72h = 107$ (47,8%). Foi possível realizar o cálculo do *Injury Severity Score* (ISS) em 216 casos (96,4%) obtendo-se média de $34,8 \pm 21,3$ e 40,7% dos pacientes tinham $ISS > 30$.

Discussão: Em 2004, outra pesquisa, descreve uma distribuição diferente para a hora do óbito intra-

hospitalar em uma amostra de 2.648 pacientes: DOA = 887 (33,5%), $\leq 1h = 154$ (5,8%), $> 1 \leq 6h = 540$ (20,4%), $> 6 \leq 24h = 371$ (14,0%), $> 24 \leq 72h = 302$ (11,4%), e $> 72h = 395$ (14,9%) ($p < 0,001$). A média do ISS foi 29,2 e 32% possuía $ISS > 30$. O baixo número de mortes classificadas como DOA na amostra brasileira sugere que a assistência pré-hospitalar não tem tido o mesmo desempenho em acessar e transportar com rapidez as vítimas de trauma grave, quando comparado às equipes norte-americanas. Por outro lado, a alta mortalidade intra-hospitalar após 72h (47,8%) na amostra brasileira sugere a necessidade de melhora nos cuidados oferecidos pelas equipes de trauma, de cuidados intensivos e de reabilitação, já que aparentemente, o maior risco de vida ocorreu nos primeiros 3 dias, na amostra americana. Passado este primeiro momento do atendimento, onde as lesões mais graves já foram controladas, o número de mortes deveria diminuir. Estes resultados indicam a necessidade de maior investimento nestes setores no atendimento ao trauma.

ANÁLISE MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DO HIPOCAMPO EM RATOS WISTAR COM HIDROCEFALIA EXPERIMENTAL

Karina Veríssimo Meira

Orientadora: Profa. Dra. Luiza da Silva Lopes

Dissertação de Mestrado apresentada em 16/11/2006

A hidrocefalia é um problema freqüente em Neurocirurgia Pediátrica e causa inúmeros danos cerebrais, especialmente nas estruturas ao redor dos ventrículos cerebrais. Como as crianças com hidrocefalia apresentam déficits nas aquisições não verbais mais do que nas verbais, nem sempre revertidos com o tratamento precoce, e o hipocampo está envolvido diretamente com a cognição, este trabalho procura melhor estabelecer as alterações causadas pelo aumento dos ventrículos cerebrais nesta estrutura. Hidrocefalia foi induzida em ratos com 7 dias de vida pós-natal por injeção intracisternal de caulim. Sete (G1), 14 (G2) e 21 (G3) dias após a injeção, os animais foram sacrificados, juntamente com seus controles correspondentes, totalizando 40 animais injetados e 14 animais controles. Os hemi-encéfalos esquerdos dos animais hidrocefálicos e controles foram pro-

cessados para inclusão em parafina e coloração com tricrômico de Masson, para análise por microscopia de luz. Foram considerados: organização e lesão neuronal no hipocampo, correlacionando-os com o tamanho ventricular e tempo de indução da hidrocefalia. Foram contados os números totais de neurônios de cada subárea do hipocampo (CA1 a CA3), bem como o número de neurônios picnóticos. A seguir, foi calculado o índice de picnose (IP) por subárea hipocampal. A hidrocefalia causou alterações morfológicas no hipocampo, provocando mudanças importantes na sua forma. O IP somente foi estatisticamente maior na subárea CA1, no grupo experimental com 1 semana de indução de hidrocefalia comparado com os controles correspondentes, mas apresentou também tendência em aumentar nos animais da mesma idade com demais graus de dilatação ventricular. O IP foi também diferente nos animais que desenvolveram hidrocefalia discreta entre os grupos G1, G2 e G3 ($G1 > G2 < G3$). Nas subáreas CA2 e CA3 o IP não apresentou diferença estatística entre os grupos examinados, em qualquer grau de dilatação ventricular.

EFEITOS DA APROTININA EM CRIANÇAS COM CARDIOPATIA CONGÊNITA ACIANOGENICA OPERADAS COM CIRCULAÇÃO EXTRACORPÓREA

César Augusto Ferreira

Orientador: Prof.Dr. Walter Villela de Andrade Vicente
Tese de Doutorado apresentada em 22/11/2006

Introdução. A Aprotinina parece reduzir o uso de transfusões, o processo inflamatório e o dano miocárdico, pós-CEC.

Objetivo. Verificar os efeitos hemostático, antiinflamatório e protetor do miocárdio da administração intraoperatória de aprotinina em crianças operadas por cardiopatia congênita acianogênica com CEC.

Material e Métodos. Estudo prospectivo randomizado em crianças de 30 dias a 4 anos de idade, submetidas à correção de cardiopatia congênita acianogênica, com CEC e divididas em dois grupos, um denominado Controle (n=9) e o outro, Aprotinina (n=10). Neste, a droga foi administrada imediatamente antes da CEC. A resposta inflamatória sistêmica e disfunções hemostática e multiorgânicas foram analisadas por marcadores clínicos e bioquímicos. Foram considerados significantes as diferenças com $P < 0,05$.

Resultados. Os grupos foram semelhantes quanto às variáveis demográficas e intra-operatórias, exceto por maior hemodiluição no Grupo Aprotinina.

Não houve benefício quanto aos tempos de ventilação pulmonar mecânica, permanência no CTIP e hospitalar, nem quanto ao uso de inotrópicos e função renal. A relação PaO_2/FiO_2 (pressão parcial de oxigênio arterial/fração inspirada de oxigênio) apresentou queda significativa com 24 h PO, no Grupo Controle. Ocorreu preservação da concentração plaquetária com a Aprotinina enquanto no grupo Controle houve plaquetopenia desde o início da CEC. As perdas sanguíneas foram semelhantes nos dois grupos. No grupo Aprotinina surgiu leucopenia significativa, em CEC, seguida de leucocitose. Fator de necrose tumoral alfa ($TNF-\alpha$), Interleucinas (IL)-6, IL-8, IL-10, proporção IL-6/IL-10, troponina I cardíaca (cTnI), fração MB da creatinofosfoquinase (CKMB), transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e fração amino-terminal do peptídeo natriurético tipo B (NT-proBNP) não apresentaram diferenças marcantes inter-grupos. A proporção IL-6/IL-10 PO aumentou no grupo Controle. A lactatemia e acidose metabólica pós-CEC foi mais intensa no grupo Aprotinina. Não houve complicações com o uso da Aprotinina.

Conclusão. A Aprotinina não minimizou manifestações clínicas e marcadores séricos de resposta inflamatória, sistêmica e miocárdica, mas preservou quantitativamente as plaquetas.

USO DO PACLITAXEL COMO POTENCIALIZADOR DA RADIOTERAPIA NO TRATAMENTO DOS GLIOMAS MALIGNOS CEREBRAIS

José Paulo Montemor

Orientador: Prof.Dr.Benedicto Oscar Colli
Dissertação de Mestrado apresentada em 08/12/2006

O tratamento dos gliomas malignos cerebrais é um dos grandes desafios da medicina atualmente, pois, apesar do grande avanço no conhecimento destes tumores, o prognóstico de vida dos portadores desta doença é muito ruim. Foram estudados retrospectivamente 61 pacientes com diagnóstico de glioblastoma multiforme ou astrocitoma anaplásico, no período de 1998 a 2002, com o objetivo de avaliar o uso do Paclitaxel como potencializador do tratamento radioterápico destes tumores. Todos os pacientes foram tratados inicialmente com cirurgia para retirada am-

pla do volume tumoral (mínimo de 80%) seguido de tratamento com radioterapia fracionada e reforço com radiocirurgia estereotáxica. Em caso de crescimento tumoral, após o tratamento inicial dos pacientes com $KPS > 70$, novo tratamento cirúrgico e nova radiocirurgia foram indicados. Destes 61 pacientes, 32 receberam tratamento com Paclitaxel, na dose de $100mg/m^2$ e 29 pacientes não receberam nenhum tipo de quimioterápico. Os grupos foram comparados, em relação ao tipo histológico, faixa etária, sexo e localização tumoral, não havendo diferenças estatisticamente significantes entre os mesmos. Os pacientes de ambos os grupos tiveram acompanhamento laboratorial antes, durante e após o tratamento com paclitaxel e foram acompanhados até o óbito causado pela doen-

ça. Foram excluídos do estudo os portadores de tumor que foram a óbito por outras causas. A análise dos resultados mostrou que não houve diferenças estatísticas em relação à sobrevida média do grupo tratado com Paclitaxel e o grupo sem o tratamento ($p=1,000$). Da mesma forma, a comparação entre os pacientes com glioblastomas ($p=0,8933$) e com astrocitomas anaplásicos ($p=0,5920$) de ambos os grupos não mostrou diferença estatística em relação à sobrevida. O número de craniotomias ($p=0,5268$) e o número de radiocirurgias ($p=0,3666$) foram semelhan-

tes estatisticamente. Os estudos laboratoriais realizados durante o tratamento no grupo que recebeu o paclitaxel, não mostraram alterações que levassem à suspensão do tratamento. A análise dos resultados deste estudo, permitiu concluir que o uso do paclitaxel, concomitante ao tratamento radioterápico dos gliomas malignos cerebrais, não mostrou nenhum ganho adicional na sobrevida dos pacientes portadores destes tumores e, pela análise da necessidade de novo tratamento durante o curso da doença, não potencializou os efeitos da radioterapia.

IMPACTO DE UM PROJETO DE PREVENÇÃO DE ACIDENTES DE TRÂNSITO EM UM MUNICÍPIO DO INTERIOR DO BRASIL

Cármine Porcelli Salvarani

Orientador: Prof. Dr. Benedicto Oscar Colli

Tese de Doutorado apresentada em 15/12/2006

Os acidentes de trânsito constituem a principal causa de morte nas primeiras décadas de vida e respondem por 1,2 milhões de óbitos e 50 milhões de feridos, por ano, em todo mundo. O Traumatismo cranioencefálico (TCE) é a principal causa de morte e invalidez por estes acidentes, além de acarretar uma grande demanda de recursos para tratamento e reabilitação de pacientes. Anualmente, 60.000 pessoas perdem suas vidas e 180.000 se tornam inválidas nas ruas e estradas brasileiras, constituindo grave problema sócio-econômico e de saúde pública. Quase 6 bilhões de reais anuais são gastos no país com as vítimas de acidente de trânsito. Maringá, município de médio porte e aglomerado urbano com população de 320.000 habitantes, é pólo regional do noroeste paranaense e 3ª cidade do estado. A violência do seu trânsito urbano resulta em índices elevados de acidentes, como a maioria dos municípios brasileiros. Em 1995, a Sociedade Brasileira de Neurocirurgia (SBN) lançou o programa educativo de prevenção de acidentes de trânsito “Pense Bem”, adaptado para a realidade brasileira, a partir do modelo americano “Think First”. O presente trabalho consistiu na implantação de um programa de prevenção de acidentes de trânsito, baseado no Pense Bem, na cidade de Maringá/PR, entre os meses de 09/2004 e 08/2005, além da medida de seu impacto através da comparação de variáveis epidemiológicas, antes e após o início do projeto. Os recursos financeiros vieram de organizações privadas. As ações

educativas foram dirigidas para toda a população, principalmente aos adolescentes e adultos jovens, grupos sob maior risco. A execução do programa se deu através da formação de uma rede de facilitadores e multiplicadores de informação dentro da sociedade civil organizada. As variáveis foram estabelecidas a partir da gravidade geral do trauma (Escala de Trauma Revisada) e do TCE (Escala de Coma de Glasgow), dos índices padronizados pelo Departamento Nacional de Trânsito (DENATRAN) e por indicadores hospitalares. Os dados extra e intra-hospitalares foram armazenados e processados em um software criado para este estudo e denominado Datatrauma®. A integração dos dados foi realizada através de um programa gratuito disponível na Internet, que reúne vários computadores com terminal servidor (conexão de área de trabalho remota). Os resultados mostraram que, apesar de ter havido um aumento absoluto do número de vítimas e de acidentes, houve redução da gravidade do trauma. Esta diminuição se deu pelas quedas da mortalidade, da gravidade geral do trauma e do TCE. Os índices do DENATRAN confirmaram a melhora do trânsito e os indicadores hospitalares revelaram economia dos custos com o atendimento às vítimas. Pela primeira vez, em um município brasileiro, o Projeto Pense Bem foi implantado de forma sistematizada e seu impacto medido. A padronização na execução e os resultados obtidos pela análise das variáveis em um banco de dados informatizado credenciam este trabalho como referência para estudos futuros, ações de saúde pública e modelo para outros municípios nacionais e internacionais na prevenção dos acidentes de trânsito.

ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL DE CURTA DURAÇÃO SEGUIDA DE REPERFUSÃO EM RATOS. ESTUDOS RELACIONADOS COM A INFILTRAÇÃO LEUCOCITÁRIA, PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E APOPTOSE

Sinésio Grace Duarte

Orientador: Prof. Dr. Benedicto Oscar Colli

Tese de Doutorado apresentada em 15/12/2006

Introdução: A isquemia encefálica focal apresenta aspectos fisiopatológicos ainda obscuros, sendo constante objeto de estudos. A reperfusão provoca novos fenômenos fisiopatológicos que podem agravar a lesão inicial. A isquemia focal temporária pode ser espontânea ou produzida em cirurgias neurovasculares. Neste caso, a redução no aporte de substratos se faz de forma breve, com curtos períodos de isquemia, mas com intensidade máxima. A duração da isquemia torna-se então a variável significativa. Na isquemia ocorre redução na produção de energia no território acometido que causa alterações eletrolíticas/metabólicas que desencadeiam a peroxidação lipídica (estimada pela dosagem do malonaldeído), o fenômeno apoptótico (estimado pela dosagem da caspase-3), infiltração leucocitária e alterações histopatológicas, inclusive necrose.

Objetivo: Este estudo visou analisar alterações histopatológicas, infiltração leucocitária, peroxidação lipídica e apoptose na isquemia focal temporária experimental de curta duração.

Material e Método: Utilizamos 81 ratos machos da raça Wistar, submetidos à isquemia focal durante 15 e 30 minutos e seguidos de reperfusão de 24, 96 e 168 horas. A isquemia foi produzida pela obstrução da artéria cerebral média com um embolo endovascular. Após o período de reperfusão os animais eram sacrificados e amostras dos hemisférios cerebrais eram coletadas para análise. As análises histopatológicas (alterações teciduais e infiltração leucocitária) foram feitas por microscopia de luz. A presença indireta de leucócitos foi analisada através da dosagem da mieloperoxidase. A destruição de membranas celulares foi avaliada pela peroxidação lipídica,

expressa pela presença de malonaldeído. A apoptose foi avaliada pela dosagem da caspase-3. As dosagens de mieloperoxidase, caspase-3 e malonaldeído foram realizadas por espectrofotometria. A comparação entre áreas isquêmicas e não isquêmicas foi efetuada empregando-se o teste de Wilcoxon e a comparação intergrupos pelo teste de Kruskal-Wallis, sendo considerados significantes valores de $p \leq 0.05$.

Resultados: Histopatologia - Quinze minutos de isquemia, 24 horas de reperfusão: edema citoplasmático, irregularidade da cromatina e núcleo com aspecto “espumoso”; 15 minutos de isquemia, 96 ou 168 horas de reperfusão: involução dos achados precoces na maioria dos neurônios acometidos e número menor com sinais de agravamento das lesões (deslocamento do nucléolo para a periferia e vacuolização citoplasmática). Trinta minutos de isquemia, 24 horas de reperfusão: alterações foram mais acentuadas, mais precoces e maior número de neurônios comprometidos (acentuado edema, núcleo em “favo de mel”, deslocamento do nucléolo para a periferia e perda da nitidez das membranas celulares); 30 minutos de isquemia, 96 e 168 horas de reperfusão: neurônios com aspecto necrótico. Não foram vistos leucócitos na área isquêmica em nenhum dos grupos, dado confirmado pela dosagem da mieloperoxidase (diferenças não significativas entre as áreas isquêmicas ou não e entre os diferentes grupos). Não houve diferenças significativas nas dosagens da caspase-3 e do malonaldeído, quando comparadas as áreas isquêmicas e não isquêmicas do mesmo grupo ou entre os diferentes grupos.

Conclusões: Na isquemia focal temporária de curta duração em ratos, foram observadas alterações histopatológicas em variados graus, que geralmente regredem na primeira semana, ausência de infiltração leucocitária e não evidência de apoptose e de peroxidação lipídica.

CLÍNICA MÉDICA

DETERMINAÇÃO DE ANTICORPOS SÉRICOS IgG REATIVOS A *Phaseolus vulgaris* INGERIDO EM ADULTOS SAUDÁVEIS, PACIENTES COM DOENÇAS AUTO-IMUNES E EM DESNUTRIDOS

Camila Maria Zanin Cortez

Orientador: Prof. Dr. Ivan Fiore de Carvalho

Tese de Doutorado apresentada em 03/10/2006

Objetivo: a) determinar a concentração sérica de IgG anti-componentes de *Phaseolus vulgaris* em adultos brasileiros saudáveis e em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES), com artrite reumatóide (AR), com auto-anticorpos anticardiolipina circulantes (ACA) e, em desnutridos; b) estabelecer intervalo de referência para os saudáveis e comparar com a distribuição de valores nos grupos de pacientes estudados.

Casuística: foram avaliadas a) 2 populações de saudáveis - 196 estudantes universitários - e, - 96 doadores de sangue - como representativas de grupos de referência; b) LES (58 pacientes); AR (33 pacientes); anticorpo anti-cardiolipina (47 pacientes) e desnutridos (23 pacientes com síndrome de intestino curto).

Metodologia: a quantificação de anticorpos séricos do isotipo IgG reativos a componentes de *Phaseolus vulgaris* foi realizada pela técnica de imunoenensaio ligado a enzima (ELISA) utilizando o extrato da leguminosa (EPv), preparado após tratamento térmico (ebulição durante 15 minutos para inativar lectinas), como substrato antigênico de IgG sérica anti-EPv. Os resultados, expressados em uni-

dades de absorbância mostraram, na população de universitários, uma distribuição de valores não-gaussiana com mediana de 0,07 unidades e limites de 0,001 - 1,33; a população de doadores mostrou distribuição semelhante embora com menor dispersão e sem diferença estatisticamente significativa em relação aos universitários. Os valores de IgG dos grupos com doenças auto-imunes apresentaram distribuição diferente da observada para os saudáveis (mediana de 0,03) estatisticamente significativa; o grupo de desnutridos mostrou distribuição de valores semelhante a observada para saudáveis. Não se encontraram na literatura indexada investigações sobre a ocorrência de anticorpos IgG reativos aos componentes do *Phaseolus vulgaris* no soro da população de adultos saudáveis ou de doentes em nosso meio, apesar de tratar-se de alimento comum na dieta da população.

Conclusões: este trabalho demonstrou: 1) há resposta imunológica humoral em termos de formação e circulação de anticorpos do isotipo IgG reativos ao *Phaseolus vulgaris* ingerido; 2) os resultados permitiram o estabelecimento de intervalo de referência para valores da concentração de IgG anti-EPv na população brasileira de adultos saudáveis; 3) nas doenças auto-imunes estudadas há uma formação menor de IgG anti-EPv, e, 4) em desnutridos a concentração sérica de IgG anti-EPv é, aparentemente, da mesma ordem que na população de saudáveis avaliadas neste estudo.

A INFLUÊNCIA DE FATORES CONSTITUTIVOS E GENÉTICOS NO DESENVOLVIMENTO DE MICROQUIMERISMOS PÓS-TRANSFUSIONAIS

Luiz Paulo Cicogna Faggioni

Orientador: Prof. Dr. Julio César Voltarelli

Tese de Doutorado apresentada em 10/10/2006

A hipótese deste trabalho é que fatores individuais estão envolvidos no desenvolvimento de microquimerismos pós-transfusionais, entre estes fato-

res a diferente expressão individual de Fas na linhagem T auxiliar de recipientes, polimorfismos de HLA-G e de Interferon- γ . O desenho do estudo propôs, inicialmente, a abordagem de uma população trinta pacientes transfundidos com concentrados de hemácias, destes, foram eleitos para análise dezesseis sujeitos de pesquisa de acordo com seleção de critérios de inclusão e exclusão. Os sujeitos de pesquisa foram pareados, sendo cada par foi composto por um paciente que havia desenvolvido microquimerismo pós-transfusional e um controle que não desenvolveu microquimerismo. A expressão de Fas nas linhagens T auxiliares dos dois grupos de sujeitos foi comparada através por análise de citometria de fluxo e encontramos uma expressão superior de Fas nas linhagens T

auxiliares periféricas de pacientes que desenvolveram microquimerismos. Não encontramos diferenças estatisticamente comparativas entre estes grupos com relação aos polimorfismos de HLA-G e Interferon- γ . Estes dados mostram que um fator individual está relacionado ao desenvolvimento de microquimerismos pós-transfusionais: a diferente expressão de Fas na linhagem T auxiliar. Tal observação está de acordo com o achado da literatura demonstrando uma elevada concentração de FasL em concentrados de hemácias com maior tempo de estocagem. A presença de FasL nestes concentrados pode ser responsável por uma atividade supressora ainda maior em sujeitos que apresentem uma maior expressão de Fas em suas linhagens auxiliares.

AS BASES MOLECULARES DAS HIPERCOLESTEROLEMIAS FAMILIARES NO BRASIL: O RIO GRANDE DO SUL

Carlos Alberto Werutsky

Orientador: Prof.Dr. José Ernesto dos Santos

Tese de Doutorado apresentada em 27/10/2006

A hipercolesterolemia familiar (HF) é uma doença autossômica dominante causada por mutações no gene do receptor de LDL (LDLR) (cromossomo 19p13.1 – p13.3), que alteram parcialmente ou totalmente a função do LDLR. A HF é também uma das doenças genéticas mais comuns com frequências estimadas de heterozigotos e homozigotos de 1/500 e 1/1.000.000, respectivamente. Manifesta-se com altos níveis de LDL colesterol, arco corneal, xantomas tendíneos e sintomas prematuros de doença coronariana. A grande heterogeneidade observada na manifestação clínica desta doença pode ser explicada, ao menos parcialmente, pelo amplo espectro de mutações no gene do LDLR. O presente estudo teve por objetivo a caracterização molecular do gene LDLR em pacientes com HF do Rio Grande do Sul (RS), Brasil. Para isso, foram obtidas amostras de DNA de 40 indivíduos provenientes de cinco macrorregiões do Estado, representando seis diferentes populações de ascendência européia, para a realização do seqüenciamento direto do gene do LDLR, com posterior análise por meio das ferramentas de bioinformática. Quinze

mutações pontuais foram identificadas no gene do LDLR, a saber: c.408C>T (D115D), c.1616C>T (P518L), c.1773C>T (N570N) e c.2243A>G (D727G) na região codificadora, IVS6+36G>A, IVS6+171G>A, IVS11+56C>T, IVS11-69G>T, IVS11-55A>C, IVS15-136A>G, IVS16+46C>T e IVS17-42A>G na região intrônica, e *52G>A, *105T>G e *141G>A na região 3'-UTR. Destas, oito ainda não foram descritas na literatura (três situadas nos exons, quatro nos introns e uma na região 3'-UTR). A mutação *52G>A foi previamente identificada em pacientes com HF da região Sudeste do Brasil, sugerindo que possa exercer um importante efeito na patogênese da HF em pacientes brasileiros. Em relação às macrorregiões do RS, os portugueses, italianos e espanhóis apresentaram o maior número de mutações dentre os grupos étnicos analisados. Assim, os resultados obtidos confirmam que existe um amplo de espectro de mutações no gene do LDLR. As mutações nas regiões intrônicas precisam ser investigadas sobre seu efeito potencial no desenvolvimento de HF. Considerando que este é o primeiro estudo que teve por objetivo a caracterização molecular de pacientes com HF no RS, novos estudos que visem a elucidação das bases moleculares da HF devem ser realizados, a fim de obter uma melhor caracterização genética desta doença no Brasil.

REEDUCAÇÃO POSTURAL GLOBAL ASSOCIADA À DESINSUFLAÇÃO PULMONAR: CONTRIBUIÇÃO PARA A REABILITAÇÃO PULMONAR EM PORTADORES DE DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA (DPOC)

Sheila Miranda Payno

Orientador: Prof. Dr. João Terra Filho

Tese de Doutorado apresentada em 30/10/2006

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo. A limitação ao fluxo gasoso é consequência de alterações estruturais e funcionais de pequenas vias aéreas e do parênquima pulmonar com reflexos sobre a retração elástica, propiciando o aparecimento da hiperinsuflação pulmonar. A reabilitação pulmonar através de ações interdisciplinares reduz os sintomas, melhora a qualidade de vida e a condição física e emocional dos pacientes com reflexo sobre suas atividades diárias. Diversos estudos comprovam que os exercícios aeróbios de membros inferiores e resistivos de membros superiores melhoram a tolerância ao esforço e reduzem a dispnéia, porém pouco tem-se investigado sobre os recursos que atuam sobre as disfunções músculo-esqueléticas da caixa torácica e do diafragma. Acredita-se que a reeducação respiratória com treino das respirações diafragmática e freno-labial melhore momentaneamente a ventilação pulmonar e os parâmetros gasométricos. A reeducação postural global pelo reequilíbrio muscular proprioceptivo (RPG/RPM) tem por objetivo o realinhamento postural e a readequação tóraco-abdominal, através do alongamento das cadeias musculares e do controle da respiração. É possível que pacientes com DPOC que apresentem alterações biomecânicas de tórax causadas pela hiperinsuflação pulmonar possam se beneficiar com um programa de RPG/RPM.

Objetivos: avaliar os possíveis efeitos da RPG/RPM associada à respiração freno-labial na função pulmonar e muscular, na tolerância ao esforço, na percepção da dispnéia e na qualidade de vida dos pacientes portadores de DPOC hiperinsuflados.

Materiais e métodos: Quinze pacientes com DPOC moderada/grave (VEF_1 47 ± 17 e VEF_1/CVF 48 ± 10), clinicamente estáveis, com idade média de $69,5 \pm 7,2$. Foram realizadas avaliações da função pulmonar (medidas de volumes e capacidades pulmonares, fluxo expiratório máximo, capacidade de difusão e medidas pletismográficas), função muscular (pressões expiratórias máximas), tolerância ao exercício (teste da caminhada de seis minutos), percepção

da dispnéia (escala de Borg), e qualidade de vida (Saint George Respiratory Disease), antes e após a aplicação do programa de reeducação postural global (RPG/RPM). O programa constou de sessões de RPG/RPM com duração de sessenta minutos, duas vezes por semana, por dois meses. Como tarefa complementar os pacientes foram treinados e orientados a realizar quinze minutos diários de exercícios de alongamento associados ao controle respiratório.

Resultados: Quando foram comparados os resultados antes e após o RPG/RPM, houve reduções significativas ($p < 0,05$) nos valores da VGT (pré $5,4 \pm 1,0$ l e pós $4,7 \pm 0,9$ l), medido pela pletismografia corporal. O mesmo ocorreu para os valores medidos pela diluição de He, CRF (pré $4,7 \pm 0,6$ l; $139 \pm 19\%$ e pós $4,1 \pm 0,6$ l; $124 \pm 19\%$), para VR (pré $4,3 \pm 0,9$ l e pós $3,7 \pm 0,7$ l) e para CPT (pré $6,8 \pm 0,8$ l e pós $6,3 \pm 0,6$ l). Os valores de CVF, VEF_1 , FEF_{25-75%}, VEF_1/CVF , PFE, V_{max50} , V_{max75} e D_{LCO} apresentaram-se reduzidos antes e após o RPG, mas sem diferenças significativas entre as duas fases. Houve melhora significativa no valor das pressões respiratórias máximas (P_{imax} de $59,7 \pm 15,3$ cmH₂O para $74,6 \pm 26,2$ cmH₂O e a P_{emax} $76,6 \pm 26,2$ cmH₂O para $88,2 \pm 30,9$ cmH₂O), nos índices cirtométricos (axilar = $2,2 \pm 0,8$ cm; xifoídea = $2,1 \pm 0,9$ cm; umbilical = $0,4 \pm 1,6$ cm; para axilar = $3,6 \pm 1,0$ cm; xifoídea = $3,4 \pm 0,9$ cm; umbilical = $2,9 \pm 0,9$ cm), no TC6' (de $328,7 \pm 96,8$ m para $382,6 \pm 101,1$ m) e em todos os domínios do SGRQ. O mesmo não ocorreu para os valores da escala de Borg e da avaliação postural estática.

Conclusões: 1) O programa proposto esteve associado à significativa redução nos valores do VTG, CRF, VR e CPT, resultados compatíveis com a presença de desinsuflação pulmonar que persistiu mesmo após a realização do TC6', aumentou a força da musculatura respiratória, a expansibilidade da caixa torácica, o desempenho físico em todos os domínios que avaliam a qualidade de vida. 2) Os benefícios obtidos com o programa não modificaram completamente o comportamento dos fluxos/resistências das vias aéreas e não estiveram associadas a atenuação dos sintomas. 3) Neste selecionado grupo de pacientes, os resultados sugerem que o programa empregado pode ser uma opção para auxiliar na reabilitação pulmonar de pacientes portadores de DPOC.

DIABETES MELLITUS TIPO 2 E DOENÇA ATEROSCLERÓTICA

Carlos Eduardo Barra Couri

Orientador: Prof. Dr. Milton Cesar Foss

Tese de Doutorado apresentada em 06/11/2006

O diabetes mellitus tipo 2 é um importante fator de risco cardiovascular. Cinquenta a 70% dos indivíduos diabéticos vão a óbito por doenças do aparelho cardiocirculatório, (risco 2 a 4 vezes maior do que na população não diabética). Uma das principais hipóteses para isto é a elevada frequência de comprometimento cardiovascular silencioso apresentada por esta população. Não há estudos prévios analisando simultaneamente o comprometimento aterosclerótico coronariano, arterial renal e vascular periférico em uma população de indivíduos diabéticos tipo 2 hipertensos sem sintomas cardiovasculares. Os objetivos deste estudo são avaliar, em uma amostra de indivíduos diabéticos tipo 2 hipertensos e assintomáticos do ponto de vista cardiovascular: I- A frequência de vasculopatia periférica (VP), estenose de artérias renais (EAR) e isquemia miocárdica silenciosa (IMS), além de variáveis clínico-laboratoriais relacionadas a cada forma de acometimento; II- A correlação entre VP, EAR e IMS; III- A concordância entre os exames complementares utilizados para o diagnóstico de EAR e IMS. Foram incluídos 92 pacientes diabéticos tipo 2 hipertensos, com idade entre 40 e 70 anos, sem qualquer evidência clínica de doença cardiovascular e sem investigação prévia, atendidos no Ambulatório de Diabetes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. Para o rastreamento de IMS foram utilizados cintilografia miocárdica perfusional com sestamibi-99mTc e teste ergométrico (protocolo Bruce). O rastreamento de EAR foi feito por angiografia por ressonância magnética com reconstrução tridimensional e quantificação de fluxo e por ultra-sonografia Doppler de artérias renais. O índice tornozelo-braquial foi utilizado para o rastreamento de VP. A frequência de qualquer forma pesquisada de comprometimento arterial silencioso foi de 40,2%,

enquanto que 22,8% apresentaram IMS, 7,8% apresentaram EAR e 22,8%, VP. Foi observada correlação somente entre IMS e DVP nos pacientes estudados. Dentre os preditores de doença cardiovascular silenciosa analisados nesta população, a presença de calcificação aórtica à radiografia simples de tórax foi preditora IMS; duração da hipertensão arterial sistêmica superior a 20 anos foi preditora de EAR e a presença de nefropatia diabética ou calcificação aórtica ou HDL-colesterol < 40 mg/dl (este último em homens) foram preditores de VP. O uso de terapia antilipemiantes ou presença de sinais eletrocardiográficos em repouso sugestivos de infarto do miocárdio prévio foram preditores de IMS grave e a presença de calcificação aórtica ou retinopatia diabética foram preditores de qualquer forma de comprometimento arterial silencioso. A cintilografia miocárdica perfusional foi um método capaz de diagnosticar um número maior de pacientes com IMS, não havendo concordância entre seus resultados e o teste ergométrico. Com relação aos métodos utilizados para o diagnóstico de EAR, houve concordância entre a angiografia por ressonância magnética e ultra-sonografia Doppler na amostra estudada. Em suma, a frequência de doença cardiovascular silenciosa nesta população de pacientes diabéticos tipo 2 hipertensos foi elevada. O rastreamento das diversas formas de comprometimento aterosclerótico é necessário uma vez que pacientes diabéticos frequentemente apresentam doença aterosclerótica multiarterial e comumente apresentam poucos ou nenhum sintoma cardiovascular. Com este intuito, o reconhecimento de preditores clínicos e laboratoriais auxilia na escolha de pacientes em que a relação custo-benefício do rastreamento se tome mais adequada. Desta forma, o diagnóstico em fases iniciais da doença aterosclerótica e implementação de medidas terapêuticas mais eficazes podem ser uma ferramenta útil na redução da elevada morbimortalidade cardiocirculatória apresentada por indivíduos diabéticos tipo 2 hipertensos.

AVALIAÇÃO DA SECREÇÃO DO HORMÔNIO ADRENOCORTICOTRÓFICO E HORMÔNIOS NEURO-HIPOFISÁRIOS MEDIADA POR ATIVAÇÃO DE RECEPTORES ATRIAIS

Maurício Benedetti

Orientadora: Profa.Dra. Lucila L.Kagohara Elias

Dissertação de Mestrado apresentada em 09/11/2006

A regulação do eixo hipotálamo hipófise adrenal (HHA) é influenciada por alterações do sistema cardiovascular. Em situações de perda de volume, as-

sociada à hipotensão arterial, ocorre um aumento da atividade do eixo HHA, ou seja, aumento da secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), com aumento concomitante da secreção de vasopressina (AVP). Por outro lado, a elevação da pressão arterial promove uma diminuição das concentrações plasmáticas destes hormônios. Alterações cardiovasculares induzem respostas do sistema nervoso central e autonômico, mediadas por sinalização desencadeada a partir de pressorreceptores e quimiorreceptores. Os receptores atriais são sensíveis às alterações de frequência cardíaca, volume circulante e pressão venosa central. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a secreção de ACTH, AVP, ocitocina (OT) e peptídeo atrial natriurético (ANP) e a ativação de neurônios hipotalâmicos do núcleo paraventricular (PVN) e núcleo supra-óptico (SON), em resposta à estimulação de receptores atriais presentes na junção da veia cava superior com o átrio direito (JVCS-AD). Para tanto, ratos Wistar (200-250 g, 4 a 13 animais por grupo) foram submetidos à implantação de balão na JVCS-AD, por meio de canulação da veia jugular direita, três dias antes do experimento. Para determinação da frequência cardíaca (FC) e pressão arterial média (PAM) durante a distensão da JVCS-AD, os animais foram submetidos, também, à canulação da artéria femoral no dia anterior ao experimento. Os animais foram submetidos à distensão da JVCS-AD durante 1 minuto ou submetidos à distensão repetida da JVCS-AD para tanto, foi realizada a distensão por 1 minuto com repouso de 2 minutos, sendo a distensão repetida por cinco vezes. Os ratos foram decapitados, cinco minutos após a distensão, para coleta de sangue do tronco para determinação de ACTH, corticosterona, AVP, OT e ANP plasmáticos, por radioimunoensaio. Um outro grupo de ratos foi submetido ao mesmo protocolo experimental, porém, foi submetido à perfusão cardíaca, 2 horas após o término da distensão atrial, para coleta de tecido cerebral, utilizado para realização de imunohistoquímica para proteína Fos, AVP

e OT. Os protocolos acima foram realizados em animais hidratados ou submetidos à restrição hídrica por 24 horas, antes do experimento. Observamos que não houve diferença significativa na PAM, porém, houve um aumento significativo na FC durante a distensão da JVCS-AD, quando comparada ao período pré-distensão ($p < 0,005$). Houve um aumento significativo na concentração plasmática de ACTH, sem alteração na concentração plasmática de corticosterona, AVP, OT e ANP em animais normohidratados, submetidos à distensão da JVCS-AD, quando comparadas ao grupo controle sem distensão. Nos ratos submetidos à restrição hídrica, houve uma diminuição da concentração plasmática de AVP após a distensão atrial, sem alteração das concentrações de OT. Observamos aumento na expressão de Fos em neurônios parvocelulares mediais e posteriores do PVN, sem alteração da expressão Fos-AVP e Fos-OT no PVN e SON nos animais normohidratados submetidos à distensão. A restrição hídrica promoveu um aumento significativo no número de neurônios Fos positivos das divisões parvocelular posterior, magnocelular lateral e medial do PVN, bem como no SON no grupo desidratado sem distensão, quando comparado ao grupo controle hidratado. Interessantemente, observamos que a expressão de Fos nas divisões parvocelular medial e posterior após a distensão da JVCS-AD foi maior no rato sob restrição hídrica do que no rato normohidratado. Não houve alteração da expressão de Fos-AVP e Fos-OT com a distensão da JVCS-AD nos animais desidratados, quando comparada ao grupo desidratado sem distensão. Os dados obtidos demonstram que a secreção de ACTH pode, também, ser induzida por reflexo cardiovascular desencadeado pela distensão dos receptores atriais. Adicionalmente, demonstramos que a atividade das vias de sinalização, desencadeadas pela distensão dos receptores da JVCS-AD, e que resultam na ativação do núcleo paraventricular, são potencializadas pelo estímulo osmótico.

GRIDS COMPUTACIONAIS PARA RECUPERAÇÃO DE IMAGENS MÉDICAS A PARTIR DE CONTEÚDO: UM ESTUDO DE VIABILIDADE

Marcelo Costa Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Paulo M. de Azevedo Marques
Tese de Doutorado apresentada em 10/11/2006

A recuperação de imagens baseadas em conteúdo (CBIR) é de grande interesse da comunidade médica, pois é capaz de recuperar imagens similares

que possuam patologias conhecidas em servidores de imagem. Entretanto, uma solução de CBIR eficiente e confiável ainda não foi alcançada, devido à complexidade das imagens médicas e ao grande volume de dados que elas representam. Esta tese apresenta uma nova metodologia baseada no poder de processamento dos Grids Computacionais para realizar a CBIR utilizando algoritmos de registro de imagens. A metodologia também é composta pela Análise de Textura (AT), que é utilizada para filtrar as imagens do servidor antes de serem processadas pela técnica de registro. As técnicas foram avaliadas pela capacidade de recuperar imagens do mesmo exame, seqüência de corte e ponderação em relação à imagem de referência. Foram utilizados como referência exames de mama, cabeça e joelho. Os procedimentos de registro utilizaram duas métricas, diferença das médias qua-

dradas (DMQ) e correlação cruzada (CC). Estas apresentaram alta eficiência. A DMQ obteve precisão média de 0,83% (mama) e 0,94% (cabeça) e a CC apresentou média de 0,81% (mama) e 0,98% (cabeça). Porém, a precisão em recuperar imagens de joelho foi satisfatória 0,58% (DMQ) e 0,52% (CC). Imagens de joelho ponderadas em T1 e no plano de corte sagital contidas no servidor reduziram a precisão dos algoritmos, pois os algoritmos de CC e DMQ são fortemente baseados na correlação linear entre as intensidades das imagens. Entretanto, a precisão média obtida foi 0,24% (DMQ) e 0,18% (CC) superior à apresentada pela AT. O alto custo computacional dos algoritmos de registro foi amortizado pelos Grids Computacionais, que proporcionaram segurança aos dados e uma solução de baixo custo capaz de integrar diferentes hospitais ou centros médicos.

EFEITO DA QUIMIOTERAPIA EM ALTAS DOSES SOBRE AS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS

Karen de Lima Prata

Orientador: Prof. Dr Dimas Tadeu Covas

Dissertação de Mestrado apresentada em 23/11/2006

As células-tronco mesenquimais (CTMs) constituem um grupo de células com capacidade de diferenciação multipotencial. São de fácil isolamento e expansão *ex vivo* e, portanto, atrativas para utilização na terapia celular. A quimioterapia em altas doses (QAD) é comumente utilizada no tratamento de doenças hematológicas e auto-imunes. Entretanto, os possíveis efeitos da QAD nas CTMs ainda são desconhecidos. O objetivo deste trabalho foi avaliar as CTMs isoladas de pacientes previamente submetidos a este tratamento. Foram selecionados para este estudo 12 pacientes portadores de linfoma de Hodgkin (DH) ou não-Hodgkin (LNH), sem infiltração medular da doença, com idade entre 18 e 60 anos. Todos os pacientes foram submetidos ao protocolo BEAM (BCNU, etoposide, aracytin, melfalan) como condicionamento para o transplante autólogo. Como controles, foram utilizadas amostras de medula óssea (MO) de 6 doadores normais (DN). Os pacientes foram classificados em subgrupos segundo a idade (< 40 vs \geq 40 anos), doença de base (DH vs LNH) e tempo após o transplante (< 180 dias vs \geq 1280 dias). Células mononucleares da MO foram obtidas por centrifugação em gradiente de Ficoll-Hypaque. As CTMs foram iso-

ladas por aderência ao plástico e expandidas *ex vivo*, pelo cultivo em garrafas de cultura com meio α -MEM enriquecido com 15% de soro bovino fetal. Quando confluentes, as células foram tripsinizadas e expandidas. Os seguintes parâmetros foram avaliados: a) caracterização morfológica; b) quantificação das unidades formadoras de colônias fibroblastóides (CFU-F); c) tempo necessário para a duplicação celular; d) número de dias que as células permaneceram em cultivo; e) expansão celular; f) tamanho, viabilidade celular, imunofenotipagem e ciclo celular (por citometria de fluxo); g) potencial de diferenciação multipotencial; h) capacidade de sustentação da hematopoese e expansão de células CD34⁺, isoladas *ex vivo* do sangue de cordão umbilical e placentário. Os dados obtidos foram utilizados para comparações entre o grupo de DN e o grupo de pacientes e entre os doadores normais e os subgrupos acima descritos. Os percentis 25 e 75 dos doadores normais, por convenção, foram utilizados como valores de referência. Foram isoladas células com características morfológicas e imunofenotípicas compatíveis com as CTMs de todas as amostras de MO coletadas para este estudo. Dentre as amostras testadas, todas se diferenciaram *in vitro* em adipócitos, osteócitos e condrócitos, demonstrado pela morfologia, imuno-histoquímica (marcação com anticorpo monoclonal anti-colágeno II) ou expressão dos genes PPAR γ e osteopontina por análises de RT-PCR.

Os principais resultados foram: a) redução na frequência das CFU-F (6/12 pacientes); b) menor expansão celular em cultura (8/12 pacientes); c) menor duração do cultivo (6/12 pacientes); d) menor velocidade de duplicação celular entre a 1ª e a 2ª passagem (10/12 pacientes); e) diminuição da capacidade de sustentação da hematopoese tardia. Os dados encontrados são

heterogêneos e quando comparados aos encontrados nas amostras isoladas dos doadores normais sugerem que as CTMs são qualitativa e quantitativamente lesadas pela quimioterapia em altas doses. Entretanto, mais estudos são necessários para definir o quanto esta lesão limitaria a expansão e, conseqüentemente, o sucesso do uso destas células na terapia.

EFEITOS DO BROMETO DE IPRATRÓPIO NO BRONCOESPASMO INDUZIDO POR EXERCÍCIO: COMPARAÇÃO ENTRE INÍCIO DA MANHÃ E FINAL DA TARDE

Luiz Carlos Boaventura

Orientador: Prof.Dr.Elcio dos Santos Oliveira Vianna
Tese de Doutorado apresentada em 23/11/2006

A asma pode ser definida como uma doença inflamatória crônica, caracterizada por hiperreatividade brônquica, limitação reversível ao fluxo aéreo e inflamação das vias aéreas. Estímulos broncoconstritores, como o exercício intenso, podem desencadear o broncoespasmo induzido por exercício (BIE) e são frequentemente utilizados para avaliação da reatividade brônquica. O brometo de ipratrópio é uma medicação broncodilatadora, porém os efeitos desta droga variam entre indivíduos. Elaboramos a hipótese de que o horário de administração da medicação interfere nos seus efeitos broncodilatadores e broncoprotetores. Trata-se de um estudo prospectivo, duplo-cego cruzado controlado por placebo para avaliar o efeito do brometo de ipratrópio no BIE em diferentes horários do dia (manhã x tarde). O estudo consistiu de 4 testes de exercício por paciente (2 testes às 7:00 h e 2 às 18:00 h). No início da manhã, um teste era realizado

após a administração de placebo e, em outra manhã, após administração de brometo de ipratrópio (80 mcg). No final da tarde, seguiu-se o mesmo protocolo (placebo e brometo de ipratrópio). Os procedimentos foram realizados em dias separados com intervalos de 3 a 7 dias e em ordem aleatória. Dados sobre a intensidade do BIE e da broncodilatação foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Os resultados da broncodilatação pelo brometo de ipratrópio (VEF_1) na manhã foram: $0,25 \pm 0,21$ L ou $13,11 \pm 10,99$ % ($p=0,001$ comparado com valores basais), e, $0,14 \pm 0,25$ L ou $7,25 \pm 11,37$ % ($p=N.S.$) na tarde. Após o placebo, a broncodilatação não foi significativa. Em relação a broncoproteção, na manhã, o BIE foi $0,58 \pm 0,29$ L no dia placebo e $0,38 \pm 0,22$ L no dia brometo de ipratrópio ($p=0,01$), enquanto que, os valores no período da tarde foram: $0,62 \pm 0,28$ L no dia placebo e $0,51 \pm 0,35$ L no dia brometo de ipratrópio ($p=N.S.$). Concluímos com este estudo que o brometo de ipratrópio pode ser utilizado para o tratamento da asma, porém o horário de administração tem que ser levado em consideração.

IMPACTO DA TERAPIA ANTI-RETROVIRAL NO NÚMERO DE LEVEDURAS DO GÊNERO CANDIDA NO FLUIDO ORAL DE PACIENTES INFECTADOS PELO HIV-1

Ana Carolina Lima Frade Gomes

Orientador: Prof.Dr.Roberto Martinez
Tese de Doutorado apresentada em 24/11/2006

A candidíase oral é a infecção fúngica mais comum entre indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1). Porém, a inci-

dência da mesma diminuiu com o advento da terapia anti-retroviral (TARV). Os objetivos deste trabalho foram: realizar estudo longitudinal qualitativo e quantitativo de leveduras do gênero *Candida* no fluido oral de pacientes em diferentes fases de TARV; correlacionar a quantidade de leveduras com a de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e carga viral plasmática do HIV-1;

avaliar o papel do tabagismo, etilismo, uso de prótese dental, *diabetes mellitus*, tipo de esquema anti-retroviral e aderência ao mesmo no número de *Candida* spp.; e estudar a ação de antifúngicos sobre o número de *Candida* spp.. Foram analisados pacientes infectados pelo HIV-1 alocados em cinco grupos. O grupo I, com 49 indivíduos sem TARV; o II, com 36 em início de TARV; o III, com 47 em TARV há, pelo menos, um ano; o IV, com 5, sem TARV, apresentando criptococose ou histoplasmose e em tratamento com anfotericina B ou fluconazol; e o V, com 5, sem ou em uso irregular de TARV, com candidíase oral e em tratamento com fluconazol. Para os grupos I, II e III, as amostras foram coletadas, respectivamente, 2 a 5 meses, 6 a 9 meses, 10 a 13 meses e mais que 14 meses após a primeira coleta, que ocorreu antes do início de TARV no grupo II. Para o IV, foi realizada coleta única na vigência de antifúngico. Para o V, a primeira coleta foi efetuada antes do início de fluconazol e as subseqüentes após 2 a 5, 6 a 9, 14 a 21 e após 30 dias da primeira. O fluido oral foi semeado em placa de agar *Saboraud* dextrose com antibióticos. O índice de isolamento de leveduras em pacientes sem tratamento antifúngico foi de 93,2% (123/132), isolando-se as seguintes espécies: *C. albicans* – 92,3% (327/354), *C. tropicalis* – 5,1% (18/354), *C.*

parapsilosis - 1,7% (6/354), *C. lusitaniae* – 0,6% (2/354) e *C. krusei* – 0,3% (1/354). No grupo II, após início de TARV, houve significativa e progressiva redução da quantidade de leveduras no fluido oral associada à elevação do número de linfócitos T CD4⁺ circulantes e à redução da carga viral plasmática do HIV-1 ($p < 0,05$). Considerando os pacientes com infecção pelo HIV-1 classificada como C, aqueles em TARV (grupo III) apresentaram menor contagem de leveduras, menor carga viral e maior contagem de células T CD4⁺ e T CD8⁺ do que os pacientes que não faziam uso de TARV (grupo I) ($p < 0,05$). Os resultados indicam que TARV reduz o número de *Candida* spp. já nos primeiros meses de seu início, com tendência à estabilização das contagens no decorrer do tratamento devido ao controle da replicação viral e à recuperação da imunidade celular. Não foi observada associação entre número de leveduras e tabagismo, etilismo, uso de prótese dental, *diabetes mellitus*, tipo de esquema anti-retroviral e aderência ao mesmo. Pacientes em uso de anfotericina B ou fluconazol apresentaram número de *Candida* spp. significativamente menor que indivíduos sem tratamento antifúngico. Em indivíduos com candidíase oral e em tratamento com fluconazol foi observada rápida e significativa redução do número de leveduras.

ESTUDO DO RECEPTOR DO GLICOCORTICÓIDE EM PACIENTES RENAI CRÔNICOS EM PROGRAMA DIALÍTICO E SUA INFLUÊNCIA NA EVOLUÇÃO DO TRANSPLANTE RENAL

Sérgio Ricardo de Antônio

Orientadora: Profa. Dra. Margaret de Castro

Tese de Doutorado apresentada em 27/11/2006

O presente estudo avalia a sensibilidade *in vitro* aos glicocorticóides em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de 40 indivíduos controles e de 28 pacientes renais crônicos em programa dialítico e sua influência na evolução do enxerto renal. IC₅₀ foi definido como a concentração de dexametasona (DEX) que causava 50% de inibição sobre a proliferação de PBMC estimulada pela concanavalina-A (Con-A). A capacidade de ligação (B_{max}) e a afinidade (K_D) do receptor do glicocorticóide foram determinadas por meio de ensaios de ligação hormonal (“binding assay”). Os pacientes foram seguidos por um período de 18 meses após o transplante renal observando a ocorrência de rejeição aguda (RA), nefropatia crônica do

transplante (NCTx), sobrevivência do enxerto e do paciente. A proliferação estimulada de PBMC foi inibida pela DEX de forma dose dependente em ambos os grupos. A média (\pm EPM) do valor de IC₅₀ foi maior nos pacientes com IRC que nos controles ($2,2 \times 10^{-5} \pm 1,0 \times 10^{-5}$ vs $8,3 \times 10^{-6} \pm 4,2 \times 10^{-6}$ mol/L, $p=0,02$). Valores médios de K_d ($12,4 \pm 1,8$ vs $7,2 \pm 0,9$ nM) e B_{max} ($7,7 \pm 1,1$ vs $4,1 \pm 0,3$ fmol/mg protein) foram maiores nos pacientes com IRC que nos controles ($p=0,02$ e $p=0,001$, respectivamente). Individualmente, elevações do B_{max} ($p=0,006$) e do K_d ($p=0,02$) foram mais frequentemente observados nos pacientes com IRC que nos controles. Os valores de IC₅₀ apresentaram correlação positiva com os valores de K_d do mesmo indivíduo ($r=0,5$; $p=0,01$). Baseados nos valores de K_d > P95 do grupo controle, os pacientes foram divididos em dois subgrupos: resistentes aos glicocorticóides (CR, n=11) e sensíveis aos glicocorticóides (CS, n=17).

Houve maior incidência de RA ($p=0.02$) e de NCTx ($p=0.002$) no grupo resistente aos glicocorticóides que no grupo sensível. A sensibilidade e a especificidade do K_d em prever a ocorrência de RA e NCTx foram ambas 71.4% e 75%, respectivamente. Concluindo,

há uma alteração na sensibilidade aos GC nos pacientes com IRC em programa dialítico e esta resistência, observada previamente ao transplante renal, leva a uma maior morbidade no pós-transplante, com maior incidência de RA e NCTx em 18 meses de seguimento.

INFLUÊNCIA DA VACINA DNA HSP65 EM UM MODELO DE FIBROSE PULMONAR EXPERIMENTAL

Adriana Ignacio de Padua

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Baddini Martinez
Tese de Doutorado apresentada em 05/12/2006

As Doenças Intersticiais Pulmonares são um grupo heterogêneo de patologias que levam a graus variados de inflamação e fibrose. Estudos sobre a sua patogênese sugerem desequilíbrio entre as respostas imune Th_1 e Th_2 , com predomínio da última. Recentemente foi desenvolvida uma vacina baseada na tecnologia do DNA recombinante, que utiliza como antígeno a proteína de choque térmico (hsp) 65 do *Mycobacterium leprae*, a qual vem mostrando bons resultados tanto na prevenção como no tratamento da tuberculose. A sua aplicação cursa com redução do número de *Mycobacterium tuberculosis* ao nível tecidual e desvio da resposta imune Th_2 para Th_1 . O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da imunização com a vacina DNA hsp 65 num modelo de fibrose pulmonar por bleomicina. Foram estudados 211 camundongos C57BL6, com idade entre 8 a 10 semanas, distribuídos em 4 grupos: Grupo SS: vacinados com salina e injetados com salina intratraqueal (IT). Grupo SB: vacinados com salina e injetados com bleomicina IT. Grupo PB: vacinados com vacina sem gene bacteriano (plasmídeo) e injetados com bleomicina IT. Grupo VB: vacinados e injetados com bleomicina IT

(VB). A vacinação foi por via intramuscular na dose de 100 μ g, em 4 ocasiões com intervalos de 15 dias entre cada uma. Bleomicina foi administrada 15 dias após a data da última imunização. Os animais foram sacrificados em duas ocasiões: uma semana e seis semanas após a injeção IT. A mortalidade do grupo SS foi significativamente menor em relação aos demais grupos (SS: 11,11%; SB: 53,06%; PB: 53,57%; VB: 26,08%). O valor médio percentual de matriz tecidual pulmonar do grupo VB foi significativamente menor do que nos grupos SB (VB: 34,32 % x SB: 53,06%) e PB (VB: 34,32% x PB: 53,57%). Os valores do percentual da matriz tecidual pulmonar corada pelo picrossírius foi significativamente menor no grupo SS em relação aos demais grupos (SS: 2,02 %; SB: 8,23%; PB: 7,19% e VB: 6,64%). O conteúdo pulmonar total de hidroxiprolina foi significativamente menor no grupo SS em relação aos outros grupos (SS: 104,86 pg/pulmão; SB: 160,42 pg/pulmão; PB: 170,00 pg/pulmão e VB: 162,54 pg/pulmão). Não houve diferença estatística entre os grupos avaliados no estudo do IFN- γ (SS: 171,98 pg/pulmão; SB: 178,60 pg/pulmão; PB: 181,31 pg/pulmão; VB: 141,18 pg/pulmão) e TGF- β (SS: 2051,34 pg/pulmão; SB: 2385,33 pg/pulmão; PB: 2382,74 pg/pulmão; VB: 2745,64 pg/pulmão). Os dados disponíveis não indicam uma ação significativa da vacina DNA hsp65 sobre o estabelecimento da fibrose pulmonar induzida por bleomicina.

ANÁLISE HISTOLÓGICA COMPARATIVA DE BIÓPSIAS HEPÁTICAS DE PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA, CO-INFECTADOS PELO HIV-1, REALIZADAS ANTES E APÓS O TRATAMENTO DA HEPATITE C

Gleusa de Castro

Orientador: Prof. Dr. José Fernando de C. Figueiredo
Tese de Doutorado apresentada em 08/12/2006

Sabe-se que o vírus da imunodeficiência humana (HIV) pode modificar a história natural da infec-

ção pelo HCV, acelerando a progressão da fibrose hepática e conseqüente evolução para cirrose. O tratamento com interferon-alfa pode levar à melhora da histologia hepática, reduzindo a inflamação e fibrose, principalmente nos pacientes que apresentam resposta virológica sustentada. O impacto do tratamento so-

bre a evolução histológica em pacientes não-respondedores ao tratamento da hepatite C apresenta resultados controversos.

Objetivos: Avaliar, nos pacientes com hepatite C crônica, co-infectados pelo HIV, o impacto do tratamento da hepatite C, sobre as modificações de parâmetros indicativos de fibrose e atividade inflamatória, em biópsias de fígado realizadas antes e após o tratamento da hepatite C.

Métodos: Foram estudados 26 pacientes co-infectados pelo HCV e HIV-1, submetidos à biópsia hepática antes e, em média, 25,2 meses após o término do tratamento da hepatite C. Fragmentos da biópsia hepática foram comparados, antes e após o tratamento, em relação aos seguintes parâmetros: Índice de Atividade Histológica (HAI) e o grau de Fibrose (Knodell); intensidade do depósito de colágeno (coloração pelo picrossírius) e o grau de ativação das células estreladas (marcação com alfa-actina de músculo liso). Os índices destas variáveis histológicas, pós e pré-tratamento, foram relacionadas com o resultado do teste qualitativo RNA HCV (RT-PCR-AMPLICOR®) na 24ª semana de tratamento, com a duração do tratamento da hepatite C e com o intervalo de tempo entre a interrupção do tratamento e a biópsia-controle. Foi avaliada a relação de possíveis fatores prognósticos de resposta virológica com a resposta histológica e foram realizadas correlações dos parâmetros histológicos entre si.

Resultados: Os parâmetros histológicos avaliados de forma global foram semelhantes nas biópsias pré e pós-tratamento. As razões pós/pré-tratamento, em todos os parâmetros avaliados nas biópsias hepáticas, diminuíram de forma significativa nos pacien-

tes que apresentaram pesquisa negativa para o RNA HCV na 24ª semana de tratamento. Os parâmetros histológicos foram semelhantes nos grupos com duração de tratamentos diferentes (≤ 24 semanas e > 24 semanas), exceto as CEH células α -positivas, que teve melhora no grupo com tratamento mais prolongado. O intervalo de tempo entre o final do tratamento e a biópsia-controle não influenciou a melhora histológica. Na análise de regressão logística, houve associação da melhora dos parâmetros histológicos com o resultado negativo do RNA HCV na 24ª semana de tratamento. Houve correlação significativa entre todos os parâmetros histológicos avaliados.

Conclusões: Os pacientes avaliados em conjunto tiveram seus parâmetros histológicos nas biópsias pré e pós-tratamento com valores semelhantes, porém quando se definiu melhora histológica, como a manutenção, ou melhora dos parâmetros histológicos avaliados individualmente, verificou-se que uma substancial parcela da população estudada apresentou melhora histológica. O efeito benéfico do tratamento parece se relacionar com o controle da viremia do HCV durante o tratamento e se verifica também em pacientes que não sustentaram a resposta virológica após a suspensão dos medicamentos. Os achados fazem supor que a redução da viremia do HCV teria como consequência a diminuição da inflamação e fibrose hepáticas, inclusive com diminuição do estado de ativação das células estreladas hepáticas, mesmo nos casos em que não houve resposta virológica sustentada. Os resultados do presente estudo são sugestivos de que o tratamento da hepatite C pode modificar a história natural da evolução da hepatite crônica nos pacientes co-infectados pelo HIV.

CLONAGEM E EXPRESSÃO DO FATOR VIII RECOMBINANTE EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS UTILIZANDO O SISTEMA RETROVIRAL

Evandra Strazza Rodrigues

Orientadora: Profa. Dra. Aparecida Maria Fontes
Dissertação de Mestrado apresentada em 18/12/2006

O fator VIII de coagulação sangüínea humana é uma glicoproteína composta por 2332 aminoácidos e organizada em três principais domínios, a cadeia pesada (90 kDa), a cadeia leve (80 kDa) e o domínio central de 909 aminoácidos, a qual não desempenha papel importante na atividade biológica da proteína e pode

ser removido sem a perda de sua função. Essa molécula desempenha papel fundamental durante a coagulação sangüínea, atuando como um co-fator do fator IX para a ativação do fator X e mutações nesse gene causam o desenvolvimento de uma doença conhecida como hemofilia A. Em muitos países a estratégia terapêutica adotada para esses indivíduos é o uso de moléculas recombinantes. Entre as diferentes estratégias para a produção da proteína recombinante com o domínio B deletado, o uso do sistema retroviral é pouco explorado. Nesse sentido, esse trabalho visa a clona-

gem e expressão do fator VIII de coagulação sanguínea humana em células de mamíferos utilizando o DNA plasmidial retroviral comercial portador do gene marcador de seleção que codifica a proteína GFP (“*green fluorescent protein*”). Inicialmente, uma molécula recombinante em que foram mantidos apenas 6 aminoácidos do domínio B (região deletada: Arg 747 a Glu 1671) foi clonada em um vetor de seqüenciamento (pCR 2.1) a partir de PCR utilizando como molde o DNA plasmidial comercial portador do cDNA completo do fator VIII. A molécula gerada denominada *rFVIII/CP+CL* preserva os sítios principais de ligação de trombina (R373, R740 e R1689) e de fator X (domínio A2 e C2), entre outras características, essenciais para a ativação do fator VIII. Em seguida, o clone *rFVIII/CP+CL-PCR2.1⁺* foi submetido ao seqüenciamento de DNA para avaliação sobre a acuracidade da seqüência nucleotídica relativa a molécula recombinante e, posteriormente, foi realizada a sub-clonagem no vetor de expressão bicistrônico acima mencionado. O vetor recombinante gerado *rFVIII/CP+CL-BMN⁺* foi transfectado em células produtoras de retrovírus PG13LN c8, o que resultou em uma eficiência de transfecção de 12%. Os vírus produzidos por essa linhagem *PG13/rFVIII/CP+CL⁺* foram utiliza-

dos para transduzir a célula alvo Hek-293. Após a transdução retroviral foram realizados dois ciclos de seleção celular, por meio da citometria de fluxo, o que possibilitou o isolamento de 13 clones, dos quais em 12 deles mais que 90% das células expressavam GFP. Destes, foi escolhido um clone (clone E) para prosseguir a caracterização da molécula recombinante relativa ao fator VIII. Primeiramente, foi realizado o ensaio de tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT) para avaliação da atividade biológica do *rFVIII-CP+CL* presente no sobrenadante desta cultura o que resultou em níveis de atividade biológica, da ordem de 2,4 UI/mL. Finalmente, confirmações da presença do *rFVIII-CP+CL* no sobrenadante produzido pela linhagem celular HEK-293/*rFVIII-CP+CL* foi demonstrada através de “*western blot*” utilizando anticorpo monoclonal específico para cadeia leve, que permitiu a detecção de uma banda imuno-reativa de 80 kDa, tamanho esperado para a cadeia leve do fator VIII e específica na linhagem transfectada. Em conjunto, esse trabalho mostrou a eficácia do sistema retroviral em manter a expressão estável e duradoura da proteína recombinante e permitiu estabelecer, toda a tecnologia para geração de linhagens celulares transgênicas produtoras de fator VIII recombinante.

FARMACOLOGIA

EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO PEPTÍDEO M 205 NA NEUROPATIA INDUZIDA PELA LIGADURA DO NERVO CIÁTICO EM RATOS

Vania Aparecida Vopato Kina

Orientador: Prof. Dr. Wiliam Alves do Prado

Tese de Doutorado apresentada em 27/10/2006

A importação nuclear de fatores de transcrição como o NFκB ativa a expressão gênica de substâncias envolvidas com processos nociceptivos e inflamatórios. Sendo assim, a inibição da translocação do NFκB poderia reduzir quadro nociceptivo no modelo de nocicepção neuropática induzida pela ligadura do nervo ciático. Para testar esta hipótese, foi utilizado o peptídeo M 205, capaz de penetrar nas células, e que possui a seqüência NLS, capaz de competir com NFκB na translocação citoplasma – nucleoplasma. A ligadu-

ra dos ramos espinais L5 e L6 acentuou a alodinia mecânica na pata do animal ipsilateral ao lado ligado, estendendo-se até o décimo quinto dia do experimento. A administração por via intratecal (i.t.) do peptídeo M205 (0.1, 1.0 e 5.0 nMoles) no primeiro dia após a ligadura reduziu a alodinia mecânica, enquanto que dose menor (10 pMoles) não produziu redução detectável dos limiares nos animais tratados. Quando administrado no terceiro ou sétimo dia após a ligadura, doses de 1.0 e 5.0 nMoles reduziram a alodinia enquanto que doses menores (0.01 e 0.1 nMol) não tiveram efeito significativo. O peptídeo controle M205 C (1.0 nMol) administrado por via i.t não alterou o limiar nociceptivo dos animais.

A marcação imunohistoquímica nuclear de NFkB em células do corno dorsal da medula espinal foi intensificada após a ligadura, e a administração por via i.t do peptídeo M205 (1.0 nmol) no primeiro, terceiro ou sétimo dia após a ligadura reduziu esta marcação. Esta redução, entretanto, foi significativa apenas nos grupos de animais tratados no primeiro ou sétimo dia pós-cirúrgico.

A ligadura aumentou a marcação nuclear de NFkB em células de gânglio da raiz dorsal em todos os grupos estudados, sendo que este aumento foi significativo apenas no grupo de animais sacrificados no terceiro dia. O tratamento por via i.t. do peptídeo (1.0 nMol) não alterou a marcação de NFkB no núcleo de células do gânglio da raiz dorsal no grupo de animais tratados no primeiro dia após a cirurgia, mas reduziu esta marcação de modo significativo nos grupos de animais tratados no terceiro ou sétimo dia após a ligadura.

A ligadura das raízes do nervo ciático aumentou a marcação da enzima iNOS em células do corno dorsal da medula espinal de animais sacrificados no terceiro ou quarto dia após a ligadura. O tratamento

com o peptídeo reduziu a expressão da iNOS em células da medula espinal apenas no grupo de animais que receberam o peptídeo no sétimo dia após a ligadura.

A ligadura das raízes do nervo ciático aumentou a marcação da enzima iNOS em células do gânglio da raiz dorsal. Este aumento pôde ser observado em animais sacrificados no terceiro, quarto ou nono dia após a ligadura. O tratamento com o peptídeo reduziu a expressão da iNOS de modo significativo em células do gânglio apenas no grupo de animais tratados no terceiro dia após a cirurgia para ligadura.

Nossos resultados indicam que a redução da concentração de NFkB no núcleo celular está associada à redução da alodinia mecânica causada pela ligadura do nervo ciático. A atividade do peptídeo M205 aponta ainda para envolvimento da inibição da translocação do NFkB pelo menos como parte de seu mecanismo de ação anti-alodínico e para uma eficaz atividade analgésica de drogas que inibem a translocação de fatores de transcrição, podendo constituir drogas promissoras para o tratamento da dor neuropática e da inflamação.

ESTUDO DA RESPOSTA PRESSORA À MICROINJEÇÃO DE NORADRENALINA NA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL DE RATOS

Gislaine Garcia Pelosi Gomes

Orientador: Prof.Dr. Fernando M. de Aguiar Corrêa
Tese de Doutorado apresentada em 24/11/2006

A Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP) tem sido descrita como uma região mesencefálica envolvida principalmente na efetuação de respostas defensivas, sendo importante para a integração dos sistemas sensoriais e autonômicos envolvidos na efetuação de respostas comportamentais.

Há evidências de que estimulação elétrica ou química (com aminoácidos excitatórios ou acetilcolina) da SCP desencadeia alterações cardiovasculares. Dentro os inúmeros neurotransmissores presentes na SCP, destaca-se a noradrenalina (NA), visto a existência de uma intensa projeção noradrenérgica para esta área. Dados da literatura sugerem que o efeito pressor após administração intracerebroventricular de NA em ratos não anestesiados envolva um sítio de ação mesencefálico na SCP.

Resultados anteriores deste laboratório evidenciaram respostas pressoras após a administração de NA nas diferentes sub-regiões da SCP. Além disso, o

efeito pressor à microinjeção de NA na região dorsal da SCP (SCPd) de ratos não anestesiados foi dose-dependente, sendo acompanhado por resposta bradicárdica. Assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar o envolvimento do sistema simpático ou de mecanismos vasopressinérgicos na efetuação da resposta cardiovascular à injeção de NA na SCPd, bem como identificar as conexões eferentes dessa região mesencefálica.

As alterações cardiovasculares causadas pela microinjeção de NA na SCPd de ratos não anestesiados foram reduzidas em animais anestesiados com uretana (i.p.), sugerindo de que tais respostas sejam de origem central e não devido ao efeito de um possível extravasamento de NA para a circulação sanguínea.

Em ratos não anestesiados, a resposta pressora à microinjeção de NA na SCPd foi potencializada por pré-tratamento endovenoso com bloqueador ganglionar e bloqueada por pré-tratamento periférico com antagonista de vasopressina ou ausente em animais hipofisectomizados, sugerindo ser a liberação sistêmica de vasopressina o mecanismo envolvido nessa resposta.

No estudo neuroanatômico, foram evidenciadas eferências da SCPd para diversas regiões do Sistema Nervoso Central, destacando-se o núcleo paraventricular do hipotálamo (NPV), a banda diagonal de Broca (BDB) e o hipotálamo lateral (HL). A análise das projeções entre o HL e a SCPd revelou que a região rostral da SCPd recebe projeções de todo o HL, enquanto regiões mais caudais da SCPd recebem aferências somente de áreas específicas do HL sugerindo uma correlação somatotópica das projeções do HL para a SCPd.

Experimentos funcionais foram realizados a partir das observações neuranatômicas do presente trabalho. Inicialmente, evidenciou-se que a ablação farmacológica e reversível do NPV, assim como o pré-tratamento com antagonista de receptores glutamatérgicos do tipo não-NMDA no NPV, reduziram o efeito pressor à NA na SCPd. Além disso, o pré-

tratamento do NPV com antagonista de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA não alterou esse efeito pressor, sugerindo o envolvimento dos receptores glutamatérgicos não-NMDA presentes no NPV na via estimulada pela NA na SCPd. Em seguida, verificou-se que a ablação farmacológica e reversível da BDB também interferiu com a resposta pressora à NA na SCPd, indicando que a via percorre a região da BDB antes de atingir o NPV.

O presente trabalho sugere a existência de um mecanismo noradrenérgico na SCPd o qual integraria o controle cardiovascular e neuroendócrino. Além disso, os resultados sugerem a existência de uma via ascendente a partir do sítio de microinjeção de NA na SCPd, a qual percorre a BDB e termina nos núcleos hipotalâmicos responsáveis pela síntese de vasopressina, dentre os quais preferencialmente no NPV.

EFEITOS CARDIOVASCULARES DA MICROINJEÇÃO DE NORADRENALINA NO NÚCLEO LEITO DA ESTRIA TERMINAL DO CÉREBRO DE RATOS

Carlos César Crestani

Orientador: Prof. Dr. Fernando M. de Aguiar Correa.
Dissertação de Mestrado apresentada em 07/12/2006

O núcleo leito da estria terminal (NLET) é envolvido no controle do sistema cardiovascular. Nosso objetivo neste estudo foi verificar os efeitos cardiovasculares da microinjeção de noradrenalina (NA) no NLET, e identificar os possíveis mecanismos periféricos envolvidos. A microinjeção de NA no NLET causou resposta pressora e bradicárdica dose dependente em ratos não-anestesiados. Estas respostas foram significativamente reduzidas em ratos anestesiados com uretana, inviabilizando o uso de animais anestesiados no estudo. Nenhuma resposta foi observada quando NA foi microinjetada em áreas adjacentes ao NLET, tais como a comissura anterior, a cápsula

interna e a estria terminal, indicando um predominate efeito no NLET. A resposta pressora à NA foi potencializada pelo pré-tratamento sistêmico com o bloqueador ganglionar pentolínio, excluindo a possibilidade de uma mediação simpática da resposta. A resposta bradicárdica foi inibida, sugerindo ser uma resposta barorreflexa vagal, conseqüente ao aumento da PAM. As respostas cardiovasculares observadas após a microinjeção de NA no NLET foram bloqueadas pela injeção endovenosa de dTir(CH₂)₅(Me)AVP, um antagonista vasopressinérgico, sugerindo o envolvimento da liberação sistêmica de vasopressina nestas respostas. Em suma, os presentes resultados indicam que a microinjeção de NA no NLET causa resposta pressora mediada pela liberação sistêmica de vasopressina, e são acompanhadas de bradicardia reflexa.

EFEITOS CARDIOVASCULARES DA MICROINJEÇÃO DE CARBACOL NO NÚCLEO LEITO DA STRIA TERMINAL DE RATOS NÃO ANESTESIADOS

Fernando Henrique Ferrari Alves

Orientador: Prof. Dr. Fernando M. de Aguiar Corrêa
Dissertação de Mestrado apresentada em 20/12/2006

O núcleo leito da estria terminal (NLET) é uma estrutura do sistema nervoso central, envolvido no controle cardiovascular. Respostas cardiovasculares

foram relatadas após estimulação elétrica ou química do NLET. Assim, a neurotransmissão presente no NLET pode estar envolvida com a modulação do sistema cardiovascular. As respostas têm como substrato neural suas conexões com estruturas envolvidas no controle da atividade cardiovascular, tais como o núcleo dorsal do gâgo e o núcleo do trato solitário.

Dentre os neurotransmissores presentes no NLET, a Ach aparece como possível moduladora do sistema cardiovascular. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi estudar os efeitos cardiovasculares decorrentes da microinjeção de carbacol (CB) no NLET, bem como caracterizar os receptores colinérgicos presentes no NLET e os mecanismos periféricos envolvidos na mediação desses efeitos.

A microinjeção de CB no NLET de ratos não anestesiados causou resposta pressora e bradicárdica, dose-dependente, sendo que essas respostas cardiovasculares provocadas pela microinjeção de CB no NLET foram bloqueadas pelo pré-tratamento do NLET com atropina 3nmol/0,1µl (antagonista muscarínico não seletivo) e 4-DAMP 2nmol/0,1µl (antagonista de receptores M_2). Todavia, o pré-tratamento com antagonista de receptores M_1 , pirenzepina 6nmol/

0,1µl, não alterou as respostas pressoras e bradicárdicas microinjeção de CB no NLET. Estes dados indicam que receptores colinérgicos do subtipo M_2 , presentes no NLET, medeiam as respostas cardiovasculares à microinjeção de CB no NLET. As respostas cardiovasculares à microinjeção de CB foram reduzidas em animais anestesiados com uretana.

O pré-tratamento sistêmico com o bloqueador ganglionar pentolínio 10 mg/kg potencializou a resposta pressora ao CB no NLET, sendo que o pré-tratamento com dTir(CH₂)₅(Me) AVP 50µg/kg, um antagonista de receptores de vasopressina V_1 , foi capaz de bloquear as respostas de aumento na PA e de queda na FC do CB microinjetado no NLET. Assim sendo, estes dados sugerem que as respostas cardiovasculares decorrentes da microinjeção de CB no NLET são mediadas por vasopressina liberada sistemicamente na corrente sanguínea.

Em conclusão, nossos resultados mostram que a resposta pressora e bradicárdica à microinjeção de CB no NLET é dependente da ativação de receptores colinérgicos do subtipo M_2 localmente no NLET, sendo a resposta pressora é mediada periféricamente pela liberação sistêmica de vasopressina.

FISIOLOGIA

ATIVAÇÃO OSMÓTICA DE NEURÔNIOS OCITOCINÉRGICOS MEDIADA POR ANGIOTENSINA II E ESTERÓIDES OVARIANOS EM RATAS

Waldecy de Lucca Junior

Orientador: Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci
Tese de Doutorado apresentada em 16/11/2006

Aferências angiotensinérgicas que partem de órgãos circunventriculares, passam pelo núcleo préóptico mediano (MnPO) e atingem aos núcleos paraventricular (PVN) e supraóptico (SON) para modular a secreção de ocitocina (OT) induzida pelo estímulo osmótico. Essa modulação é modificada pelos esteróides ovarianos. O objetivo deste trabalho foi analisar a participação do MnPO e dos esteróides ovarianos na secreção de OT e na marcação da proteína c-Fos em neurônios ocitocinérgicos no PVN e

SON induzidas por estímulo osmótico. Após três ciclos regulares, ratas Wistar foram submetidas à ovariectomia bilateral (ratas OVX) e colocadas em um aparelho estereotáxico para a implantação de cânula no MnPO (experimento I) ou para microinjeção de ácido ibotênico no MnPO (experimento II). Passados 5 dias, as ratas receberam terapia hormonal (TH) com injeções subcutâneas transmusculares de cipionato de estradiol (25 g / dia) às 10:00 h nos três primeiros dias de terapia e no quarto dia receberam apenas uma injeção de progesterona (2 mg) às 10:00 h. O grupo controle recebeu apenas injeções transmusculares de veículo oleoso (óleo de milho *Mazola* – Cargil Agrícola® S.A.) às 10:00 h durante os quatro dias.

Às 16:00 h do quarto dia, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de salina hipertônica ou isotônica. 30 minutos após essas injeções, o sangue foi coletado para dosagem de OT, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) no plasma, e os cérebros foram perfundidos e crioprotégidos para o processamento de dupla imunofluorescência para c-Fos e OT no PVN e SON, assim como c-Fos e LHRH na área preóptica medial (MPOA).

A secreção de OT induzida pelo estímulo osmótico não foi alterada pela TH, pelo Losartan ou microinjeção de ácido ibotênico no MnPO. A secreção de LH induzida pela TH em ratas OVX foi reduzida pelo estímulo osmótico e pela lesão ibotênica do MnPO, mas não pela microinjeção de Losartan no MnPO. A secreção de FSH induzida pela TH em ratas OVX não foi modificada por nenhuma das condições experimentais estudadas.

Os neurônios LHRH na MPOA não apresentaram marcação positiva para c-Fos em resposta ao

estímulo osmótico. A porcentagem média de marcação c-Fos em neurônios OT induzida pelo estímulo osmótico não foi alterada no SON e na região magnocelular lateral (PaLM) do PVN pela lesão ibotênica e pela microinjeção de Losartan no MnPO de ratas OVX e OVX + TH. Por outro lado, ela foi reduzida nas regiões magnocelulares periventricular (PeM) e medial (PaMM) do PVN pela microinjeção de Losartan no MnPO de ratas OVX + TH e pela lesão ibotênica no MnPO de ratas OVX, assim como na região magnocelular comissural anterior (PaAC) do PVN também pela lesão ibotênica no MnPO. Portanto, a ativação de neurônios magnocelulares OT no SON e na região PaLM do PVN pelo estímulo osmótico não depende do MnPO e seus receptores AT1, e não é modulada pelos esteróides ovarianos. Entretanto, essa ativação em outras regiões magnocelulares do PVN (PeM, PaAC e PaMM) envolve o MnPO e seus receptores AT1 e é modulada pelos esteróides ovarianos.

NEUROTRANSMISSÃO DO COMPONENTE SIMPÁTICO DO QUIMIORREFLEXO NO NTS CAUDAL NA PREPARAÇÃO CORAÇÃO-TRONCO CEREBRAL ISOLADOS DE RATOS

Valdir de Andrade Braga

Orientador: Prof. Dr. Benedito H. Machado

Tese de Doutorado apresentada em 30/11/2006

A ativação do quimiorreflexo em ratos não-anesesiados promove aumento da pressão arterial (decorrente de um aumento da atividade eferente simpática), bradicardia e taquipnéia. O objetivo do presente estudo foi avaliar principalmente a participação do L-glutamato e do ATP na neurotransmissão do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo no NTS caudal. Para isso, utilizamos a preparação coração-tronco cerebral isolados (WHBP) de ratos, a qual nos permitiu avaliar o componente simpato-excitatório do quimiorreflexo por meio do registro direto da atividade eferente simpática. A preparação WHBP também nos permitiu avaliar os componentes parassimpato-excitatório e respiratório do quimiorreflexo por meio dos registros da frequência cardíaca e do nervo frênico respectivamente. A ativação do quimiorreflexo com KCN (0,05 %/0,05 mL) promoveu aumento da atividade simpática torácica, bradicardia e aumento da atividade do nervo frênico. A microinjeção de doses

crecentes de L-glutamato (5, 25, 50, 250 e 500 mM) no NTS caudal promoveu aumento da atividade simpática, bradicardia e redução da frequência de despolarização do nervo frênico de maneira dose-dependente. O mesmo padrão de respostas foi observado após a microinjeção de doses crescentes de α,β -metileno-ATP (10, 25, 50, 100 e 200 mM) no NTS caudal. A microinjeção de doses crescentes do *trans*-ACPD (0,5, 1, 2,5, 5 e 10 mM), uma agonista não-seletivo dos receptores metabotrópicos do glutamato, no NTS caudal promoveu aumento da frequência de despolarização do nervo frênico e bradicardia de maneira dose-dependente, sem afetar a atividade simpática. As respostas promovidas pelo L-glutamato, ATP e *trans*-ACPD foram significativamente atenuadas pelos seus respectivos antagonistas: ácido quinurênico (250 mM), PPADS (20 mM) e MCPG (100 mM). A microinjeção de salina como controle de veículo promoveu alterações desprezíveis nos parâmetros avaliados. O aumento da atividade simpática promovido pela ativação do quimiorreflexo não foi afetado pela microinjeção bilateral de ácido quinurênico (51 ± 2 vs $54\pm 3\%$, $n=11$), MCPG (54 ± 5 vs $48\pm 5\%$, $n=7$),

ácido quinurênico + MCPG (55 ± 3 vs $57 \pm 6\%$, $n=6$) ou PPADS (52 ± 4 vs $55 \pm 2\%$, $n=8$) no NTS caudal. No entanto, a microinjeção bilateral de ácido quinurênico combinada com o PPADS no NTS caudal atenuou significativamente o aumento da atividade simpática promovido pela ativação do quimiorreflexo (17 ± 1 vs $52 \pm 2\%$, $n=9$). Nossos resultados mostram que o L-glutamato e o ATP participam da neurotransmissão do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo no NTS caudal e que o aumento da

atividade simpática em resposta ao quimiorreflexo é atenuado apenas se ambos os receptores glutamatérgicos e purinérgicos forem bloqueados. A compreensão dos mecanismos celulares por meio dos quais esses dois neurotransmissores atuam no NTS caudal poderá contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na geração e na modulação da atividade eferente simpática no sistema nervoso central, especialmente em situações de hipóxia e hipertensão arterial.

CONTROLE DA VENTILAÇÃO PULMONAR EM *LEPIDOSIREN PARADOXA*: QUIMIORRECEPÇÃO FRENTE A HIPERCARBIA

Jalile Amin Naves Ventura

Orientador: Prof. Dr. Mogens Lesner Glass

Tese de Doutorado apresentada em 07/12/2006

O aparecimento da respiração aérea nos vertebrados aconteceu há mais de 400 milhões de anos, com o surgimento dos primeiros peixes pulmonados. Abundantes naquela época, hoje existem apenas seis espécies viventes, representadas por três gêneros (*Lepidosiren*, *Protopterus* e *Neoceratodus*). A ordem dos peixes pulmonados (Dipnoi) representa, na taxonomia clássica, o último ramo anterior ao surgimento dos anfíbios ancestrais. Sendo assim, o detalhamento de sua morfologia e de sua fisiologia torna-se de extrema importância. Dentro da fisiologia respiratória, o controle da ventilação é um tópico de grande relevância. Para atingir este objetivo, foram realizados neste trabalho, dois protocolos experimentais, sendo o primeiro para verificar a presença de quimiorreceptores periféricos sensíveis a PC_2/pH , bem como sua contribuição na resposta ventilatória total e o segundo, para verificar a seletividade dos quimiorreceptores centrais a C_2 , H^+ ou ambos. Ao aplicarmos o primeiro protocolo - hipercarbia aquática e aérea de 7% ($\sim 49 \text{ mm}^2 \text{ HG}$) durante cinco horas - constatamos que a ventilação, na última hora do registro, aumentou cerca de oito vezes em relação ao controle normocárbico. Ao aplicarmos a superfusão normocárbica com pH constante normal para o animal (7,45) - para eliminarmos a resposta dos quimiorreceptores centrais - a ven-

tilação caiu cerca de cinco vezes em relação a quinta hora de hipercárbia. Esse resultado excedeu o controle normocárbico em cerca de três vezes. Os quimiorreceptores periféricos para PC_2/pH foram as responsáveis por essa resposta, que através de cálculos, constatamos ser 20% da resposta ventilatória total frente a hipercarbia, resposta similar a dos homens. Ao aplicarmos o segundo protocolo - vários níveis de pH com C_2 constante em valor normocárbico para o animal e variação do nível de C_2 com pH constante normal para o animal - verificamos que nas duas situações, a ventilação aumentou, sendo que a hipercárbia foi um estímulo menor do que a acidose. Com o pH normal (7,45) e o aumento do nível de C_2 de 3 para 6%, a ventilação aumentou cerca de duas vezes. Com a PC_2 em valores normocárbicos, a diminuição do pH, de 7,45 para 7,20 e sucessivamente para 7,10 causou um aumento de 3 vezes na ventilação. Dessa forma concluímos que pH^+ e o C_2 são estímulos distintos aos quimiorreceptores centrais de *Lepidosiren paradoxa*. Esses dados são de extrema importância no estudo da evolução da vida aquática para a terrestre, apoiando a teoria de que Dipnoi é grupo irmão de tetrápodes. Além disso, demonstramos que o controle da ventilação pulmonar surgiu anteriormente a transição para a vida terrestre, sendo *Lepidosirenidae*, a família mais primitiva na escala taxonômica a apresentar, além de quimiorreceptores respiratórios centrais, distinção entre seus estímulos e também quimiorreceptores periféricos internos que respondem a estímulos ácido-base.

EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE AMINOÁCIDOS EXCITATÓRIOS NA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DE COBAIAS SOBRE A MODULAÇÃO DA IMOBILIDADE TÔNICA

Márcio Ramos Coutinho

Orientadora: Profa.Dra. Leda Menescal de Oliveira
Dissertação de Mestrado apresentada em 13/12/2006

A imobilidade tônica (IT) é uma resposta defensiva inata, caracterizada pelo estado profundo e temporário de acinesia e de ausência relativa de respostas motoras às estimulações do meio ambiente, desencadeada por meio de manobras de restrição física e inversão postural. Tem sido descrito na literatura a participação de circuitos neurais da substância cinzenta periaquedutal (SCP) na modulação da duração das repostas de IT. Os aminoácidos excitatórios (AAE) são importantes mediadores envolvidos nos ajustes de diversas respostas comportamentais defensivas produzidas pela SCP, sendo provável a sua participação também na IT. Visando contribuir para o entendimento de um possível papel dos AAE sobre a modulação da IT, o presente trabalho teve o objetivo de investigar os efeitos, sobre a duração dos episódios de IT, da microinjeção de DLH (agonista AAE) e de MK-801 (antagonista não competitivo dos receptores NMDA) na SCP ventrolateral (SCPvl) e dorsolateral/dorso-medial (SCPd) de cobaias. A microinjeção de DLH (15 nmol / 0,2 µl) na SCPvl promoveu aumento significativo da duração da IT, que não foi observado quando

houve microinjeção de MK-801 (3,6 nmol / 0,2 µl) na SCPvl previamente à microinjeção de DLH no mesmo sítio. A administração de 3,6 e 10,8 nmol / 0,2 µl de MK-801 na SCPvl, *per se*, não provocou alterações na duração dos episódios de IT. A microinjeção de DLH (30 nmol / 0,2 µl) na SCPd diminuiu os episódios de IT. Esse efeito não foi observado quando houve microinjeção de MK-801 (3,6 nmol / 0,2 µl) na SCPd, previamente à administração do DLH. A microinjeção do MK-801 (3,6 nmol / 0,2 µl), *per se*, na SCPd não provocou alterações na duração dos episódios de IT. Os resultados sugerem que a microinjeção de 15 nmol de DLH na SCPvl foi capaz de elevar a duração das repostas de IT, possivelmente, pela ativação dos receptores NMDA existentes nesse sítio. Além disso, a modulação das respostas de IT, pelo sistema glutamatérgico na SCPvl, não pareceu ser do tipo tônica, visto que a administração do antagonista MK-801, *per se*, não produziu efeito. A microinjeção de 30 nmol de DLH na SCPd foi capaz de diminuir a duração da IT, certamente, com envolvimento dos receptores NMDA presentes na região. Esses dados apontam a participação dos AAE na modulação da duração da IT, ao nível da SCP de cobaias, e um papel distinto entre as colunas da SCP, na organização desse comportamento defensivo.

SISTEMA SEROTONINÉRGICO ENVOLVIDO NA FEBRE INDUZIDA POR LPS NO LOCUS COERULEUS

Alexandre Oliveira Fernandes da Silva

Orientador: Prof. Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco
Dissertação de Mestrado apresentada em 20/12/2006

Este estudo testou a hipótese de que os receptores serotoninérgicos no *Locus coeruleus* (LC) desempenham um papel sobre a febre induzida por LPS. Para tanto, antagonistas 5-HT_{1A} (WAY-100635; 3 µg/

100 nL) e 5-HT_{2A} (ketanserín; 2 µg/100 nL) foram microinjetados no LC e a temperatura corporal (T_b) medida por biotelemetria. Microinjeções intra-LC de ketanserín ou WAY-100635 não causaram alterações na T_b de ratos eutermicos. Antagonistas 5-HT_{2A} aboliram a primeira fase da febre induzida por LPS. Os resultados indicam que a serotonina agindo sobre receptores 5-HT_{2A} no LC mediam a primeira fase da resposta febril.

GENÉTICA**APLICAÇÃO DE METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO DE CONHECIMENTOS EM PESQUISAS E GERENCIAMENTO DE PROGRAMA DE MELHORAMENTO GENÉTICO EM BOVINOS DA RAÇA NELORE****Jéferson Nomelini**

Orientador: Prof. Dr. Raysildo Barbosa Lôbo

Dissertação de Mestrado apresentada em 02/10/2006

O Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore (PMGRN – Nelore Brasil) experimentou, em 17 anos de existência, rápido crescimento geográfico, abrangendo rebanhos em 12 estados brasileiros mais 3 países da América Latina, além de crescimento exponencial de sua base de dados (774.870 animais avaliados em 2005). Para administrar essa enorme base de dados e gerar descobertas científicas que proporcionem progresso genético aos rebanhos avaliados, torna-se necessário o uso de tecnologias da informação. Os objetivos foram utilizar tecnologias da informação para: caracterizar a estrutura populacional do rebanho avaliado, identificar vias de fluxo gênico, analisar evolução do coeficiente de endogamia e extrair padrões de seleção e acasalamento das fazendas participantes. Foi utilizado o Nelore Business Intelligence, o sistema de inteligência empresarial (BIS) do PMGRN – Nelore Brasil, carregado com a avaliação genética de 2005, como fonte única de dados. As tecnologias utilizadas para análise foram Processamento Analítico On-Line (OLAP) e mineração visual de dados. Quanto ao sexo dos animais avaliados, geralmente há equilíbrio em regiões exportadoras de genética (rebanho seleção – destinados à produção de reprodutores) e maior proporção de matrizes em regiões exportadoras de carne (rebanho multiplicador – destinado à multiplicação dos genes provenientes do rebanho seleção e rebanho comercial – dedicado à produção de carne), além disso, a proporção vem equilibrando ao longo do tempo, indicando amadurecimento do PMGRN – Nelore Brasil. Quanto à varie-

dade (padrão e mocho), o mocho representa 24% de todo rebanho avaliado, com ligeiro crescimento de participação nos últimos anos, preferência e crescimento regional de cada uma das variedades provavelmente estejam ligadas às culturas e tradições locais e marketing dos criadores. O fluxo gênico na Raça Nelore ocorre pela incorporação de genes do rebanho seleção no multiplicador e comercial, causado, principalmente, pela difusão da Inseminação Artificial, proporcionando progresso genético até no rebanho comercial. O controle da endogamia mostrou-se eficiente para todas categorias, exceto Puro de Origem Importado, causado pelo pequeno número de progenitores. A análise da endogamia por fazenda indica bom controle deste índice na maioria delas (92,7% de rebanhos avaliados com coeficiente de endogamia menor que 2%). Animais de elevado potencial genético para diversas características (peso, habilidade materna, fertilidade e reprodutivas) tem maior probabilidade de produzir grande número de descendentes, traduzindo em vantagem competitiva às fazendas que produzem este perfil de reprodutores. A maioria das fazendas participantes do PMGRN – Nelore Brasil selecionaram matrizes com elevado potencial genético para serem destinadas às biotecnologias de Transferência de Embriões e Fertilização In Vitro. O uso de um BIS é potencialmente eficiente como ferramenta gerencial e fonte de pesquisa de um programa de melhoramento genético, por capacitarem tecnologias OLAP e mineração visual de dados a extraírem informações e conhecimentos válidos e úteis para os rebanhos participantes. A aplicação destas tecnologias e a incorporação dos conhecimentos à comunidade de usuários (criadores) podem maximizar o progresso genético do rebanho e aumentar a competitividade da pecuária de corte brasileira.

ALTERAÇÕES NO GENE *MLL* (11q23) EM LINFÓCITOS DE PACIENTES QUE RECEBERAM TRATAMENTO PARA LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA NA INFÂNCIA

Maria Sol Brasesco Annichini

Orientadora: Profa. Dra. Elza Tiemi Sakamoto Hojo
Tese de Doutorado apresentada em 10/10/2006

As terapias atuais utilizadas no tratamento da Leucemia Linfóide Aguda em crianças têm permitido índices de cura superiores a 75%, mas estas a custos da exposição dos pacientes a altas doses de radiação ionizante e a combinações de quimioterápicos, cujos efeitos mutagênicos são bem conhecidos. Assim, os pacientes já tratados para doenças neoplásicas apresentam um risco aumentado de desenvolver câncer secundário. Dependendo das doses administradas, entre 1 e 15% dos pacientes tratados com inibidores de Topoisomerase II e/ou agentes alquilantes desenvolvem Leucemia Mielóide Aguda relacionada ao tratamento (t-LMA), caracterizada por translocações em 11q23.

O objetivo do presente trabalho foi a detecção de rearranjos no gene *MLL*, por meio da aplicação de métodos citogenéticos e moleculares em linfócitos periféricos de pacientes em alta, submetidos anteriormente à quimioterapia na infância para o tratamento de LLA. Paralelamente, foram conduzidos experimentos *in vitro* que caracterizassem o potencial clastogênico do Etoposide (VP-16), a fim de estabelecer comparações com os resultados obtidos nas análises dos pacientes previamente submetidos a diferentes drogas, inclusive o VP-16. Foram analisadas preparações cromossômicas de 49 pacientes e de 49 indivíduos normais (grupo controle), empregando-se a sonda comercial LSI *MLL* (Vysis), que permite a detecção de diferentes translocações na região cromossômica 11q23. O grupo de pacientes foi dividido em dois subgrupos, dependendo da inclusão ou não de inibidores de Topoisomerase II (VM-26 e/ou VP-16) no protocolo de tratamento.

A análise estatística revelou diferenças significativas ($p=0,00875$) quando as freqüências de translocações envolvendo o gene *MLL* entre os dois subgrupos de pacientes e o grupo de controles foram comparadas. Da mesma forma, diferenças significativas ($p=0,00598$) entre o grupo total de pacientes (independentemente da inclusão ou não de inibidores de Topo II no tratamento) e o de indivíduos controles foram observadas. As freqüências de translocações apresentadas pelos pacientes também foram testadas

quanto ao tipo de tratamento, mas as diferenças entre os dois subgrupos não foram estatisticamente significativas ($p=0,709$). Similarmente, não houve diferenças entre os grupos quanto à presença de sinais extras para o gene *MLL* ($p=0,328$). O emprego do método de fiber-FISH permitiu detectar diversos rearranjos intragênicos, sendo que as freqüências destes não diferiram significativamente ($p = 0,679$).

O tratamento *in vitro* de linfócitos de indivíduos controles com VP-16 (0,25, 0,5, e 1 $\mu\text{g/ml}$, em pulso de 1 hora e tratamento contínuo) induziu um aumento estatisticamente significativo nas freqüências de aberrações cromossômicas (detectadas por coloração convencional e por FISH com sondas específicas para os cromossomos 8 e 11) e de células com alterações em relação aos controles negativos ($p<0,05$). A ocorrência de alterações em 11q23 nas culturas tratadas (detectadas pela aplicação de sonda específica para o gene *MLL*) foi significativamente elevada ($p=0,0000209$). Contrariamente, a aplicação da sonda específica para o gene *IgH* (14q32) não revelou diferenças significativas entre os tratamentos.

Por outro lado, a técnica de PCR-inversa permitiu detectar diversas translocações envolvendo o gene *MLL* nas culturas tratadas: t (3;11), t (4;11), t (7;11), t (8;11), t (9;11), t (11;12), t (11;16) e t (11;17); estas foram identificados após clonagem e seqüenciamento. Também foram analisadas amostras de 43 pacientes que apresentaram LLA na infância e amostras de 100 indivíduos controles, sendo detectadas várias translocações putativas. Entre os pacientes, 35 (81%) apresentaram translocações putativas, enquanto que nos controles, tais translocações foram detectadas em 49% dos indivíduos. Em ambos os grupos, as translocações putativas apareceram como três, duas ou uma única banda por indivíduo. No grupo de pacientes foi mais freqüente a presença de duas ou três bandas em relação aos controles; a aplicação do teste estatístico revelou diferenças significativas ($p<0,05$). No primeiro grupo, 91% (30) das translocações identificadas corresponderam a t (4;11) (q21;q23) e os 3 clones restantes foram identificados como t (11;X), t (8;11) (q23; q23) e t (11;16). Nos controles, a análise por seqüenciamento revelou uma distribuição de translocações similar à detectada nas culturas tratadas com VP-16. As translocações mais freqüentes foram t (4;11) (q21; q23) e t (9;11), 66% e 20%, respectiva-

mente, sendo que as de menor frequência (14%) se corresponderam com a t (1;11), t (2;11), t (11;12) e a t (11;19) (q23; p13).

Por outro lado, os estudos *in vitro* caracterizaram a atividade clastogênica do Etoposide em termos de sítios de ação, mesmo em concentrações baixas (inferiores às relatadas em pacientes sob tratamento) durante curtos períodos de exposição. Além disso, observou-se uma indução preferencial de danos provocados por este inibidor de Topo II no gene *MLL*, e conseqüentemente, no cromossomo 11, comparativamente ao gene *IGH* e o cromossomo 8.

Os resultados da presente pesquisa indicaram frequências elevadas de translocações no gene *MLL* em pacientes submetidos ao tratamento de LLA na infância. Este aumento poderia estar relacionado à prévia exposição a drogas antitumorais, independentemente da inclusão de inibidores de Topoisomerase II no tratamento. Embora o significado biológico de tais rearranjos não seja claro, estes são indicadores de instabilidade genômica e dos efeitos tardios das terapias, tornando importante o acompanhamento citogenético e/ou molecular dos pacientes em remissão clínica completa.

AVALIAÇÃO DA AÇÃO GENOTÓXICA E ANTIGENOTÓXICA DOS EXTRATOS AQUOSOS DE *Spirulina maxima*, *Laminaria digitata* E *Fucus vesiculosus* EM LINFÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO HUMANO *IN VITRO*

Cleide Leite da Silva

Orientadora: Profa. Dra. Catarina Satie Takahashi
Tese de Doutorado apresentada em 16/10/2006

As algas *Spirulina maxima* (Oscillatoriales, Oscillatoriaceae), *Laminaria digitata* (Laminariales, Laminariaceae) e *Fucus vesiculosus* (Fucales, Fucaceae) foram testadas quanto a sua atividade protetora contra danos no DNA induzidos pela doxorubicina (DXR). Nesse estudo, avaliamos os potenciais genotóxico e antigenotóxico dos extratos aquosos dessas algas em três concentrações diferentes (0,2; 0,5 e 1,0 mg/ml em meio de cultura, para *Spirulina maxima*), (0,125; 0,25 e 0,5 mg/ml em meio de cultura, para *Laminaria digitata*) e (0,25; 0,5 e 1,0 mg/ml em meio de cultura, para *Fucus vesiculosus*), usando o teste de aberração cromossômica (AC) e o ensaio Cometa. Os tratamentos das culturas de linfócitos humanos (12 mulheres) com extratos aquosos dessas

algas *per se* (em todas as concentrações) não alteraram o índice mitótico (IM), a frequência de alterações cromossômicas ou a extensão de danos no DNA detectado no ensaio Cometa. O efeito antigenotóxico dos extratos aquosos das algas estudadas foi testado em culturas de linfócitos humanos tratadas com DXR (15 µg/ml). Os extratos dessas algas foram adicionados às culturas: antes, simultaneamente com e após o tratamento com DXR. Apenas nas culturas pré-tratadas, todas as concentrações dos extratos aquosos de *L. digitata* e *F. vesiculosus* e a maior concentração de *S. maxima* (1,0 mg/ml em meio de cultura) foram eficientes na redução tanto de danos no DNA quanto de aberrações cromossômicas (ACs) induzidas pela DXR. Estes resultados demonstram que os extratos aquosos dessas algas não são genotóxicos nos linfócitos humanos cultivados e indicam que nas culturas pré-tratadas eles têm atividade antigenotóxica contra os danos no DNA induzidos pela DXR.

AVALIAÇÃO DA AÇÃO GENOTÓXICA E ANTIGENOTÓXICA DO EXTRATO DO NIM (*Azadirachta indica* A. Juss.) E DA AZADIRACTINA *IN VITRO* E *IN VIVO*

Cássia Lima Silva Gusmão

Orientadora: Profa. Dra. Catarina Satie Takahashi
Tese de Doutorado apresentada em 20/10/2006

Os extratos e substâncias químicas extraídas do nim (*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae) têm sido estudados por suas propriedades farmacológicas,

tais como antiinflamatória, antibacteriana, antioxidante, antitumoral e anticarcinogênica, bem como por seus efeitos contra numerosas espécies de insetos. A azadiractina (AZ) é o principal composto encontrado no nim, sendo o principal responsável por sua atividade inseticida e pesticida. O objetivo deste estudo foi testar o potencial genotóxico e antigenotóxico de um

extrato de folhas do nim (EFN) e da azadiractina (AZ) *in vitro* e *in vivo*, usando o teste de aberração cromossômica (AC) e o ensaio Cometa.

Os efeitos genotóxicos e antígenotóxicos do EFN (0,1, 0,2 e 0,4 mg/ml) e da AZ (25, 50 e 100 µM) foram testados em culturas de linfócitos humanos por 24-26 h, sendo que os efeitos antígenotóxicos foram avaliados frente aos danos induzidos pelo antitumoral doxorubicina (DXR, 15 µg/ml) em pré-tratamento, tratamento simultâneo e pós-tratamento.

Nos ensaios *in vivo*, os efeitos genotóxicos e antígenotóxicos do EFN (0,2; 0,4 e 0,8 g/kg p.c.) e da AZ (15 e 30 g/kg p.c.) foram testados em camundongos (células da medula óssea e linfócitos), sendo que efeitos antígenotóxicos foram avaliados frente aos danos induzidos pela DXR (15 mg/kg p.c.).

Os resultados *in vitro* mostraram que todas as

concentrações testadas de EFN não foram citotóxicas, genotóxicas ou clastogênicas; além disso, reduziram os danos provocados pela DXR, diminuindo significativamente a frequência de ACs no pós-tratamento com 0,4 mg/ml. Por outro lado, a AZ apresentou atividade genotóxica em todas as concentrações testadas, mas não foi citotóxica ou clastogênica *per se*; entretanto, os danos no DNA produzidos pela DXR foram significativamente aumentados no pós-tratamento, principalmente na concentração de 100 µM.

Nos ensaios *in vivo*, todas as concentrações testadas de EFN e AZ não foram citotóxicas, genotóxicas ou clastogênicas. Além disso, não exibiram alteração significativa sobre os danos induzidos pela DXR; todavia, o EFN mostrou uma tendência de reduzir os danos, ao passo que a AZ exibiu uma tendência de agravar os danos causados por este antitumoral.

DETECÇÃO PRECOCE DE FIBROSSARCOMA EXPERIMENTAL BASEADA EM PERFIS DE EXPRESSÃO GÊNICA DO SISTEMA IMUNE

Márcia Maria Chiquitelli Marques

Orientador: Prof.Dr. Geraldo Aleixo da Silva Passos Jr.
Tese de Doutorado apresentada em 15/12/2006

Nosso objetivo foi avaliar o perfil de expressão gênica em larga escala do sistema imune em resposta a presença de células tumorais *in vivo*. Para isto, desenvolvemos um sistema-modelo experimental no qual fibroblastos Balb-3T3 transfectados com o oncogene Ha-ras (linhagem B61), foram injetados por via subcutânea em camundongos Balb-c imunocompetentes (10⁶ células por animal). A injeção destas células foi seguida do aparecimento de fibrossarcoma no local, cujo crescimento foi estudado por meio de curva de crescimento do tumor (tempo em dias *versus* peso úmido do tumor). Para testar nossa idéia, amostras de RNA total foram extraídas primeiramente do timo de camundongos injetados com as células B61 (ou dos controles) durante o crescimento tumoral. O perfil de expressão gênica (assinaturas de hibridação) foi avaliado por meio da tecnologia dos cDNA microarrays em náilon, cujos arrays contiveram 1536 seqüências de cDNA de timo murino da biblioteca IMAGE. Neste caso as sondas (cDNA de timo) foram marcadas com o isótopo radioativo ³³P. Os dados foram analisados com auxílio de programas de bioinformática dedicados como SAM (significance analysis of microarrays) para evidenciarmos os genes diferenciais com

base estatística e cluster & tree-view para traçarmos as árvores (dendrogramas) de agrupamento hierárquico. Logo após três dias da injeção de 10⁶ células B61, pudemos observar resposta de expressão gênica diferencial no timo de camundongos injetados em relação aos controles, o que continuou ao longo do crescimento do tumor. Conseguimos demonstrar que o timo é responsivo, em termos de expressão gênica, a um estímulo antigênico tumoral num local distante no corpo. Tais achados nos conduziram a considerar que o método estudado poderia ser útil na detecção da presença de quantidades diminutas de células tumorais *in vivo*, mesmo antes do surgimento de um tumor milimétrico. Para avaliarmos esta possibilidade, variamos o número de células tumorais B61 injetadas (10³ e 10⁵ células por animal) e extraímos RNA total de linfócitos do sangue circulante. Aumentamos o número de seqüências avaliadas para 4.500 e utilizamos microarrays em lâminas de vidro e as sondas de cDNA das células mononucleares do sangue circulante foram marcadas com fluorocromos Cy3 ou Cy5. Além disso, utilizamos citometria de fluxo para estudar as eventuais variações de subpopulações celulares, tais como linfócitos T CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺, linfócitos B CD19⁺ e células natural killer (NK) no sangue dos animais. As análises mostraram que não houve variação significativa (p < 0,005) no número destas células em resposta à injeção de células tumorais, nas quanti-

dades estudadas. Entretanto, o método de análise por cDNA microarrays, se mostrou sensível o bastante para detectarmos genes diferencialmente expressos nas células mononucleares do sangue circulante após a injeção de 10^5 células tumorais. Também analisamos as subpopulações celulares sanguíneas e expressão gênica das células mononucleares do sangue circulante de camundongos com inflamação e daqueles com infecção bacteriana, para avaliarmos a especificidade da resposta transcricional do sistema imune. O agrupamento hierárquico usando dados com signifi-

cância estatística (valores obtidos com o programa SAM), permitiu a separação das diferentes amostras de maneira não supervisionada. Estes resultados mostraram que a tecnologia dos cDNA microarrays, incluindo os programas de bioinformática dedicados, foi sensível o bastante para traçarmos assinaturas de expressão gênica do sistema imune, características de situações patológicas, dentre as quais a presença de células tumorais *in vivo* e, cujo sistema-modelo, nos dá suporte para aplicar este método na detecção precoce do câncer.

MECANISMOS DE RESPOSTA ÀS LESÕES NO DNA INDUZIDAS PELA CISPLATINA E RADIAÇÃO IONIZANTE EM CÉLULAS HUMANAS

Stephano Spanó Mello

Orientadora: Profa. Dra. Elza Tiemi Sakamoto Hojo
Tese de Doutorado apresentada em 19/12/2005

Os mecanismos de morte celular relacionados ao reparo do DNA e progressão do ciclo celular sob tratamento com o antitumoral cisplatina ainda são pouco compreendidos. Com o objetivo de investigar respostas celulares a essa droga, foram estudadas diferentes linhagens celulares: células normais (FHN), Ataxia Telangiectasia (deficientes para o gene ATM) e Xeroderma Pigmentosum grupo de complementação A (deficientes para o gene XPA). As células foram tratadas com a cisplatina (12.5-300 μ M) e os perfis de expressão gênica foram analisados pelo método de micro-arranjos de cDNA. Além disso, outros ensaios (sobrevivência celular, indução de apoptose e cinética do ciclo celular) também foram realizados. As células XPA apresentaram um aumento na indução de apoptose e uma alta sensibilidade à cisplatina, enquanto que as células AT não sofreram apoptose e mostraram um nível de sobrevivência maior que as células FHN e XPA. Enquanto as células normais FHN não sofreram um bloqueio no ciclo após o tratamento, as células XPA e AT apresentaram um bloqueio na fase G1/S. Os dados de expressões gênicas indicaram uma indução dos genes apoptóticos (CIDEA, CRADD e DAPK2) em células AT, embora estas não tenham sofrido apoptose após o tratamento. As células AT também demonstraram alterações nos níveis transcricionais de genes associados às modificações da histone H2A, tal como o MORF4L1 (induzido) e RNF2 (reprimido), sugerindo que a mutação em ATM pode afetar os even-

tos de remodelamento da cromatina após o tratamento com a cisplatina, bem como a ativação de histonas relacionadas ao reparo do DNA, como a H2AX.

Os resultados obtidos com as células deficientes para XPA, as quais apresentaram sensibilidade ao tratamento com a droga, confirmaram o envolvimento de XPA no reparo dos *cross-links* induzidos por cisplatina. Ainda, os resultados apresentados também sugerem que o gene ATM desempenha um importante papel nas respostas celulares à cisplatina, atuando nos eventos iniciais de transdução de sinais.

Além disso, a distribuição intranuclear dos *foci* de gama-H2AX foi avaliada em células sob a influência da cisplatina (100 μ M) por até 24h após o tratamento. De forma geral, todas as linhagens de fibroblastos testadas, apresentaram um aumento significativo nos níveis de gama-H2AX, iniciando em 3 h e alcançando um ápice em 12 h após exposição. As células ATM e XPA apresentaram um aumento na indução de um padrão difuso (pan-nuclear) de ativação da gama-H2AX sob o tratamento. Uma vez que a H2AX parece ser essencial na manutenção da estabilidade cromossômica e remodelamento da cromatina, os *foci* de gama-H2AX em células tratadas podem constituir uma importante estratégia para o estudo de reparo do DNA e das vias de sinalização em resposta à cisplatina.

Adicionalmente, os perfis de expressão gênica foram estudados em duas linhagens de fibroblastos normais, a fim de verificar se células proliferativas expostas a 50 cGy de radiações gama exibiam mudanças significativas na expressão gênica, avaliadas 6 dias após a irradiação. A expressão gênica foi estu-

dada pela técnica de microarranjos de cDNA e a análise estatística, pelo teste SAM, indicou um conjunto de 22 genes com alterações significativas nos níveis de expressão (FDR < 0,10). Vários genes são envolvidos na regulação transcricional, organização das fibras de actina, controle do ciclo celular, apoptose e reparo do DNA. A modulação dos genes de resposta ao estresse pode ativar a produção de proteínas de interação, demonstrando a conexão entre os meca-

nismos de transcrição e defesa celular. A indução dos genes de reparo e dos genes relacionados ao proteossoma, reforçam o envolvimento do ciclo ubiquitina/proteólise em um mecanismo de resposta às radiações ionizantes. Portanto, células humana expostas a 50 cGy de radiações gama mostraram efeitos tardios relacionados às respostas transcricionais, mesmo depois de 6 dias após a irradiação, depois da ocorrência de aproximadamente 5-6 ciclos de divisão.

DINÂMICA REPRODUTIVA E INFLUÊNCIA DAS ÁREAS DE CONGREGAÇÃO DE ZANGÕES NA AFRICANIZAÇÃO DE *Apis mellifera* (APIDAE: APINI) NO BRASIL

Omar Arvey Martínez Caranton

Orientador: Prof. Dr. Ademilson E. Egea Soares

Dissertação de Mestrado apresentada em 21/12/2006

A introdução de 33 rainhas africanas (*Apis mellifera scutellata*) em 1956, com o objetivo de iniciar um programa de seleção e melhoramento genético no Brasil, e a posterior enxameação de algumas destas rainhas, deu início ao processo de Africanização, originando o poli-híbrido, denominado, “Abelha africanizada”. Este processo envolveu uma série de fatores biológicos e ambientais, cujas interações não são suficientemente claras. Os acasalamentos em abelhas melíferas ocorrem em sítios denominados como Áreas de Congregação de Zangões (ACZ), estes locais têm sido bem estudados em abelhas européias, porém, pouco pesquisados em abelhas africanizadas. Assim, é mister a necessidade de desenvolver novos estudos sobre o comportamento reprodutivo destas subespécies, que contribuiriam para a rápida expansão das abelhas africanizadas nas Américas. Foram observados os comportamentos de vôos de 10 rainhas (*Apis mellifera carnica* e *Apis mellifera africanizada*) e de 126 e 146 zangões de cada raça, respectivamente. Observou-se 6 pontos, localizados no campus da USP de Ribeirão Preto, os quais poderiam ter uma maior concentração de zangões em vôo. Estes pontos foram analisados por meio de uma rainha fecundada presa a um balão preenchido com gás Hélio e determinadas características ambientais. Todas as rainhas retornaram ao núcleo com a marca de acasalamento e ini-

ciaram o processo de postura. Os dados revelaram que não existem diferenças significativas ($\alpha = 0,05\%$) ao compararmos: A idade da rainha no seu primeiro vôo (T=123: P=0,185); a idade da rainha no vôo do acasalamento (t=1,721; P=0,104); o número de vôos que cada rainha realizou (T=79,5; P=0,789); a duração do vôo de acasalamento (t=1,065; P=0,303); a temperatura no dia do vôo de acasalamento (t=0,263; P=0,796) e o horário do dia no qual ocorrem os vôos de acasalamento (t = 0,0; P=1,0). A atividade de vôo dos zangões carnicos nunca precedeu o horário as 14:15 e 14:30h para zangões carnicos e africanizados, respectivamente, confirmando que não existem diferenças significativas no período do dia em que estes realizam seus vôos (t = -3,11E-015; P = 1,000). Dos 6 pontos observados, somente um ponto não atraiu zangões à isca. Não foram encontrados diferenças significativas entre as diferentes ACZ (P = 0,109). Ao analisar a velocidade do vento (m/s), a análise de variância encontrou diferenças significativas entre as diferentes ACZ (P=<0,001), porém não influenciando a presença de zangões na isca. Dados coletados neste experimento revelaram que os zangões freqüentam estas áreas durante condições de vento superiores a 4 m/s, e em algumas ocasiões com ventos de 8.1 m/s. Também foi observado que os zangões realizam seus vôos de acasalamento em dias nublados e com pouca luminosidade. Não existiu uma preferência, pelos zangões, por determinadas ACZ, constatando-se que o ambiente oferece muitos espaços abertos típicos de ACZ, garantindo e facilitando o acasalamento destas abelhas.

INSEMINAÇÃO INSTRUMENTAL EM RAINHAS AFRICANIZADAS DE *Apis mellifera* (APIDAE: APINI) COMO SUBSÍDIO PARA O MELHORAMENTO GENÉTICO

Umberto Moreno Velandia

Orientador: Prof. Dr. Ademilson E. Egea Soares

Dissertação de Mestrado apresentada em 21/12/2006

A produção apícola vem tomando grande importância nos últimos anos devido, principalmente, ao aumento na produção e na exportação dos produtos das abelhas. O mercado brasileiro de produtos apícolas está avaliado atualmente em US\$ 360 milhões anuais. As pesquisas vislumbram um potencial crescimento a curto prazo para valores superiores a US\$ 1 bilhão anual. Operam atualmente no país cerca de 200 empresas legalmente registradas, gerando cerca de 15.000 empregos diretos. Estes dados demonstram que a produção e comercialização dos produtos apícolas, principalmente o mel, estão em crescimento. Portanto é de grande importância a profissionalização da apicultura no país para responder aos níveis produtivos e de padrões de qualidade exigidos nos países importadores dos produtos apícolas. Uma ferramenta importante para atingir estes objetivos de incremento produtivo é o estabelecimento de programas de melhoramento genético para as abelhas africanizadas. Para isto é necessário o uso de ferramentas que permitam aumentar os níveis produtivos como, por exemplo, a inseminação instrumental. Alguns autores demonstraram que não existem diferenças significativas entre rainhas inseminadas e acasaladas naturalmente quanto as características produtivas. Foram utilizadas colmeias de *Apis mellifera* africanizadas para a iden-

tificação de colônias boas produtoras de mel numa região com vegetação típica de cerrado, sendo que em setembro de 2005 obteve-se uma produção total de 348,55 Kg de mel ($n = 27$, $\bar{x} = 12,909 \pm 5,846$ Kg/colônia) e em março de 2006 um total de 432,8 Kg ($n = 39$, $\bar{x} = 11,09 \pm 4,44$ Kg/colônia). As duas avaliações tinham como objetivo a identificação de colmeias que eram persistentes na produção de mel. Estas foram avaliadas utilizando-se uma padronização por unidade de área e os dados foram transformados a valores de z, o que permitiu a eliminação do efeito de apiário. Assim foram selecionadas 2 colmeias como matrizes para o fornecimento de larvas para a produção de rainhas. Para a seleção de colmeias para o fornecimento de machos foram eleitas as colônias com produções acima dos valores médios dos apiários e/ou com valores de z superiores a média acrescida de um desvio padrão. As inseminações instrumentais foram realizadas em um aparelho Schley que permite um grande intervalo de movimentos e possibilitou inseminar até 25 rainhas por dia. Os bancos de rainhas foram adaptados às abelhas africanizadas para obter sobrevivência das rainhas superior a 10 dias. 48 horas após a inseminação algumas rainhas foram dissecadas para verificar a migração dos espermatozoides para a espermateca. As rainhas foram introduzidas em colmeias 5 dias após a inseminação instrumental. Verificou-se que tais rainhas iniciaram a postura nos dias seguintes sem diferenças aparentes em relação as rainhas fecundadas naturalmente.

GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA

EFEITO DA TIBOLONA EM MULHERES DIABÉTICAS NA PÓS-MENOPAUSA

Ana Karla Monteiro Santana de Oliveira Freitas

Orientador: Prof. Dr. Rui Alberto Ferriani

Tese de Doutorado apresentada em 24/10/2006

Objetivo: avaliar a influência da terapia com tibolona no metabolismo dos carboidratos e lipídeos de pacientes na pós-menopausa portadoras de *diabetes mellitus* tipo 2.

Método: estudo prospectivo, longitudinal, aberto e controlado envolvendo 24 mulheres na pós-menopausa portadoras de *diabetes mellitus* tipo 2, com média de idade de $57,5 \pm 4,8$ anos, tratadas seqüencialmente com placebo (6 meses) e tibolona-2,5 mg/dia (6 meses). Parâmetros clínicos, antropométricos, bioquímicos, hormonais e ultrasonográficos foram avaliados no período basal, após 6 (tempo 1) e 12 meses

de acompanhamento (tempo 2). Análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA paramétricas repetidas, com nível de significância 5%.

Resultados: com os 6 meses de uso da tibolona, evidenciamos reduções significativas nos sintomas climatéricos avaliados através do índice de Blatt-Kuperman, assim como no percentual de gordura corporal, circunferência abdominal, pressão arterial diastólica, e níveis séricos de transaminases, triglicerídeos e HDL-colesterol. Não houve variações significativas nos níveis de glicose e insulina de jejum, hemoglo-

bina glicada, área sobre a curva da glicose, área sobre a curva da insulina, índice QUICKI, colesterol total e LDL colesterol. A avaliação ultra-sonográfica não revelou variações significativas do volume uterino e espessura endometrial. Efeitos colaterais surgiram apenas durante o primeiro mês de uso da tibolona (cefaléia e mastalgia em 8,3% e sangramento genital em 16,6%).

Conclusão: o tratamento com tibolona em curto prazo mostrou-se uma alternativa viável para pacientes na pós-menopausa portadoras de *diabetes mellitus* tipo 2.

REPERCUSSÕES TARDIAS DA RADIOTERAPIA SOBRE A FUNÇÃO PULMONAR EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA

Liana Barbaresco Gomide

Orientador: Prof.Dr. Francisco José Cândido dos Reis
Dissertação de Mestrado apresentada em 17/11/2006

A realização de radioterapia adjuvante no tratamento do câncer de mama está comumente associada com complicações pulmonares em curto prazo, mas é questionável se essas alterações podem estar presentes também ao longo do tempo. Este trabalho teve como objetivo avaliar, em mulheres que foram diagnosticadas com câncer de mama, o comportamento da função pulmonar e a presença de dispnéia 18 meses após o término da radioterapia. Para tanto, foi realizado um estudo caso-controle em um grupo de 40 voluntárias não tabagistas e sem doenças cardiorrespiratórias que foram divididas em: irradiadas e controle. No grupo irradiado foram incluídas pacientes que realizaram tratamento conservador para o câncer de mama e que receberam radioterapia adjuvante. No grupo controle participaram voluntárias saudáveis com características físicas, etárias e antropométricas semelhantes ao

grupo irradiado. Os parâmetros da função pulmonar como volumes (inclusive residual), capacidade vital forçada, fluxos expiratórios máximos e capacidade de difusão foram obtidos por meio do espirômetro GS Plus da Collins. O sintoma de dispnéia em pacientes irradiadas foi quantificado pela escala de dispnéia do Conselho Britânico de Pesquisas Médicas (MRC). As pacientes que realizaram radioterapia apresentaram valores de CPT, CV, CVF e VEF1 (em percentual do previsto) significativamente menores ($p < 0,05$) que os valores correspondentes obtidos pelas voluntárias controle. Observamos ainda, uma tendência dos parâmetros da função pulmonar diminuírem à medida que o grau de dispnéia aumentava. As pacientes com dispnéia grau 2, apresentaram valores de CV, CVF e VEF1 (em percentual do previsto) significativamente menores que as pacientes que não relataram dispnéia. A detecção de alterações da função pulmonar em fases tardias de pacientes submetidas à radioterapia reforça a necessidade de seguimento longitudinal prolongado pré e pós-procedimento.

DETERMINAÇÃO DO LIMIAR DE ANAEROBIOSE PELA ANÁLISE VISUAL GRÁFICA E PELO MODELO MATEMÁTICO DE REGRESSÃO LINEAR BI-SEGMENTADO DE HINKLEY EM MULHERES SAUDÁVEIS

Mali Naomi Higa

Orientador: Prof.Dr. Marcos Felipe Silva de Sá
Dissertação de Mestrado apresentada em 17/11/2006

O limiar de anaerobiose (LA) é definido como a intensidade de exercício físico em que a produção

de energia pelo metabolismo aeróbio é suplementada pelo metabolismo anaeróbio. Este índice constitui-se de um delimitador fisiológico de grande importância para o fornecimento de informações concernentes aos principais sistemas biológicos do organismo, os quais estão envolvidos na realização de um exercício físico.

O LA é um importante parâmetro de determinação da capacidade aeróbia funcional de um indivíduo. Diversos métodos são usados para estimar o LA durante exercício. Existem métodos invasivos, como a medida repetida da concentração de lactato sanguíneo; e métodos não-invasivos, por meio de análise de variáveis biológicas como medidas contínuas dos gases respiratórios, através da análise de mudança do padrão de resposta das variáveis ventilatórias e metabólicas, e também pela análise da mudança do padrão de resposta da frequência cardíaca (FC) frente a um exercício físico incremental. O objetivo deste estudo foi comparar e correlacionar o LA determinado por métodos não-invasivos de análise visual gráfica das variáveis ventilatórias e metabólicas, considerado como padrão-ouro neste estudo, e pelo modelo matemático de regressão linear bi-segmentado utilizando o algoritmo de Hinkley, aplicado a série de dados de FC (Hinkley – FC) e da produção de dióxido de carbono (VCO_2) (Hinkley - VCO_2).

Metodologia: Treze mulheres jovens ($24 \pm 2,63$ anos) e dezesseis mulheres na pós-menopausa ($57 \pm 4,79$ anos), saudáveis e sedentárias realizaram teste ergoespirométrico contínuo do tipo rampa em cicloergômetro (Quinton Corival 400), com incrementos de 10 a 20 Watts/min até a exaustão física. As variáveis ventilatórias e metabólicas foram captadas respiração a respiração (CPX-D, Medical Graphics), e a FC batimento a batimento (ECAFIX, ACTIVE-E). Os dados foram analisados por testes não paramétricos de Friedman, Mann-Whitney e correlação de Spearman. Nível de significância de $\alpha = 5\%$. Resultados: Os valores das variáveis potência (W), FC (bpm), consumo de oxigênio relativo (VO_2) (mL/kg/min), VO_2

absoluto (mL/min), VCO_2 (mL/min) e ventilação pulmonar (VE) (L/min) no LA não apresentaram diferenças significativas entre as metodologias ($p > 0,05$) nos dois grupos de mulheres estudadas. A análise de correlação dos valores de potência em W, FC em bpm, VO_2 em mL/kg/min, VO_2 em mL/min, VCO_2 em mL/min e E em L/min, entre o método padrão-ouro com o Hinkley – VCO_2 foram respectivamente: $r_s=0,75$; $r_s=0,57$; $r_s=0,48$; $r_s=0,66$; $r_s=0,47$ e $r_s=0,46$ no grupo jovem, e $r_s=-0,013$; $r_s=0,77$; $r_s=0,88$; $r_s=0,60$; $r_s=0,76$ e $r_s=0,80$ no grupo pós-menopausa. Os valores de correlação do método padrão-ouro com Hinkley – FC para as variáveis potência em W, FC em bpm, VO_2 em mL/kg/min, VO_2 em mL/min, VCO_2 em mL/min e VE em L/min, obtidas no LA foram respectivamente: $r_s=0,58$; $r_s=0,42$; $r_s=0,61$; $r_s=0,57$; $r_s=0,33$ e $r_s=0,39$ no grupo de jovens, e $r_s=0,14$; $r_s=0,87$; $r_s=0,76$; $r_s=0,52$; $r_s=0,33$ e $r_s=0,65$ no grupo pós-menopausa. O grupo pós-menopausa apresentou melhores valores de correlação em relação ao grupo de jovens, exceto para as variáveis potência e consumo de oxigênio absoluto (mL/min). Este fato pode estar relacionado a uma maior taxa de variação e magnitude das variáveis analisadas em indivíduos jovens em relação aos de meia-idade, sendo, desta forma, obtida melhor adequação do modelo matemático estudado em mulheres de meia idade.

Conclusão: O algoritmo matemático de Hinkley proposto para detectar a mudança no padrão de resposta da VCO_2 e da FC foi eficiente nos indivíduos de meia-idade, portanto, a metodologia matemática utilizada no presente estudo constitui-se de uma ferramenta promissora para detectar o LA em mulheres saudáveis, por ser um método semi-automatizado, não invasivo e objetivo na determinação do LA.

ESTUDO DA HIPERPROLACTINEMIA E MACROPROLACTINEMIA NO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E RELAÇÃO DE SEUS NÍVEIS COM A ATIVIDADE DA DOENÇA

Camila Toffoli Ribeiro

Orientador: Prof.Dr. Marcos Felipe Silva de Sá
Dissertação de Mestrado apresentada em 06/12/2006

Introdução: A prolactina (PRL) exerce efeitos imunoestimulatórios *in vitro* e *in vivo*, porém a literatura é controversa quanto ao papel deste hormônio na atividade do Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES). A macroprolactina possui menor atividade biológica *in vivo* e poderia explicar os resultados díspares.

Objetivos: avaliar a prevalência de hiperprolactinemia e macroprolactinemia em pacientes lúpicas; analisar a correlação entre a atividade do LES e PRL, e interferência da macroprolactina nesta associação.

Casística e Métodos: Em 73 mulheres com LES ativo foi dosada a PRL pelo Immulite 2000®, e a macroprolactina pelo método do Polietilenoglicol (momento 1); em 62 destas pacientes foi colhida uma segunda amostra com a menor atividade do LES ao longo do tratamento (momento 2). Os controles foram

29 mulheres hígdas no menacme (grupo C) e 34 gestantes no terceiro trimestre (grupo G).

Resultados: Houve 15 casos (20,55%) de hiperprolactinemia nas lúpicas, e nenhum entre as mulheres hígdas ($p = 0,005$). Todas as gestantes apresentaram hiperprolactinemia. A concentração de PRL foi maior (Med = 11,70 ng/ml) ($p = 0,01$) no LES do que no grupo C (Med = 8,81 ng/ml), e correlacionou-se com a atividade da doença pelo SLEDAI ($r = 0,41$; $p = 0,0003$) no momento 1. No LES muito ativo os níveis de PRL foram maiores do que na doença inativa (Med = 17,10 ng/ml vs. Med = 8,36 ng/ml) ($p < 0,01$), e moderadamente ativa (Med = 7,75 ng/ml) ($p < 0,05$). Dentre as lúpicas hiperprolactinêmicas, 04 casos

(26,7%) foram devidos à macroprolactina, e nas gestantes, 02 casos (5,9%). O LES foi tão ativo na macroprolactinemia quanto nos casos pela forma monomérica, porém a correlação entre PRL e SLEDAI foi maior para a PRL livre ($r = 0,44$; $p = 0,0001$). O tratamento das pacientes lúpicas hiperprolactinêmicas resultou em diminuição da concentração de PRL (Me momento 1 = 56,71 \pm 43,87 ng/ml vs. Me momento 2 = 18,68 \pm 24,20 ng/ml) ($p = 0,015$).

Conclusões: pacientes lúpicas apresentam hiperprolactinemia mais frequentemente do que mulheres hígdas, e a PRL correlaciona-se com a atividade do LES. A macroprolactinemia não é marcador de doença inativa/pouco ativa.

EFEITOS DO IMPLANTE CONTRACEPTIVO DE ETONOGESTREL SOBRE O SISTEMA HEMOSTÁTICO DE MULHERES HÍGDAS

Carolina Sales Vieira Macedo

Orientador: Prof.Dr. Marcos Felipe Silva de Sá
Tese de Doutorado apresentada em 21/12/2006

Introdução: Vários estudos têm sugerido que o risco para tromboembolismo venoso (TEV) é duas vezes maior com contraceptivos combinados que contêm progestagênios de terceira geração (gestodeno, desogestrel) comparados com aqueles com progestagênios de segunda geração (levonorgestrel). Dessa forma, o tipo de progestagênio associado ao estrogênio, e não só a dose deste último, tornou-se motivo de estudos sobre o papel dos progestagênios na hemostasia. Previamente, nós mostramos que o implante de etonogestrel (ENG) está associado à redução transitória da agregação plaquetária. No presente estudo, o objetivo foi avaliar o efeito do implante subdérmico de ENG sobre o sistema hemostático de mulheres hígdas, durante seis meses de tratamento.

Casuística e Métodos: Vinte mulheres saudáveis e voluntárias foram selecionadas neste estudo aberto, autocontrolado, longitudinal e prospectivo, para usar um implante contraceptivo subdérmico liberador de ENG (metabólito biologicamente ativo do desogestrel). Foram avaliadas as seguintes variáveis pré-inserção e após 1, 3 e 6 meses de uso: tempo de protrombina parcial ativada, tempo de trombina, tempo de protrombina, fatores de coagulação (fibrinogênio, II, V, VII, VIII, IX, X, XI), fator de von Willebrand,

anticoagulantes naturais (proteína C, proteína S livre, antitrombina), marcadores de antifibrinólise (PAI-1, $\alpha 2$ antiplasmina), dímeros D, complexo trombina-antitrombina (TAT- marcador de ativação da cascata de coagulação) e resistência à proteína C ativada. A análise estatística foi feita com testes de Friedman ou ANOVA para medidas repetidas.

Resultados: Houve uma redução da atividade da proteína C ($p < 0,01$), FII ($p = 0,02$), FVII ($p = 0,006$) e FX ($p = 0,01$) durante o tratamento. Observou-se também aumento das concentrações de PAI-1 ($p = 0,01$) e do fator de coagulação XI ($p = 0,006$). Todas essas alterações foram transitórias e dentro da normalidade dos ensaios. Além disso, não ocorreu desenvolvimento de resistência à proteína C ativada. Encontramos uma redução significativa de 55% das concentrações do complexo TAT em seis meses ($p < 0,001$), chegando a atingir valores abaixo do limite de normalidade, refletindo uma hipoativação da cascata de coagulação. As demais variáveis não foram afetadas pelo uso do implante.

Conclusão: Os resultados mostraram, pela primeira vez, que o uso do implante liberador de ENG está associado à hipoativação da cascata de coagulação e à ausência de resistência à proteína C. As demais mudanças foram transitórias e, provavelmente, sem importância clínica. É tentador especular que esse progestagênio, quando usado isoladamente, não tem risco aumentado para trombose.

IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

AVALIAÇÃO DA VACINA DNA-hsp65 NA INDUÇÃO DE AUTO-AGRESSÃO TECIDUAL

Deison Soares de Lima

Orientador: Prof.Dr. Célio Lopes Silva

Dissertação de Mestrado apresentada em 06/10/2006

Nos últimos anos nosso grupo vem estudando uma vacina gênica que codifica a proteína de choque térmico de 65kDa (Hsp65) de *Mycobacterium leprae*. Esta vacina (DNA-hsp65) tem apresentado eficácia tanto em modelos de profilaxia quanto de terapia contra a Tuberculose (TB) experimental.

No entanto, existe grande preocupação quanto ao risco de desenvolvimento de doenças auto-imunes decorrente do uso dessa vacina gênica em humanos. Tal preocupação se justifica pelo fato de que o próprio DNA bacteriano do vetor plasmideal age como fator imunoestimulatório, e principalmente porque as HSPs são filogeneticamente conservadas durante a evolução e estão presentes em células procarióticas e eucarióticas, mostrando alta homologia entre as espécies. Em razão disso, há diversos trabalhos na literatura sugerindo que as HSPs podem ter um papel na patogênese de doenças auto-imunes.

Desse modo, a possibilidade da vacina induzir auto-imunidade patológica baseia-se na hipótese do mimetismo molecular, sendo possível que a vacinação

com DNA-hsp65 induza a ativação de linfócitos capazes de reconhecer, por reatividade cruzada, a Hsp60 do próprio organismo, levando ao desenvolvimento de doenças auto-imunes. Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar se a vacina DNA-hsp65 induz ou não auto-agressão tecidual. Para isto, analisamos parâmetros imunológicos como produção de anticorpos anti-DNA, anti-Hsp65 e anti-Hsp60 além de analisarmos histologicamente 18 órgãos de animais vacinados com DNA-hsp65 e também de animais vacinados e infectados com *tuberculosis*.

Os resultados obtidos neste trabalho não evidenciaram a indução de qualquer quadro patológico auto-imune até 6 meses depois da última imunização. Não houve detecção de anticorpos anti-DNA, e embora tenha sido observada a produção de anticorpos anti-Hsp65 e anti-Hsp60, estes anticorpos não provocaram alterações teciduais, como observado nas análises histológicas dos órgãos estudados. Sendo assim, estes resultados nos permitem afirmar que apesar da alta homologia interespecie das proteínas HSPs, a vacina DNA-hsp65 não induziu auto-agressão tecidual em camundongos saudáveis ou infectados nos períodos de tempo analisados, sugerindo que ela possa ser segura para utilização em mamíferos superiores.

EFEITOS IMUNOTERAPÊUTICOS DA VACINA DNA-Hsp65 NA TUBERCULOSE EXPERIMENTAL MURINA DETERMINADOS POR “MICROARRAYS”

Carlos Rodrigo Zárate Bladés

Orientador: Prof.Dr. Célio Lopes Silva

Tese de Doutorado apresentada em 18/10/2006

“Microarrays” constituem uma ferramenta poderosa para o estudo da expressão gênica de milhares de genes ao mesmo tempo. Assim, esta “visão de amplo espectro” poderia ser especialmente útil para ampliar os conhecimentos no estudo de agentes tera-

pêuticos cujo mecanismo de ação não está bem determinado, como é o caso das vacinas de DNA. O nosso grupo de pesquisa demonstrou que a vacina gênica que codifica o gene da proteína de choque térmico de 65 kDa de *Mycobacterium leprae* (DNA-Hsp65), apresenta propriedades profilática e terapêutica na tuberculose (TB) experimental murina. A fim de se entender melhor os mecanismos moleculares que explicariam as propriedades terapêuticas da vaci-

na DNA-Hsp65, no presente estudo foi investigado o perfil de expressão gênica de camundongos tratados com DNA-Hsp65.

“Microarrays” foram preparados “in-house” empregando 4.500 clones de cDNA. Foi comparada a expressão gênica de amostras de pulmão de camundongos saudáveis (controles) com amostras de camundongos infectados e posteriormente tratados com DNA-Hsp65, ou infectados não tratados (grupos injetados com solução salina ou vetor). Os resultados dessas análises foram correlacionados com uma avaliação histopatológica e contagem das Unidades Formadoras de Colônias.

Os perfis de expressão gênica das amostras dos diferentes grupos foram analisados por clusterização. A análise de “bootstrap” mostrou que o perfil de expressão gênica das amostras dos animais infectados e não tratados com a vacina gênica (salina e vetor) são mais semelhantes entre si que o perfil apresentado nas amostras dos animais tratados com DNA-Hsp65 ou dos controles. Posteriormente, uma análise estatística dos “microarrays” através do programa SAM ($p < 0,05$) apontou 444 genes e 480 ESTs (do inglês “Expressed Sequence Tags”) diferencialmente expressos entre os grupos. Entre os genes de função conhecida, foram identificados vários cujas funções estão implicadas em diferentes processos como infla-

ção, remodelamento tecidual, apoptose, resposta da célula T e processamento antigênico. Dentre esses genes, alguns não haviam sido ainda correlacionados com resposta à TB ou à terapia com DNA. A confirmação da expressão desses genes foi realizada através de PCR em Tempo Real. Surpreendentemente, a comparação dos dados de expressão gênica com os resultados obtidos nos ensaios histopatológicos do pulmão revelou grande correlação.

Os dados indicam que os animais que recebem o tratamento com DNA-Hsp65 apresentam uma inibição da resposta de padrão Th2 o que possibilita a atuação da resposta Th1 necessária para o combate da infecção. Esta resposta em associação com vários outros fatores descritos no trabalho provoca a redução da inflamação, preservam a arquitetura pulmonar e diminuem o número de bacilos viáveis no pulmão, se comparados com os grupos que recebem salina ou vetor. Ressaltamos que este é o primeiro trabalho que mostra a utilidade do emprego dos “microarrays” no estudo dos mecanismos que são ativados/desativados durante a imunoterapia com uma vacina de DNA aplicada num modelo de uma doença humana.

Finalmente, sugerimos o termo “transcriptipo” como sinônimo de “assinatura de hibridação” ou “perfil do transcriptoma” para descrever resultados de experimentos de expressão gênica em larga escala.

OTIMIZAÇÃO DA VACINA DNA-Hsp65 PELA ESTRATÉGIA DE “PRIME-BOOST”

Eduardo Dantas Casillo Gonçalves

Orientador: Prof.Dr. Célio Lopes Silva

Tese de Doutorado apresentada em 19/10/2006

O aumento crescente do número de casos de tuberculose notificados no mundo revela um problema sério de saúde pública. Embora a tuberculose seja tratável com quimioterápicos e a vacina BCG tenha eficácia protetora na meningite tuberculosa e formas disseminadas desta infecção em criança, dificuldades associadas ao tratamento (cepas multi-droga resistentes e eficácia variável desta vacina em adultos) mostram a necessidade premente de uma nova estratégia vacinal para controle da tuberculose. Nesse contexto, a caracterização de uma nova estratégia vacinal que inclua o BCG é altamente desejável e promissora. Foi mostrado anteriormente que a vacina DNA-hsp65 apresentou elevada imunogenicidade e eficácia pro-

tetora em modelo experimental de tuberculose. Neste trabalho nós demonstramos que o esquema “prime-boost” empregando BCG por via intranasal como “prime”, seguido de um “boost” com DNA-hsp65 por via intramuscular (BCGin/DNA), desencadeou efeito profilático caracterizado por diminuição significativa do número de unidades formadoras de colônias em animais desafiados com *M. tuberculosis*. Além de ser significativamente mais imunogênica do que o BCG sozinho, a estratégia BCGin/DNA induziu níveis elevados de IFN- γ , IL-12 e TNF- α nos pulmões dos animais 30 e 70 dias após o desafio. No grupo BCGin/DNA também foi constatado aumento na frequência de células CD4⁺ e CD8⁺ efetoras e de memória significativamente maior do que nos demais grupos. Essa resposta resultou na preservação do parênquima pulmonar com poucos focos granulomatosos isolados. Verificamos também que a transferência de células

dendríticas linfóides (CD11c⁺CD8⁺), purificadas de animais imunizados pela estratégia BCGin/DNA, para animais normais resultou em proteção quando os mesmos foram infectados com *M. tuberculosis*, ressaltando, desta forma, a contribuição dessas células na resposta imune contra a tuberculose. Outras combinações de BCG por via intranasal ou subcutânea com a vacina de DNA-hsp65 foram investigadas, entretanto os resultados observados foram menos signifi-

cativos do que os referentes ao protocolo BCGin/DNA.

Nossos resultados mostram, portanto, que a imunização prévia com BCG seguida de um reforço com a vacina DNA-hsp65 resultou em maior imunogenicidade e maior eficácia protetora, em comparação com BCG ou DNA-hsp65 administradas de forma individual, sugerindo que esta estratégia é altamente promissora na profilaxia da tuberculose.

MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE POR CÉLULAS T REGULADORAS NA INFEÇÃO POR *Trypanosoma cruzi*

Flávia Sammartino Mariano

Orientador: Prof. Dr. João Santana da Silva

Dissertação de Mestrado apresentada em 20/10/2006

Pacientes infectados por *Trypanosoma cruzi* não são capazes de eliminar os parasitas por completo, isto é, não há imunidade esterilizante. A manutenção do estado de latência, embora possa ser benéfica ao hospedeiro, diminuindo a possibilidade de lesão e mantendo a imunidade à re-infecção, permite a reativação da doença em várias situações por manter o reservatório do patógeno. Os dados obtidos em nosso laboratório apontam para a participação de células T CD4⁺CD25⁺ reguladoras (Tregs), na fisiopatogenia da infecção por *T. cruzi*. Assim sendo, para investigarmos o papel de linfócitos CD25⁺ e GITR⁺ na resistência, suscetibilidade e indução de patologia em animais infectados por *T. cruzi*, tratamos animais com anti-GITR ou anti-CD25 seguindo dois protocolos experimentais. No primeiro, inoculamos os anticorpos antes e durante a infecção e no segundo, os anticorpos foram inoculados somente antes a infecção com parasita. O grupo tratado com anti-GITR antes e durante a infecção apresentou caquexia e elevada miocardite

composta de intensa presença de células T CD4⁺, CD8⁺, IFN- γ ⁺ e CCR5⁺ quando comparados aos demais grupos. Valores reduzidos de NO foram detectados no soro desses animais, o que sugere que as células inflamatórias estivessem anérgicas. No entanto, no segundo protocolo, o tratamento com anti-GITR ou anti-CD25 apenas antes da infecção resultou em maior mortalidade de animais de ambos os grupos, porém apenas os que receberam anti-GITR tiveram maiores níveis de parasitemia. Além disso, estes apresentaram o desenvolvimento de intensa miocardite, com presença de células T CD4⁺, CD8⁺ e CCR5⁺. No entanto, altos níveis de NO no soro foram detectados após tratamento com anti-GITR, contrastando com elevada presença de parasitas no tecido cardíaco desses animais. Ademais, baixos níveis de IL-10, TGF- β , IFN- γ e IL-12 foram observados em ambos os grupos tratados com anti-GITR e anti-CD25 quando comparados com os controles. Os resultados sugerem um papel indispensável da presença das Tregs efetoras durante a infecção por *T. cruzi*, pois a ausência da atividade supressora, exercida por essas células, leva a uma intensa resposta imune causando a morte do hospedeiro.

ESTUDO SOBRE A PATOGÊNESE DA SÍNDROME PULMONAR E CARDIOVASCULAR POR HANTAVIRUS E SUA ASSOCIAÇÃO COM POLIMORFISMOS GENÉTICOS

Alessandra Abel Borges

Orientador: Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo

Tese de Doutorado apresentada em 08/11/2006

Este trabalho teve como objetivo investigar aspectos da patogênese da Síndrome Pulmonar e Cardiovascular por Hantavirus (SPCVH) e a sua associa-

ção com polimorfismos em genes codificadores de proteínas envolvidas na resposta imune. Estudou-se um total de 27 pacientes com a síndrome. Foram quantificados mediadores pró- e anti-inflamatórios em amostras séricas de indivíduos acometidos pela SPCVH. Encontrou-se níveis séricos elevados de TNF- α , TNF- β , IL-6, IFN- γ , IL-12, IL-10 e de IL-2R, estes foram associados com a hemoconcentração e a hipotensão, nos pacientes com SPCVH. A polarização da resposta imune contra hantavírus parece ser para padrão TH1. Os níveis da citocina supressora, TGF- β estavam diminuídos nos pacientes com a SPCVH, sugerindo que ocorra uma inibição na produção desta citocina durante a infecção por hantavírus. Assim, citocinas da resposta inata e de padrão TH1 tem papel importante na patogênese da SPCVH. A infecção por hantavirus pode inibir a secreção de TGF- β e este

poderia ser um dos mecanismos responsáveis pela resposta imune exacerbada que ocorre na SPCVH.

Ainda, neste trabalho foram determinados os polimorfismos nos genes codificadores de HLA, Antígenos Plaquetários Humanos (HPA) e citocinas, nos pacientes com a SPCVH. As frequências dos alelos HLA-A*80, HLA-B*38, HLA-B*78 e HLA-Cw*03 estavam aumentadas nos indivíduos com SPCVH quando comparadas com as da população, sugerindo um fator de risco para a doença. Também, o alelo TNF-2, determinante da hipersecreção do TNF- α , foi encontrado de estar presente em maior frequência nos indivíduos que desenvolveram a SPCVH do que em indivíduos que tiveram infecção pregressa por hantavírus sem história clínica da doença, sugerindo que este alelo possa estar envolvido no desenvolvimento da doença.

O PAPEL DAS CELULAS T CD4⁺ E CD8⁺ NO MECANISMO DE INDUÇÃO E MANUTENÇÃO DA PROTEÇÃO A *Paracoccidioides brasiliensis*

Marcelo de Souza Fernandes Pereira

Orientador: Prof.Dr. João Santana da Silva

Dissertação de Mestrado apresentada em 14/11/2006

Paracoccidioides brasiliensis é o fungo causador da paracoccidioidomicose, uma micose endêmica na América Latina. A resposta imune celular contra *P. brasiliensis* é importante na defesa do hospedeiro contra esse fungo. O papel dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ durante a resposta primária e secundária não é conhecido, embora sabe-se que são fundamentais para a formação do granuloma. Neste estudo avaliou-se o papel de células T CD4⁺ e T CD8⁺ durante uma infecção primária e secundária por *Paracoccidioides brasiliensis*. Para tal, avaliou-se a carga fúngica e a mortalidade de camundongos geneticamente normais (C57BL/6-WT) e geneticamente deficientes de MHCII (CK4KO) e de β_2 microglobulinas (CD8KO). A ausência de linfócitos T CD4⁺ resultou em maior susceptibilidade à infecção, visto que camundongos CD4KO apresentaram maior taxa de mortalidade do que a observada em animais WT e CD8KO, além de maior disseminação fúngica para baço e fígado. Em relação à produção de citocinas, os animais CD4KO falharam em produzir IFN- γ , porém, produziram grande quantidade de IL-4. Esses animais também apresentaram menor produção de anticorpos contra antígenos do fungo. Em contrapartida, camundongos

CD8KO secretaram altas quantidades de IFN- γ e TNF- α . Com o intuito de entender o papel de células T CD4⁺ e T CD8⁺ na indução e manutenção da imunidade, os animais foram inoculados com leveduras de Pb265 (cepa avirulenta), e após 30 dias, desafiados com a cepa virulenta (Pb18). Animais CD4KO, quando desafiados, apresentaram maior resistência à infecção por Pb, com redução na UFC e da taxa de mortalidade, quando comparado aos animais não-imunizados, durante 30 dias após o desafio. Entretanto, aos 60 dias esses animais apresentaram aumento na carga fúngica no pulmão, baço e fígado. Por outro lado camundongos CD8KO apresentaram altas quantidades de leveduras no baço e fígado após 30 e 60 dias de infecção. Ao analisar a produção de citocinas após a imunização, observou-se que, camundongos CD4KO e CD8KO apresentaram redução significativa em todas citocinas analisadas. Os animais selvagens imunizados são mais resistentes à infecção por *P. brasiliensis* quando comparados com os animais não imunizados (WT), com pequena quantidade de UFC recuperada dos órgãos aos 60 dias de infecção, além de produzirem grande quantidades de TNF- α , IL-4 e IL-10. Nossos resultados mostraram que é de fundamental importância a atuação sinérgica das células T CD4⁺ e CD8⁺ para a efetuação de uma resposta protetora de longa duração contra *Paracoccidioides brasiliensis*.

DIFERENTES ESTRATÉGIAS VACINAIS NA PROTEÇÃO CONTRA TUBERCULOSE

Patrícia Rodrigues Marques de Souza

Orientador: Prof.Dr. Célio Lopes Silva

Dissertação de Mestrado apresentada em 01/12/2006

O número crescente de casas de tuberculose (TB) revela a situação alarmante dessa doença. As estatísticas mostram que a TB permanece como uma das maiores causas de mortalidade devido a doenças infecciosas no mundo. Apesar da vacina de uso corrente, BCG, proteger contra as formas mais graves de TB durante a infância e TB extrapulmonar, a eficácia da mesma pode variar de 0 a 80% dependendo da população estudada. Diante desse quadro em que se encontra a população mundial perante à TB, somado às dificuldades das estratégias de controle, a otimização de recursos preventivos e terapêuticos para essa doença torna-se imprescindível. A vacina gênica DNA-Hsp65 descrita pelo nosso grupo tem mostrado propriedades profiláticas e terapêuticas contra a TB experimental quando administrada na forma de solução salina (DNA nu) por via intramuscular em quatro doses de 100 µg cada uma. O presente trabalho teve como objetivo a otimização dessa vacina visando seu uso clínico. Assim, foram utilizadas formulações baseadas em sistemas de liberação controlada como os lipossomas e as microesferas, bem como estratégias de “prime-boost”. Observamos que independentemente das estratégias vacinais utilizadas, houve um aumento significativo das citocinas IL-12 e IFN- γ quando os ani-

mais imunizados com as formulações citadas foram desafiados subseqüentemente com *M. tuberculosis*, assim como a diminuição de IL-4 e IL-10, indicando um perfil de resposta Th1 associado com uma resposta efetiva contra a infecção por *M. tuberculosis*. Observamos também a diminuição significativa do número de unidades formadoras de colônias em todos os grupos experimentais. Além disso, é importante ressaltar que o estudo histopatológico, incluindo a análise morfométrica, revelou a preservação do parênquima pulmonar e redução do infiltrado inflamatório nos grupos imunizados com as diferentes formulações. Dessa forma, as novas estratégias vacinais empregadas neste trabalho demonstram otimização da utilização de nossa vacina de DNA, uma vez que permitem reduzir a quantidade de DNA inoculado e o número de doses administradas mantendo a mesma eficácia protetora obtida com o DNA nu. Dentre essas, a formulação empregando lipossomas parece ser a mais promissora das estratégias, pois utiliza menor quantidade de DNA, seus componentes são de fácil acesso e já estão liberados para uso em humanos. No entanto, como a formulação baseada na utilização de microesferas utiliza estruturas que liberam o antígeno por um período mais prolongado do que os lipossomas, deve-se considerar a possibilidade delas ativarem uma resposta imune mais duradoura. Finalmente, esses resultados abrem perspectivas promissoras de utilização dessas estratégias para o uso clínico dessa vacina.

NEUROLOGIA

AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES TRANSITÓRIAS NO PARÊNQUIMA CEREBRAL, DECORRENTES DE CRISE EPILÉPTICA, ATRAVÉS DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA

Gustavo Novelino Simão

Orientador: Prof.Dr. Antonio Carlos dos Santos

Tese de Doutorado apresentada em 06/10/2006

O objetivo deste estudo foi investigar imagens pós-ictais em ressonância magnética com técnicas

estruturais e quantitativas, incluindo o coeficiente de difusão aparente, o tempo de relaxação T2 e a taxa de transferência de magnetização em pacientes com epilepsia focal, na tentativa de detectar alterações transitórias cerebrais, decorrentes de uma única crise epilética. Estes métodos foram utilizados para examinar

e comparar o cérebro de 17 pacientes com epilepsia focal nos períodos pós-ictal e intercrítico. O teste estatístico utilizado comparou o coeficiente de difusão aparente, o tempo de relaxação T2 e a taxa de transferência de magnetização dos pacientes nos períodos pós-ictal e intercrítico. Diferentes áreas foram comparadas. O local do foco epiléptico e áreas remotas, incluindo o tálamo, o esplênio do corpo caloso e a área de hiperperfusão observada no exame de SPECT pós-ictal. A análise estatística evidenciou uma redução sig-

nificativa do coeficiente de difusão aparente no local de provável origem das crises epilépticas, mas não com os outros métodos. Não foram observadas alterações significativas no coeficiente de difusão aparente, no tempo de relaxação T2 e na taxa de transferência de magnetização nas regiões remotas. A redução na difusibilidade provavelmente reflete o edema celular na região de início da crise epiléptica. Nossos resultados demonstram que a difusão da água pode ser alterada após uma única crise na região do foco epiléptico.

AVALIAÇÃO QUALITATIVA DO LÚPUS NEUROPSIQUIÁTRICO POR RESONÂNCIA MAGNÉTICA

Tatiana Cruz Braga

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos dos Santos

Dissertação de Mestrado apresentada em 20/10/2006

Objetivo: O acometimento do sistema nervoso central no lúpus eritematoso sistêmico é comum, sendo denominado lúpus neuropsiquiátrico (LNP). Suas manifestações podem incluir psicose, distúrbios cognitivos e do humor, ansiedade, estado confusional agudo, crises epilépticas, cefaléia, doença cerebrovascular, meningite asséptica, mielopatias, síndrome de Guillan-Barré, síndromes desmielinizantes centrais e coréia, além de alterações periféricas como plexopatias, mono e polineuropatias, distúrbios autonômicos e miastenia. Neste estudo foram avaliadas as alterações encefálicas relacionadas com as manifestações citadas através de imagens por ressonância magnética (RM).

Pacientes e métodos: A casuística incluiu 32 pacientes do sexo feminino e 1 do sexo masculino, selecionados por apresentarem critérios clínicos para LNP e exames de RM com boa qualidade, livres de artefatos de movimento. Os pacientes foram avaliados em aparelho de RM de 1,5 Tesla com seqüências e protocolo específicos para avaliação do lúpus.

Resultados: Encontramos 5 exames normais (16,5%), 8 com alterações multifocais discretas da substância branca (24,2%), com ou sem atrofia discreta, 8 com atrofia e lesões de aspecto vasculítico na angiografia por RM (24,2%) e 12 com infartos (36,4%), sendo 6 corticais, 5 lacunares e 1 misto. A angiografia foi fundamental no diagnóstico de mais de um terço dos casos. A seqüência de difusão ajudou nos casos de infartos agudos. A seqüência FLAIR foi a mais sensível para lesões da substância branca e a seqüência T2 * evidenciou calcificações em núcleos da base em duas pacientes. Nenhum paciente apresentou reforço patológico após a infusão do contraste.

Conclusão: Nossos achados são compatíveis com relatos anteriores da literatura com maior incidência de alterações, atribuído ao nosso viés de seleção, incluindo apenas pacientes com sinais de envolvimento do SNC. Com este trabalho foi possível ter uma visão geral da distribuição de lesões no LNP e definir a contribuição relativa das seqüências de RM a fim de se compor um protocolo de estudo para a doença. É importante notar que as alterações da imagem muitas vezes são sutis, restritas a discretas alterações focais da substância branca ou atrofia incipiente.

ANÁLISE NEUROETOLÓGICA DE CRISES EPILÉPTICAS EM PACIENTES COM EPILEPSIA DE LOBO TEMPORAL E ESCLEROSE MESIAL TEMPORAL UNILATERAL

Maria Luiza Cleto Dal Col

Orientador: Prof. Dr. Norberto Garcia Cairasco

Tese de Doutorado apresentada em 23/10/2006

A Epilepsia de Lobo Temporal (ELT) é a síndrome epiléptica mais comum na população. Cerca de 50% dos casos de ELT são farmacorresistentes, e

a ressecção de lobo temporal leva a 60 a 80% de remissão das crises, e 10 a 20% de melhora significativa. A semiologia é uma importante ferramenta no estudo e diagnóstico das epilepsias.

Objetivo: Padronizar a neuroetologia e expressão em fluxogramas para crises em pacientes com ELT (Experimento I; EI) e comparar os padrões comportamentais apresentados por pacientes com ELT direito (ELTD) e esquerdo (ELTE; Experimento II; EII).

Metodologia: Para isso foram utilizados vídeos de crises de pacientes monitorados no CIREP-FMRP-USP (Comissão de Ética, processo 782/98). EI: 44 crises de 8 pacientes com ELT e esclerose mesial temporal (EMT); farmacoresistência; previamente à ressecção de lobo temporal; Engel I (somente aura; exceto uma paciente). EII: Oitenta crises de 40 pacientes (20 ELTE e 20 ELTD). Critérios de seleção: mesmos de EI, não ter patologia dual (exceto 2 casos de neurocisticercose verificados posteriormente, por problemas referentes ao prontuário) e apresentar apenas descargas interictais unilaterais ipsilaterais ao foco das crises. Os vídeos foram capturados e digitalizados, um glossário comportamental criado, os vídeos observados e todos os comportamentos registrados segundo-a-segundo. Os dados foram analisados usando o programa *Ethomatic* e apresentados em fluxogramas (frequência, duração e interação estatística sequencial dos ítems comportamentais).

Resultados: Foram corroborados dados da literatura como auras, valor lateralizatório contralateral da distonia e versão unilaterais, alteração de consciência e linguagem e o valor lateralizatório ipsilateral de coçar a face (*face wiping*), além da associação entre pares de comportamentos altamente significativos, novos na literatura. De maneira geral a fase pré-ictal foi semelhante em ambos os grupos (E+D), com despertar e aura. Durante a crise, E+D apresentaram sugestão de aura epigástrica, e em ELTD, aura de dor de cabeça. ELTE apresentou fala desconexa no início da crise. Foram encontradas diversas interações en-

tre automatismos de boca e membros, e em alguns casos com distonia ou comportamentos clônicos. A distonia foi contralateral ao foco em ELTE, mas ocorreu tanto contra quanto ipsilateral em ELTD. Não existiram interações diretas entre distonia e comportamentos tônicos ou clônicos. Em E+D o relaxamento do membro superior contralateral ao foco esteve relacionado ao fim da crise. No pós-ictal verificam-se automatismos de membros superiores e coçar a face ipsilateral ao foco em E+D. Como não foram encontradas interações entre distonias e comportamentos tônicos ou clônicos (generalização secundária; GS) nos fluxogramas do período ictal, foram analisadas 91 crises de 55 pacientes, sendo Grupo I) várias crises por paciente (8 pacientes e 44 crises) ou Grupo II) uma crise por paciente (47 pacientes e crises), para verificar se existe um antagonismo entre a presença de distonia e GS. O Spearman Rank Sum Test evidenciou um Coeficiente de Correlação negativo altamente significativo para ambos os grupos ($r=-0,543$, $p=0,00245$; e $r=-0,571$, $p<0,001$). Não foi encontrada diferença no Student's T Test ou Mann-Whitney Rank Sum Test na análise das latências para o primeiro comportamento tônico e/ou clônico ($p=0,298$) e para a crise tônica e/ou clônica generalizada ($p=0,382$). Também não foi encontrada diferença no tempo total da crise

Conclusão: A Neuroetologia apresentou grande potencial para o estudo semiológico da epilepsia humana. A metodologia foi eficiente para corroborar a literatura e detectar algumas interações ou ausências de interações interessantes durante as crises. O estudo teve um papel importante na validação e padronização da metodologia para epilepsia humana, possibilitando o desenvolvimento de trabalhos clínicos, incluindo a correlação com outros métodos de diagnóstico (EEG, ressonância e SPECT). Verificamos ainda que a distonia e generalização secundária apresentam um padrão antagônico de ocorrência, podendo sugerir que a distonia seja a expressão da ativação de um circuito anticonvulsivante endógeno.

SÍNDROME DE PUSHER EM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO TERCIÁRIO: INCIDÊNCIA, AVALIAÇÃO FUNCIONAL PROSPECTIVA E SUA CORRELAÇÃO COM DADOS DE NEUROIMAGEM ESTRUTURAL

Taiza Elaine G. dos Santos Pontelli
Orientador: Prof.Dr. João Pereira Leite
Tese de Doutorado apresentada em 18/12/2006

Introdução: A Síndrome de Pusher (SP) caracteriza-se por uma alteração de controle postural observada em pacientes com lesões encefálicas e

hemiparesia que apresentam uma inclinação do corpo no plano frontal para o lado parético, empurram-se ativamente para o mesmo lado e resistem à correção passiva da postura. Apesar de ter sido descrita há mais de 20 anos, vários aspectos desta síndrome ainda não estão completamente elucidados.

Objetivos: Identificar a ocorrência da SP em pacientes com lesão encefálica aguda internados em hospital universitário terciário assim como suas características clínicas e fatores funcionais; avaliar o tempo de recuperação dos sintomas da SP e sua relação com outros déficits neurológicos; identificar as estruturas encefálicas envolvidas na SP; avaliar a função dos canais semicirculares horizontais em pacientes com esta condição.

Material e métodos: Prospectivamente, identificamos pacientes com SP internados na Enfermaria de Neurologia UE-HCFMRP-USP durante o período de 3,5 anos. Os pacientes foram submetidos à avaliação neurológica clínica e neuropsicológica, escala de gravidade da doença através da *National Institute of Health Stroke Scale* (NIHSS) ou Escore de Trauma Revisado (*Revised Trauma Score-RTS*), análise da função de vida diária através do Índice de Barthel (IB), *Scale for Contraversive Pushing* (SCP) e análise das imagens estruturais de encéfalo. Para analisar a função dos canais semicirculares laterais, avaliamos 9 pacientes com acidente vascular cerebral (AVC) e SP através das provas calórica e rotatória.

Resultados: Encontramos 31 pacientes com a SP (SCP média=5,81±0,4), idade média de 67,4±11,89 anos, 25 pacientes com diagnóstico de AVC, 5 com TCE e 1 com sangramento de metástase cerebral. A pontuação média NIHSS foi de 18,24±4,9 e do RTS de 6,66±0,86 com IB médio inicial de 1,77±4,75 e final de 40,56±25,3. A hemianopsia estava presente em 64,5% dos pacientes, hipoestesia em 61,3%, disfagia

em 100%, heminegligência em 35,5% e anosognosia em apenas 2 dos pacientes avaliados. O tempo mediano de permanência da SP foi de 53 dias. Não houve correlação dos déficits neurológicos com o prognóstico da SP. Os pacientes com TCE apresentaram sintomas mais leves e melhor prognóstico da SP que os pacientes com AVC. A gravidade da SP influenciou no seu prognóstico. O território vascular da artéria cerebral média é predominantemente acometido nos pacientes com SP causada por AVC isquêmico. A frequência de lesão talâmica e parietal posterior foi maior nos pacientes com SP. Não foram observadas correlações dos desvios de linha média (DLM) e do volume do AVC hemorrágico com a gravidade e prognóstico da SP. Na prova calórica, foram encontrados três pacientes que apresentaram preponderância direcional (PD) e dois pacientes com predomínio labiríntico (PL). Na prova rotatória, foram observados quatro pacientes com PD na análise de velocidade da componente lenta. Não houve correlação da PD e PL com a gravidade e prognóstico da SP.

Conclusões: 1) A frequência relativa da SP na Enfermaria de Neurologia-UE-HCFMRP-USP é de 1,5%; 2) SP ocorre em diversas etiologias; 3) o tempo de permanência dos sintomas da SP pode exceder 2 anos; 4) pacientes com TCE apresentam sintomas da SP mais leves e melhor prognóstico desta condição que pacientes com AVC; 5) a idade, lado da lesão, presença de lesão encefálica prévia, alteração de sensibilidade, hemianopsia e anosognosia não influenciam o tempo de permanência dos sintomas da SP; 6) a gravidade dos sintomas da SP influencia seu prognóstico; 7) os DLM influenciam a gravidade do AVC; 8) os DLM e o volume do AVC hemorrágico não influenciam a gravidade dos sintomas da SP nem seu prognóstico; 9) a disfunção dos canais semicirculares horizontais não parece ser fundamental para a expressão da SP.

OFTALMOLOGIA, OTORRINOLARINGOLOGIA E CIRURGIA DA CABEÇA E PESCOÇO

AVALIAÇÃO BIOMECÂNICA E MICROBIOLÓGICA DE ESCLERAS HUMANAS PRESERVADAS EM GLICERINA

Tarciso Schirmbeck

Orientador: Prof. Dr. Antonio Augusto Velasco e Cruz
Tese de Doutorado apresentada em 23/10/2006

O emprego de tecido escleral humano tem-se tornado bastante rotineiro na oftalmologia atual. Vários procedimentos cirúrgicos como a reparação de

afilamento escleral, a reconstrução palpebral, a enucleação e o implante de válvulas em glaucoma utilizam segmentos esclerais para a obtenção de um resultado mais apropriado. A preservação de escleras visa disponibilizar tecidos que mantenham sua integridade estrutural e não transmitam patologias ao receptor. Este estudo objetivou avaliar a qualidade da preservação do tecido escleral em glicerina sob refrigeração entre 4 e 8 ° C. Foram utilizadas 114 escleras distribuídas em seis grupos conforme o tempo de preservação - 0, 7, 15, 30, 90 e 180 dias. Cada grupo foi analisado quanto à contaminação por bactérias e fungos, pesquisada em cultura nos meios tioglicolato e Sabouraud; quanto à preservação estrutural através da avaliação histológica com as colorações hematoxilina-eosina (HE) e tricrômio de Mallory; e quanto às características mecânicas de rigidez e alongamento por meio de testes de tração. Os resultados do estudo microbiológico não revelaram isolamento fúngico em

nenhuma amostra; mas houve crescimento bacteriano nas amostras não preservadas (*Staphylococcus coagulase negativo* e *Acinetobacter baumannii/haemolyticus*), e nas amostras com 7 dias de armazenamento (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus coagulase negativo*). A partir de 15 dias de preservação, não houve crescimento bacteriano. A avaliação microscópica revelou a manutenção da arquitetura histológica do tecido escleral em todos os tempos de preservação, não havendo degenerações nas fibras colágenas. A partir de 90 dias de preservação, o tecido apresentou elevação da resistência mecânica e diminuição da elasticidade ($p < 0,0001$). Conclui-se que a preservação da esclera em glicerina é um método eficiente para manter a integridade estrutural, resultando num tecido com maior rigidez e menor elasticidade, e livre de contaminação fúngica e bacteriana após 15 dias de armazenamento.

ESTUDO DE PACIENTES COM RETINOPATIA DIABÉTICA NÃO-PROLIFERATIVA SUBMETIDOS À FOTOCOAGULAÇÃO A LASER PELO MÉTODO DO ETDRS VERSUS ANEL PERIFÉRICO

Luis Antonio Demarco

Orientador: Prof. Dr. Nivaldo Vieira de Souza

Dissertação de Mestrado apresentada em 26/10/2006

Objetivo: Comparar os resultados do edema macular de pacientes com retinopatia diabética não-proliferativa submetidos à fotocoagulação a LASER pelo método de ETDRS versus anel periférico.

Métodos: Cem olhos de cinquenta pacientes foram submetidos à fotocoagulação. Um olho de cada paciente foi randomizado para receber ETDRS e o outro para a receber anel periférico. O acompanhamento foi realizado a cada três meses. Foram observados os efeitos da fotocoagulação no edema macular

e na acuidade visual. O campo visual não foi avaliado.

Resultados: Os dois métodos, anel periférico e ETDRS, quando comparados, apresentaram-se bastante concordantes, particularmente para o edema macular e acuidade visual. Não foram encontradas diferenças que favorecessem um ou outro grupo com relação à acuidade visual.

Conclusão: Os resultados demonstraram que ambos os métodos são efetivos na redução do edema macular não apresentando diferenças significativas entre eles. O tratamento focal aumenta a chance de melhora da acuidade visual. Contudo, o método anel externo pode ser uma alternativa segura para iniciar o tratamento precoce em pacientes com retinopatia diabética não-proliferativa leve e moderada.

AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA FUNDAMENTAL E DA ATIVIDADE ELETROFISIOLÓGICA DO RETALHO DE PREGA VESTIBULAR UTILIZADO NA RECONSTRUÇÃO LARÍNGEA PÓS-CORDECTOMIA

Hilton Marcos Alves Ricz

Orientador: Prof. Dr. Rui C. M. Mamede

Tese de Doutorado apresentada em 30/10/2006

O uso da corpectomia por laringofissura é uma opção para tratamento de tumores glóticos iniciais, e o retalho de prega vestibular, uma opção para recons-

trução glótica. A prega vestibular posicionada no nível glótico assume a função fonatória, no entanto, pouco se sabe como esta estrutura contribui com a anatomofisiologia laríngea após a cirurgia. O propósito deste estudo foi avaliar a frequência fundamental obtida durante a emissão sonora e a atividade eletrofisiológica dos músculos laríngeos em pacientes submetidos à laringofissura e cordectomia por carcinoma espinocelular de região glótica e que tiveram a laringe reconstruída com retalho de prega vestibular.

Foram avaliados 12 indivíduos operados pela técnica citada, todos do sexo masculino, com idade variando de 53 a 82 anos, média de 67,1 anos. Os participantes foram submetidos à análise acústica da voz para obtenção da frequência fundamental (Fo) e à eletromiografia laríngea, onde, por meio da inserção de eletrodo-agulha, avaliou-se a atividade eletrofisiológica das fibras do músculo tireoaritenóideo, na prega vocal remanescente e no retalho de prega vestibular, e do músculo cricotireóideo, do lado operado e não operado. O músculo tireoaritenóideo foi avaliado com a introdução do eletrodo-agulha através da cartilagem tireóide e da membrana cricotireóidea. Foram consideradas as atividades de inserção da agulha e as ati-

vidades espontâneas, durante o repouso muscular, e o padrão de recrutamento das unidades motoras, bem como as características morfológicas dos potenciais de ação, durante a emissão sonora.

Verificou-se que a Fo média foi de 151,7 hertz, e ela não se mostrou diferente com relação ao tamanho da área de ressecção tumoral, e quando o intervalo entre o ato cirúrgico e a avaliação foi maior ou menor que 36 meses. Identificou-se, por eletromiografia, a presença de musculatura no retalho, em 70% dos casos avaliados, e em todos esses havia recrutamento à emissão sonora. Não foram observadas lesões neurogênicas nos músculos examinados, exceto em um paciente que apresentou evidências de lesão crônica, na avaliação do músculo presente no retalho de prega vestibular.

Concluiu-se que a reconstrução foi capaz de preservar a frequência fundamental fisiológica, e evidenciou-se pela eletromiografia, que o retalho contém musculatura e que essa apresenta recrutamento de unidades motoras, durante a emissão sonora, sendo que, em um paciente, os potenciais de ação dessas unidades motoras mostraram-se alterados, sem, no entanto, afetar a função.

FREQÜÊNCIA DE HIPERTENSÃO OCULAR E GLAUCOMA EM PACIENTES COM ORBITOPATIA DE GRAVES E ANÁLISE DE MARCADORES DE SUSCETIBILIDADE GENÉTICA NOS SUBTIPOS DA ORBITOPATIA DE GRAVES

Fabrizio Leon Mascaro da Silva

Orientadora: Profa.Dra. Maria de Lourdes Veronese Rodrigues

Tese de Doutorado apresentada em 15/12/2006

Objetivos do estudo: determinar a frequência de hipertensão ocular e glaucoma nos pacientes com orbitopatia de Graves e avaliar a presença de marcadores de suscetibilidade genética nos subtipos da OG em uma amostra desses pacientes.

Métodos: foram avaliados 107 pacientes com diagnóstico de orbitopatia de Graves, acompanhados no setor de Oculoplástica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, através de tonometria de aplanção, campimetria visual computadorizada (Humphrey 30-2, Full Threshold) e análise e documentação fotográfica do nervo óptico. Os pacientes considerados suspeitos foram reavaliados 1 ano após, para confirmação ou exclusão diagnóstica. Em

38 pacientes, selecionados aleatoriamente, foram colhidas amostras de sangue periférico para análise de alelos de histocompatibilidade de classe II, e realizada análise tomográfica quantitativa para classificação dos pacientes em subtipos miogênico e não miogênico.

Resultados: foi observada prevalência de hipertensão ocular de 3,74% (4 pacientes) e de glaucoma de 2,80% (3 pacientes). O alelo HLA DRB1*16 foi mais frequente no subtipo miogênico ($p=0,0008$; $pc=0,027$; *odds ratio*: 9,76), em comparação com grupo controle.

Conclusões: observou-se frequência semelhante de HIO e glaucoma nos pacientes com orbitopatia de Graves à observada na população geral. Porém, quando se considerou apenas pacientes com idade superior a 40 anos de idade, a frequência observada foi maior do que na população geral. A presença do alelo HLA DRB1*16 esteve associado à predisposição ao subtipo miogênico da OG.

ANÁLISE DO EFEITO CITOPROTETOR DA AMIFOSTINA NA ORELHA INTERNA IRRADIADA DE PORCOS DA ÍNDIA: ESTUDO EXPERIMENTAL

Ricardo Miranda Lessa

Orientador: Prof. Dr. José Antonio A. de Oliveira
Tese de Doutorado apresentada em 18/12/2006

A radioterapia causa lesão de graus variados na orelha interna podendo provocar desde a surdez sensorineural até a anacusia. Com o objetivo de verificar o efeito antioxidante e radioprotetor da amifostina no órgão de Corti de cobaias irradiadas em região da cabeça e pescoço, foi realizado um estudo envolvendo três grupos de animais: um grupo foi submetido à lesão imediata de células ciliadas pela radiação em dose única de 350cGy e outros dois passaram por pro-

cessos idênticos, porém receberam doses de 100 e 200mg/kg nos 30 minutos que antecederam a radiação. Todas as cobaias foram sacrificadas 30 dias após o experimento e suas bulas retiradas para estudo em microscópio de varredura. Depois de realizada a contagem das células ciliadas externas e o somatório dos percentuais de lesão em cada espira de cada grupo isoladamente, concluiu-se que a lesão das células ciliadas externas foi menor nos dois grupos que receberam a amifostina que no grupo apenas irradiado. Essa diferença ocorreu principalmente nas segunda e terceira espiras das cócleas onde a diferença foi estatisticamente significativa. Não foi encontrada diferença de proteção entre as doses de amifostina testadas.

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS PROTEÍNAS ANEXINA-1 E GALECTINA-1 NOS PÓLIPOS RINOSSINUSAIS E SUA MODULAÇÃO PELO GLICOCORTICOIDE

Átilio Maximino Fernandes

Orientadora: Profa. Dra. Wilma T. Anselmo-Lima
Tese de Doutorado apresentada em 21/12/2006

A polipose rinossinusal ainda não tem uma fisiopatologia totalmente compreendida, apesar de várias hipóteses em relação ao seu processo inflamatório.

Objetivo: Estudou-se a expressão dos genes que codificam as proteínas que têm ação antiinflamatória, a anexina-1 e a galectina-1, e sua modulação pelo glicocorticoide.

Material e Métodos: Onze pacientes portadores de polipose rinossinusal tiveram biopsiados seus pólipos em dois momentos: inicialmente na ausência de glicocorticoide sistêmico, e a segunda vez na presença do mesmo. Nestas duas amostras, foi avaliada a expressão dos genes das proteínas e comparada com

a expressão dos genes das proteínas na mucosa nasal normal do meato médio.

Resultado: Verificou-se que a média de expressão da anexina-1 e galectina-1 estava predominantemente aumentada independente do uso do glicocorticoide em relação à mucosa nasal controle. Entretanto, nos pólipos sem uso de glicocorticoide, a média de expressão da anexina-1 foi significativamente maior dos que estavam sob uso de glicocorticoide. Com relação à galectina-1 não houve diferença significativa entre as médias de expressão antes e após o uso de glicocorticoide sistêmico.

Conclusão: Os genes das proteínas apresentaram um aumento da expressão na mucosa polipóide, independente do uso da medicação, porém a relação destas duas proteínas antiinflamatórias com o glicocorticoide não ocorreu da mesma maneira.

ORTOPEDIA

CORRELAÇÃO ENTRE DIFERENTES MÉTODOS DE AVALIAÇÃO FUNCIONAL DA MARCHA DE RATOS COM LESÃO POR ESMAGAMENTO DO NERVO ISQUIÁTICO

Andréa Licre Pessina Gasparini

Orientador: Prof.Dr. Cláudio Henrique Barbieri

Tese de Doutorado apresentada em 25/10/2006

A avaliação da recuperação funcional é um fator experimental desafiador. Um estudo da avaliação funcional da lesão por esmagamento do nervo isquiático foi realizado em ratos. Vinte e cinco ratos Wistar machos foram utilizados e submetidos a três métodos de avaliação para obtenção do índice funcional do ciático. A metodologia estabelecida por De Medinaceli e colaboradores (1982) foi aplicada de forma manual e por medida computadorizada através das impressões das pegadas em papel. A metodologia estabelecida por Bain, Mackinnon, Hunter (1989) foi utilizada somando-a ao uso de imagens por filmagem da marcha do rato, proposto por Varejão e colaboradores (2001). O nervo isquiático direito do animal foi exposto sob anestesia geral e por incisão cutânea longitudinal na face lateral da coxa, exposto e esmagado utilizando um dispositivo de peso morto em um segmento logo acima da bifurcação durante 10 minutos, com carga estática de 15000g. As impressões das pegadas dos animais foram obtidas na fase pré-operatória e, de-

pois, no 1º pós-operatório e na seqüência, semanalmente até o 21º pós-operatório em um corredor de madeira com papel sulfite preparado previamente banhado em solução de bromofenol, e em um corredor de acrílico com filmagem da locomoção em filmadora SONY OCR-OVO 203. As impressões das pegadas registradas no papel eram avaliadas manualmente sendo depois digitalizadas, armazenadas e novamente avaliadas através de um software desenvolvido por Selli (1998) e modificado por Yamasita (2002) pela medida de parâmetros pré-determinados. Ao término da colheita das medidas, o programa oferecia automaticamente o SFI (índice funcional do ciático). As imagens filmadas eram editadas em frames e analisado o quadro em que as duas patas encontravam-se próximas usando um programa gráfico Image J para determinar os parâmetros pré-estabelecidos pela fórmula. Os resultados mostraram ser o método da filmagem ferramenta ideal para avaliação funcional desde as primeiras semanas de regeneração, com correlação entre os métodos quando os mesmos utilizarem a mesma fórmula de obtenção do SFI, no entanto quando utilizadas fórmulas diferentes, que apresentavam hipótese de correlação, esta não foi verdadeira.

AVALIAÇÃO DA TOXINA BOTULÍNICA-A NA PROFILAXIA DA ENXAQUECA EM PACIENTES TRATADOS COM BLOQUEIOS DO SEGMENTO CEFÁLICO COM LIDOCAÍNA E DEXAMETASONA

Christiane Pellegrino Rosa

Orientadora: Profa.Dra. Gabriela Rocha Lauretti

Dissertação de Mestrado apresentada em 09/11/2006

Introdução: Enxaqueca é uma cefaléia crônica primária que se caracteriza por reação neurovascular anormal em um organismo geneticamente vulnerável, exterioriza-se por episódios recorrentes e manifestações associadas, que geralmente dependem de fatores desencadeantes.

Objetivos: Este estudo visa avaliar o efeito profilático da administração intramuscular da toxina botulínica-A na região frontal em pacientes portadores de enxaqueca. Adicionalmente visa avaliar se o bloqueio prévio de segmentos cefálicos com lidocaína ou lidocaína e dexametasona exacerbaria a resposta da mesma.

Métodos: Foram selecionados 20 pacientes com enxaqueca, divididos em dois grupos. Todos os pacientes foram avaliados e tratados por médicos neu-

rologistas previamente à inclusão no estudo, e os diferentes fármacos prescritos assim como suas combinações foram de competência dos mesmos. Sete dias antes da aplicação de TXB-A, todos os pacientes foram submetidos a bloqueios do segmento cefálico, sendo divididos aleatoriamente em dois grupos. O Grupo 1 (n=10) recebeu dexametasona de depósito e lidocaína e o Grupo 2 (n=10) recebeu lidocaína e solução fisiológica 0,9%. Decorridos sete dias, todos os pacientes receberam 25 UI de TXB-A intramuscular, diluída com solução fisiológica a 0,9%, administrada na região frontal. Após a administração da TXB-A, os pacientes permaneceram sob observação por 45 minutos. Os pacientes foram avaliados de forma prospectiva em relação à analgesia, sendo avaliados o consumo de analgésicos, a intensidade da dor, a responsividade ao analgésico habitual e a frequência das crises de enxaqueca nos períodos avaliados (zero, 28°, 56° e 84° dias) após a administração da TXB-A.

Resultados: Os dois grupos foram demograficamente semelhantes entre si ($p > 0,05$). A associa-

ção de TXB-A resultou em redução aproximada de 50% da intensidade da dor durante as crises de enxaqueca nos dias 28°, 56° e 84°. Houve diminuição da intensidade da dor nos pacientes que receberam dexametasona no 28° dia de avaliação, comparados com os que receberam apenas lidocaína. Nos dias 56 e 84 os grupos foram semelhantes entre si ($p > 0,05$). Houve diminuição da frequência das crises em torno de 30-40% nos dias 28°, 56° e 84°, em relação ao valor inicial. O tempo de alívio desde a ingestão dos comprimidos de escolha do paciente até o alívio da enxaqueca reduziu-se de forma semelhante nos três períodos avaliados.

Conclusões: A aplicação da TXB-A na amostra avaliada resultou em redução aproximada de 50% da intensidade da dor, redução da frequência das crises de dor nos períodos avaliados e redução do tempo para alívio da dor. A associação de dexametasona aos bloqueios do segmento cefálico, previamente à TXB-A, reduziu a intensidade da dor no 28° dia, não interferindo nos demais parâmetros.

EFEITO HIPOALGÉSICO DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NERVOSA TRANSCUTÂNEA (TENS) EM MODELO DE DOR PÓS-OPERATÓRIA VISCERAL

Josimari Melo de Santana

Orientadora: Profa.Dra. Gabriela Rocha Lauretti

Tese de Doutorado apresentada em 17/11/2006

Os estudos sobre os efeitos da TENS em dor visceral são muito escassos na literatura, principalmente quando associada a um componente cirúrgico. Geralmente, as pacientes submetidas a cirurgia para esterilização tubária percebem muita dor imediatamente após cirurgia, quando do término da anestesia geral. Embora seja oferecida medicação analgésica tal como cetoprofeno, hioscina, tramadol, dipirona, mesmo que as medicações sejam combinadas, as pacientes continuam relatando alta intensidade dolorosa. Assim, objetivou-se, avaliar se a TENS pode reduzir dor aguda visceral após cirurgia de laqueadura tubária. Participaram, deste estudo aleatório, duplamente encoberto e controlado por placebo, 60 mulheres, as quais foram igualmente distribuídas em três grupos (TENS Alta Frequência-TAF, TENS Baixa Frequência-TBF e TENS Placebo). As faixas de 100Hz e 4Hz foram usadas como alta e baixa frequência nos grupos TAF e TBF, respectivamente. A aplicação de TENS foi

realizada imediatamente à admissão das pacientes na Sala de Recuperação Pós-Anestésica (SRPA), após mensuração da dor. A escala numérica de 10cm e a versão brasileira do Questionário McGill de Dor (Br-MPQ) foram usados para medir o nível de dor pós-operatória das pacientes antes e depois da aplicação de TENS na SRPA. Os dados foram analisados através dos testes de Chi-quadrado, Kruskal Wallis, Wilcoxon Matched Pairs e teste post hoc de Tukey. Os achados com valor de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. A intensidade de dor foi reduzida nos grupos TAF e TBF quando comparado ao grupo TENS placebo ($p < 0,05$), conforme análise da escala numérica e Br-MPQ. Porém, não se notou qualquer diferença estatística entre as duas frequências de TENS. De acordo com a análise feita do Br-MPQ, detectou-se que os termos cólica, que enfraquece, horrível e incômoda são os descritores que mais adequadamente caracterizam a dor percebida por estas pacientes, sendo o descritor cólica selecionado pelo número total de pacientes. Além disso, o grupo TAF apresentou um menor tempo de permanência na SRPA ($p < 0,05$). A maioria das pacientes em todos os

grupos (90 a 100%) relataram que a estimulação coma a corrente TENS era confortável e que também usariam novamente a TENS, caso viessem a sofrer uma outra cirurgia no futuro. Assim, sugere-se que a TENS, tanto em alta quanto em baixa frequência, foi eficaz

para reduzir a intensidade de dor pós-operatória visceral após procedimento de esterilização tubária videolaparoscópica, quando associada à medicação analgésica pós-operatória, em sistema de analgesia multimodal.

AVALIAÇÃO DA TERAPÊUTICA MULTIMODAL NO TRATAMENTO DA DOR OCULAR CRÔNICA SECUNDÁRIA AO GLAUCOMA

Wilder Ronaldo Trevelin

Orientadora: Profa. Dra. Gabriela Rocha Lauretti

Tese de Doutorado apresentada em 04/12/2006

Objetivos. O estudo se propôs a avaliar a ação do bloqueio retrobulbar combinado ou não ao bloqueio do gânglio estrelado referente ao campo visual, dor ocular e pressão em pacientes portadores de dor crônica ocular secundária ao glaucoma

Métodos. 54 pacientes foram aleatoriamente distribuídos por sorteio em três grupos (n=18) para avaliação da dor, campo visual e pressão ocular. Todos os grupos foram submetidos ao bloqueio do gânglio estrelado com lidocaína (70mg) e clonidina (30µg) ou solução fisiológica; combinado ou não ao bloqueio retrobulbar com clonidina (30 µg), lidocaína 20 mg e dexametasona 10 mg, ou somente solução fisiológica. O grupo 1 foi submetido ao bloqueio retrobulbar com clonidina + dexametasona + lidocaína e ao bloqueio do gânglio estrelado com SF0,9%. O grupo 2 foi submetido ao bloqueio do gânglio estrelado com clonidina e lidocaína e ao bloqueio retrobulbar com SF0,9%.

Finalmente, o grupo 3 foi submetido aos dois tipos de bloqueios com todas as drogas do estudo. Todos os grupos foram submetidos a seqüência de 1 bloqueio semanal por três semanas consecutivas. A avaliação da dor, da pressão ocular e do campo visual foi feita antes dos procedimentos, na quarta e na décima sexta semana. $P < 0,05$ foi considerado significativo.

Resultados. Todos os grupos apresentaram analgesia na quarta semana de avaliação ($p > 0,05$). Entretanto, apenas o grupo 3 apresentou analgesia residual até a décima sexta semana de avaliação ($p < 0,05$). Em relação aos valores de pressão ocular e ao campo visual, não houve diferenças entre os grupos nos diferentes tempos avaliados ($p > 0,05$).

Conclusões. A combinação dos bloqueios estrelado e retrobulbar com clonidina, dexametasona e lidocaína resultou em pelo menos 16 semanas de analgesia. A ausência de alterações da pressão ocular e do campo visual foi provavelmente devida à população avaliada, uma vez que todos os pacientes apresentavam perda visual importante devido ao avanço da doença.

PROPRIEDADES MECÂNICAS DE UM SISTEMA DE OSTEOSSÍNTESE DE ESTABILIDADE RELATIVA

Alexandre Yoneda

Orientador: Prof. Dr. Nilton Mazer

Dissertação de Mestrado apresentada em 21/12/2006

Neste trabalho foram estudadas as propriedades mecânicas de um novo sistema de osteossíntese metálica (SPS® - Sistema Pengo de Síntese) por meio de ensaios mecânicos de flexão lateral e torção. Os SPS® foram confeccionados em aço inox e são constituídos por duas placas metálicas iguais e de comprimentos variáveis de acordo com o número de furos e

interligadas por um pino em forma de “U” encaixado nos sulcos da parte inferior das placas. Os SPS® foram montados em bastões cilíndricos de madeira e fixados com parafusos corticais de aço inox. Para os ensaios foram adotados nove grupos de modelos em função dos três comprimentos de placas e das três distâncias de montagem entre as placas. Os ensaios de flexão lateral foram feitos em três posições do SPS® no bastão de madeira, lateral, superior e inferior. Para os ensaios de torção não se adotou nenhuma posição específica do SPS® no bastão de madeira. Os resultados das propriedades de rigidez e da deflexão do

SPS®, nos ensaios mecânicos de flexão lateral e torção, tiveram a interferência de maneira proporcional das variantes números de furos nas placas e o espaço entre as placas na montagem do sistema, ou seja, quanto maior o número de furos nas placas e menor o espaço entre elas, maior a rigidez e menor a deflexão. Efetuou-se a análise estatística dos resultados dos ensaios para identificar a rigidez média e a deflexão média nos grupos utilizando a análise de variância

multifatorial (ANOVA). Conclui-se que a rigidez e a deflexão variaram proporcionalmente ao número de furos nas placas e ao espaço entre elas e a posição superior do SPS® nos ensaios de flexão lateral foi a que apresentou maior rigidez e deflexões médias. O grupo de modelos com maior rigidez e menor deflexão foi o 3A (placas com 4 furos e espaço de 20,0 mm entre elas) tanto nos ensaios mecânicos de flexão lateral com também no de torção.

SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

COLONIZAÇÃO DA NASOFARINGE, RESISTÊNCIA E SOROTIPOS DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* ISOLADOS DA NASOFARINGE DE CRIANÇAS DE UMA CRECHE

Sandra Márcia de Faria

Orientadora: Profa.Dra. Maria Célia Cervi

Dissertação de Mestrado apresentada em 04/10/2006

Há mais de um século da descoberta do *Streptococcus pneumoniae*, este continua sendo importante causa de morbidade e mortalidade em pessoas em todas as faixas etárias, especialmente em crianças e idosos. O *Streptococcus pneumoniae* pode fazer parte da flora normal da nasofaringe de 10% a 50% de crianças saudáveis e 10% a 20% em adultos. 15% das crianças colonizadas podem desenvolver doenças. Existem diversos fatores que podem influenciar tanto na colonização pneumocócica como na resistência antimicrobiana como: faixa etária (menores de 2 anos de idade), sexo, área geográfica, ambientes fechados e creches, estação do ano, tabagista no domicílio, uso de antibióticos, otites de repetição, presença de irmãos menores de 5 anos, aleitamento materno, hospitalização prévia, imunodeficiências. Devido a isso, resolvemos fazer um estudo em creche, analisando a prevalência de colonização e da resistência do *Streptococcus pneumoniae* à penicilina e estudar os fatores associados tanto ao risco de colonização quanto ao risco de resistência. No período de 10/06/2003 a 28/08/2003 foram obtidos swabs de nasofaringe de crianças de 0 a 7 anos que freqüentavam a creche Carochinha Coseas localizada no Campus Universitário da FMRP-USP na cidade de Ribeirão Preto(SP). Antes da cole-

ta, a mãe ou o responsável pela criança foi submetida (o) a um questionário para coleta de dados da criança. Após a coleta com um swab de cálcio alginateado, o material era colocado em um meio de transporte adequado e encaminhado ao Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas da FMRP-USP onde o *Streptococcus pneumoniae* foi isolado de acordo com as normas do NCCLS. As cepas isoladas foram avaliadas quanto à susceptibilidade à penicilina por meio do método de triagem com disco de oxacilina e por meio do E-teste. Após os procedimentos as cepas foram armazenadas e enviadas periodicamente para a Universidade Federal do Rio de Janeiro (RJ) onde permaneciam até a realização da sorotipagem no CDC. A prevalência de colonização nasofaríngea pelo *Streptococcus pneumoniae* encontrada nessa população foi de 41,8% (46/110), com 15,2% de resistência intermediária à penicilina e nenhuma cepa com resistência plena. Encontramos a presença de 14 sorotipos, em ordem decrescente: 23B, 15B, 6A 15A, 19F, 6B, 23F, 14, 11A, 16F, 18C, 19A, 19B, 28F. Os sorotipos que apresentaram resistência à penicilina foram: 23F, 6B,14,19A, 19F. Não houve associação entre a colonização pneumocócica e os fatores de risco estudados para essa população, exceto o aleitamento materno que foi associado ao risco de colonização na análise univariada, o que pode ter ocorrido devido ao pequeno tamanho da amostra ou em decorrência da associação de outros fatores ou caracterís-

ticas como, por exemplo, aquelas que estavam em aleitamento materno eram crianças menores com idade entre 8 e 32 meses, e essas não estavam em aleitamento materno exclusivo. Quanto à resistência a penicilina, nenhum dos fatores estudados foi associado

ao risco de resistência. A média de idade das crianças colonizadas com cepas resistentes à penicilina foi menor que a média de idade daquelas colonizadas com cepas sensíveis, tendo sido essa diferença estatisticamente significativa.

ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À RESISTÊNCIA MÚLTIPLA A DROGAS EM TUMORES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL POR PCR QUANTITATIVA

Elvis Terceira Valera

Orientador: Prof.Dr. Luiz Gonzaga Tone

Tese de Doutorado apresentada em 15/12/2006

Introdução: a resistência celular a drogas antineoplásicas é considerada uma das barreiras mais significativas ao tratamento efetivo dos tumores cerebrais.

Objetivos: Avaliar e comparar o perfil de expressão de genes relacionados à resistência a drogas em tumores cerebrais; analisar o impacto da expressão aumentada destes genes na sobrevida global.

Pacientes e método: Oitenta amostras de tumores cerebrais microdissecados, provenientes de 79 pacientes, foram analisadas por RQ-PCR, para os genes *MDR1*, *MRP1*, *MRP3*, *LRP* e *BCRP*. Casos pediátricos (0 a 20 anos): 46 (17F:29M, mediana de idade de $7,3 \pm 5,9$ anos); tumores em adultos: 33 (17F:16M, mediana de idade de $46,6 \pm 14,5$ anos). Diagnósticos histológicos: 21 astrocitomas I e II, 28 astrocitomas III e glioblastomas, 17 meduloblastomas, 8 endimomas e 6 oligodendrogliomas.

Resultados: tumores gliais expressaram maio-

res níveis de *MDR1* ($p=0,003$) e *BCRP* ($p=0,03$) que tumores embrionários. Os astrocitomas de baixo grau expressaram altos níveis de *MDR1* ($p=0,001$), *MRP3* ($p=0,01$) e *LRP* ($p=0,02$). O gene *MRP1* foi preferencialmente expresso por meduloblastomas ($p=0,04$) e endimomas ($p=0,04$); endimomas também apresentaram aumento de *LRP* ($p=0,02$). A comparação do perfil de expressão gênica entre astrocitomas pilocíticos primários do hipotálamo e de demais localizações foi semelhante. Expressão aumentada dos genes de resistência, isoladamente ou em conjunto, não se correlacionou com menor sobrevida global dos pacientes com meduloblastomas/PNET e gliomas malignos.

Conclusões: Os genes de resistência a drogas não explicam a maior sensibilidade dos gliomas de hipotálamo/hipófise/vias ópticas à quimioterapia. A expressão aumentada dos genes de resistência não mostrou impacto na sobrevida global de pacientes com meduloblastomas/PNET e gliomas de alto grau. Altos níveis de *MDR1*, *MRP3* e *LRP* poderiam ter implicações na resistência primária dos astrocitomas pilocíticos à quimioterapia.

URTICÁRIA CRÔNICA E AUTOIMUNIDADE

Cecília Isumi Saito Miyahara

Orientadora: Profa Dra Luisa Karla de Paula Arruda
Dissertação de Mestrado apresentada em 21/12/2006

Urticária Crônica (UC) é rara em crianças. Em adultos, a associação entre UC e doenças autoimunes tem sido bem documentada. Em crianças, têm sido encontrados autoanticorpos funcionais contra receptores de IgE ou contra IgE em pelo menos 30% dos

casos, definindo este grupo como Urticária Crônica Autoimune (UCAI). A presença destes anticorpos pode ser avaliada *in vivo* através do teste cutâneo com soro autólogo, e *in vitro* por ensaios de liberação de histamina. Os objetivos do presente trabalho foram avaliar pacientes com UC de acordo com as características clínicas, doenças associadas, evolução do quadro clínico e presença de alergia, e investigar a presença de autoanticorpos na patogênese da doença,

através de teste cutâneo autólogo. Foram avaliados 93 pacientes com UC, sendo 48 crianças e 45 adultos, sendo realizados testes cutâneos de hipersensibilidade imediata, dosagens de IgE total e específica, teste cutâneo autólogo, e avaliação laboratorial. Observamos uma frequência de UC semelhante nos dois sexos entre as crianças (47% do sexo feminino), e predomínio do sexo feminino nos adultos (82%); a alergia esteve presente em 75,5% dos casos tanto em adultos como crianças e mais de 65% dos pacientes apresentaram IgE total acima dos níveis normais. Urticária por alergia alimentar, embora rara como causa de UC, foi observada em 6 crianças e em um adulto. A associação de tireoidites autoimunes e UCAI foi mais frequente em adultos, mas observamos sua ocorrência em uma criança. Outras doenças autoimunes também estiveram presentes em crianças: uma menina com Artrite Idiopática Juvenil e outra com Puberdade Precoce e Síndrome de Sjögren durante seu seguimento. No presente trabalho, observamos frequência elevada de UCAI tanto no grupo de crianças (59,5%) como adultos (42,2%); houve uma frequência significativamente menor de alergia nos pacientes com teste autólogo positivo (66%) em relação àqueles com teste

autólogo negativo (88%). Pacientes com teste autólogo positivo apresentaram uma tendência a maior frequência de angioedema (77%) comparados aos pacientes com teste autólogo negativo (58%). Remissões de UC foram mais frequentes nas crianças (43,7%); nos adultos, apenas 4,4% apresentaram remissão. Nas crianças, a remissão foi menos frequente naquelas com teste autólogo positivo (28%). A UC continua a ser um desafio em termos de diagnóstico, investigação e manejo clínico, mas uma avaliação criteriosa permitiu definir a sua etiologia em 62,5% das crianças e 44,5% dos adultos. Observamos alguns sinais que podem sugerir presença de doença mais grave e de difícil controle, como presença do angioedema, teste autólogo positivo e positividade dos autoanticorpos, estes últimos podendo nos alertar para desenvolvimento de doença autoimune subsequente. Com a etiologia da urticária crônica definida, torna-se mais fácil alcançar um controle adequado da doença, assim como a sua remissão, proporcionando melhor qualidade de vida para esses pacientes. A definição de um grupo de etiologia autoimune possibilita novas abordagens terapêuticas a este grupo, assim como a necessidade de seguimento para eventual surgimento de outras patologias autoimunes.

SAÚDE MENTAL

ALTERAÇÕES DE MEMÓRIA E DOS ESTADOS DE CONSCIÊNCIA QUE ACOMPANHAM A REMEMORAÇÃO EM PACIENTE COM ESQUIZOFRENIA

Marcos Aurélio Martins Ribeiro

Orientador: Prof.Dr. Luiz Alberto Bechelli Hetem
Tese de Doutorado apresentada em 07/11/2006

A memória é uma das funções cognitivas mais prejudicadas na esquizofrenia e seu acometimento é seletivo. Envolve principalmente o centro executivo da memória operativa, responsável pela coordenação de tarefas concomitantes, e a memória episódica, referente a dados pessoais e autobiográficos. A memória episódica pode ser avaliada levando-se em conta os estados de consciência que acompanham o reconhecimento. Um deles é a rememoração consciente, o outro é o sentimento de familiaridade. Há indícios

de que em pacientes com esquizofrenia o reconhecimento acompanhado de rememoração consciente esteja comprometido. Diferentes variáveis, entre elas o nível de processamento da informação, influem de forma distinta nos estados de consciência que acompanham a rememoração em voluntários sãos, sugerindo que os mesmos se baseiem em processos cognitivos distintos. O objetivo principal deste trabalho foi avaliar comparativamente um grupo de pacientes com esquizofrenia a um de voluntários sãos em termos de memória episódica - com ênfase na influência dos estados de consciência que acompanham a rememoração - e memória operativa. Além disso pretendeu-se também verificar se há correlação entre estas duas

formas de memória. Participaram do estudo 20 pacientes com esquizofrenia e 20 voluntários sãos, emparelhados quanto à idade, sexo e escolaridade. A memória de longa duração foi avaliada por tarefa de reconhecimento com auto-avaliação dos estados de consciência e rememoração livre. O efeito do nível de processamento foi avaliado por meio de instruções associadas às palavras na fase de aprendizagem da tarefa de reconhecimento. (“Formar Frase” ou “Contar Letras”), que sabidamente implicam em tratamento diferenciado da informação. O centro executivo da memória operativa foi avaliada pela tarefa dupla. Os grupos não diferiram quanto à medida de estimativa de inteligência. Os pacientes tiveram pior desempenho nas tarefas de reconhecimento e de rememoração livre. Na de reconhecimento, a diferença entre os grupos decorreu exclusivamente de maior proporção de reconhecimentos acompanhados de rememoração

consciente nos voluntários sãos. Em ambos os grupos verificou-se o efeito do nível de processamento, mas ele foi menos acentuado nos pacientes. Não houve diferença entre os grupos na tarefa de memória operativa, nem foi encontrada correlação entre desempenho na tarefa dupla e nas tarefas de memória episódica. Foi evidenciado o efeito do nível de processamento em pacientes com esquizofrenia, apesar de ser menos evidente do que em voluntários sãos. Também foi verificado, contrariamente ao que se pensava, que não houve correlação entre desempenho na tarefa dupla e nas tarefas de memória episódica. Tais resultados têm possíveis implicações terapêuticas e nos rumos da pesquisa na área da esquizofrenia e cognição. Pacientes com esquizofrenia podem se beneficiar de intervenções de reabilitação cognitiva que levem em conta o perfil de déficits cognitivos exibidos por estes pacientes.

SAÚDE NA COMUNIDADE

ANÁLISE DO PADRÃO ALIMENTAR DOS NIPO-BRASILEIROS DE MOMBUCA-GUATAPARÁ-SP, RELACIONADO-O AO ESTADO NUTRICIONAL E ALTERAÇÃO DA HOMEOSTASE GLICÊMICA

Solange Maria Xavier de Souza

Orientador: Prof.Dr. Laércio Joel Franco

Dissertação de Mestrado apresentada em 16/10/2006

Introdução: Estudos epidemiológicos com migrantes japoneses têm sido desenvolvidos para avaliar os efeitos da mudança ambiental, que aliados ao componente genético, aumentaram a prevalência de diabetes. A dieta é um importante componente ambiental e está associada à etiologia do diabetes tipo 2, embora seu papel não esteja totalmente esclarecido. Estudos apontam um excesso de calorias levando à obesidade, a qual tem sido relacionada com o desencadeamento do diabetes. A obesidade, principalmente a abdominal, é fator de risco não somente para o diabetes tipo 2, assim como para doenças cardiovasculares. A comunidade nipo-brasileira de Mombuca-

Guatapará-SP estabeleceu-se no Brasil nos anos 60, mantendo muitos de seus costumes tradicionais, inclusive os hábitos alimentares.

Objetivo: Descrever e analisar o padrão alimentar dos nipo-brasileiros de Mombuca, relacionando-o ao estado nutricional e alteração da homeostase glicêmica.

Casuística e métodos: Total de 111 indivíduos, de ambos os sexos, sem miscigenação, participaram de estudo transversal conduzido no ano de 2005. Foram aplicados questionários sócio-demográficos, de saúde e nutricional, e obtidas medidas antropométricas (peso, altura, circunferência de cintura) e de composição corporal por bioimpedância. Utilizou-se como critério para sobrepeso e obesidade valores de IMC entre 23-24,9 kg/m² e ≥ 25 kg/m², respectivamente, e para obesidade abdominal, valores de circunferência abdominal ≥ 85 cm e ≥ 90 , para homens e mulhe-

res, respectivamente. A dieta habitual foi avaliada através de questionário de frequência alimentar validado, utilizando-se o programa Dietsys 4.0.

Resultados: Os nipo-brasileiros apresentaram média (DP) de idade de $56,0 \pm 15,0$ anos, sendo 54,9% mulheres e 71,1 % de 1ª geração. Observou-se dieta habitual hiperlipídica (31,5 % VCT), hiperprotéica (16,6 % VCT), com elevados teores de ácidos graxos trans (5 % VCT), colesterol (320,9 mg/dia) e sódio (3.360,8 mg/dia), e inadequado consumo de fibras dietéticas (17,0 g/dia) e do grupo de frutas (172,7 g/dia) e vegetais (99,4 g/dia), segundo recomendações da OMS (2003). O estado nutricional, avaliado segundo o IMC para a população asiática, mostrou diferença estatisticamente significativa entre os sexos, para eutrofia ($< 23 \text{ kg/m}^2$) e excesso de peso ($\geq 23 \text{ kg/m}^2$). A obesidade ($\geq 25 \text{ kg/m}^2$) foi observada em 46% e 44,3%

dos indivíduos do sexo masculino e feminino, respectivamente. A obesidade central apresentou maior prevalência no sexo masculino (54% vs 21,3%, $p < 0,05$). Indivíduos com sobrepeso apresentaram maior consumo calórico e dos grupos de cereais, frutas e bebidas alcoólicas quando comparados aos indivíduos eutróficos ($p < 0,05$). A mesma tendência foi verificada em indivíduos portadores de obesidade abdominal para consumo de cereais.

Conclusão: Os resultados mostraram que a população estudada apresenta uma dieta habitual com tendência à ocidentalização, refletindo uma possível adaptação cultural dos hábitos alimentares. Esta pode estar associada à alta prevalência de sobrepeso e obesidade, particularmente a obesidade central, que pode favorecer o aparecimento de doenças cardiovasculares.

A UTILIZAÇÃO DOS PRONTUÁRIOS NAS UNIDADES DE SAÚDE DA FAMÍLIA NOS MUNICÍPIOS DA DIR XVIII

Mara Garcia Delamuta

Orientador: Prof.Dr.Milton Roberto Laprega

Dissertação de Mestrado apresentada em 24/10/2006

Este trabalho teve como objetivo analisar a forma de registro de dados e a utilização dos prontuários para subsidiar o atendimento nas Unidades de Programa de Saúde da Família nos municípios de abrangência da Direção Regional da Saúde – DIR XVIII, Ribeirão Preto - São Paulo. O instrumento utilizado para a pesquisa foi um questionário semi-estruturado, aplicado aos enfermeiros que atuam nas Equipes de Saúde da Família, implantadas até novembro de 2004, perfazendo um total de 50 enfermeiros, com a finalidade de caracterizar as equipes, avaliando, segundo as informações dos enfermeiros, quanto à organização e utilização do prontuário adotado pela unidade. Os dados coletados neste estudo permitiram concluir que o prontuário é um instrumento reconhecidamente importante quanto à forma de registro das informa-

ções, visto que todas as equipes utilizam prontuário, porém não há um padrão quanto à forma de organização deste. Foram identificadas várias dificuldades referentes à organização do prontuário, tais quais; organizar o prontuário em unidades que trabalham os modelos PSF e UBS, registro de informações incompletas, inadequadas e/ou fragmentadas, subutilização de informações da família e de alguns profissionais da equipe, prontuário centrado em queixa/ conduta, problemas administrativos, desconhecimento do modelo de atenção do PSF e suas estratégias de ação; tais dificuldades estão relacionadas à construção de um novo modelo de atenção, no qual é necessário que as informações sejam registradas de forma adequada, para serem compartilhadas entre os elementos da equipe, mantendo a privacidade do usuário, fornecendo subsídios para uma atenção integral e de qualidade, valorizando os determinantes sociais do processo saúde-doença, fortalecendo os laços de co-responsabilidade entre os profissionais, dinamizando assim, o atendimento multiprofissional.

PERCEPÇÃO E AVALIAÇÃO DOS ALUNOS DO CURSO DE MEDICINA DE UMA ESCOLA MÉDICA PÚBLICA SOBRE A IMPORTÂNCIA DO ESTÁGIO EM SAÚDE DA FAMÍLIA NA SUA FORMAÇÃO

Maria Angelica de Figueiredo Campos

Orientadora: Profa.Dra. Aldaísa Cassanho Forster

Dissertação de Mestrado apresentada em 24/10/2006

Introdução: Na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), o ensino no internato da Atenção Primária à Saúde (AP) com enfoque em medicina de família iniciou-se em 1997. São promovidas a integração do aluno com a equipe de Programa de Saúde da Família (PSF) e a participação na rotina da equipe por meio dos grupos de educação em saúde, reuniões de equipe, visitas domiciliares, discussões de casos individuais e de família. O cuidado médico é realizado na consulta individual e no seguimento das famílias, sendo enfatizadas a prevenção e a promoção da saúde e a avaliação do paciente buscando a assistência integral. São poucos os estudos sobre a percepção dos alunos sobre a vivência nos estágios em saúde da família.

Objetivos: Avaliar a percepção dos alunos do 5º ano de medicina do Curso de Medicina da FMRP-USP quanto à contribuição do estágio em Saúde da Família na formação em atenção primária.

Metodologia: Os sujeitos do estudo foram alunos do 5º ano do Curso de Medicina da FMRP no ano de 2005, cuja idade médica foi 23 anos e dos quais

58,3% eram do sexo masculino. A esses alunos foi aplicado questionário estruturado antes e após o estágio. O questionário incluiu itens sobre dados pessoais, importância, contribuição e influência do estágio na formação médica e outros aspectos, como integração com a equipe, mudanças na relação médico-paciente, adequação do estágio no 5º ano e duração.

Resultados: Dos 103 respondentes, 75,5% avaliaram o estágio em saúde da família como bastante ou muito importante e 87% consideraram adequada sua inserção no 5º ano. Em relação à duração, 49,5% e 82,5% consideraram suficiente no primeiro e segundo questionário respectivamente. 91,3% referiram boa integração com a equipe. Quanto ao atendimento, 68% perceberam mudanças em sua forma de atender o paciente durante o estágio. Os princípios da estratégia de saúde da família mais percebidos pelos alunos foram acessibilidade e longitudinalidade.

Conclusão: Na avaliação dos graduandos, o estágio contribui positivamente para a sua formação, principalmente nos aspectos de integração com a equipe de saúde, humanização e visão dos principais princípios da saúde da família, como trabalho em equipe, longitudinalidade, acessibilidade e atuação na prevenção. Após o estágio o aluno passou a dar mais importância aos aspectos sociais e econômicos do paciente e avaliá-lo com um ser bio-psico-social.