

**RESUMOS DE DISSERTAÇÕES DE MESTRADO E TESES DE DOUTORADO APRESENTADAS NA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - USP
DE JULHO A DEZEMBRO DE 2004**

BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

MODULAÇÃO NA EXPRESSÃO DE INTEGRINAS EM MASTÓCITOS MADUROS E IMATUROS DURANTE O REPOVOAMENTO DA CAVIDADE PERITONEAL

Maria Verónica Dávila Pastor

Orientadora: Profa. Dra. Constance Oliver

Tese de Doutorado apresentada em 07/07/2004

Os mastócitos originam-se de precursores hematopoiéticos na medula óssea e migram para tecidos periféricos onde amadurecem. O mecanismo envolvido na migração e endereçamento dos precursores de mastócitos não está bem definido. Estudos *in vitro* demonstraram que mastócitos em cultura expressam receptores integrina, heterodímeros, constituídos por uma subunidade α e uma subunidade β que atuam como mediadores de adesão célula-matriz extracelular. Sugere-se que as integrinas participam tanto dos processos de retenção de mastócitos na medula óssea quanto do recrutamento e endereçamento dessas células para tecidos específicos. No presente estudo, foi investigada a expressão de integrinas em mastócitos durante o repovoamento da cavidade peritoneal. Populações puras de mastócitos foram isoladas da medula óssea, do mesentério e do lavado peritoneal de rato com os anticorpos específicos para mastócitos mAb AA4 e mAb BGD6 conjugados a esferas magnéticas e a expressão das subunidades de integrina foi analisada através de imunomicroscopia, citometria de fluxo e RT-PCR semiquantitativo. Com o objetivo de obter dados comparativos, estudos *in vitro* foram desenvolvidos com a linhagem de mastócitos RBL-2H3.

Tanto os mastócitos da medula óssea quanto os mastócitos peritoneais e os mastócitos do mesentério expressam as subunidades de integrina $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 1$ e $\beta 7$. Por outro lado, observou-se uma expressão diferencial das subunidades de integrina nos mastócitos maduros presentes no mesentério e na cavidade peritoneal quando comparados aos mastócitos imaturos recém recrutados para esses locais. A expressão da subunidade de integrina $\alpha 4$ e a mensagem para as subunidades $\beta 1$ e $\beta 7$ foi significativamente maior nos mastócitos peritoneais maduros, quando comparados com mastócitos imaturos, que estão repovoando a cavidade peritoneal. Em contraste, mastócitos imaturos do mesentério apresentaram maior expressão da subunidade $\alpha 4$, se comparados com os mastócitos maduros. Os resultados sugerem que a modulação na expressão de integrinas pode ser crucial para a migração de mastócitos da medula óssea para a cavidade peritoneal e para o endereçamento dessas células para os tecidos específicos. Os dados obtidos também fornecem evidências de que heterodímeros de integrinas contendo a subunidade $\alpha 4$ têm um papel importante na adesão de mastócitos imaturos à matriz celular durante seu recrutamento. Estes resultados podem contribuir para o entendimento da dinâmica de processos nos quais ocorre o recrutamento de mastócitos, como nas reações alérgicas e inflamatórias e nas patologias como a mastocitose.

CARACTERIZAÇÃO DO LOCUS H DE *LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS*

Fabrcio César Dias

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Orsini Tosi

Dissertação de Mestrado apresentada em 08/09/2004

A amplificação gênica é um mecanismo de auto-preservação celular observado em linhagens do protozoário parasita *Leishmania* sob pressão por drogas.

As regiões R e H do genoma de *Leishmania major* são os loci mais estudados que leva à amplificação em resposta a drogas não relacionadas. A região H possui 47 Kb e está presente no cromossomo 23 de *L. major*. Três genes associados a resistência à drogas foram identificados neste locus. Os genes *PTR1* (Pteridina Redutase-1), *PGPA* (P-glicoproteína A) e *HTBF* (gene de resistência à terbinafina associado a região H) estão envolvidos na resistência ao metotrexato, antimonialis e terbinafina, respectivamente.

Genes conhecidos e elementos repetitivos foram usados como sondas em análises de Southern para estabelecer uma comparação entre o locus H de *L. major* e o de *Leishmania braziliensis*. A presença de quatro loci em um mesmo cromossomo de 850 Kb foi confirmado por análises de Southern de cromossomos separados por PFGE. Apesar de todos os loci analisados estarem em um mesmo cromossomo, os dados de DNA genômico revelaram importantes diferenças em seu padrão de restrição. O mapeamento dos diferentes loci no genoma de *L. braziliensis* foi a

base para a construção de bibliotecas genômicas parciais. Estas bibliotecas foram usadas para isolar dois genes da região H em *L. braziliensis*. Clones carregando os genes *PTR1* e *TTRS* (Triptofanil t-RNA sintetase), foram isolados e parcialmente seqüenciados. Os dados da seqüência revelaram uma divergência considerável entre *L. major* e *L. braziliensis*, que explica as diferenças no perfil de restrição encontradas. Apesar da baixa identidade de seqüência, a sentença do locus H é mantida entre as duas espécies.

A possível amplificação do locus em uma linhagem de *L. braziliensis* selecionada em terbinafina também foi investigada. Experimentos de resistência cruzada indicaram que a resistência à terbinafina em *L. braziliensis* parece não estar relacionada ao locus H. O mecanismo de amplificação gênica na linhagem LbTBF-R9 também foi investigada em corridas curtas de PFGE e análises de Southern blotting. Estes resultados indicam que a amplificação gênica não é o evento favorecido no desenvolvimento de resistência à drogas em *L. braziliensis*.

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO ATIVADOR DE GLÂNDULA SALIVAR DE 129 pb (-186/-58) DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DE PUFE DE DNA *BhC4-1*

Matheus Silveira Lecci

Orientadora: Profa.Dra. Nadia Monesi

Dissertação de Mestrado apresentada em 15/09/2004

O gene *BhC4-1*, do pufe de DNA C4 de *Bradysia hygida*, é expresso na glândula salivar no final do desenvolvimento larval em resposta ao aumento dos níveis de ecdisona. Estudos anteriores em linhagens transgênicas de *Drosophila* revelaram que os mecanismos envolvidos na regulação de *BhC4-1* estão conservados no sistema heterólogo. Análises em linhagens de *Drosophila* transformadas com deleções progressivas da região promotora do gene *BhC4-1* definiram fragmentos contendo elementos envolvidos na regulação deste gene. Um destes fragmentos constitui o fragmento de 129 pb (-186/-58), candidato a funcionar como um ativador de glândula salivar em pré-pupas. Para testar funcionalmente este fragmento foram geradas as construções (-186/-58) e (-58/-186), contendo o fragmento de 129 pb clonado nas orientações nativa e invertida, respectivamente, à montante do promotor basal heterólogo *Fbp1* e do gene repórter *lacZ*, no vetor de transformação de *Drosophila* pBP. Estas construções foram injetadas em embriões de *Drosophila* e a atividade do gene

repórter *lacZ* foi analisada nas linhagens transgênicas. Em todas as linhagens transformadas com a construção (-186/-58) e em todas as linhagens transformadas com o transgene (-58/-186), a expressão do gene repórter nas glândulas salivares é restrita ao período pré-pupal e inicialmente verificada em pré-pupas 0 hora. Em todas as linhagens da série (-58/-186) foi também observada a expressão do gene repórter na glândula anelar. Entretanto, diferentemente do padrão de expressão verificado na glândula salivar, esta expressão é restrita a grupos de células e verificada ocasionalmente nos animais ensaiados. No conjunto estes resultados confirmam a sugestão de que o fragmento de 129 pb (-186/-58) dirige a expressão para a glândula salivar de modo regulado durante o desenvolvimento, indicando que trata-se de um ativador de glândula salivar.

Dados anteriores indicaram que o gene *Broad-Complex (BR-C)*, é essencial para ativação de *BhC4-1* na glândula salivar de pré-pupas 0h e que a interação entre as diferentes isoformas deste gene e o promotor do gene *BhC4-1* ocorre no fragmento de 226 pb (-186/+40). Dentre as isoformas de BR-C, a isoforma Z3 foi identificada como essencial para ativar a expressão de *BhC4-1* na glândula salivar. Com

o propósito de restringir no promotor de *BhC4-1* a região na qual esta interação ocorre, cruzamentos foram realizados entre uma das linhagens transformadas com o fragmento de 129 pb (-186/-58) em sua orientação nativa e linhagens mutantes de *BR-C*. A análise da expressão do repórter nos animais resultantes destes cruzamentos confirmou o papel de *BR-*

C na ativação do gene na glândula salivar e permitiu restringir ao fragmento de 129 pb (-186/-58), do promotor de *BhC4-1*, a região de interação com *BR-C*. No conjunto, o presente trabalho contribuiu para a caracterização dos elementos *cis*-ativadores da expressão de *BhC4-1*, assim como, restringiu no promotor deste gene, a região de interação com o fator *trans*-ativador *BR-C*.

DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO SUBCUTÂNEA POR VÍRUS OROPOUCHE EM HAMSTER

Alcir Humberto Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto

Dissertação de Mestrado apresentada em 22/10/2004

O vírus Oropouche pertence à família *Bunyaviridae*, gênero *Orthobunyavirus*, sorogrupo Simbu, e é segunda causa mais frequente de arbovirose febril no Brasil. Estima-se que mais de meio milhão de casos de febre do Oropouche tenham ocorrido no Brasil nos últimos 30 anos, havendo também ocorrências no Panamá, Peru, Suriname e Trinidad. Epidemias de febre do Oropouche têm sido registradas quase que exclusivamente na Amazonia. Porém, com o aquecimento global do planeta, desmatamentos e consequente redistribuição de insetos vetores e animais reservatórios, há risco de disseminação de vírus Oropouche para outras regiões do Brasil e da América do Sul. A patogenia da infecção por Oropouche não é bem entendida. Modelo em roedores, usando inoculação intracerebral, tem sido descrito, mas não com uso da via subcutânea, que mais se assemelha à rota natural da infecção. O objetivo deste trabalho foi estabelecer e caracterizar um modelo experimental de infecção com Oropouche, usando inoculação subcutânea em hamster, a fim de contribuir para o enten-

dimento da patogenia do mesmo. Oropouche da linhagem BeAn19991, passado em cérebro de camundongo recém-nascido, foi inoculado ($10^{6.25}$ TCID₅₀/100µL) por via subcutânea na coxa de hamsters sírios com 2-3 semanas de idade. Em torno de 3 dias alguns animais desenvolveram doença com sinais clínicos brandos caracterizados por: eriçamento dos pêlos e agressividade, outros com características mais graves: perda de peso, tremores sugestivos de calafrios, letargia e paralisia. Os animais foram sacrificados 1, 3, 5, 8 e 11 dias pós-inoculação ou quando eram encontrados em estado agônico. Baço, cérebro, coração, fígado, músculo e sangue foram colhidos para titulação viral, histologia e imunohistoquímica. Infiltrado inflamatório estava presente no cérebro, principalmente em torno dos vasos, meninges e discretamente no coração. O vírus Oropouche foi detectado no tecido cerebral ($10^{7.23}$ TCID₅₀/g), no fígado ($10^{6.67}$ TCID₅₀/g) ,e no sangue (10^6 TCID₅₀/g). Antígeno de Oropouche foi encontrado, difusamente no fígado, associado com hepatócitos e em neurônios de diversos locais do cérebro. Este modelo reproduz uma infecção sistêmica por Oropouche e pode tornar-se útil no estudo da patogênese, bem como para testar drogas antivirais e possíveis candidatos a vacina.

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE AMOSTRAS DE *HELICOBACTER PYLORI* ISOLADAS DE PACIENTES DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DE RIBEIRÃO PRETO

José Luiz Proença Módena

Orientador: Prof.Dr. Marcelo Brocchi

Dissertação de Mestrado apresentada em 16/11/2004

Helicobacter pylori é um bacilo gram-negativo, que infecta mais de 50% da população mundial,

estando relacionado com inúmeras doenças gastro-duodenais em humanos, como gastrite, úlcera gástrica, úlcera duodenal e câncer gástrico. Esta espécie bacteriana possui um genoma plástico, o que explica a falta de uma associação universal entre marcadores genéticos e quadros clínicos específicos. É aceito, em

geral, que as doenças pépticas relacionadas a *H. pylori* são multi-fatoriais, determinadas pelo genótipo bacteriano, genética e hábito de vida do hospedeiro. Entretanto alguns marcadores de virulência dessa bactéria são descritos na literatura como estando associados aos quadros clínicos mais graves. Apesar disso, existe uma grande variação regional entre os genótipos bacterianos e patologias associadas. Somado a isso, existem poucos estudos que caracterizaram essa associação no Brasil. Assim, o objetivo desse estudo foi caracterizar amostras de *H. pylori* com relação à presença de genes patogênicos por PCR, associando a presença destes com quadros clínicos na população residente da região de Ribeirão Preto.

Cento e setenta e dois pacientes atendidos no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto foram analisados e um total de sessenta e nove amostras de *H. pylori* foram isoladas e tiveram seu DNA extraído. A pesquisa para os genes patogênicos indicou que 77% das amostras bacterianas são *cagA+*, sendo que, esse genótipo foi associado à presença de úlcera duodenal. O gene *cagE* foi encontrado em 87% das amostras bacterianas e foi, também, associado à presença de úlcera duodenal. Ambos genes são marcadores para a presença da ilha de patogenicidade *cag* (PAI*cag*). Esses resultados

indicam ser *cagE* um melhor marcador para a presença do PAI*cag* do que o gene *cagA* nas amostras analisadas. Foram obtidos dados que sugerem que *H. pylori* é capaz de ganhar e perder a PAI*cag* dinamicamente, podendo estar relacionado com a adaptação dessa bactéria à diferentes condições ambientais, confirmando resultados prévios descritos na literatura. Foi observado uma maior predominância dos alelos s1 e m1 de *vacA* em relação aos alelos s2 e m2, respectivamente. O genótipo s1/m1 mostrou ser predominante entre os pacientes com úlcera péptica, enquanto que o genótipo s2/m2 mostrou uma forte relação com a ausência de úlceras, confirmando a associação entre os alelos s1/m1 de *vacA* e a gênese da ulceração péptica. A detecção desses alelos de *vacA* também revelou que 26% dos pacientes estudados eram portadores de mais de uma linhagem de *H. pylori*.

Em conclusão, nosso estudo confirmou a alta prevalência de *H. pylori* na população humana residente na região de Ribeirão Preto e sua associação com doenças gástricas. Amostras de *H. pylori* com os genótipos *cagA*, *cagE* e *vacA* s1/m1 mostraram-se associadas com a presença de úlcera duodenal, sugerindo que a detecção desses genes funcionam como marcador para as amostras mais patogênicas.

ESTUDO DE EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *SHIGELLA* spp. REVELA A POSSÍVEL ORIGEM CLONAL DE AMOSTRAS MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS

Gustavo Olszanski Acrani

Orientador: Prof.Dr. Marcelo Brocchi

Dissertação de Mestrado apresentada em 19/11/2004

O gênero *Shigella* pertence à família *Enterobacteriaceae*. Ele é dividido em 4 “espécies” patogênicas para o homem, de acordo com características bioquímicas e antigênicas: *S. sonnei*, *S. boydii*, *S. flexneri* e *S. dysenteriae*. Essa divisão é apenas didática, pois experimentos de hibridação de DNA sugerem que o gênero é composto por uma única espécie que também compreenderia *Escherichia coli*. *Shigella* spp é frequentemente associada a infecções intestinais denominadas shigelose ou disenteria bacilar. Na região de Ribeirão Preto existe um quadro endêmico de casos de *Shigella* spp. No período de janeiro de 1999 a fevereiro de 2000, foram isoladas 64 amostras de *Shigella* spp. pela Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, as quais foram caracterizadas quanto à “espécie” e tiveram sua sensibilidade a antibióticos analisada, revelando que 35,13% das amostras eram multirresistentes. Foram também analisadas seis amostras de *S. dysenteriae* e uma de *S. boydii* cedidas pelo Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto. No presente trabalho a tipagem molecular de tais amostras foi realizada utilizando a técnica de PCR de elementos repetitivos, com iniciadores específicos para as seqüências ERIC e REP, e tipagem por ribotipagem, para verificar se tais metodologias seriam eficientes na discriminação das amostras e identificar diferenças genotípicas entre as quatro “espécies” de *Shigella* spp. Tal análise revelou que REP e ERIC-PCR foram mais eficientes do que ribotipagem na discriminação das amostras analisadas e revelou também que *S. sonnei* e *S. flexneri*

traz de *Shigella* spp. pela Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, as quais foram caracterizadas quanto à “espécie” e tiveram sua sensibilidade a antibióticos analisada, revelando que 35,13% das amostras eram multirresistentes. Foram também analisadas seis amostras de *S. dysenteriae* e uma de *S. boydii* cedidas pelo Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto. No presente trabalho a tipagem molecular de tais amostras foi realizada utilizando a técnica de PCR de elementos repetitivos, com iniciadores específicos para as seqüências ERIC e REP, e tipagem por ribotipagem, para verificar se tais metodologias seriam eficientes na discriminação das amostras e identificar diferenças genotípicas entre as quatro “espécies” de *Shigella* spp. Tal análise revelou que REP e ERIC-PCR foram mais eficientes do que ribotipagem na discriminação das amostras analisadas e revelou também que *S. sonnei* e *S. flexneri*

compartilham mais características em comum entre si do que essas em relação a *S. dysenteriae* e *S. boydii*. Os dados ainda sugerem uma possível origem clonal de amostras multirresistentes, já que estas apresentaram grande similaridade genética. O presente trabalho revelou também através do ERIC-PCR uma região do genoma destas bactérias conservada entre as amostras de *Shigella* spp. que poderia ser utilizada

para fins diagnósticos. A função biológica das seqüências ERIC ainda é muito especulativa e desconhecida. Os resultados aqui descritos sugerem a existência de uma pressão seletiva para manter essas seqüências ERIC intactas em uma região específica do genoma. Portanto, uma melhor caracterização desta região genômica poderia revelar a significância biológica das seqüências ERIC.

O PAPEL DAS ISOFORMAS DA ENZIMA FOSFOLIPASE D EM CÉLULAS DA LINHAGEM DE MASTÓCITOS RBL-2H3

Liliana Martos Nicoletti

Orientadora: Profa.Dra. Constance Oliver

Dissertação de Mestrado apresentada em 17/12/2004

Os mastócitos são células imunorreguladoras que participam dos mecanismos de defesa do organismo e de outros processos como reações alérgicas, inflamatórias, asma e eliminação de parasitas. Os mastócitos possuem receptores com alta afinidade para a imunoglobulina E (FcεRI), que constituem a sua principal via de ativação. Os mais importantes resultados obtidos no presente trabalho, utilizando linhagens de mastócitos transfectadas para a super expressão das forma catalítica ativa e catalítica inativa das isoforma de fosfolipase D (PLD), mostraram que a isoforma PLD1 está relacionada com a formação de grânulos

secretores, mas não interfere com a liberação de β-hexosaminidase. A isoforma PLD2 participa da manutenção da morfologia celular em mastócitos e, neste trabalho, mostramos pela primeira vez, que nestas células a isoforma PLD2 está localizada no complexo de Golgi. Os resultados obtidos no estudo sobre a isoforma PLD1, auxiliam na elucidação do papel desta enzima em mastócitos e, possivelmente, em outras células secretoras. Também nossos achados irão contribuir para as futuras investigações onde as isoformas da PLD1 e PLD2 estejam envolvidas, contribuindo assim, para novas intervenções no processo de liberação de mediadores por mastócitos. No entanto, investigações mais aprofundadas deverão ser realizadas para se entender o mecanismo destas isoformas na desgranulação de mastócitos.

IDENTIFICAÇÃO, CLONAGEM E EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA FRAÇÃO VESICULAR DE *LEISHMANIA MAJOR* COM POSSÍVEIS FUNÇÕES NA RELAÇÃO PARASITA/HOSPEDEIRO

Arthur Henrique Cavalcante de Oliveira

Orientador: Prof.Dr. Richard John Ward

Tese de Doutorado apresentada em 20/12/2004

O parasita *Leishmania* é o agente causador da leishmaniose. Essa doença afeta cerca de 12 milhões de pessoas que, em sua maioria, vivem em países subdesenvolvidos. Assim, a leishmaniose é considerada um problema de saúde mundial pela O.M.S. (Organização Mundial de Saúde). Os estudos bioquímicos e de biologia molecular podem ajudar no entendimento da biologia do parasita e, assim, colabo-

rar no combate à doença.

Os objetivos do projeto foram identificar, clonar e expressar proteínas da fração vesicular das formas promastigotas de *Leishmania major* e *Leishmania amazonensis*. A etapa inicial desse estudo consistiu no fracionamento das formas promastigotas para o enriquecimento das amostras com a fração vesicular. Após a ruptura das vesículas, as proteínas solúveis foram separadas por géis unidimensional e bidimensional e analisadas por espectrometria de massa. ESI-MS/MS e MALDI-TOF/MS foram usadas para identificação das proteínas através do mapeamento das massas de peptídeos tripsínicos ("peptide mass

fingerprint”, PMF). Essa técnica possibilitou a análise de 74 “spots” de proteínas, resultando na identificação de 28 deles.

A identificação das proteínas presentes no extrato solúvel de vesículas possibilitou a seleção de três, possivelmente secretadas, como alvos de estudo para investigação de suas funções na biologia da *Leishmania*. Foram selecionadas: a nucleosídeo difosfato kinase b (NDK-b); a protease calpaína-“like” (CLP) e a carboxipeptidase termoestável (TCP). As seqüências codificadoras foram obtidas por PCR de DNA genômico de *L. major* e clonadas nos vetores pT7T3 e pET28a. As construções em pET28a foram usadas para a expressão das proteínas em *E. coli*

BL21(DE3)pLysS e resultaram em duas proteínas solúveis, a NDK e a CLP, e uma insolúvel, a TCP. As três proteínas tiveram bons níveis de expressão. As proteínas NDK e CLP foram parcialmente purificadas por cromatografia de afinidade. As proteínas NDK e TCP, expressadas em *E. coli*, tiveram sua identificação confirmada por ESI-MS/MS.

Portanto, a estratégia aplicada nesse estudo, baseada na caracterização do proteoma subcelular, demonstra que a biologia molecular e a bioquímica podem contribuir para a elucidação de processos envolvidos no mecanismo de invasão do hospedeiro pelo parasita e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de drogas ou estratégias de combate ao parasita.

MODULAÇÃO DA FUNÇÃO DO RECEPTOR DE ALTA AFINIDADE PARA IgE ATRAVÉS DE GANGLIOSÍDEOS

Fabiana Matioli

Orientadora: Profa. Dra. Maria Célia Jamur

Dissertação de Mestrado apresentada em 20/12/2004

Os mastócitos desempenham uma função imuno-regulatória em várias doenças imunes e na defesa do hospedeiro contra parasitas, bactérias e vírus. A liberação de mediadores químicos produzidos pelos mastócitos é mediada pelo receptor de alta afinidade para a imunoglobulina E (FcεRI). Evidências recentes mostram que os eventos iniciais da transdução do sinal via FcεRI ocorrem em *lipid rafts*, microdomínios da membrana plasmática, constituídos por esfingolípidos, colesterol e onde certas proteínas são confinadas. Evidências indiretas sugerem que os gangliosídeos derivados do GD_{1b}, específico de mastócitos, podem estar em *lipid rafts*, mas a sua relação com o FcεRI e/ou papel funcional na sua modulação, permanecem desconhecidos. Nossos resultados mostram que células RBL-2H3 expostas por 24 horas, ao mAb

AA4, que se liga aos gangliosídeos derivados do GD_{1b}, apresentam estes gangliosídeos agregados na superfície celular. Quando estas células são estimuladas via FcεRI, a liberação da beta-hexosaminidase é inibida. No entanto, quando as células foram expostas ao mAb AA4 por 1 hora e cultivadas por mais 23 horas na ausência do mAb AA4, não ocorreu inibição da liberação desta enzima. Estes dados mostram que estas células, embora possuam gangliosídeos agregados, novos gangliosídeos foram sintetizados durante as 23 horas, os quais se encontram dispersos na superfície celular em proximidade com o FcεRI. Ainda, foi detectada a LAT, uma proteína integrante dos *lipid rafts*, associada aos agregados de gangliosídeos. Por outro lado, a Vav-1, uma proteína citoplasmática que só é observada em *lipid rafts* quando as células são estimuladas, não foi encontrada nos agregados de gangliosídeos de células não-estimuladas. Nossos resultados mostram que a associação dos gangliosídeos com o FcεRI é essencial para que ocorra a transdução do sinal para liberação dos mediadores químicos.

LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DA MIOSINA Va FOSFORILADA DURANTE O CICLO CELULAR E NA PROGRESSÃO TUMORAL EM MELANOMAS

Hellen Cristina Ferreira Ishikawa

Orientador: Prof. Dr. Roy Edward Larson

Dissertação de Mestrado apresentada em 21/12/2004

As miosinas da classe V são motores moleculares envolvidos em um vasto número de funções celulares, atuando nas várias formas de motilidade

em eucariotos, tais como migração celular, citocinese, fagocitose, tráfego de organelas e vesículas, transporte de RNA mensageiro, extensão do cone de crescimento neuronal, crescimento polarizado, manutenção da forma celular e possivelmente envolvida na dinâmica do centrôssomo e em vias centrais da fisiologia celular. O presente estudo mostrou através de microscopia de confocal e imunofluorescência a localização subcelular diversificada da miosina Va fosforilada durante as fases do ciclo celular e nas etapas da progressão tumoral. Durante as fases da intérfase a localização da miosina Va fosforilada foi nuclear, perinucleolar e aparentemente distribuída em regiões de grânulos intercromatínicos denominados de “*speckles*”. Na mitose a localização da miosina Va

fosforilada foi difusa, entretanto, na metáfase e anáfase houve uma colocalização com o centrôssomo. No melanoma primário em fase de crescimento radial (RGP), que restringe-se a epiderme; e no melanoma primário de fase de crescimento vertical (VGP), quando as células começam a infiltrar a derme verticalmente, a localização da miosina Va fosforilada foi semelhante a encontrada na intérfase. Porém, no melanoma metastático, a localização apresentou-se difusa e mais intensa no citoplasma em comparação ao nucleoplasma. Essa variação da localização da miosina Va fosforilada sugere que a fosforilação desta proteína possa ser regulada durante o ciclo celular e na progressão tumoral em melanomas.

BIOQUÍMICA

ESTUDO DE TREALASES BIFUNCIONAIS NOS FUNGOS TERMOFÍLICOS *SCYTALIDIUM THERMOPHILUM* E *HUMICOLA GRISEA* VAR. *THERMOIDEA*

Agda Karina Brodoloni Lucio

Orientador: Prof. Dr. Hector Francisco Terenzi
Tese de Doutorado apresentada em 24/09/2004

A trealose é um dissacarídeo amplamente difundido entre fungos, cuja função no interior da célula é atuar como um carboidrato de reserva e ainda como um açúcar protetor em situações estressantes. Sua hidrólise é realizada pela enzima trealase, específica para seu substrato. Dois tipos de trealases têm sido descritos na literatura: uma neutra, com baixa estabilidade térmica e dependente de fosforilação via cAMP, que é responsável pela hidrólise da trealose intracelular; e outra ácida, com alta estabilidade e não-regulatória, que parece ser responsável pela hidrólise de trealose externa, capacitando as células a usar este açúcar como fonte de carbono.

Na primeira parte deste projeto, estudamos a mobilização de trealose durante choque térmico nestes fungos termofílicos, demonstrando que os micélios de tais fungos não acumulam trealose frente a um simples aumento na temperatura (de 40° C para 50° C) e

sim quando são resfriados a 25° C antes de terem suas temperaturas elevadas para 40° C e 50° C.

A segunda parte do projeto evidenciou a existência de trealases bifuncionais nos fungos termofílicos *Scytalidium thermophilum* e *Humicola grisea* var. *thermoidea*. Estudos feitos com trealases de fungos termofílicos demonstraram que estas enzimas não se enquadram no padrão convencional de classificação, tendo sido demonstradas, até o presente momento, apenas trealases ácidas com propriedades mistas nestes fungos. No entanto, nossos dados demonstraram que tais enzimas possuem duas atividades: uma ácida e uma neutra as quais parecem coexistir na mesma molécula. Estas duas atividades trealásicas foram caracterizadas bioquimicamente e demonstraram possuir propriedades cinéticas diferentes: temperatura ótima, termoestabilidade, efeito de íons, efeito de ATP e de glicosídeos e parâmetros cinéticos Km e Vmáx.

Além disso, na terceira parte deste projeto, investigações moleculares nos permitiram detectar um fragmento de gene para trealase neutra nas trealases dos fungos termofílicos aqui estudados.

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MECANISMO DE AÇÃO DE FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS PURIFICADAS DA PEÇONHA DA ARANHA *PARAWIXIA BISTRIATA*

René de Oliveira Beleboni

Orientador: Prof.Dr. Joaquim Coutinho Netto
Tese de Doutorado apresentada em 27/09/2004

Aranhas são animais que dependem da peçonha para sua defesa, bem como para induzir paralisia e morte da presa utilizada na alimentação. Peçonhas de aranhas são constituídas principalmente de polipeptídeos solúveis, bem como de compostos de baixa massa molecular, tais quais acil-poliâminas, peptídeos, aminoácidos normais e modificados, alcalóides, neurotransmissores, sais inorgânicos e outros. Muitos de seus componentes funcionam como neurotoxinas de alta afinidade e seletividade dirigidas para estruturas específicas do Sistema Nervoso Central (SNC) de mamíferos e invertebrados. Em consequência, são compostos estratégicos e relevantes para pesquisa neuroquímica e neuroetológica, assim como para a prospecção de novas drogas terapêuticas e inseticidas naturais.

O ácido γ -aminobutírico é o mais prevalente neurotransmissor inibitório do SNC de mamíferos, atuando também em invertebrados na neurotransmissão central e periférica. Diversas alterações neurológicas e neuropsíquicas em humanos, tais como a epilepsia e isquemia cerebral, estão vinculadas a disfunções do sistema GABAérgico em regiões específicas ou generalizadas do encéfalo.

A aranha *Parawixia bistriata* é social, abundante nas regiões de cerrado brasileiro. Constrói ninhos quiescentes no verão, facilitando assim o acolhimento de um grande número de indivíduos de mesma espécie numa pequena área circunscrita. A peçonha da aranha ora descrita é capaz de inibir a recaptação sinaptosomal de GABA, bem como as ligações a receptores (“bindings”) GABAérgicos e glutamatérgicos em membranas sinaptosomais. No referido trabalho apresentamos a purificação, identificação e caracterização bioquímica dos componentes responsáveis pelos efeitos supracitados.

O procedimento de purificação foi acompanhado de ensaios sinaptosomais de recaptação e liberação GABAérgicas, estando as preparações morfo-funcionalmente preservadas, como evidenciado pelo emprego da microscopia eletrônica de transmissão, ensaios da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) e testes funcionais.

O trabalho culminou na purificação em alto grau de homogeneidade de um composto inibitório da recaptação de GABA (FrPbAII), o qual provavelmente se trata de um aminoácido modificado, em alto grau de pureza e massa molecular de 174 Da. O componente isolado é um inibidor competitivo da recaptação GABAérgica, que não altera a atividade de canais iônicos de sódio, cálcio, potássio, de receptores GABA_B, e da enzima GABA-T. Em concordância com estes dados, seu modo de ação independe do envolvimento destes componentes. FrPbAII age de modo dependente da dose e do tempo. Os aumentos diretos da liberação ou do transporte reverso estão descartados como partes constituintes de sua atividade, assim como ações inespecíficas, como a formação de poros na membrana citoplasmática e inibição da respiração celular. FrPbAII ainda é seletivo para os transportes de GABA e glicina, apresentando pouco ou nenhum efeito sobre transportadores homólogos (monoaminas) ou similares (glutamato).

Por fim, o componente purificado apresenta marcada atividade anticonvulsivante e neuroprotetora, como evidenciado pelos experimentos de convulsão induzidas em ratos, glaucoma experimental, e experimentação *in vitro*. Em adição, FrPbAII é capaz de atravessar a barreira hematoretiniana, estruturalmente relacionada a hematoencefálica, formação que se constitui como um obstáculo para passagem da maioria dos compostos inibidores da recaptação GABAérgica descobertos até o momento.

GABA e glutamato estão presentes na peçonha da aranha *P. bistriata* em concentrações da ordem de 12,7 e 45 nmoles/mg de peçonha bruta, respectivamente. Estes aminoácidos são em grande parte responsáveis pela inibição do “binding” glutamatérgico e GABAérgico provocada pela peçonha bruta.

A análise detalhada da atividade neuroprotetora ou neurotóxica das peçonhas de aranhas, através da purificação dos princípios ativos, da elucidação estrutural, assim como de sua caracterização neuroquímica contribui também para o desenvolvimento de novos fármacos que atuem contra patologias neurológicas em humanos e potentes inseticidas naturais, bem como para o desenvolvimento de poderosos instrumentos farmacológicos úteis na pesquisa neuroetológica nos seus mais variados níveis.

CLÍNICA CIRÚRGICA

INFLUÊNCIA DA DESNERVAÇÃO MIOENTÉRICA NA CARCINOGENESE DO CÓLON

Ênio Chaves de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Orlando de Castro e Silva Jr.
Tese de Doutorado apresentada em 27/07/2004

A doença de Chagas é causada pela infecção pelo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. A fase aguda é de curta duração e oligossintomática e após 10 a 20 anos na fase crônica 7 a 15% dos pacientes apresentam manifestações digestivas: megacólon e/ou megaesôfago. A neoplasia de cólon não é uma complicação do megacólon chagásico. Não obstante, vários fatores epidemiológicos relacionados ao câncer colorretal colocariam o megacólon chagásico como um grupo de risco para tumores. O objetivo deste trabalho foi o de simular a fisiopatologia do megacólon chagásico cujo substrato histológico é a destruição dos neurônios do sistema nervoso entérico (SNE) após a infecção pelo parasito e estudar a influência do SNE na carcinogênese colorretal. O presente modelo experimental eliminou a influência das variáveis parasito e resposta imunológica do hospedeiro em relação a doença de Chagas. Foram utilizados 40 ratos Wistar, machos, pesando 250 g \pm 50 g, com idade entre 90 e 120 dias. Os animais foram divididos em cinco grupos. Dezesesseis animais receberam aplicação de cloreto de benzalcone (CB) 0,2% sobre a serosa do cólon esquerdo através de laparotomia. Dezesesseis animais foram submetidos ao mesmo procedimento com a aplicação de salina 0,9% e oito ratos serviram como controles. Após dez dias da aplicação de CB, sete animais (grupo CB Precoce) e mais oito ratos tratados com salina (grupo Sal Precoce) foram desafiados com o carcinógeno 1,2-dimetilhidrazina (DMH).

Cento e sessenta dias após a aplicação do CB, nove animais (grupo CB Tardio) e oito (grupo Sal Tardio) foram injetados com a DMH. A dose do cancerígeno foi de um mg/kg de peso semanalmente, durante 16 semanas, via subcutânea. Após o sacrifício dos animais, um segmento do cólon proximal e outro do distal foram processados para a contagem neuronal do SNE, avaliação da atividade proliferativa do epitélio colônico pelo número de células marcadas pelo antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) através de ensaio imuno-histoquímico. Os resultados foram analisados pelo teste U de Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. O número de neurônios/mm de comprimento intestinal nos animais foi de $449,8 \pm 99,9$ e $843,2 \pm 57,0$ para os grupos CB Precoce e Sal Precoce, respectivamente ($p = 0,021$). Para os animais que receberam a DMH tardiamente o número de neurônios/mm de comprimento intestinal foi de $457,1 \pm 80,4$ e $802,3 \pm 66,5$ para os grupo CB e Sal, respectivamente ($p = 0,018$). O grupo controle apresentou um número de neurônios de $1950,3 \pm 170,4$ por mm. O Índice-PCNA foi de 0,480 no grupo CB Tardio e de 0,656 no grupo Sal Tardio ($p = 0,004$) no segmento distal dos cólons. O segmento proximal não mostrou diferença nos quatro grupos. Concluiu-se que: a diminuição do número de neurônios do SNE foi associada a uma menor taxa de proliferação celular em todos os compartimentos das criptas da mucosa colônica; foi necessário um período de latência após a deservação para que se observar uma taxa de proliferação celular diminuída nos cólons e a deservação fisiológica que ocorreu com o envelhecimento não diminuiu a taxa de proliferação celular.

ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS PESOS CORPÓREOS ESTIMADOS E OS MEDIDOS OBTIDOS DE PACIENTES IDOSOS E NÃO-IDOSOS EM ESTADO CRÍTICO

Jaciara Machado Viana

Orientador: Prof. Dr. Anibal Basile Filho
Dissertação de Mestrado apresentada em 02/08/2004

A antropometria corresponde à técnica de mensuração do corpo humano ou de suas várias partes. Este método foi desenvolvido no final do século XIX

com a utilização de aparelhos de medição para quantificar diferenças na forma humana. A finalidade das medidas antropométricas é identificar a quantidade e distribuição dos principais determinantes composicionais do peso corpóreo. O objetivo do presente estudo foi comparar a medida direta do peso corpóreo com ajuda de uma balança portátil (real) e a estimada visualmente em pacientes em estado crítico, selecionados de acordo com a faixa etária. Foram estudados prospectivamente 74 pacientes de ambos os sexos (34 masculinos e 40 femininos). Cerca de 31 pacientes tinham idade igual ou superior a 60 anos. Todos os pacientes foram estratificados na admissão de acordo com índice de gravidade APACHE II- Acute Physiologic and Chronic Health Evaluation II. No momento da internação, o paciente era pesado à beira do leito com ajuda de uma balança portátil. Logo em seguida, era realizada a pesquisa do peso corpóreo estimado visualmente. Para cada doente participaram 10 pessoas da equipe médica e/ou da enfermagem escolhidos de forma aleatória, que escreviam de forma sigilosa o valor do peso corpóreo estimado. A média encontrada correspondia ao peso corpóreo estimado, sendo comparado com peso corpóreo medido (ou real). De acordo com a idade, os pacientes foram divididos em dois grupos distintos: aqueles com idade inferior a 60 anos e aqueles com 60 anos ou mais. O primeiro grupo era composto por 43 pacientes, sendo que 55,8 % (n = 24) tiveram os pesos corpóreos e os gastos energéticos em repouso subestimados e 41,9 % (n = 18) apresentaram uma superestimação desses

dados, evidenciando-se uma diferença significativa do ponto de vista estatístico ($p < 0,05$) em ambas as situações, quando comparadas com os pesos corpóreos e os gastos energéticos em repouso reais dos respectivos pacientes. Em 2,3 % dos pacientes (n=1) foi observado que os dados reais eram iguais aos estimados. O segundo grupo era formado por 31 pacientes, sendo que 35,5% (n=11) tiveram os pesos corpóreos e os gastos energéticos em repouso subestimados, sendo esse resultado considerado estatisticamente significativo ($p < 0,05$). Em 64,5 % (n = 20) dos pacientes desse grupo os pesos corpóreos e os gastos energéticos em repouso foram superestimados, sendo esse dado também considerado significativo do ponto de vista estatístico ($p < 0,05$). Nesse grupo, nenhum paciente teve o peso corpóreo e o gasto energético em repouso real igual ao estimado. Entre o grupo total de pacientes (n = 74) os pesos corpóreos foram subestimados em 35 e superestimados em 38 pacientes, sendo observado um erro maior durante a subestimativa, resultado esse considerado significativo do ponto de vista estatístico ($p < 0,05$). Em conclusão, observou-se diferença significativa do ponto de vista estatístico ($p < 0,05$) quando comparados os pesos corpóreos e os gastos energéticos em repouso reais e estimados. Porém, apesar desse achado, os cálculos dos gastos energéticos em repouso pelos dois métodos (real e estimado) não foram importantes do ponto de vista clínico, pois os intervalos encontrados situam-se dentro da faixa de normalidade

ASSOCIAÇÃO DA CICLOSPORINA À "AO PRÉ-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO EM RIM DE RATOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA NORMOTÉRMICA E REPERFUSÃO

Lucy Vieira da Silva Lima

Orientador: Prof.Dr. Adauto José Cologna

Tese de Doutorado apresentada em 13/08/2004

O objetivo deste estudo foi avaliar se a ciclosporina A (CsA) e o pré-condicionamento isquêmico afetam a lesão da isquemia e reperfusão em rim de ratos.

Ratos Wistar machos pesando entre 200 e 300 gramas foram separados aleatoriamente em três grupos, sendo um para controle (GS) e dois experimentais (I e II). Os seis animais do grupo controle foram submetidos à laparotomia seguida da coleta de san-

gue e exposição do pedículo renal E, permanecendo anestesiados durante o período correspondente ao tempo máximo do procedimento (PCI + I/R). O grupo I foi constituído por quatro subgrupos de seis animais cada: Subgrupo I_A – submetido à isquemia normotérmica do rim E durante 60 minutos; subgrupo I_B – com tratamento semelhante aos do grupo I_A, exceto pelo emprego de pré-condicionamento isquêmico (15 min de isquemia renal + 10 min de reperfusão), que precedeu a isquemia; subgrupo I_C - animais pré-tratados com ciclosporina A, na dose de 20 mg/kg/dia, iniciada 24 horas antes da cirurgia e administrada novamente após a cirurgia; subgrupo I_D - animais igualmente tratados

com ciclosporina A e submetidos à pré-condicionamento isquêmico, seguido de isquemia e reperfusão. O grupo II foi igualmente dividido em quatro subgrupos de seis ratos que receberam tratamento semelhante ao do grupo I, exceto pelo tempo de isquemia renal normotérmica, reduzido para 40 minutos. A isquemia renal foi realizada por meio de uma laparotomia mediana e seguida de pinçamento da artéria renal E. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg). Ao final da cirurgia todos os ratos foram submetidos à nefrectomia D. Amostras de sangue venoso foram colhidas de todos os animais 24 horas antes da cirurgia para determinação dos níveis de uréia e creatinina séricos. Após 24 horas da cirurgia os ratos foram sacrificados e o rim esquerdo removido para histologia e estudo da função mitocondrial, que foi avaliada pela determinação dos estados respiratórios 3 e 4, da razão do controle respiratório (RCR), do potencial de membrana e do intumescimento osmótico.

No grupo GS não houve alteração da função renal (uréia e creatinina) quando se comparou os re-

sultados obtidos no dia da cirurgia (D_0) àqueles encontrados 24 horas após (D_1). Neste grupo a função mitocondrial e a histologia do rim foram normais. No grupo GII a função renal foi protegida pela ciclosporina A associada ou não ao pré-condicionamento, fato que não se repetiu quando o PCI foi aplicado isoladamente. O efeito protetor da ciclosporina A foi confirmado, neste grupo, pela preservação da respiração mitocondrial, manutenção do potencial de membrana, mudanças pouco significativas no intumescimento mitocondrial e redução do grau de lesão tecidual determinado por microscopia ótica, no tecido corado com hematoxilina-eosina. Nem a ciclosporina e nem o pré-condicionamento isquêmico foram capazes de preservar a função renal ou a lesão tecidual após isquemia de 60 minutos (grupo I). Neste mesmo grupo tanto a ciclosporina como o pré-condicionamento protegeu apenas a membrana mitocondrial como ficou determinado pela medida do potencial de membrana e do intumescimento mitocondrial. Esses parâmetros ainda sugerem que houve proteção, mesmo com 60 minutos de isquemia.

ESPECTROSCOPIA POR RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA NO DIAGNÓSTICO DA COLESTASE NEONATAL E SUA RELAÇÃO COM A HISTOLOGIA E A FUNÇÃO MITOCONDRIAL

Roberto de Oliveira Cardoso dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Orlando de Castro e Silva Jr.

Tese de Doutorado apresentada em 25/08/2004

A atresia biliar tem se mantido ao longo das últimas décadas como um dos maiores desafios a ser enfrentado pelo cirurgião pediátrico. Apesar dos grandes avanços técnicos e científicos, ainda não se esclareceu a etiologia desta moléstia, ainda não se descreveu um método objetivo e não invasivo para se estabelecer seu diagnóstico e ainda não se conhece uma conduta terapêutica simples e efetiva para tratá-la. Este estudo procura avaliar o valor da Espectroscopia do ^{31}P por Ressonância Magnética como método diagnóstico no pré-operatório das síndromes colestáticas neonatais. E procura relacionar os achados espectroscópicos às alterações anatômicas e funcionais encontradas no parênquima hepático.

Foram analisadas 17 crianças com idade entre 1 e 12 meses, que foram divididas em três grupos: atresia biliar (Grupo I), colestases não atrésicas (Grupo II) e Controle (Grupo III). Todos os pacientes tiveram o fígado analisado através da Espectroscopia do ^{31}P por

Ressonância Magnética, e 15 das 17 crianças foram submetidas à cirurgia, com biópsia hepática e análise das alterações histológicas e da função mitocondrial.

Encontrou-se queda nos valores de PDE/PME ($p < 0,05$) no Grupo I quando comparado ao Grupo II e ao Grupo III, e queda nos valores de ATP/PME ($p < 0,01$) quando comparado ao Grupo III. Houve também diferença significativa entre os Grupos I e III nos valores da largura das relações PDE/PME, ATP/PME e PME/ P_i . Há tendência à queda nos valores de PDE/PME à medida que aumenta o grau da inflamação, fibrose, colestase e proliferação ductal no fígado examinado. A função mitocondrial (Estado IV e RCR, razão de controle respiratório) encontra-se comprometida de maneira importante nos pacientes com colestase (Grupos I e II) quando comparados ao Grupo Controle ($p < 0,01$) e este comprometimento tem relação ($p < 0,05$) com a queda nas relações espectroscópicas PDE/ATP (integral e amplitude), e ATP/ P_i (largura).

Estes resultados sugerem que a Espectroscopia é um método objetivo e não invasivo, útil no diagnóstico diferencial das colestases neonatais. Seus va-

lores estão relacionados tanto com as alterações histológicas como com as alterações energéticas do hepatócito. Além disso, este estudo demonstra, pela

primeira vez, a existência de importante comprometimento da função mitocondrial no fígado de crianças com síndrome colestatíca.

ESTUDO DA CITOPROTEÇÃO DA MUCOSA GÁSTRICA POR UMA DROGA DOADORA DE ÓXIDO NÍTRICO (DINITRATO DE ISOSSORBIDA) EM RATOS SUBMETIDOS À AÇÃO DE UM ANTI-INFLAMATÓRIO NÃO-ESTEROIDAL (CETOPROFENO)

Afonso Luiz Villa

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo Ceneviva

Dissertação de Mestrado apresentada em 21/09/2004

As drogas anti-inflamatórias não-esteroidais constituem um importante grupo de fármacos, com uma ampla variedade de indicações terapêuticas nas diversas áreas da medicina moderna. Apesar de seus efeitos benéficos, há uma alta incidência de efeitos adversos, principalmente no trato gastrointestinal. A compreensão dos mecanismos de lesões induzidas por AINES e dos mecanismos de defesa da mucosa gástrica constitui hoje um dos principais objetivos da pesquisa científica mundial, destacando-se principalmente os que tentam avaliar o papel do óxido nítrico (NO) como agente citoprotetor.

Objetivo: definir eventual citoproteção da mucosa gástrica por uma droga doadora de óxido nítrico, o dinitrato de isossorbida, em ratos submetidos à ação de uma droga anti-inflamatória, o cetoprofeno.

Métodos: ratos adultos machos WISTAR, previamente submetidos a jejum de 24 horas e divididos em 3 grupos: grupo I (padrão): animais que receberam apenas solução salina isotônica via intra-gástrica por gavagem e por via endovenosa; grupo II (controle-cetoprofeno): animais que receberam solução salina isotônica via intra-gástrica por gavagem, e cetoprofeno

por via endovenosa; grupo III (nitrato-cetoprofeno): animais que receberam solução de dinitrato de isossorbida a 2 mM/l via intra-gástrica por gavagem, e cetoprofeno por via endovenosa. Posteriormente procedeu-se a eutanásia destes animais e o estômago foi submetido a estudo macroscópico, microscópico e bioquímico. Os parâmetros avaliados foram: a) determinação do índice de lesão, b) determinação da espessura da camada do muco secretor; c) determinação da concentração de NOx tecidual d) determinação da concentração do MDA tecidual. Resultados: O índice de lesão foi significativamente menor e a espessura da camada de muco secretor foi significativamente maior nos animais do grupo III em relação aos do grupo II. A variação da concentração do NOx tecidual foi semelhante nos três grupos, não ocorrendo significância estatística quando comparados entre si. A taxa de peroxidação lipídica avaliada pela dosagem do MDA, foi estatisticamente maior no grupo III que nos demais grupos, não sendo possível, contudo, se estabelecer uma correlação com os demais parâmetros, pois este método de avaliação da taxa de peroxidação lipídica é inespecífico, além do fato que este evento também é influenciado diretamente pela ação da droga anti-inflamatória.

Conclusão: o dinitrato de isossorbida exerce uma atividade citoprotetora na mucosa gástrica de ratos submetidos à ação do cetoprofeno.

ESTUDO DO REFLUXO DUODENOGASTROESOFÁGICO E DAS ALTERAÇÕES CLÍNICAS E ENDOSCÓPICAS EM PACIENTES CHAGÁSICOS SUBMETIDOS À ESOFAGECTOMIA SUBTOTAL COM ESOFAGOGASTROPLASTIA

Rennel Pires de Paiva

Orientador: Prof. Dr. Reginado Ceneviva

Dissertação de Mestrado apresentada em 24/09/2004

O tratamento cirúrgico do megaesôfago chagásico avançado por esofagectomia subtotal com re-

construção por esofagoplastia cervical e piloro-plastia implica em possíveis complicações tardias, provavelmente associadas ao refluxo duodenogastroesofágico. A gênese destas complicações tem sido insuficientemente estudada. O objetivo do presente estudo foi, avaliar o refluxo biliar duodenogástrico e o refluxo ácido gastroesofágico correlacionados com os aspec-

tos clínicos e endoscópicos sugestivos de doença do refluxo gastroesofágico (DRGE). Para tanto foram estudados nove pacientes chagásicos com idade variando entre 33 e 75 anos no pós-operatório tardio de esofagectomia subtotal com esofagogastroplastia cervical e piloroplastia. Foram submetidos à avaliação clínica e endoscópica considerando os seguintes aspectos: pirose, regurgitação, esofagite e Barrett no coto esofágico. O refluxo duodenogástrico (IRDG) foi quantificado através da determinação da radioatividade no aspirado gástrico após injeção endovenosa de ^{99m}Tc ANTPOT. Tecnécio-DISIDA', e o refluxo ácido gastroesofágico mediante pHmetria de 24 horas. Os seguintes resultados foram evidenciados: a esofagite foi encontrada em sete dos nove pacientes; foi

correlacionada positivamente com a presença de bile no estômago ($p=0,001$), mas não com os resultados do IRDG e da pHmetria ($p=0,810$ e $0,933$). Houve predomínio do refluxo ácido nos casos com esofagite, de acordo com as medianas dos resultados de cada exame. Quanto à pirose, regurgitação e Barrett no coto esofágico as medianas dos valores do IRDG e da pHmetria foram maiores que os valores normais indicando participação de refluxo ácido e biliar. Os resultados da quantificação do refluxo duodenogástrico e da pHmetria, correlacionados aos achados endoscópicos e clínicos da DRGE, permitem indicar a existência de refluxo ácido e biliar, isolados ou em associação, como implicados na gênese dos processos inflamatórios do coto esofágico.

REGENERAÇÃO DO REMANESCENTE HEPÁTICO APÓS HEPATECTOMIA PARCIAL A 70% COM E SEM ESTÍMULO DA LUZ LASER. ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATO

João Luiz Brisotti

Orientador: Prof. Dr. Orlando de Castro e Silva Jr.
Tese de Doutorado apresentada em 27/09/2004

Nos últimos anos ocorreram eventos que permitiram a abordagem cirúrgica de diversas enfermidades hepáticas envolvendo ressecções parciais desse órgão. Assim ganharam maior importância os estudos relacionados à regeneração do fígado, envolvendo os mecanismos reguladores e também os métodos de avaliação desse fenômeno. Particularmente, o estudo de vários métodos que influenciem positivamente a regeneração hepática, de modo especial os que relacionam a emissão de luz laser (em suas diversas modalidades) têm se tornado foco de vários estudos experimentais visando futuras aplicações clínicas. Este estudo teve por objetivo estudar experimentalmente a regeneração e a função mitocondrial do remanescente hepático, em ratos submetidos à ressecção parcial do fígado, sob o efeito seletivo da luz laser de baixa potência, avaliando-se variáveis teciduais hepáticas (estado III e IV da respiração mitocondrial, índice de fosforilação) e atividade replicativa do hepatócito (P.C.N.A. - *Proliferating Cell Nuclear Antigen*). A amostra de 17 ratos foi dividida em grupos: Grupo FRc ($n = 6$) – submetidos a hepatectomia parcial a 70%, Grupo FR ($n = 6$) – submetidos a hepatectomia parcial a 70%, nos quais o remanescente hepático direito, foi irradiado diretamente com laser de argônio duran-

te 5 minutos. O remanescente hepático esquerdo foi protegido contra a irradiação por anteparo totalmente opaco à passagem da luz laser e Grupo C ($n = 5$) – controle, cujos animais foram submetidos a procedimento cirúrgico simulado para hepatectomia parcial. Após 24 horas do procedimento cirúrgico todos os animais foram submetidos à eutanásia. A análise estatística entre os diversos grupos foi feita através de testes não paramétricos de Mann-Whitney com nível de significância de 5%. Dessa maneira, no estado III da respiração mitocondrial, observou-se aumento do consumo de oxigênio no grupo que recebeu irradiação laser (FRL), em relação aos demais grupos, que tiveram níveis semelhantes; já no que se refere ao estado IV ocorreu diferença significativa entre o lobo irradiado e o seu controle (FRDc e FRDL), porém isto não se repetiu nos remanescentes hepáticos que não foram submetidos a radiação laser e seus controles (FREc e FREni); com relação à síntese de A.T.P. ocorreu aumento significativo quando comparou-se o lobo irradiado (FRDL) e seu controle (FRDc); o índice mitótico observado através de P.C.N.A. aumentou significativamente quando comparou-se os grupos controle (FREc e FRDc) com os grupos experimentais (FREni e FRDL). Portanto, observou-se que o remanescente hepático, após hepatectomia parcial a 70%, apresentou regeneração hepática semelhante quer na parte irradiada quer na parte não irradiada com luz laser.

ANÁLISE CRÍTICA DOS PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS PARA O MEGACÓLON CHAGÁSICO EM 430 PACIENTES OPERADOS NO HCFMRP-USP

Ricardo Luiz dos Santos Garcia

Orientador: Prof.Dr. José Joaquim Ribeiro da Rocha
Dissertação de Mestrado apresentada em 27/09/2004

A doença de Chagas é uma moléstia endêmica causada pelo *Trypanossoma cruzi*, um parasita que é transmitido ao ser humano através de insetos triatomídeos. Afeta milhões de pessoas na América Latina, principalmente no Brasil, Argentina, Chile, Paraguai e Bolívia. O megacólon, a mais comum complicação da tripanossomíase intestinal, quando causa constipação grave, é necessário tratamento cirúrgico. Uma variedade de procedimentos operatórios tem sido proposta para o tratamento do megacólon chagásico e suas complicações. O seguimento a longo prazo de todas essas operações tem demonstrado que não existe uma única técnica que contemple as diversas apresentações do megacólon. No período de janeiro de 1977 a dezembro de 2003, 430 pacientes chagásicos foram submetidos a tratamento cirúrgico para o megacólon no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Foram realizadas 351 operações eletivas e 79 de urgência. A constipação intestinal crônica progressiva, refratária ao tratamento clínico, foi a principal indicação cirúrgica nos pacientes operados eletivamente. A obstrução intestinal por volvo do cólon sigmóide, presente em 48 pacientes, foi a principal indicação cirúrgica na urgência. A obstrução intestinal por fecaloma, a perfuração iatrogênica do retossigmóide e a colite isquêmica foram as outras complicações do megacólon que necessitaram operação de urgência. Quatro tipos de operações realizadas em caráter eletivo mereceram des-

taque por terem sido as mais utilizadas: retossigmoidectomia anterior (52, 71 %), hemicolectomia esquerda (18,23%), abaixamento de cólon à Duhamel-Haddad (15,95%) e colectomia total (5,98%). Das 79 laparotomias exploradoras realizadas em regime de urgência, em 53 (67,09%) houve ressecção intestinal. Dessas, a sigmoidectomia com colostomia e sepultamento do reto foi a tática mais empregada (45,28%). Das 26 laparotomias exploradoras sem ressecção intestinal, 23 (88,46%) resultaram em rafia do sigmóide ou do reto (com ou sem colostomia proximal), destorção do volvo (com colostomia ou fixação do cólon na goteira parieto cólica), ou esvaziamento do fecaloma. Dentre os 430 pacientes operados, 268 (62,33%) evoluíram sem recidiva e 71 (16,51 %) com recidiva da constipação intestinal. A recidiva ocorreu nos primeiros dois anos em 25 pacientes submetidos a retossigmoidectomia anterior, em 16 submetidos a hemicolectomia esquerda, em 4 submetidos à operação de Duhamel-Haddad e em 1 submetido a colectomia total. Quanto ao seguimento pós-operatório, a maioria compareceu aos retornos nos primeiros cinco anos. Com base nos resultados obtidos concluiu-se que: a hemicolectomia esquerda, comparada às demais operações, apresentou maior recidiva da constipação intestinal; a retossigmoidectomia anterior comparada à operação de Duhamel-Haddad apresentou menor número de complicações e maior recidiva da constipação intestinal; as operações de urgência para o tratamento do volvo e do fecaloma apresentaram alta morbimortalidade, exigem ressecções intestinais, estomas e reoperações.

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE O BLOQUEIO DO GÂNGLIO ESTRELADO E BLOQUEIO REGIONAL INTRAVENOSO COM ANESTÉSICO LOCAL NO TRATAMENTO DA SÍNDROME DE DOR REGIONAL COMPLEXA TIPO I NO MEMBRO SUPERIOR

Maria Salete de Angelis Nascimento

Orientador: Prof. Dr. Jyrson Guilherme Klamt
Tese de Doutorado apresentada em 19/10/2004

Objetivo: Nesse trabalho avaliamos a eficácia analgésica do bloqueio simpático cervical (bloqueio do gânglio estrelado) com lidocaina sozinha ou associ-

ada à clonidina, ao bloqueio regional intravenoso produzido pela lidocaina associada a clonidina para controle da dor em pacientes portadores de Síndrome Complexa de Dor Regional tipo I (S.C.D.R. tipo I) do membro superior.

Método: Após aprovação pelo Comitê de Ética Médica, foram selecionados 45 pacientes alocados

em 3 grupos de 15. Os pacientes foram submetidos ao bloqueio do gânglio estrelado (BGE) pela técnica de injeção por via paratraqueal anterior em C-7; e ao bloqueio regional intravenoso (BRI) pela técnica de Bier. No grupo I, os pacientes foram submetidos ao BGE com 7 ml de lidocaina a 1%; no grupo II, ao BGE com 7 ml de lidocaina a 1% associada a 30µg de clonidina; e no grupo III foram submetidos ao BRI com 7ml de lidocaina a 1% associada a 30µg de clonidina. Foram realizados em cada paciente um total de 5 bloqueios com intervalo de 7 dias; e todos fizeram uso de amitriptilina por via oral na dose diária de 25 mg a 100 mg. A avaliação da intensidade da dor foi feita pela escala numérica verbal (ENV) de 0 a 10 nos retornos realizados semanalmente antes de cada bloqueio e após 7 dias do término do tratamento. Avaliou-se também a duração do alívio da dor, durante os 7 dias após o bloqueio, através do registro pelo paciente do dia e da hora em que a ENV ≥ 3 . A ocorrência de eventos adversos, nos 90 minutos após o bloqueio, foram também registrados.

Resultados: Dos 45 pacientes foram excluídos 2, um por apresentar reação alérgica a lidocaina e

o outro por não completar o número de bloqueios estipulados. O tempo médio (em meses) entre o diagnóstico de S.C.D.R. tipo I e o primeiro bloqueio não diferiu entre os grupos ($24 \pm 4,89$ no G I, $24 \pm 4,19$ no G II e $22,28 \pm 3,39$ no G III) correspondentes, portanto, a fase tardia da doença. Foi observado melhora significativa da dor em todos os grupos estudados, não havendo diferença estatística significativa entre os mesmos. Os três grupos, também não apresentaram diferença entre si quanto à duração do alívio da dor, que foi progressivamente maior a cada bloqueio, tendendo a um platô após o terceiro bloqueio. Não foram registradas alterações importantes na pressão arterial média e na frequência cardíaca em todos os pacientes do presente estudo. Os principais eventos adversos observados foram sonolência (14 no G II e 6 no G III), tontura (2 no G I, 2 no G II e 1 no G III) e secura na boca (4 no G II).

Conclusão: Os bloqueios simpáticos são úteis na S.C.D.R. tipo I tardia; e a clonidina associada a lidocaina tanto no bloqueio do gânglio estrelado como no bloqueio regional intravenoso é capaz de promover analgesia de eficácia comparável ao bloqueio do gânglio estrelado com lidocaina.

A ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO DE ESTEATOSE HEPÁTICA

Gustavo Ribeiro de Oliveira

Orientador: Prof.Dr. Orlando de Castro e Silva Jr.

Tese de Doutorado apresentada em 23/11/2004

A esteatose hepática no doador de fígado é considerada um fator de risco para a ocorrência de disfunção primária do enxerto após o transplante. O diagnóstico da esteatose hepática é feito pelo aspecto macroscópico do fígado avaliado pelo cirurgião no momento da extração do órgão do doador ou através de biópsia de congelação. Neste trabalho investigou-se a aplicabilidade da espectroscopia de fluorescência induzida por laser como método diagnóstico dos diferentes graus de esteatose, induzidos experimentalmente em ratos, por se tratar de um método objetivo e com resultado em tempo real.

Método: Ratos Wistar receberam dieta hiperlipídica por períodos diferentes (1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias e 7 dias) para indução da esteatose hepática e foram agrupados de acordo com o grau de esteatose

verificado na histologia. O grupo controle recebeu dieta padrão por 7 dias. Todos os grupos foram avaliados bioquimicamente, submetidos a avaliação da função mitocondrial, avaliação da concentração de gordura hepática e verificação da espectroscopia de fluorescência induzida por laser utilizando o sistema de espectroscopia de fluorescência da Cluster LTD, Rússia. A fluorescência foi avaliada pela sua amplitude e pelo Fator de Fluorescência de Esteatose (FFE), obtido pela razão entre o pico de retroespalhamento e o pico da amplitude de fluorescência.

Resultados: A avaliação bioquímica não mostrou diferenças entre os diferentes graus de esteatose que indicassem disfunção ou agressão hepática causada pela esteatose. A função mitocondrial foi semelhante em todos os grupos estudados. A concentração de gordura foi significativamente maior nos grupos Esteatose Moderada ($29,22 \pm 6,17$ mg/g de fígado) e Esteatose Grave ($39,8 \pm 3,75$ mg/g de fígado) quando comparados ao Controle ($11,05 \pm 2,98$ mg/g de fígado, $p < 0,001$) e também foi diferente quando se comparou

os grupos com diferentes graus de esteatose entre si ($p < 0,001$). A intensidade da fluorescência induzida por laser foi significativamente menor no Grupo Esteatose Grave ($0,16 \pm 0,01$ u.arb; $p < 0,001$) e no Grupo Esteatose Moderada ($0,20 \pm 0,03$ u.arb; $p < 0,05$) em relação ao Grupo Controle ($0,38 \pm 0,07$ u.arb), assim como foi menor quando se comparou o Grupo Esteatose Grave com o Grupo Esteatose Leve ($0,16 \pm 0,01$ vs $0,28 \pm 0,06$ u.arb; $p < 0,01$). Não houve diferença nas demais comparações. Foi possível estimar a média populacional para a intensidade de fluorescência através de intervalos de confiança ($p = 95\%$), que foram distintos para cada grau de esteatose, sendo: grave: $0,15 - 0,17$ u.arb, moderada: $0,18 - 0,23$ u.arb., leve: $0,25 - 0,32$ u.arb e controle: $0,31 - 0,45$ u.arb. O FFE foi significativamente maior no Grupo Esteatose Grave ($6,05 \pm 0,58$; $p < 0,001$) quando comparado aos grupos Esteatose Moderada ($4,40 \pm 0,46$), Esteatose Leve ($3,21 \pm 0,49$) e ao Controle ($2,69 \pm 0,66$). O FFE foi estatisticamente maior no Grupo Esteatose Moderada em relação ao Grupo Esteatose

Leve e ao Controle ($p < 0,001$), assim como foi significativamente maior no Grupo Esteatose Leve quando comparado ao Controle ($p < 0,01$). Houve correlação direta e positiva entre o FFE e a concentração de gordura hepática (GH), expressa pela equação $FFE = 0,114x[GH] + 1,352$, tendo um fator de correlação de 0,983.

Conclusão: A avaliação bioquímica não auxiliou na identificação dos diferentes graus de esteatose e a função mitocondrial estava preservada em todos os grupos estudados. A concentração de gordura foi diferente nos vários graus de esteatose. Há intervalos de confiança distintos para a intensidade de fluorescência na Esteatose Moderada e Grave. O FFE se correlacionou com a concentração de gordura hepática, além de ter sido capaz de distinguir todos os graus de esteatose. A espectroscopia de fluorescência foi um método capaz de diagnosticar os vários graus de esteatose, sendo possível sua aplicação nos transplantes de fígado após estudos clínicos.

A IMPLEMENTAÇÃO DO SISTEMA DE ATENDIMENTO MÓVEL DE URGÊNCIA COM REGULAÇÃO MÉDICA E O IMPACTO SOBRE O PERFIL DE GRAVIDADE DAS URGÊNCIAS NÃO TRAUMÁTICAS TRATADAS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO

Sérgio Luiz Brasileiro Lopes

Orientador: Prof. Dr. José Sebastião dos Santos

Tese de Doutorado apresentada em 01/12/2004

A baixa resolubilidade na atenção às urgências nas unidades pré-hospitalares fixas e a falta de gestão do fluxo dos pacientes sobrecarregam os hospitais de referência. A constatação deste fenômeno em Ribeirão Preto e, particularmente, na Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (UE-HCFMRP-USP), induziu a implementação do Sistema de Atendimento Móvel de Urgência (SAMU). O SAMU presta suporte pré-hospitalar básico e avançado de vida e, por meio da regulação médica, ordena o fluxo de pacientes para os hospitais de acordo com a complexidade dos casos e a capacidade operacional instalada nos hospitais de referência. O objetivo deste trabalho é avaliar o impacto das ações do SAMU no perfil de gravidade dos pacientes com urgências não traumáticas internados na UE-HCFMRP-USP. Foram verificados indicadores demográficos, assistenciais hospitalares e de agravo à saúde, com destaque para a

probabilidade calculada de óbito pelo Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II (APACHE II) dos pacientes internados nos serviços das clínicas médica, cirúrgica e neurológica. Os registros foram feitos no mês de maio de 1996, antes da implantação do SAMU, e em maio de 2001, após sua plena implementação. Na comparação global entre os dois períodos estudados, observou-se, no segundo período, aumento da idade média dos pacientes internados ($P = 0,021$; 95% IC 0,45-5,69), do percentual de pacientes portadores de co-morbidades ($P = 0,0001$; 95% IC 0,04-0,16), das complicações hospitalares ($P = 0,0001$; 95% IC 0,13-0,24), da média da probabilidade calculada de óbito ($P = 0,0008$; 95% IC 1,20-4,40) e do coeficiente de mortalidade ($P = 0,002$; 95% IC 0,02-0,09), sendo todas as diferenças mais significativas para o grupo de pacientes internados na área da clínica médica. Conclui-se que o SAMU, principalmente por ordenar a ocupação de leitos hospitalares por meio de sua regulação médica, contribuiu para a internação, na UE-HCFMRP-USP, de pacientes com afecções mais graves, o que demonstra a potencialidade deste Serviço na organização das referências hospitalares.

TRATAMENTO CONSERVADOR DO ANEL FIMÓTICO COM O FUROATO DE MOMETASONA A 0,1 %, EM CRIANÇAS

Flávio de Oliveira Pileggi

Orientadora: Prof^a Dr^a Yvone A. M.V. A. Vicente
Dissertação de Mestrado apresentada em 07/12/2004

Fimose, definida como a dificuldade em retrair o prepúcio para expor a glândula, devido à presença de um anel fibroso, tem sido tradicionalmente tratada por meio da circuncisão. Durante a última década, no entanto, a corticoterapia foi proposta como tratamento clínico da fimose. Apresentamos um estudo duplo cego, para tratamento clínico de fimose em crianças, comparando um creme de furoato de mometasona 0,1%, aplicado topicamente, com um creme hidratante. Crianças de 2 a 13 anos de idade (n=110) apresentando fimose grau 5 de acordo com a escala de retratibilidade de Kikiros et al, todas previamente agendadas para cirurgia, foram incluídas neste trabalho.

Após oito semanas de tratamento tópico, tanto com o creme hidratante quanto com o corticóide, os

pacientes foram reavaliados e os que não responderam ao tratamento, antes da abertura do estudo duplo cego, foram submetidos a um adicional tratamento com corticóide, por mais oito semanas. No grupo dos pacientes tratados com corticóide, o anel fimótico desapareceu e a glândula foi exposta em 49 pacientes (87,5%). No grupo placebo, o mesmo aconteceu em 28 pacientes (52%) (*p <0,05). Dos 7 pacientes que não responderam ao tratamento inicial, com corticóide, 5 apresentaram boa resposta, enquanto que dos 26 pacientes do grupo placebo, 22 apresentaram exposição da glândula, após o tratamento adicional (*p <0,05). Dois meninos, do grupo tratado com corticóide e quatro do grupo placebo, ainda continuaram com o anel fimótico, mesmo após o tratamento adicional com corticóide, e foram submetidos à postectomia. Concluímos que o uso de corticóide tópico, durante oito semanas, representa uma boa opção para o tratamento da fimose, principalmente na idade pré-escolar.

INCIDÊNCIA DE COMPLICAÇÕES EM TERAPIA NUTRICIONAL ENTERAL EM PACIENTES INTERNADOS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA

Ricardo Martins Borges

Orientador: Prof.Dr. Aníbal Basile Filho
Dissertação de Mestrado apresentada em 10/12/2004

O ser humano necessita de nutrientes em quantidade e qualidade adequadas para atender suas necessidades nutricionais. Muitas vezes a oferta desses nutrientes não pode ser feita via oral, devendo ser feita via enteral ou parenteral, sendo a via enteral preferencialmente a mais indicada.

Os objetivos desse estudo foram verificar a frequência de complicações associadas à terapia nutricional enteral (TNE) em pacientes em estado crítico e analisar comparativamente estas quanto ao sistema de condicionamento e à fonte de macronutrientes das fórmulas.

Foi realizada revisão de 364 internações consecutivas em dois centros de terapia intensiva (CTI). 166 preencheram os critérios de inclusão no estudo. Os

pacientes foram analisados em dois grupos distintos que receberam soluções para nutrição enteral com características semelhantes, exceto pelo sistema de condicionamento e pela fonte de macronutrientes.

As seguintes complicações foram analisadas: diarreia, broncoaspiração, regurgitação, vômitos, constipação e distensão abdominal.

Houve diferença na incidência de complicações totais (22,8% e 38,5%, p<0,05) e na incidência de diarreia (13,8% e 45,8%, p< 0,05).

A incidência de complicações relacionadas à TNE foi de 27,7% e comprometeu a oferta calórica a estes pacientes. O tipo de condicionamento da solução não parece influenciar a incidência das complicações, porém o uso de apenas uma ou duas fontes de macronutrientes (100% das proteínas provenientes de caseinato ou 100% dos carboidratos provenientes da maltodextrina) pode ser um fator predisponente importante de diarreia.

CLÍNICA MÉDICA

EFEITO DA INGESTÃO DA ASSOCIAÇÃO DE β -SITOSTEROL E FIBRA DE BETERRABA SOBRE A LIPEMIA DE INDIVÍDUOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS MODERADOS

Adriana Lúcia Carolo

Orientador: Prof.Dr. José Ernesto dos Santos

Dissertação de Mestrado apresentada em 16/08/2004

O β -sitosterol e a fibra de beterraba são alimentos funcionais que quando adicionados à alimentação reduzem os níveis de colesterol total e LDL-colesterol, sem alterar HDL-colesterol e triglicérides, em indivíduos hipercolesterolêmicos, diminuindo o risco de DAC. Este é um estudo aberto, randomizado, comparativo entre três doses de β -sitosterol e a fibra de beterraba, com duração total de três meses, dividido em três períodos. No primeiro e terceiro período os sujeitos consumiram uma dieta orientada e, no segundo período, a dieta mais duas barras de cereal contendo: 8,5g de fibra de beterraba e 0,9 gramas de β -sitosterol, grupo A; 11,5g de fibra de beterraba e 1,35 gramas de β -sitosterol, grupo B; e 11,5g de fibra

de beterraba e 1,80 gramas de β -sitosterol, grupo C. Foram selecionados 24 sujeitos, 18 do sexo feminino e 6 do sexo masculino, com idade média de $46,6 \pm 12,74$ anos. Durante o período do estudo não houve alteração do IMC e da dieta consumida pelos sujeitos. Quando analisamos os resultados sem randomização, houve redução de 6,55% do colesterol total e 9,71% do LDL-colesterol, sem alteração de HDL-colesterol e triglicérides. No grupo A, com 9 sujeitos, não houve diferença significativa no perfil lipídico entre as visitas. No grupo B, com 7 sujeitos, houve redução de 9,04% e 11,42% no colesterol total e LDL-colesterol, respectivamente. No grupo C, com 8 sujeitos, houve redução de 7,87% no colesterol total e 11,77% no LDL-colesterol. A associação de β -sitosterol e a fibra de beterraba mostrou-se eficaz na redução do colesterol total e LDL-colesterol, contribuindo para atenuar o risco de DAC.

Klebsiella spp PRODUTORA DE BETA-LACTAMASE DE ESPECTRO ESTENDIDO: FATORES DE RISCO PARA INFECÇÃO E IMPACTO CLÍNICO, EM PACIENTES HOSPITALIZADOS

Fernando Bellíssimo Rodrigues

Orientador: Prof.Dr. Roberto Martinez

Dissertação de Mestrado apresentada 16/08/2004

A incidência de infecções nosocomiais causadas por *Klebsiella* spp produtora de ESBL tem apresentado crescimento significativo nas últimas duas décadas, em diversas partes do mundo. Essa situação preocupa a comunidade médica tendo em vista as limitadas opções terapêuticas disponíveis para o tratamento dessas infecções, e o impacto clínico e financeiro por elas determinado. O objetivo desse estudo foi o de avaliar, entre pacientes internados em um hospital universitário, com infecção documentada por *Klebsiella* spp, quais foram os fatores de risco para a infecção por cepa produtora de ESBL, qual o perfil de

sensibilidade exibido por essas cepas a antimicrobianos de diferentes classes, e qual o impacto clínico por elas determinado sobre os pacientes acometidos. Foram incluídos 104 pacientes, sendo 47 infectados por cepa produtora de ESBL e 57 infectados por cepa não-produtora de ESBL. Os fatores de risco para infecção por cepa produtora de ESBL encontrados foram a idade (risco inversamente proporcional), a exposição à ventilação mecânica ou ao acesso venoso central, o uso prévio de antimicrobianos em geral, e especificamente de cefalosporinas de 4^a geração ou quinolonas. As cepas produtoras de ESBL exibiram padrão de resistência significativamente superior ao demonstrado entre as cepas não-produtoras de ESBL para aminoglicosídeos, quinolonas, cloranfenicol, sulfametoxazol/trimetoprim, cefepime e penicilinas associadas a inibidores de β -lactamase. Os pacientes

infectados por cepa produtora de ESBL permaneceram internados por tempo significativamente maior que aqueles acometidos por cepa não-produtora de ESBL. Entretanto, a produção de ESBL não esteve relacio-

nada à evolução final para óbito nessa casuística, tendo esse desfecho apresentado associação com a ocorrência de ventilação mecânica ou insuficiência renal, e a presença de bacteremia.

FARMACOLOGIA

EFEITOS DA L-ARGININA SOBRE A HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR INDUZIDA POR MICROEMBOLIA PULMONAR AGUDA EM RATOS

Débora Cristine Souza da Costa

Orientador: Prof.Dr. José Eduardo Tanus dos Santos
Dissertação de Mestrado apresentada em 16/07/2004

A embolia pulmonar aguda (EPA) é uma séria complicação resultante da migração de êmbolos para os pulmões e obstrução dos vasos pulmonares. A causa primária de morte na EPA é decorrente do desenvolvimento da falência aguda do lado direito do coração devido ao aumento da resistência vascular pulmonar (RVP). Os mecanismos responsáveis pelo aumento da RVP e consequente produção de hipertensão arterial pulmonar (HAP) incluem obstrução vascular pelo material embólico bem como ativa vasoconstrição mediada por potentes substâncias vasoconstritoras.

O óxido nítrico (NO) é um importante vasodilatador que pode ser liberado durante a EPA. A L-arginina é o substrato para NO sintase endotelial, que oxida este aminoácido em L-citrulina e óxido nítrico, um poderoso vasodilatador com propriedades antiplaquetárias e redutoras da adesão leucocitária ao endotélio. Alguns estudos demonstraram que o NO endógeno desempenha um papel importante na vigência de HAP e que a L-arginina é capaz de reduzir a pressão arterial pulmonar (PAP) e a resistência vascular pulmonar (RVP) em pacientes com HAP. Efeitos antioxidante da L-arginina também já foram demonstrados.

Já foi demonstrado que ocorre um aumento do stress oxidativo na vigência de tromboembolia pulmonar em camundongos, porém ainda não foi demonstrado se este aumento ocorre durante a EPA. O stress oxidativo também é capaz de aumentar a atividade de metaloproteinases, porém estudos da atividade de me-

taloproteinases durante a EPA ainda não foram realizados.

Assim, este trabalho foi realizado visando determinar se a L-arginina é capaz de atenuar a HAP produzida por microembolia pulmonar aguda em um modelo de perfusão de pulmões isolados de ratos. Além disso, foram avaliados o grau de stress oxidativo e atividade de metaloproteinases durante a EPA e os efeitos da L-arginina nessas condições.

Os resultados mostraram que a administração de L-arginina previamente a EPA foi capaz de atenuar os aumentos da PAP produzidos pela EPA. O grupo embolia elevou a PMAP em aproximadamente 19 mmHg dos valores basais, enquanto os grupos que receberam L-arginina anteriormente à EPA nas concentrações finais 0,5 mM, 3 mM e 10 mM atenuaram a PMAP em 39%, 26% e 35%, respectivamente ($P < 0,05$). Esses efeitos foram mediados pela produção de NO, uma vez que, a inibição da NOS pelo L-NAME inibiu os efeitos da L-arginina.

A EPA produziu um aumento do stress oxidativo. Porém, a L-arginina foi capaz de atenuar a produção do stress oxidativo, sugerindo uma redução na produção de radicais livres que agravam a HAP. Esses efeitos também foram mediados pelo NO, uma vez que a inibição da NOS pelo L-NAME aboliu os efeitos da L-arginina. Durante a EPA também ocorreu um aumento na atividade de metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9), e a L-arginina foi capaz de atenuar a atividade destas enzimas.

Esses resultados sugerem que a L-arginina pode contribuir para a atenuação da hipertensão arterial pulmonar induzida por EPA, além de possuir propriedades antioxidantes e redutora da atividade de metaloproteinases durante a embolia pulmonar aguda.

ENVOLVIMENTO DA NEUROTRANSMISSÃO SEROTONINÉRGICA DO HIPOCAMPO DORSAL NA MEDIAÇÃO DE RESPOSTAS ADAPTATIVAS A UM ESTRESSE INESCAPÁVEL EM RATOS

Sâmia Regiane Lourenço Joça

Orientador: Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães
Tese de Doutorado apresentada em 23/08/2004

Diversas evidências sugerem que a neurotransmissão serotonérgica do hipocampo dorsal, através da ativação de receptores 5-HT_{1A}, seria responsável por desconectar associações previamente aprendidas em eventos aversivos de suas conseqüências comportamentais, permitindo aos animais se adaptarem ou se tornarem tolerantes aos estímulos aversivos crônicos. Disfunções nessa via, induzidas pelo estresse crônico, poderiam predispor ao desenvolvimento de conseqüências comportamentais, como o desamparo em animais, e da depressão em humanos. Com objetivo de testar a hipótese de que a facilitação da neurotransmissão serotonérgica hipocampal preveniria o desenvolvimento do desamparo aprendido em ratos, os animais foram submetidos a choques inescapáveis nas patas e testados 24h depois com choques escapáveis. Esses animais desenvolvem déficits comportamentais que foram prevenidos pelo tratamento crôni-

co, mas não agudo, com imipramina (15 mg/kg/dia, 21 dias) ou pela administração bilateral intra-hipocampo dorsal de zimelidina (100 nmoles/0,5 uL), inibidor seletivo da recaptação de serotonina. O efeito da zimelidina foi bloqueado pelo pré-tratamento com WAY-100635 (30 nmoles/0,5 uL), antagonista de receptores 5-HT_{1A}, e mimetizado pela administração hipocampal de 8-OH-DPAT (10 nmoles/0,5 uL), agonista desses receptores. Além disso, observou-se que o efeito da zimelidina foi dependente do momento de sua administração em relação ao estresse inescapável, sendo eficaz apenas quando administrada imediatamente após a sessão de choques inescapáveis. Por outro lado, a administração de desipramina (3 e 30 nmoles/0,5 uL), inibidor seletivo da neurotransmissão noradrenérgica, no hipocampo dorsal imediatamente após o estresse não preveniu o desenvolvimento do desamparo aprendido em ratos.

Em conjunto, os resultados corroboram a hipótese de que a ativação dos receptores 5-HT_{1A} hipocampais promove adaptação ao estresse severo, resultando em um efeito antidepressivo em modelos animais.

CONSEQÜÊNCIAS DA INJÚRIA PERIVASCULAR SOBRE A MORFOLOGIA E REATIVIDADE À ANG II EM ARTÉRIA CARÓTIDA DE RATA: EFEITO DO ESTRÓGENO PRÉ E PÓS INJÚRIA

Sandra Yasuyo Fukada

Orientadora: Prof. Dra. Ana Maria de Oliveira
Tese de doutorado apresentada em 30/08/2004

A camada adventícia pode participar do processo de remodelamento vascular. A ativação de fibroblastos da adventícia, em modelos animais, é considerada um dos estágios iniciais da lesão vascular e contribui para o espessamento da íntima. O remodelamento da adventícia inclui proliferação e diferenciação de fibroblastos e formação de neointima. Os estágios iniciais da lesão vascular são geralmente acompanhados por alterações na reatividade vascular. Estudos clínicos e epidemiológicos sugerem que o estrógeno apresenta um importante papel protetor do sistema cardiovascu-

lar. Existem evidências de que o efeito do estrógeno sobre o sistema cardiovascular é modulando o sistema renina-angiotensina, o qual é um dos principais sistemas biológicos relacionados com a patogênese da restenose e outras doenças cardiovasculares. Os objetivos do presente estudo foram investigar as conseqüências da injúria perivascular, sobre a morfologia e reatividade à angiotensina II (Ang II) em carótidas submetidas a lesão por colar de silicone e avaliar o efeito do tratamento com 17 β -estradiol sobre a lesão arterial bem como sobre as alterações na reatividade vascular de animais que receberam o tratamento prévio à lesão ou pós-lesão. O posicionamento do colar de silicone ao redor da carótida promoveu espessamento caracterizado por uma resposta inflamatória na

camada adventícia acompanhada de uma redução da resposta contrátil estimulada pela Ang II. A redução da resposta contrátil não ocorre devido a uma maior liberação de prostanóides vasodilatadores ou de fatores liberados pelo endotélio. Foram evidenciados comprometimento da mobilização de cálcio do meio extracelular pela Ang II, além de uma maior expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) na camada média e adventícia de artérias lesadas pelo colar de silicone. A incubação das artérias com inibidor da enzima óxido nítrico sintase (NOS) reverte a hiporesponsividade em carótidas com lesão de 14 dias enquanto o antagonista de receptores AT_2 reverte a redução da resposta à Ang II em artérias com lesão de 21 dias. Esses dados sugerem que a redução da resposta contrátil ocorre em função de diferentes mecanismos dependendo do tempo de lesão vascular. O conjunto de dados mostra ainda que o tratamento crônico com 17β -estradiol iniciado antes ou após a lesão

vascular não modifica as alterações morfológicas promovidas pela lesão vascular contudo, protege contra o efeito da lesão vascular sobre a reatividade da Ang II. O efeito do 17β -estradiol se reflete de maneira diferenciada em artérias contralaterais e ipsilaterais a lesão de colar, visto que observamos um aumento da atividade contrátil na artéria lesada e redução na contralateral do mesmo animal. O efeito do 17β -estradiol na artéria contralateral envolve redução da mobilização de cálcio extracelular enquanto na artéria lesada ocorre uma provável redução da expressão de receptores AT_2 de Ang II. O presente trabalho mostra que a injúria perivascular promoveu a formação de uma neo-adventícia e redução da atividade contrátil da artéria frente a Ang II por diferentes mecanismos dependendo do tempo de lesão vascular. A administração de 17β -estradiol não alterou a morfologia da artéria lesada mas reverteu o efeito da lesão sobre a reatividade independente da situação da lesão vascular.

EFEITOS HEMODINÂMICOS DO SILDENAFIL APÓS MICROEMBOLIA PULMONAR AGUDA EM CÃES

Carlos Alan Candido Dias Junior

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos
Dissertação de Mestrado apresentada em 06/10/2004

Embolia pulmonar aguda (EPA) é uma das principais causas de morbidade e mortalidade. Vasodilatadores pulmonares seletivos podem atenuar a hipertensão arterial pulmonar associada à EPA. Nós avaliamos os efeitos da inibição da fosfodiesterase 5 (PDE5) com o sildenafil sobre os distúrbios hemodinâmicos e respiratórios causados pela EPA em cães anestesiados. Um grupo de animais monitorizados (N=3) recebeu somente infusão de salina. EPA foi induzida em outros dois grupos experimentais por injeções intravenosas de microesferas de 300 μ m, em quantidades suficientes para aumentar a pressão média da artéria pulmonar (PMAP) em 20 mmHg. Coletamos os dados hemodinâmicos (Pressões médias da artéria pulmonar e sistêmica, pressão venosa central, pressão capilar pulmonar, frequência cardíaca e débito cardíaco) e amostras de sangue arterial para análise gasométrica nos seguintes momentos: basal, 15 e

30 min após a indução da EPA, e 15, 30 e 45 min após o início da infusão de sildenafil (1 mg/kg + 0,3 mg/kg/h) no grupo sildenafil (N=7), ou após o início da infusão de salina no grupo controle (N=8). A EPA induziu hipertensão pulmonar estável com um correspondente aumento de 325% no índice de resistência vascular pulmonar (IRVP) sem mudanças significativas nos demais parâmetros hemodinâmicos avaliados. O grupo controle não mostrou mudanças adicionais na PMAP e IRVP. Entretanto, observamos uma significativa redução na PMAP e RVP (-25% e -45%, respectivamente; ambos com $P < 0,05$) após a infusão de sildenafil. As mudanças na pressão arterial média, índice de resistência vascular sistêmico e índice cardíaco não alcançaram significância estatística em ambos os grupos. A EPA produziu redução significativa da PaO_2 , porém, o tratamento com sildenafil produziu um discreto aumento da PaO_2 ($P < 0,05$). Concluímos que a administração endovenosa de sildenafil pode atenuar os aumentos da PMAP e IRVP após a EPA em cães, sem produzir efeitos importantes na circulação sistêmica.

FISIOLOGIA

EXPRESSÃO DA PROTEÍNA c-FOS EM NEURÔNIOS DO NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO E DO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO EM RESPOSTA À ESTIMULAÇÃO DO QUIMIORREFLEXO EM RATOS NÃO ANESTESIADOS

Josiane de Campos Cruz

Orientador: Prof. Dr. Benedito H. Machado

Dissertação de Mestrado apresentada em 12/08/2004

No presente trabalho fizemos à análise da expressão da proteína c-Fos em diferentes regiões do NTS e PVN, após o estímulo do quimiorreflexo com injeções sucessivas de KCN para melhor caracterizarmos as sub-regiões destes núcleos envolvidas nas vias neurais do quimiorreflexo.

Os resultados demonstraram um aumento na expressão da proteína c-Fos nas regiões do NTS intermediário (ao nível da área postrema) e NTS comisural caudal (ao nível do calamus scriptorium), bem como nas regiões dorso-medial, ventro-medial (ao nível da área retroquiasmática) e região posterior (ao nível do fornix), mas não na região magnocelular do PVN, em resposta ao estímulo do quimiorreflexo feito com KCN (80 µg/ 0,05 ml/injeção i.v.) de 3 em 3 minutos durante 30 minutos. No grupo controle, no qual foram feitas injeções de salina para controle do volume de 3 em 3 minutos durante 30 minutos não verificamos alterações na expressão da proteína c-Fos. Para o controle da expressão da proteína c-Fos nas diferentes regiões do NTS e PVN analisadas, fizemos também grupos de animais com a ativação do barorreflexo com fenilefrina, de animais anestesiados (i.p.) e canulação (artéria e veia femoral), bem como de animais somente anestesiados (i.p.).

A ativação do barorreflexo a cada 3 minutos

durante 30 minutos com fenilefrina (1, ou 1,5 µg/ 0,05ml/ injeção i.v.) não alterou a expressão da proteína c-Fos nas diferentes regiões do NTS e PVN analisadas, indicando que a expressão da proteína c-Fos nos experimentos do quimiorreflexo não foram decorrentes da ativação do barorreflexo em resposta à elevação da pressão arterial, considerando que o NTS participa das vias neurais do barorreflexo e que a expressão da proteína c-Fos depende da intensidade do estímulo, bem como do tempo entre um estímulo e outro, no protocolo seguinte fizemos a ativação do barorreflexo com infusão contínua de fenilefrina durante 30 min e observamos um significativo aumento na expressão da proteína c-Fos no NTS intermediário (porção mais dorsal) e no NTS comisural caudal (porção mais medial). Assim, o estímulo do barorreflexo com infusão contínua de fenilefrina causou o aumento da expressão da proteína c-Fos em regiões diferentes daquelas estimuladas em resposta a ativação do quimiorreflexo com injeções sucessivas de KCN. Em relação aos outros controles, verificamos que a anestesia (i.p.) e/ou a anestesia (i.p.) e a canulação da artéria e veia femoral não promoveram alterações significativas na expressão da proteína c-Fos nas diferentes regiões do NTS e PVN analisadas. Os nossos resultados documentam que a ativação do quimiorreflexo com injeções sucessivas de KCN ativa neurônios em sub-regiões específicas do NTS e do PVN, os quais poderão ser estudados detalhadamente por meio de métodos imunocitoquímicos e eletrofisiológicos.

CONTROLE DO METABOLISMO DE LIPÍDIOS NO TECIDO ADIPOSEO MARROM E BRANCO

William Tadeu Lara Festuccia

Orientador: Prof. Dr. Renato Hélio Migliorini

Tese de Doutorado apresentada em 13/08/2004

Os experimentos descritos no presente trabalho tiveram como objetivo geral contribuir para o es-

clarecimento do controle da geração de glicerol-3-fosfato no tecido adiposo marrom (TAM) e branco (TAB), com ênfase no estudo da gliceroneogênese e na gliceroquinase. Também foram investigados, os núcleos do sistema nervoso central conectados à inervação do tecido adiposo retroperitoneal e a regulação

do processo de proliferação celular pelo sistema nervoso simpático.

Os principais achados em relação ao controle da gliceroquinase e gliceroneogênese no TAM foram: 1- o sistema nervoso simpático controla atividade da gliceroquinase no TAM modulando a transcrição do gene da enzima, em efeito mediado principalmente por receptores adrenérgicos do tipo β_3 ; 2- o aumento na atividade da gliceroquinase culmina com maior formação de glicerol-3-fosfato necessário para a esterificação de ácidos graxos a triacilglicerol, auxiliando na manutenção dos estoques deste substrato; 3- atividade gliceroneogênica é aumentada em situações caracterizadas por uma reduzida captação de glicose e concentração plasmática de insulina; 4- diferentemente da gliceroquinase, a gliceroneogênese não é controlada diretamente pelo sistema nervoso simpático; 5- a atividade da PEPCK é estimulada por ácidos graxos, em situações onde há uma redução na concentração plasmática de insulina.

Em relação ao TAB, o padrão de marcação neuronal encontrado no sistema nervoso central após injeção do vírus pseudorabies (PRV) no retroperitoneal, sugere que os principais núcleos conectados a inervação deste depósito são: 1- no tronco cerebral - o núcleo do trato solitário, o núcleo reticular rostroventrolateral e o núcleo da rafe obscurus; 2- no prosencéfalo - a área preóptica medial, o núcleo paraventricular, o núcleo supraquiasmático, o núcleo hipotalâmico lateral, o núcleo dorsomedial e o núcleo arqueado.

O sistema nervoso simpático parece controlar

o tamanho dos depósitos do TAB inibindo tanto a proliferação celular (hiperplasia) quanto o aumento do diâmetro dos adipócitos (hipertrofia), como demonstrado pelo aumento induzido pela desnervação simpática cirúrgica no peso, no número e no tamanho das células do lado desnervado em comparação ao lado contralateral, intacto. O TAB inguinal possui maior capacidade proliferativa e hipertrófica que o TAB retroperitoneal, já que, as porcentagens de aumento no peso, número e tamanho dos adipócitos, induzidas pela desnervação simpática foram significativamente maiores no inguinal em comparação ao retroperitoneal.

Nossos dados sugerem que a atividade da gliceroquinase no TAB não é controlada pelo sistema nervoso simpático, devido à ausência de respostas da enzima no EPI em ratos expostos ao frio por 1, 3 e 10 dias e no retroperitoneal após 1 e 3 dias de exposição. O aumento da atividade da gliceroquinase no retroperitoneal após dez dias de exposição ao frio parece estar relacionado a surgimento de adipócitos marrons neste depósito desencadeado pela intensa atividade simpática.

Em relação a gliceroneogênese, nossos dados sugerem que atividade desta via parece estar correlacionada com a atividade lipolítica no TAB, como evidenciado: 1- pelo aumento na atividade gliceroneogênica induzido pela exposição ao frio por curtos períodos; 2- pelo efeito inibitório do ácido nicotínico, um inibidor da lipólise, nos aumentos da PEPCK induzidos pela exposição ao frio, jejum e diabetes; 3- pelo aumento da atividade da PEPCK após infusão de noradrenalina, um agente lipolítico.

INTERAÇÃO NEURO-IMUNO-ENDÓCRINA DURANTE O CHOQUE ENDOTÓXICO

Alexandre Giusti Paiva

Orientador: Prof. Dr. José Antunes Rodrigues

Tese de Doutorado apresentada em 20/08/2004

A ativação do sistema imune pode ser provocada pela administração de endotoxina (componente da parede celular de bactérias gram-negativas) levando a uma situação denominada de choque endotóxico, caracterizado por sinais de infecção, acompanhada por queda da pressão arterial e alterações neuroendócrinas. Durante a fase inicial do choque endotóxico, ocorre aumento da secreção de vasopressina, ocitocina e prolactina, além da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho visou

estudar alguns aspectos da interação neuro-imuno-endócrina, particularmente quanto aos mediadores envolvidos na regulação da secreção de vasopressina, ocitocina e prolactina durante o choque endotóxico.

Os resultados obtidos demonstram que inibidores da ciclooxigenase reduziram a secreção de vasopressina, ocitocina e prolactina induzida pelo lipopolissacarídeo (LPS). O mesmo efeito também foi observado após a utilização de inibidor da enzima conversora de angiotensina e do antagonista do receptor AT1. Estes resultados sugerem que a produção local de prostaglandinas no SNC e a angiotensina II liberada na circulação sistêmica, estão entre as principais substâncias que atuam como indutoras da resposta hormonal neste modelo experimental.

Além disso, com a utilização de antagonistas alfa-, beta-adrenérgicos e colinérgicos, tipo muscarínico, administrados por via intracerebroventricular, reduziu a secreção de vasopressina, ocitocina e prolactina induzido pelo choque endotóxico. Por outro lado, com a utilização de inibidores da enzima óxido nítrico sintase e da hemeoxigenase, obtivemos um efeito oposto, aumentando a secreção de vasopressina e ocitocina induzida pelo LPS. Estes dados sugerem que a noradrenalina e a acetilcolina são neurotransmissores esti-

mulam, e os neuromoduladores gasosos (óxido nítrico e monóxido de carbono) inibem os neurônios vasopressinérgicos, ocitocinérgicos e dopaminérgicos durante o choque endotóxico.

Desta forma, o controle neuroendócrino da secreção de vasopressina, ocitocina e prolactina, em resposta à endotoxemia como estímulo estressor, depende da interação de neurotransmissores noradrenérgicos, colinérgicos, angiotensinérgicos e de mediadores gasosos.

HIPERGLICEMIA AGUDA E MODULAÇÃO AUTONÔMICA CARDIOVASCULAR EM RATOS NÃO DIABÉTICOS

Érica Maria Granjeiro

Orientador: Prof. Dr. Rubens Fazan Junior

Dissertação de Mestrado apresentada em 27/09/2004

Diabete melito é uma doença cuja característica principal é determinar um aumento dos níveis de glicose sangüínea. O diabetes acarreta diferentes complicações, entre as quais podemos destacar a neuropatia diabética, com comprometimento do controle neural cardiovascular. Podemos encontrar estudos epidemiológicos mostrando uma forte relação entre níveis de glicose sangüínea e eventos cardiovasculares mesmo em indivíduos não diabéticos. Entretanto, não há na literatura qualquer estudo investigando o efeito da hiperglicemia aguda, sobre a modulação autonômica ou reflexos cardiovasculares em ratos não diabéticos. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da infusão intravenosa aguda de glicose sobre a pressão arterial (PA), frequência cardíaca (FC), variabilidade da PA e FC e sensibilidade do barorreflexo (SBR) em ratos acordados não diabéticos.

Na véspera dos experimentos, ratos Wistar (250-300g) foram implantados com cânulas na jugular e artéria e veia femoral, para coleta de sangue, registro da PA e infusão intravenosa. Após um registro basal da PA de 30 min, iniciou-se uma infusão contínua de solução de glicose 50% ou salina 0,9% i.v. por 90 minutos.

Séries temporais, batimento a batimento, de PA sistólica e intervalo de pulso (IP) foram geradas para o período basal e de infusão. O desvio padrão (δ) das séries de PA e IP foi calculado, como índice da variabilidade total desses parâmetros. Espectros das séries temporais de PA e IP também foram calculados pela transformada rápida de Fourier (FFT) e integrados

em bandas de baixa (0,2 a 0,75 Hz) e alta frequência (HF: 0,75 a 3 Hz).

Outro grupo de animais foi realizado para a determinação da glicemia e osmolaridade plasmática. Nesse grupo, também foi avaliada a SBR induzido por elevações e reduções da PA causadas pela administração fenilefrina (PHE 2,5 μ g iv) e nitropussiato de sódio (NPS 4 μ g iv). A SBR foi determinada pela razão entre variações reflexas do IP causadas por variações da PA.

A infusão de glicose foi eficiente em elevar, de modo bastante significativo e tempo dependente, a glicemia e a osmolaridade plasmática dos ratos. A PAS não foi afetada, mas o δ da PAS foi reduzido ao longo da infusão de salina ou glicose. O espectro da PAS não foi alterado pela infusão de salina ou glicose. Ao longo da infusão de salina ou glicose, houve uma discreta taquicardia. O δ do IP e as potências dos componentes de baixa e alta frequência do espectro do IP foram reduzidos ao longo da infusão de ambas substâncias (salina ou glicose). Entretanto, quando os valores absolutos das potências dos componentes espectrais do IP foram normalizados (%), observamos que os mesmos, não se alteraram com a infusão de nenhuma das substâncias. A sensibilidade da taquicardia e bradicardia reflexas induzidas por alterações da PA, não foi afetada pela infusão de nenhuma das substâncias.

Concluindo, a pequena taquicardia e a redução do δ da PAS e do IP não pode ser relatada, como uma ação específica da glicose, mas possivelmente por um efeito do volume de solução infundida. Assim a hiperglicemia aguda induzida pela infusão de glicose, em ratos não diabéticos, parece não afetar a modulação autonômica cardiovascular avaliada pela variabilidade da PAS e IP e sensibilidade do barorreflexo.

ESTUDO DA LESÃO MEDULAR EM RATOS PRODUZIDA PELO ESTREITAMENTO DO CANAL VERTEBRAL

Albert Schiaveto de Souza

Orientadora: Profa. Dra. Elaine A. Del bel B. Guimarães
Tese de Doutorado apresentada em: 04/10/2004

Nesta pesquisa estudamos os efeitos da lesão medular em ratos produzida por estreitamento do canal medular, ao nível da função sensório-motora e das modificações no tecido neural. Possíveis efeitos protetores da melatonina após lesão foram também avaliados. Cento e oitenta e oito ratos machos adultos Wistar foram divididos em três grupos experimentais: laminectomia, e estreitamento do canal vertebral em 35% e 50%. Cada grupo foi novamente subdividido recebendo veículo ou melatonina como segue: melatonina (2,5mg/kg, i.p.) após 5 minutos e 1, 2, 3 e 4 horas após lesão. Semanalmente, de 1 a 5 semanas, a recuperação neurológica foi monitorada através do teste de retirada de cauda, da análise funcional da marcha, do teste do campo aberto, da escala de avaliação locomotora de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) e do teste do plano inclinado. A análise histológica foi feita pela coloração de hematoxilina-eosina, por microangiografia, histoenzimologia da NADPH-d e imunocitoquímica para as proteínas Fos e sintase do óxido nítrico (NOS). O estreitamento do canal vertebral resultou em importante disfunção neurológica. Os escores motores foram progressivamente mais baixos com o aumento do tamanho do espaçador na escala BBB e no plano inclinado, em todos os tempos

analisados. Resultados de ambos os testes foram fortemente correlacionados. O teste do campo aberto apresentou resultados semelhantes, porém sem diferenciar os grupos estreitamento de 35% e 50%. A latência para a retirada da cauda não foi significativamente modificada pela lesão. Ambos os grupos estreitamento apresentaram recuperação funcional significativa no decorrer do tempo, mais evidente nas duas primeiras semanas. Os animais tratados com melatonina apresentaram recuperação funcional diferente daqueles tratados com o veículo na avaliação da escala BBB ou do plano inclinado. A imunorreatividade para a proteína Fos aumentou na substância cinzenta da medula espinhal, nas primeiras horas após a lesão. Alterações vasculares foram observadas em todos os tempos analisados após estenose do canal vertebral, principalmente no sítio da lesão. A densidade de neurônios NOS/NADPH-d positivos diminuiu na substância cinzenta da medula espinhal nos animais tratados com veículo ou com melatonina, em todos os tempos analisados. Em conclusão: o estreitamento do canal vertebral produz modificações na função locomotora dos animais proporcionais ao grau de comprometimento. A escala de avaliação locomotora BBB e o teste do plano inclinado foram sensíveis para detectar perda gradual da função, apresentando resultados fortemente correlacionados. O estreitamento do canal vertebral induz diminuição da NOS neuronal. O tratamento de animais lesados com melatonina favoreceu a recuperação funcional dos animais.

EFEITOS HEMODINÂMICOS E CARDÍACOS DA AMIODARONA EM RATOS ACORDADOS

Géssica Maria Simões

Orientador: Prof. Dr. Hélio César Salgado
Dissertação de Mestrado apresentada em 05/11/2004

A amiodarona é um antiarrítmico de classe III freqüentemente utilizado no tratamento das arritmias ventriculares e supraventriculares. Seu uso após infarto agudo do miocárdio reduz o índice de morte súbita. Porém, agudamente, a amiodarona possui propriedades cardiodepressoras. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da amiodarona sobre a pressão arterial média (PAM), freqüência car-

díaca (FC), índice de consumo de O₂ do miocárdio (duplo produto), e índices de performance sistólica e diastólica cardíacas (dP/dt máxima e mínima) em ratos Wistar acordados. Além disso, foram avaliadas as respostas desses parâmetros à estimulação β_1 -adrenérgica com dobutamina.

Os protocolos experimentais consistiram: (1) registro basal da PA e PVE durante 5 min e administração endovenosa de amiodarona (25 ou 50mg/kg), ou veículo; 15 min após, fazia-se a estimulação cardíaca com doses de dobutamina administradas em seqüência aleatória (0,25; 0,5; 1; 3; 10 e 15 μ g/kg i.v.);

(2) registro basal da PA e PVE durante 5 min, administração de amiodarona na dose de 50 mg/kg, seguida de registro de 90 min. Em seguida, foram calculadas, batimento a batimento, a PAM, FC e a primeira derivada da pressão ventricular esquerda (dP/dt), além do produto da PAM pela FC (duplo produto).

A administração endovenosa de amiodarona causou redução dose-dependente na PAM, FC, duplo produto e dP/dt máxima e mínima. A dose de 25 mg/kg de amiodarona causou discreta queda da PAM e do duplo produto, enquanto que a dose de 50 mg/kg causou queda acentuada de todos os parâmetros. A evolução, durante 90 minutos, da PAM, FC, duplo produto e dP/dt máxima e mínima, após a dose de 50 mg/kg de amiodarona demonstrou recuperação dos mesmos para os níveis basais em, aproximadamente, 60 min. A estimulação com dobutamina elevou todos os parâmetros avaliados, porém a amiodarona

atenuou as respostas de FC, duplo produto e dP/dt mínima à essa estimulação, contudo a resposta da dP/dt máxima foi preservada.

Concluindo, a administração endovenosa de amiodarona causa hipotensão, bradicardia e, presumivelmente, de acordo com a queda do duplo produto, reduz o consumo de O₂ do miocárdio, além de causar efeitos inotrópico e lusitrópico negativos em ratos não anestesiados. Ainda, a amiodarona reduz a amplitude das respostas de FC, duplo produto e dP/dt mínima à estimulação cardíaca β₁-adrenérgica, porém, não afeta a resposta contrátil à dobutamina.

Esse estudo possibilitou a investigação dos efeitos da amiodarona, antiarrítmico de amplo uso clínico, sobre a performance miocárdica em ratos acordados, evitando-se, por conseguinte, os efeitos indesejáveis de anestésicos sobre variáveis cardiocirculatórias.

UMA AVALIAÇÃO DOS PADRÕES VENTILATÓRIOS E DO MODELO JET STREAM, UTILIZANDO-SE MEDIDAS DE ESPAÇO MORTO NO SAPO *Bufo paracnemis*

Marcelo dos Santos Fernandes

Orientador: Prof. Dr. Mogens Lesner Glass

Tese de Doutorado apresentada em 13/12/2004

Os anfíbios ventilam seus pulmões através de bombeamentos bucais (MacMahon, 1969). Em um estudo clássico, De Jongh e Gans (1969) propuseram um modelo, intitulado *Jet Stream*, onde o ar saíria dos pulmões atravessando a cavidade bucal sem se misturar com o ar contido nela, previamente inspirado. A crítica maior que o modelo recebeu foi de Vitalis e Shelton (1990), reportando em estudo com *Rana pipiens*, uma completa mistura intrabucal resultante de fluxo turbulento. Dado que o conflito foi muito pouco explorado, tomou-se por objetivo analisar o padrão ventilatório e testar o modelo *Jet Stream* no sapo *Bufo paracnemis*. Os sapos (0,21 ± 0,025 kg; média ± SEM, n = 6) foram coletados na região de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. Os volumes inspirados e expirados foram obtidos através da técnica de pneumotacografia, monitorados por um transdutor diferencial de pressão. Amostras sanguíneas foram coletadas através de cânulas da artéria femoral, medindo-se PaO₂, PaCO₂, pH. Apesar de os pulmões dos anfíbios não possuírem alvéolos verdadeiros, foi possível medir uma ventilação efetiva equivalente à alveolar, de acordo com a

equação: $V_{EF} = (V_P \cdot CO_2 \cdot RT) / P_A \cdot CO_2$ (Wang *et al.*, 1998). $V_P \cdot CO_2 = V_{bg} \cdot (\% CO_2) \cdot k$, onde k é um fator de conversão de BTPS para STPD. O espaço morto fisiológico foi calculado utilizando-se as equações a seguir.

- $V_M = ((P_A \cdot CO_2 - P \cdot CO_{2PE}) / P_A \cdot CO_2) \cdot 100\%$.
- (ventilação pulmonar – ventilação efetiva) / f_R, sendo f_R a frequência respiratória pulmonar.

Utilizando-se as PCO₂ e a equação de Bohr, obteve-se espaço morto entre a 30,2 ± 2,1 a 36,6 ± 0,4 % de V_C. A PCO₂ intrapulmonar (10,9 ± 1,2 mmHg) foi significativamente diferente da PCO₂ pico da primeira expiração (7,6 ± 1,0 mmHg). O mesmo foi observado para a PO₂ intrapulmonar (119,2 ± 3,3 mmHg) significativamente diferente da PO₂ intrabucal (141,7 ± 0,8 mmHg).

O volume corrente (V_C) para o *Bufo paracnemis* foi 2,4 ml BTPS·kg⁻¹, apesar de estudos mostrarem que V_C pode se alterar em condições de hipóxia e hipercapnia em diferentes temperaturas (Kruhøffer *et al.*, 1987). Um baixo V_C evidencia menor mistura intrabucal em condições em que o animal se encontra tranqüilo, permitindo-nos concluir que o espaço morto fisiológico intrabucal é limitado, evidenciando-nos um mecanismo de ventilação pulmonar eficiente, diferente do que se pensava, e corroborando o modelo *Jet Stream*, proposto por DeJongh e Gans

(1969). Contribuíram também para o entendimento dos padrões ventilatórios de *Bufo paracnemis*, as variáveis a seguir. Pressões intrabucais e intrapulmonares; fluxos e volumes ventilatórios; ventilação pulmonar e bucal, frequências respiratórias. [V_E ($12,1 \pm 0,6$ ml

BTPS.min⁻¹.kg⁻¹); V_{EB} ($164,3 \pm 2,2$ ml BTPS.min⁻¹.kg⁻¹); f_R ($5,8 \pm 0,4$ min⁻¹); frequência bucal ($68,5 \pm 1,6$ min⁻¹)]. A baixa extração de oxigênio ($17,3 \pm 2,8\%$) confirma um padrão de ventilações pulmonares e bucais de alta frequência.

GENÉTICA

ESTRUTURA DO GENE DA ESTERASE DO HORMÔNIO JUVENIL DE *APIS MELLIFERA* E SEU PAPEL DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIÓNARIO E A DIFERENCIAÇÃO DE CASTAS

Aline Mackert dos Santos

Orientadora: Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões
Dissertação de Mestrado apresentada em 16/07/2004

Os hormônios juvenis (HJ) são uma classe de sesquiterpenóides que executam um papel crucial no desenvolvimento dos insetos. O HJ modula a ação de ecdisona, prevenindo a metamorfose nos estágios larvais. Os títulos deste hormônio são determinados pela sua síntese nos *Corpora Allata* e pela atividade hidrolítica de uma esterase específica (EHJ – Esterase do Hormônio Juvenil), um membro da família das carboxiesterases (3.1.1.1), que transforma o HJ em um metabólito considerado inativo (HJ-ácido). O HJ está intimamente envolvido no desenvolvimento e diferenciação de castas em *A. mellifera*; os títulos de hormônio diferem consideravelmente durante o desenvolvimento das castas. A metodologia ORESTES (Open-Reading-Frame-Expressed-Sequence-Tags) foi usada para a obtenção da seqüência do gene da EHJ. Vinte e seis clones que mostraram homologia com a seqüência da EHJ de outros insetos foram usados para a construção de primers para a análise da expressão do gene em experimentos de RT-PCR. O fragmento obtido pela amplificação utilizando estes primers mostrou alta identidade com as EHJ de *Drosophila melanogaster* e *Tenebrio molitor* em nível de aminoácidos. A primeira fita de cDNA foi sintetizada usando RNA total e usada como molde para PCR. A normalização foi feita utilizando-se a expressão do gene da actina de *A. mellifera*. O gene da EHJ é mais expresso em corpo gorduroso e epitélio do intestino. O pico de expressão do gene em operárias foi observado nos estágios que antecedem a metamorfose (L5F

e L5S), após este período ocorre diminuição de expressão do gene em pré-pupas e pupas jovens e um aumento de expressão no final do período pupal e adultos de até 15 dias. A atividade do gene da EHJ está relacionada aos títulos de HJ durante o desenvolvimento, o que sugere a importância da EHJ para que a metamorfose ocorra normalmente. Os níveis de mRNA da EHJ foram quantificados nas castas e sexos. Operárias mostraram a maior expressão do gene durante os estágios de L3, L4, L5F1 e L5S1. Em rainhas, a expressão aumenta em pré-pupa, ao contrário do que ocorre em operárias. Os menores níveis de expressão ocorrem em zangões. A expressão do gene da EHJ é menor quando o HJ é essencial para o desenvolvimento das características de rainhas, o que ocorre nos estágios larvais mais jovens, podendo ser estabelecida relação direta entre o HJ e os níveis de mRNA da EHJ durante o desenvolvimento e manutenção de características de cada casta. O gene mostrou menor expressão em ovários de rainhas nos estágios larvais, isto pode ter importância na manutenção dos níveis de HJ para que este órgão seja protegido de degeneração, garantindo seu desenvolvimento normal. Já que os níveis de HJ são diferentes nas castas e sexos, a atividade diferencial do gene da EHJ aparentemente é um elemento chave na manutenção dos tipos morfológicos nesta complexa sociedade. O gene foi inibido pela aplicação de 20E em pupas, assim, sugerimos que o gene é induzido pela presença de HJ, como ocorre nas fases larvais jovens e após a emergência, e inibido na presença de ecdisteróides, já que os resultados obtidos neste trabalho mostram que o gene da EHJ está reprimido quando os títulos de ecdisteróides estão elevados nas fases pupais.

RELAÇÕES DE PARENTESCO POR DNA MITOCONDRIAL E MORFOMETRIA MULTIVARIADA EM *tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Meliponini)

Rosana de Cássia Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr
Tese de Doutorado apresentada em 31/08/2004

Marcadores genéticos do genoma mitocondrial tem sido muito usados em estudos genéticos de população devido à sua herança materna e rápidas taxas de evolução. Nesse estudo foi feito o *screening* de sequências variantes de um fragmento do gene 16S RNAr mitocondrial pela técnica de LIS-SSCP-PCR em *Tetragonisca angustula*. São conhecidas duas subespécies morfologicamente, *T. a. angustula* e *T. a. fiebrigi*. Estudos baseados em marcadores RAPD também mostraram a presença de dois grupos distintos. Foram analisadas 35 populações provenientes do Panamá, Brasil e Argentina que produziram quatro haplótipos variantes. O tipo mais comum ocorreu em 75% das colônias e foi o que apresentou maior distribuição geográfica. O segundo, com 16,67%, localizou-se na região onde se encontra a subespécie *T. a.*

fiebrigi (sul do Brasil, Paraguai e Argentina). O terceiro (3,33%) e quarto (5%) haplótipos foram encontrados no Estado do Maranhão e no Panamá (América Central), respectivamente. As análises filogenéticas das sequências dos haplótipos variantes colocou a população do Panamá, como a mais divergente, seguida da população da Argentina, que foi seguida pelo haplótipo comum (maioria dos sítios de coleta). E, finalmente, a mais recente, a população do Maranhão. O maior número de grupos em *T. angustula* foi correlacionado às rápidas taxas de evolução do DNA mitocondrial. Porém, a presença de haplótipos distintos, como no Panamá e no Maranhão foram relacionados a eventos de glaciação durante o período pleistoceno. As análises morfométricas da asa mostraram a existência de um clina com descréscimo de tamanho da asa das amostras do Panamá (região equatorial) até o norte do Estado de Goiás. Um clina inverso, foi observado a partir desta região até a Argentina.

INFLUÊNCIA PATERNA EM CASOS DE ABORTAMENTOS ESPONTÂNEOS RECORRENTES: ESTUDO DO COMPLEMENTO CROMOSSÔMICO DE ESPERMATOZÓIDES ATRAVÉS DA TÉCNICA DE FIV HETERÓLOGA HOMEM X HAMSTER

Marineide Neves Alves Brinn

Orientador: Prof. Dr. João Monteiro de Pina Neto
Tese de Doutorado apresentada em 14/09/2004

O abortamento espontâneo recorrente (AER) é definido como três ou mais gestações consecutivas interrompidas espontaneamente até 20 semanas. A grande maioria dos trabalhos realizados com casais que apresentam AER dá ênfase ao estudo de fatores maternos relacionados aos abortamentos. A proposta deste trabalho foi avaliar a contribuição da linhagem germinativa paterna quanto a alterações cromossômicas em casos de AER. A constituição cromossômica e a frequência de aberrações cromossômicas numéricas e estruturais em espermatozoides de sete homens de casais com AER (pacientes) e seis homens de um grupo controle foram obtidas através da técnica de FIV heteróloga. Foram analisadas 1424 complementos haplóides, sendo 629 do grupo controle e 795 do

grupo de pacientes. A proporção de cromossomos sexuais foi 48% X: 52% Y, não diferindo estatisticamente do esperado ($0,20 < p < 0,10$). As aneuploidias estiveram presentes em 7% e as anormalidades estruturais em 7,3% do total das metáfases analisadas. No grupo de pacientes encontramos 9,6% de aneuploidias e no grupo controle 3,8%. Já as anormalidades estruturais estiveram presentes em 8,5% dos complementos haplóides analisados no grupo de pacientes e em 5,7% no grupo controle. Apesar de não significativamente diferentes, as anomalias cromossômicas foram mais frequentes nos pacientes com AER. Nos pacientes P3 e P5 foram encontrados um cromossomo marcador, que se repetiu em 10% das células analisadas e anormalidades estruturais no cromossomo 1 ($del1q12 \rightarrow 1qter$), respectivamente. Essas anormalidades não foram encontradas em células somáticas, sugerindo que estas alterações sejam restritas à linhagem germinativa.

VARIAÇÃO EM DNA MICROSSATÉLITE E CARACTERÍSTICAS QUANTITATIVAS EM POPULAÇÕES NATURAIS DE *Drosophila gouveai*

Edgar Guimarães Bione

Orientadora: Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões

Tese de Doutorado apresentada em 24/09/04

Cromossomos meióticos de *Isocoprís inhiata*, *Diabroctis mimas* e *Dichotomius bos*, *Dichotomius nisus*, *Dichotomius semisquamosus*, *Dichotomius bicuspis* e *Dichotomius semiaeneus*, *Canthon staigi*, *Tetramereia convexa* e *Dendropaemon viripenne*, foram analisados através da coloração convencional, pelo bandamento C, coloração com AgNO_3 e pelo método de FISH. Adicionalmente, *I. inhiata* foi analisada pela coloração CMA₃/DA/DAPI. *I. inhiata* e as espécies de *Dichotomius* apresentaram Cariótipo com $2n= 18 (8 + Xy_p)$, com cromossomos meta-submetacêntricos e redução gradual de tamanho. *D. mimas* mostrou $2n= 20 (9II+ Xy_p)$, cromossomos meta-submetacêntricos (pares 1, 2, 3, 4 e 7) e acrocêntricos (pares 5, 6, 8 e 9), com redução gradual de tamanho. Enquanto *C. staigi*, *T. convexa* e *D. viripenne* apre-

sentaram número e morfologia cromossômica de acordo com o já descrito para a maioria dos representantes da ordem Coleóptera, ou seja, $2n= 20$ com meio fórmula $9 + Xy_p$. A análise da HC revelou padrão de bandas C similar em *I. inhiata* e *D. mimas*, mostrando bandas pericentroméricas e teloméricas e cromossomos difásicos. As espécies de *Dichotomius* e *T. convexa*, *D. viripenne* e *C. staigi* apresentaram bandas pericentroméricas em todos os cromossomos. Além de evidenciar a HC em todas as espécies estudadas, a coloração com AgNO_3 revelou que as marcações prata-positivas nos bivalente sexuais persistiam até a metáfase I. Entretanto, o método de FISH mostrou que os sítios de rDNA 28S estavam localizados em pares autossômicos e não nos bivalentes sexuais de *I. inhiata*, *D. bos*, *D. semisquamosus*, *D. bicuspis*, *C. staigi* e *Dendropaemon viripenne*. Em contraste, *D. nisus* e *D. semiaeneus*, apresentaram sítios de rDNA no par sexual, *Diabroctis mimas* apresentou sítios em dois pares de autossomos e no X e *T. convexa* apresentou seis sítios autossômicos e um no par sexual.

ULTRASPIRACLE E DIFERENCIAÇÃO DE CASTAS EM APIS MELLIFERA

Angel Roberto Barchuk

Orientadora: Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões

Tese de Doutorado apresentada em 27/09/2004

O hormônio juvenil (HJ) e os ecdisteróides, especialmente 20-hidroxiecdisona (20E), controlam muitos aspectos no desenvolvimento de insetos. Em insetos eusociais, estes hormônios estão diretamente envolvidos na diferenciação de castas alternativas. O HJ, ademais, modula o desenvolvimento e a evolução do comportamento de operárias adultas em *Apis mellifera*. Nesse trabalho, clonamos e sequenciamos o cDNA que codifica para Ultraspiracle de *Apis mellifera* (AmUsp) e analisamos a resposta de *usp* a ambos hormônios morfogenéticos. AmUsp parece ser um gene de cópia simples que produz dois transcritos (~4 e 5kb) que são diferencialmente expressos no corpo do animal. AmUsp mostra maior similaridade respeito

aos ortólogos de *Locusta*, *Celaca* e vertebrados do que aos do resto de insetos. Estas características e sua rápida resposta transcricional a HJ sugere que algumas funções do Usp de *Apis mellifera* podem depender de ligande. Por outro lado, usando RNAi testamos a resposta de vários genes à diminuição da expressão de *usp* durante o desenvolvimento pupal de operárias. Enquanto a expressão de *vg* não foi claramente alterada em pupas *knock-down* para *usp* (KDusp), os genes para a pro-fenoloxidase e para a esterase do HJ foram inibidos. De maneira interessante, a expressão de *ftz-fl* (um receptor nuclear órfão) também foi diminuída em pupas KDusp, sugerindo a participação de Usp na regulação da expressão destes genes. Títulos baixos de HJ durante os últimos estágios do desenvolvimento larval foram sugeridos como os responsáveis por desencadear a morte celular programada em ovários de operárias, ao ponto tal

que só uns poucos ovariolos permanecem para formar parte do sistema reprodutivo destas fêmeas. Nós determinamos o perfil de expressão de *usp* nos ovários de rainhas e operárias durante os últimos estágios do desenvolvimento larval. Análises por RT-PCR semi-quantitativa mostraram que o mRNA de *usp* segue de perto os títulos hemolinfáticos de HJ, e que os maiores níveis de expressão deste gene encontrados em L4 de rainhas se correspondem com títulos maiores deste hormônio. Porém, experimentos de imunofluorescência utilizando um anticorpo monoclonal contra Usp de *Drosophila melanogaster*, mostraram estru-

turas marcadas somente na região de formação de clusters nos ovariolos de operárias se preparando para a metamorfose. Esta região corresponde ao centro de células germinativas onde ocorrem os mais evidentes eventos de morte celular. Este padrão de expressão de *usp* sugere sua participação nestes processos, sozinho, ou formando heterodímeros com outros fatores de transcrição. Estes dados e a resposta positiva de *usp* a altos títulos de HJ nos permitem começar a elaboração de um modelo conceitual da rede de expressão gênica promovida pelo HJ durante o desenvolvimento e diferenciação de castas de *Apis mellifera*.

FREQÜÊNCIAS, NA POPULAÇÃO BRASILEIRA, DE HAPLÓTIPOS FORMADOS POR QUATRO LOCOS DO CROMOSSOMO X LIGADOS AO GENE FMR1

Juarez Inácio

Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões

Tese de Doutorado apresentada em 27/09/2004

Para a realização desse projeto, foram estudados três grupos da população brasileira (indígena, afro-derivado e urbano), com o objetivo de caracterizar sua estrutura genética e verificar a presença de haplótipos específicos para cada população. Foram utilizados quatro locos (DXS548, FRAXAC1, FRAXAC2 e DXS8084), ligados ao gene FMR1, causador da síndrome do X-frágil. Os locos DXS548 e o FRAXAC1 demonstraram que somente a população indígena é homogênea. O alelo FRAXAC2*4+ foi o mais freqüente em todas as populações. Esse resultado concorda com Crawford et al, (2000), mas discorda de Mingroni-Netto et al, (1999), que apresentaram o FRAXAC2*5+, como o mais freqüente. Os desvios de Hardy-Weinberg (HW), apresentados nas comunidades, foram explicados pelo tamanho amostral e endogamia. A diversidade gênica, na população indígena, devido ao seu isolamento e pequeno número amostral, foi menor do que nas populações urbanas e afro-derivadas. A comparação interpopulacional (*F_{st}*) diferenciou todos os grupos mas não diferenciou significativamente as populações dentro dos grupos. Para a análise haplotípica foram utilizados três grupos de locos: (DXS548, FRAXAC1); (DXS548, FRAXAC1 e FRAXAC2) e (DXS548, FRAXAC1, FRAXAC2 e DXS8084). No primeiro grupo, os haplótipos 7/3 e 7/4

foram os mais freqüentes, em todas as populações. Quando analisados grupos de três locos, na população urbana, o haplótipo mais freqüente, foi o 7/3/4+, estando de acordo com dados da literatura. Nas comunidades afro-derivadas e indígenas este haplótipo não foi encontrado, com exceção de Sítio Velho que apresentou, além do 7/3/4+, o haplótipo 7/3/3+, com a mesma freqüência. Em Gaucinha e Mimbó, o haplótipo 7/3/3+ foi o mais freqüente. Ao analisar o terceiro grupo, foram revelados dois haplótipos específicos, na população indígena (7/4/4+/7 e 7/3/3/5) e um em Sítio Velho (7/3/3+/5). A análise de variância molecular demonstrou que existe grande variação entre os indivíduos, dentro das populações e que o grupo urbano contribuiu significativamente para a diferenciação das populações, dentro dos grupos. Os locos estudados não foram ideais para a construção de dendrogramas, pois apresentaram baixos valores de *bootstraps* e não diferenciaram os grupos. A estimativa de mistura étnica, assumindo o modelo di-híbrido (africanos e europeus) demonstrou que a população de Minas Gerais sofreu maiores contribuições africanas (31%) do que São Paulo (25%), fato coerente com a história que aponta Minas Gerais como estado que mais recebeu negros, no passado. Apesar do pequeno número de amostras analisadas, esse trabalho apresenta dados que podem contribuir para um maior conhecimento da estrutura genética populacional brasileira; determinar os locos que melhor diferenciam as populações estudadas.

VARIAÇÃO EM DNA MICROSSATÉLITE E CARACTERÍSTICAS QUANTITATIVAS EM POPULAÇÕES NATURAIS DE *Drosophila gouveai*

Evandro Marsola de Moraes

Orientador: Prof. Dr. Fábio de Melo Sene

Tese de Doutorado apresentada em 01/10/2004

Drosophila gouveai é uma espécie associada às cactáceas com distribuição disjunta nas áreas de vegetação sazonalmente seca que se estendem desde a parte sul da caatinga até o extremo sul do cerrado, ocupando as regiões centro-oeste e sudeste. Em função da ocorrência fragmentada das cactáceas hospedeiras, esta espécie exibe um padrão insular de distribuição, consistindo de numerosas populações.

A diferenciação genética (F_{ST}) entre oito populações de *D. gouveai* foi estimada usando um marcador genético neutro (DNA microssatélite) e comparada com a diferenciação quantitativa (Q_{ST}) em medidas morfométricas da asa. A comparação F_{ST} vs Q_{ST} permitiu testar a hipótese nula que a diferenciação quantitativa segue um modelo de evolução neutra, ou seja, causada por forças estocásticas como deriva genética. Para assegurar que a diferenciação quantitativa é causada por genes agindo aditivamente, a herdabilidade (proporção da variância fenotípica atribuída a variância genética aditiva) das medidas morfométricas da asa foi estimada em uma das populações abordadas. Esta análise apresentou valores altos de herdabilidade (0,59 – 0,67), mostrando que as medidas morfométricas usadas são marcadores quan-

titativos adequados.

D. gouveai apresentou acentuada diferenciação genética entre populações ($F_{ST} = 0,245$), como esperado em função do padrão insular de sua distribuição. Esta estrutura populacional foi devida principalmente a diferenças entre grupos geográficos de populações (Norte, Centro-Sul e Sul). A divergência morfológica entre populações foi significativa, sendo maior entre as fêmeas, e foi concordante com o padrão de variação nos locos de microssatélite. A magnitude de diferenciação quantitativa ($Q_{ST} = 0,289$) foi estatisticamente igual àquela observada no marcador genético, não permitindo que a hipótese de diferenciação quantitativa neutra fosse rejeitada.

Os resultados deste estudo foram discutidos considerando a presumida ocorrência de mudanças passadas na distribuição de *D. gouveai* em decorrência da expansão e fragmentação da vegetação sazonalmente seca na América do Sul por ocasião das alterações climáticas durante o Pleistoceno. Não foi possível explicar o padrão de estrutura populacional em *D. gouveai* com base apenas em modelos simples de fluxo gênico e deriva genética. Em vez disso, os resultados são melhor compreendidos considerando a ocorrência de eventos de fragmentação na distribuição geográfica de *D. gouveai* e posterior diferenciação por deriva genética entre populações com fluxo gênico restrito.

IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE DO INIBIDOR DA FIBRINÓLISE ATIVADO PELA TROMBINA (TAFI): RELAÇÃO COM O RISCO DE TROMBOSE VENOSA

Maria Giziane Fagundes

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Zago

Tese de Doutorado apresentada em 21/10/2004

O fator TAFI (inibidor da fibrinólise ativado pela trombina) é detectado no plasma sanguíneo em diferentes concentrações entre os indivíduos normais de várias populações. Com a finalidade de verificar a existência de variações nucleotídicas que pudessem estar relacionadas a tais oscilações, foram seqüenciados 2083 pb da região promotora, toda a extensão codificadora e a região 3'-não traduzida do gene. Um total

de vinte SNPs foram identificados, mostrando fortes associações entre alguns alelos e uma relação com os níveis do fator dosado em 127 doadores de sangue saudáveis. Dois SNPs encontrados na porção promotora e um na região codificadora (-438G/A, -1102G/T e E9C/T) que estão em forte desequilíbrio de ligação, juntamente a outro na região 3'-UTR (3'3T/A), parecem estar associados nos diferentes haplogrupos a fim de atingir um nível de atividade média, modulada pela concentração e estabilidade do TAFI.

As prevalências dos SNPs identificados no promotor do gene e ligados às menores taxas do fator, foram menores em 349 pacientes com trombose ve-

nosa profunda em relação a 349 controles pareados, indicando uma provável relação entre as quantidades do TAFI e a predisposição à doença.

Comparando as frequências de todos os SNPs identificados no gene do TAFI entre indivíduos descendentes de brancos europeus, asiáticos e africanos, foram observadas diferenças alélicas e genotípicas dos indivíduos asiáticos em relação aos outros dois grupos. Os indivíduos brancos mostraram a maior

prevalência do SNP E9 (que é promovida por uma maior estabilidade do fator), enquanto os indivíduos negros mostraram a menor prevalência deste SNP.

Os resultados apresentados indicam que um maior nível de TAFI pode ser considerado um fator ténue na contribuição da doença trombotica venosa, e que os SNPs identificados no gene formam haplogrupos que modulam a atividade do fator através da sua quantidade e estabilidade no plasma sanguíneo.

GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA

HIPERESTIMULAÇÃO OVARIANA CONTROLADA COM FSH EXCLUSIVO SEGUIDO DE ESTIMULAÇÃO COM hCG OU hMG

Mariana Kefalás Oliveira Gomes

Orientador: Prof. Dr. Rui Alberto Ferriani

Dissertação de Mestrado apresentada em 06/07/2004

O objetivo desse estudo prospectivo e controlado é avaliar se o LH sob forma de baixa dose de gonadotrofina coriônica humana (hCG) é similar à gonadotrofina menopausal humana (hMG) na fase folicular tardia de pacientes em hiper-estimulação ovariana controlada (HOC). **Método:** Trinta e quatro mulheres normovulatórias com indicação de ICSI (injeção intracitoplasmática de espermatozóide) foram randomicamente direcionadas a dois diferentes protocolos de HOC (17 em cada). Todas as pacientes foram suprimidas com análogos do GnRH (aGnRH) e receberam FSH recombinante (FSHr) (200 IU/d) até que se obtivessem folículos entre 13-14 mm de diâmetro médio. A partir de então, constituíram-se dois grupos: HOC com hCG (200IU/d) (grupo hCG) e HOC com hMG (225IU/d) (grupo hMG) até que os parâmetros para administração do hCG pré-ovulatório fos-

sem atingidos. A monitorização foi realizada através de ultra-sonografia transvaginal e dosagem sérica de estradiol, progesterona e testosterona. **Resultados:** O número de folículos menores que 10, 10 a 14 e maiores que 14 mm e tempo de HOC (em dias) foram similares em ambos os grupos. De 17pacientes hiperestimuladas com hCG, 14 apresentaram progesterona sérica > 1,5 ng/mL no dia do hCG pré-ovulatório, comparado com 7 pacientes no grupo hMG. As taxas de gravidez clínica foram semelhantes nos grupos hCG e hMG (52.9% e 33.3%, respectivamente). O custo total do tratamento por paciente no grupo hCG foi significativamente inferior que no grupo hMG (R\$ 2363,00 ± 409,70 vs R\$ 1949,00 ± 292,40, respectivamente; $p = 0,0019$). **Conclusões:** LH na forma de baixa dose de hCG na fase folicular tardia apresentou o mesmo padrão de desenvolvimento folicular que o hMG. O protocolo utilizando hCG produziu taxa de gestação similar àquela evidenciada pela HOC com hMG na fase folicular tardia, mesmo apresentando níveis séricos elevados de progesterona no dia do hCG pré-ovulatório.

FARMACOCINÉTICA E ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO TRANSPLACENTÁRIA DA FENTANILA NA ASSISTÊNCIA ANESTÉSICA VIA EPIDURAL DE GESTANTES NORMAIS

Elaine Christine Dantas Moisés

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Pereira da Cunha

Dissertação de Mestrado apresentada em 23/07/2004

Introdução: Os procedimentos anestésicos em obstetrícia persistem como desafio para obstetras e anestesistas que prosseguem na investigação de mé-

todos seguros e eficazes de analgesia e anestesia, possibilitando os melhores resultados obstétricos e perinatais, aliados a conforto e segurança. No parto por via abdominal, o bloqueio epidural representa um dos procedimentos anestésicos mais freqüentes em obstetrícia. A fentanila é um fármaco opióide largamente utilizado como coadjuvante nessa prática, fato que justifica o estudo farmacocinético do mesmo nessas condições.

Objetivos: Investigar a farmacocinética e a transferência placentária da fentanila em parturientes cujas gestações foram resolvidas por via abdominal, com anestesia epidural.

Casuística e Métodos: Foram avaliadas 10 parturientes com gestação a termo, consideradas normais clinicamente e laboratorialmente. Todas as gestantes receberam 5 mL de cloridrato de lidocaína a 2% sem vasoconstrictor para bloqueio de pele e subcutâneo, seguido de injeção epidural de 2 mL de citrato de fentanila a 0,05 mg/mL, 15 mL de cloridrato de bupivacaína 0,5% com epinefrina 1:200000 e 10 mL de cloridrato de lidocaína a 2% sem vasoconstrictor. Na seqüência, foram coletadas amostras sanguíneas maternas nos tempos 1, 5, 15, 30, 45, 60, 120, 240, 360, 480, 600, 720 e 840 minutos e amostras de sangue do cordão umbilical para determinação das concentrações

de fentanila por cromatografia. Determinadas as concentrações, foram traçadas as curvas de concentração em função do tempo e análise farmacocinética bicompartimental ou tricompartmental para a fentanila, determinando-se $t_{1/2}$ de α , $t_{1/2}$ de β , $t_{1/2}$ de γ , $AUC^{0-\infty}$, $Cl/f/kg$ e $Vd/f/kg$. Com base nas concentrações maternas e fetais no momento do nascimento, foi determinada a relação feto/materna desse fármaco.

Resultados: Os parâmetros farmacocinéticos encontrados foram: $t_{1/2}$ de α de 13,5 min, $t_{1/2}$ de β de 192,5 min, $t_{1/2}$ de γ de 620 min, $AUC^{0-\infty}$ de 137,404 ng.min/mL, Cl/f de 464,984 mL/min, Vd/f de 299,974 L, $Cl/f/kg$ de 6,875 mL/min/kg e $Vd/f/kg$ de 4,441 L/kg. O tempo de latência entre a administração da droga e o nascimento foi de 28,5 min, sendo que, no momento do parto, a concentração plasmática materna foi de 0,310 ng/mL e a fetal de 0,245 ng/mL, com relação feto/materna mediana de 0,892.

Conclusões: A fentanila apresenta rápida passagem do espaço epidural para a corrente sanguínea e curto período de tempo para equilíbrio entre esses setores. O estudo evidenciou transferência placentária da fentanila em razões de aproximadamente 90% para fentanila, alertando para a elevada transferência deste fármaco através da barreira placentária.

INFLUÊNCIA DO ESTRESSE AGUDO NO PICO PRÉ-OVULATÓRIO DE LH DE RATAS

Fernanda Vieira Rodovalho Callegari

Orientadora: Profa.Dra. Janete A. Anselmo Franci.
Dissertação de Mestrado apresentada em 10/08/2004

Introdução: Apesar da maioria dos estudos demonstrarem que estresses inibem a secreção de LH, alguns trabalhos sugerem que estresses agudos podem estimular a secreção de LH se aplicados em períodos nos quais as concentrações estrogênicas estejam adequadas.

Objetivo: Investigar se a aplicação de diferentes estresses como cirurgia de canulação da veia jugular, contenção, exposição ao gato, estimulação do cérvix uterino, aplicados em separado ou em conjunto na manhã de proestro, poderiam antecipar e/ou amplificar o aumento da secreção de gonadotrofinas esperado para à tarde daquele dia.

Casuística e Métodos: Desde que a taxa de gestação em mulheres violentadas é maior do que a observada em mulheres com vida sexual normal, este

protocolo teve a intenção de simular uma situação de estupro. Ratas Wistar adultas foram submetidas à canulação da veia jugular entre às 10:40 e 11:00 horas da manhã. Um grupo de animais não foi submetido a estresses (grupo controle) e os outros foram submetidos 1) às 10:00h da manhã a 40 minutos de exposição ao gato ou imobilização, 2) às 10:00 e 10:40h da manhã a 1 minuto de estimulação cervical e 3) a todos estresses aplicados de forma idêntica. Amostras de sangue foram colhidas em todos os grupos experimentais de hora em hora das 11:00 às 18:00h para dosagem de LH, progesterona, corticosterona e estradiol.

Resultados: Apesar de todos os estresses quando aplicados em conjunto ou individualmente não interferirem no horário de deflagração do pico pré-ovulatório de LH, o qual ocorreu na maioria dos animais às 18:00h, ocorreu uma amplificação do pico de LH quando todos os estresses foram aplicados em conjunto. Todos os grupos estudados apresentaram um aumento na secreção de corticosterona e progesterona. As concentrações de corticosterona não apresenta-

ram diferença significativa entre todos os grupos estudados, no entanto, as concentrações de progesterona foram significativamente maiores no grupo submetido a todos os estresses.

Conclusão: Estes dados sugerem que estresses

agudos aplicados na manhã do proestro, quando as concentrações de estradiol já são altas, podem provocar um aumento da secreção de progesterona (provavelmente adrenal), a qual por sua vez amplifica o pico pré-ovulatório de LH.

FARMACOCINÉTICA E ENANTIOSSELETIVIDADE DA BUPIVACAÍNA EM GESTANTES NORMAIS SUBMETIDAS À ANESTESIA EPIDURAL

Luciana de Barros Duarte

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Pereira da Cunha

Dissertação de Mestrado apresentada em 20/08/2004

Introdução: O interesse fundamental que motiva estudos sobre enantiosseletividade em agentes anestésicos, principalmente os anestésicos locais, é aumentar a margem de segurança em relação à utilização dessas drogas, baseando-se no princípio de que geralmente os enantiômeros apresentam menores efeitos colaterais e um melhor perfil terapêutico em relação ao racemato. A bupivacaína é a droga mais utilizada em obstetrícia comercializada sobre a forma racêmica dos enantiômeros (+)-(R)-(-)-(S)- bupivacaína, entretanto sua administração requer cautela devido ao seu perfil tóxico.

Objetivo: Avaliar a enantiosseletividade na disposição cinética e na transferência transplacentária da bupivacaína em gestantes normais.

Material e Método: Foram avaliadas dez gestantes, submetidas a parto cesáreo eletivo e à anestesia epidural. Amostras de sangue materno foram colhidas em intervalos progressivos de tempo, iniciadas no momento da indução anestésica até 14h após o procedimento. Adicionalmente foi colhida uma única amostra da veia umbilical fetal. Os enantiômeros da bupivacaína foram determinados nas amostras de plasma pelo método HPLC utilizando a coluna Chiracel® OD-R e o detector UV.

Resultados: A análise dos parâmetros farmacocinéticos evidenciou: valor *clearance* maior para o enantiômero (+)-(R) 32,95 vs 25,52 L/h em relação

ao (-)-(S) com diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$. Valores de α encontrados foram 0,83 vs 1,18h⁻¹ para os enantiômeros (+) – (R) e (-) – (S)-bupivacaína. Valores para o $t_{1/2\alpha}$ referidos foram 0,75 vs 0,58h para os enantiômeros (+) – (R) e (-) – (S)-bupivacaína. Valores de β foram 0,08 vs 0,08h⁻¹ para os enantiômeros (+) – (R) e (-) – (S)-bupivacaína. Valores encontrados para $t_{1/2\beta}$ 8,12 vs 8,2h para os enantiômeros (+) – (R) e (-) – (S)-bupivacaína. Todos os valores não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Os valores da AUC^{0-∞} foram 956,8 vs 1.189 ng.h/ml também sem diferenças estatisticamente significantes, respectivamente para os enantiômeros (+) – (R) e (-) – (S)-bupivacaína. Os volumes de distribuição encontrados respectivamente para os enantiômeros (+) – (R) e (-) – (S)-bupivacaína foram 369,3 vs 361,3L, sem diferença estatisticamente significativa. As concentrações plasmáticas na veia umbilical fetal foram 60,11 vs 50,65 para os enantiômeros (+) – (R) e (-) – (S)-bupivacaína, sem diferenças estatisticamente significantes. A relação materno/fetal foi 0,33 vs 0,31 para os enantiômeros (+) – (R) e (-) – (S)-bupivacaína. Evidenciando pouca passagem da droga para o feto.

Conclusão: O estudo permitiu concluir que a diferença entre o *clearance* dos enantiômeros, maior para o enantiômero (+)-(R)-bupivacaína, evidenciando enantiosseletividade na disposição cinética da bupivacaína. Entretanto os valores encontrados, nas concentrações da veia umbilical fetal não nos permitiram concluir que a transferência transplacentária da bupivacaína é enantiosseletiva.

EFEITO DA GLICOSE NA HEMODINÂMICA MATERNO-FETAL AVALIADA PELO EFEITO DOPPLER

Rose Mary de Castro R. Pereira

Orientador: Prof. Dr. Francisco Maua Filho

Dissertação de Mestrado apresentada em 23/09/2004

Objetivo: Analisar as repercussões da glicose no binômio materno-fetal e avaliar as alterações hemodinâmicas pelo estudo Dopplervelocimétrico nos

vasos maternos da artéria carótida comum e artérias uterinas, nos vasos placentários da artéria umbilical e nos vasos fetais da artéria cerebral média e aorta abdominal.

Método: Estudo observacional e longitudinal realizado por um único observador em 33 gestantes clinicamente normais entre a 28ª e a 36ª semana, antes e após 60 minutos da ingestão de 50 g de glicose. Foram avaliados, em cada vaso, os seguintes parâmetros: índice de resistência, índice de pulsatilidade, velocidade sistólica máxima, velocidade diastólica final e tempo de aceleração.

Resultados: Observamos a diminuição da frequência cardíaca no compartimento fetal e a elevação da glicemia no compartimento materno. Apesar desses achados, não foram encontradas alterações velocimétricas dos demais parâmetros, tanto no compartimento materno como no fetal.

Conclusões: Procuramos contribuir com o presente estudo para a pesquisa da sobrecarga de glicose, estimulando a realização de outros trabalhos que possibilitem entender melhor o comportamento das alterações bioquímicas causadas pela glicose sobre a fisiologia.

USO DE 150MG/DIA DE ACARBOSE EM PACIENTES OBESAS E COM SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS: ESTUDO DUPLO CEGO RANDOMIZADO, COM GRUPO PLACEBO

Ivan Andrade de Araujo Penna

Orientador: Prof. Dr. Rui Alberto Ferriani

Dissertação de Mestrado apresentada em 07/10/2004

Objetivo: Avaliaram-se os efeitos do uso da acarbose na dose de 150mg/dia em pacientes obesas e portadoras de síndrome dos ovários policísticos (SOP).

Método: Estudo duplo-cego, com 30 pacientes obesas, hiperinsulinêmicas e portadoras de SOP, tratadas randomicamente (coputadorizada) com 150mg/dia de acarbose por 6 meses ou placebo. Hiperandrogenismo, índice de massa corporal (IMC), resposta de insulina e glicose ao teste de tolerância com 75g de glicose, globulina carreadora dos hormônios esteróides (SHBG), LH, FSH e efeitos colaterais foram avaliados.

Resultados: Nas pacientes do grupo acarbose,

houve redução do IMC ($35,87 \pm 2,60 \text{ kg/m}^2$ vs $33,10 \pm 2,94 \text{ kg/m}^2$), do índice de Ferriman-Gallwey ($8,85 \pm 2,31$ vs $8 \pm 1,82$) e aumento da chance de regularidade menstrual (razão = 2,67). A concentração de SHBG também aumentou ($21,01 \pm 7,9 \text{ nmol/l}$ vs $23,85 \pm 7,77 \text{ nmol/l}$) e o índice de androgênios livre (IAL) teve redução ($14,81 \pm 9,06$ vs $11,48 \pm 6,18$). Nenhum desses parâmetros se modificou no grupo placebo. Cerca de 84% das pacientes do grupo acarbose tiveram efeitos colaterais, que melhoraram no decorrer da pesquisa.

Conclusão: A acarbose em baixa dosagem em pacientes obesas, portadoras de SOP e com resistência à insulina, promove redução do índice de androgênios livres, do IMC e aumento da SHBG, com melhora do hirsutismo e padrão menstrual e é bem tolerada pelas pacientes.

ESTUDO MORFOLÓGICO E MORFOMÉTRICO DE PLACENTAS DE GESTANTES ÍNDIAS, PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE IMPERATRIZ – MA

Ana Cristina Gomes Premoli

Orientador: Prof. Dr. Miguel Angel Sala Di Matteo

Tese de Doutorado apresentada em 11/11/2004

Introdução: A placenta humana é responsável pela transferência seletiva, durante a gestação, de substâncias entre mãe e feto e *vice-versa*. Em condições ambientais desfavoráveis, as vilosidades placentárias apresentam alterações morfológicas que, segundo alguns autores, seriam uma tentativa de melhorar a oxigenação, facilitar as trocas e permitir um melhor desenvolvimento fetal. Outros fatores, como os sócio-econômicos, podem provocar alterações estruturais na placenta. Porém, muitas vezes, os fatores sócio-econômicos e ambientais interagem com fatores étnicos, os quais ainda não são bem compreendidos.

O estudo das placentas pertencentes a gestan-

tes índias, comparando-as às provenientes de gestantes não-índias, originárias de populações que vivem em condições ambientais e sócio-econômicas semelhantes, pode contribuir para a melhor compreensão dos fatores étnicos, em vista de os índios constituírem um povo relativamente livre de miscigenação e que conserva as suas tradições culturais com o passar do tempo.

Objetivos: O objetivo do presente trabalho foi realizar um estudo comparativo de placentas de índias das tribos Guajajaras e de não-índias, provenientes do Município de Imperatriz – MA, mediante a utilização de métodos morfológicos e morfométricos.

Métodos: Foram analisadas 10 placentas de índias e 10 de não-índias, num estudo de tipo caso-controle. As placentas foram examinadas imediatamente à dequitação de acordo com roteiro padronizado. Cortes histológicos, de 6 µm de espessura, corados com PAS-H, foram submetidos a análise estereológica, estimando-se os volumes relativo e absoluto das estruturas placentárias, a densidade de superfície e a superfície total de vilosidades, capilares e mem-

branas sincíviovasculares, o diâmetro das vilosidades e dos capilares e a espessura média da camada trofoblástica. A análise estatística foi realizada mediante os testes “t”, de Wilcoxon e de Fisher.

Resultados: Os resultados permitiram demonstrar diferenças importantes entre as placentas de índias e de não-índias. Assim, todas as placentas de índias apresentaram forma oval, e, em 50% dos casos, aspecto pálido, além de valores maiores para peso, volume, índice placentário, superfície de inserção, diâmetro maior, relação entre diâmetros, excentricidade e índice de contorno, e menor coeficiente de forma. Os volumes ocupados por sinciotrofoblasto, trofoblasto e vilosidades, a superfície vilositária e a espessura da camada trofoblástica foram maiores nas placentas das gestantes índias.

Conclusões: A placenta das índias possui uma maior reserva funcional, podendo, em casos de necessidade, aumentar o número de membranas sincíviovasculares, mediante o deslocamento periférico dos capilares, facilitando as trocas por difusão simples entre os sangues materno e fetal.

IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

ASSOCIAÇÃO DOS MICROSSATÉLITES DO FATOR DE NECROSE TUMORAL E DOS ALELOS DO COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE COM A ESCLEROSE SISTÊMICA EM PACIENTES BRASILEIROS

Isabela Jubé Wastowski

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Antonio Donadi

Dissertação de Mestrado apresentada em 01/07/2004

A esclerose sistêmica (ES) é uma desordem heterogênea do tecido conectivo caracterizada por fibrose da pele e presença ou não de envolvimento de órgãos internos. A etiologia da ES está associada a anormalidades do sistema imune, fatores ambientais e fatores genéticos. Além disso, o microquimerismo fetal, ou seja, a presença de células fetais na circulação materna oriundas da troca celular entre mãe e feto durante a gestação, tem sido relacionado à patogênese da ES. Células fetais parecem causar uma reação semelhante a GVHD (Graft versus host disease) contra

o organismo materno, em um processo influenciado pelos alelos HLA.

O Fator de Necrose Tumoral é uma importante citocina inflamatória, que encontra-se aumentada em pacientes com ES. Em humanos, os genes do TNF estão localizados dentro da região do HLA e pelo menos 6 microssatélites já foram descritos nessa região (TNFa-f). Esses microssatélites possuem vários alelos e, como os alelos do HLA, têm sido associados com o GVHD, cujo envolvimento cutâneo assemelha-se ao da ES.

Objetivo: Analisar os polimorfismos dos microssatélites do TNF (a, b, c, d e e) e dos alelos de classe II do HLA (DR e DQ) em pacientes brasileiros com ES.

Métodos: Amostras de sangue periférico foram colhidas de 40 pacientes (23 apresentando a forma difusa e 17 a forma limitada) e 120 controles. O DNA foi extraído por *salting out*. Os microssatélites do TNF e os alelos do HLA foram identificados por meio de hibridização de iniciadores sequência-específicos para cada loco e o produto dessa reação foi analisado em géis de poliacrilamida e agarose, respectivamente. As análises estatísticas foram feitas nos programas GENEPOP e ARLEQUIN. Foi feito, ainda, o teste exato de Fisher, o risco relativo (RR) e a fração etiológica (FE) ou fração preventiva (FP).

Resultados: Em relação aos controles, os alelos TNFa8 ($p=0,006$; RR= 21,176; 95% IC= 2,266-197,93; FE = 8,3%) e TNFd1 ($p=0,0279$; RR= 2,601; 95% IC= 1,182-5,724; FE = 12,6%) apresentaram frequências alélicas aumentadas no grupo de pacientes com ES limitada. Ainda, a frequência do alelo HLA-DRB1*08 ($p=0,0174$; RR= 3,445; 95% IC= 1,353-8,768; FE = 11%) estava aumentada no grupo de pacientes com a forma difusa. Em contraste com outros estudos, o alelo HLA-DRB1*03 ($p=0,0388$; RR= 0,185; 95% IC= 0,025-1,279;

FP = 12,2%) e o haplótipo HLA-DR3/HLA-DQ2 ($p=0,03$) apresentaram baixa frequência no grupo de pacientes. As frequências dos haplótipos TNFa8-b4-c1-d1-e3; HLA-DR1/HLA-DQ3 ($p=0,035$) e HLA-DR8/HLA-DQ3 ($p=0,026$) estavam significativamente aumentadas no grupo de pacientes. Além disso, identificamos um novo polimorfismo do loco TNFd, caracterizado por um alelo com 120 bp em uma paciente apresentando a forma difusa da ES. Esse novo alelo foi observado em quatro indivíduos de uma mesma família (mãe e três filhos).

Conclusão: Considerando-se que os microssatélites do TNF foram associados previamente com o desenvolvimento do GVHD, e que esta apresenta manifestações cutâneas semelhantes às da ES, a associação com o loco TNFd como observado nesse estudo, pode contribuir para a susceptibilidade a ambas doenças. Além disso, a associação da ES com os alelos clássicos do HLA também foi observada na população brasileira, corroborando achados em outras populações. Nossos resultados indicam a participação dos genes do HLA e dos microssatélites do TNF na patogênese da ES.

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE TROPOMIOSINA EM INVERTEBRADOS: REATIVIDADE CRUZADA E PAPEL NA RESPOSTA IMUNE MEDIADA POR IGE

Ana Beatriz Rossetti Santos

Orientadora: Profa. Dra. Luisa Karla de Paula Arruda
Tese de Doutorado apresentada em 20/08/2004

Exposição a alérgenos de baratas está associada à sensibilização e desenvolvimento de doenças alérgicas como asma. Previamente identificamos tropomiosina como um alérgeno principal de barata *P. americana*. A sequência de aminoácidos desse alérgeno (Per a 7) apresentou 80% a 82% de identidade com sequências de tropomiosinas de ácaros e camarão, importantes proteínas com ligação a IgE. No presente estudo, expressamos tropomiosina recombinante de *P. americana* no sistema *Pichia pastoris*. A proteína purificada do sobrenadante de culturas por cromatografia de afinidade utilizando anticorpo monoclonal 1A6, que reconhece tropomiosinas de ácaro, barata e camarão, foi produzida em altos níveis de expressão (7mg/L de cultura) e com elevado grau de pureza. Tropomiosina recombinante de *P. americana* induziu testes cutâneos de hipersensibilidade imediata positivos em pacientes alérgicos a barata, e a reatividade

cutânea foi comparável à do alérgeno natural, indicando que a proteína recombinante tem atividade biológica. Analisando painel de soros de 112 pacientes com asma e/ou rinite alérgica a barata, anticorpos IgE específicos para tropomiosina de barata foram detectados em 33% dos pacientes.

Utilizando *primers* baseados em sequências conservadas de tropomiosina de *P. americana*, determinamos a sequência do DNA que codifica tropomiosina do parasita *Ascaris lumbricoides*, que apresentou 90% a 98% de identidade com tropomiosinas de outros parasitas, incluindo *Anisakis simplex*, e 69 a 74 % de identidade com tropomiosinas de barata e ácaros. Imunofluorescência fortemente positiva foi observada em tecido de *A. lumbricoides* utilizando o anticorpo monoclonal 1A6 anti-tropomiosina. Reatividade IgE para tropomiosinas de *P. americana* e de *Ascaris* foi detectada em 52,7% das crianças vivendo em região de alta infestação por *A. lumbricoides*, e uma correlação significativa foi encontrada entre os níveis de IgE para tropomiosinas de *P. americana* e de *Ascaris* ($n = 146$, $r = 0,8$, $p < 0,0001$). Níveis de

IgE total nas crianças com resultados positivos para tropomiosina foram significativamente mais elevados do que os níveis observados em crianças com resultados negativos (MG: 904 e 409 kU/L, $p = 0,006$). Nossos resultados demonstram que tropomiosina é uma importante proteína com ligação a IgE em invertebra-

dos, e que pode estar envolvida na reatividade cruzada da IgE para ácaros, baratas, camarão e parasitas. Estudos futuros serão necessários para determinar a relevância clínica da reatividade cruzada e para estabelecer o papel da tropomiosina na patogênese da asma e outras doenças alérgicas.

PROTEÍNAS DE MICRONEMA DE *TOXOPLASMA GONDII* DOTADAS DE PROPRIEDADE LECTÍNICA: PAPEL NA INTERAÇÃO DO PARASITA COM O HOSPEDEIRO

Elaine Vicente Lourenço

Orientadora: Dra Maria Cristina R. Antunes Barreira
Tese de Doutorado apresentada em 30/08/2004

Toxoplasma gondii é um protozoário cosmopolita parasita intracelular obrigatório, responsável pela toxoplasmose em animais homeotermos, incluindo o homem. Sua capacidade de infectar vários tipos celulares está relacionada principalmente com os mecanismos de invasão e formação de um vacúolo parasitóforo, no qual os parasitas sobrevivem. Esses processos são dependentes de proteínas de superfície, bem como de liberação de proteínas das microne-mas, roptrias e grânulos densos. Nesse estudo, nós avaliamos o papel das proteínas micronêmicas 1 (MIC1) e 4 (MIC4) de *T. gondii* nos processos de invasão da célula hospedeira e na resposta imune por elas desencadeada. Essas proteínas foram obtidas através de cromatografia de afinidade de antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg) em coluna de lactose imobilizada e constituíram uma fração denominada Lac+. Uma vez que MIC1 e MIC4 eram copurificadas, tentamos separá-las em frações distintas, com o intuito de estudá-las individualmente. Para tanto, produzimos e utilizamos o mAb 10G8, específico para MIC1, como ferramenta para obter preparações homogêneas e distintas de MIC1 e MIC4, em procedimentos de cromatografia de afinidade de STAg em coluna contendo esse mAb imobilizado. Análises eletroforéticas das proteínas eluídas dessa coluna demonstraram que não foi possível obter frações contendo apenas MIC1 ou MIC4. Então, optamos por usar Lac+, contendo as duas proteínas, em estudos de ativação de linfócitos, macrófagos e na indução de imunidade protetora contra infecção por *T. gondii*. Lac+ induziu a produção significativa de IL-2 e IFN- γ por células do linfonodo poplíteo e células esplênicas de camundongos imunizados e de óxido nítrico por macrófagos J774. Ainda que tenha sido detectada produção de IL-10, a ausência de IL-4 nos sobrenadantes das células sugeriu que a resposta desenvolvida foi direcionada para o padrão Th1. Essa resposta conferiu proteção contra infecção oral com 40 e 80 cistos da cepa ME49 de *T. gondii*, pois 80% dos camundongos C57BL/6 imunizados com Lac+ sobreviveram mais de 30 dias após a infecção, contrastando com a ausência de sobrevivência dentre os não imunizados. Além disso, dentre os animais imunizados, foi observada redução de 68% no número de cistos cerebrais em relação aos não imunizados. Esses resultados indicam que a fração Lac+, constituída de MIC1 e MIC4, é capaz de gerar resposta imune protetora na toxoplasmose, podendo corresponder a preparação vacinal ou imunomoduladora indutora de proteção contra *T. gondii*.

tografia de afinidade de STAg em coluna contendo esse mAb imobilizado. Análises eletroforéticas das proteínas eluídas dessa coluna demonstraram que não foi possível obter frações contendo apenas MIC1 ou MIC4. Então, optamos por usar Lac+, contendo as duas proteínas, em estudos de ativação de linfócitos, macrófagos e na indução de imunidade protetora contra infecção por *T. gondii*. Lac+ induziu a produção significativa de IL-2 e IFN- γ por células do linfonodo poplíteo e células esplênicas de camundongos imunizados e de óxido nítrico por macrófagos J774. Ainda que tenha sido detectada produção de IL-10, a ausência de IL-4 nos sobrenadantes das células sugeriu que a resposta desenvolvida foi direcionada para o padrão Th1. Essa resposta conferiu proteção contra infecção oral com 40 e 80 cistos da cepa ME49 de *T. gondii*, pois 80% dos camundongos C57BL/6 imunizados com Lac+ sobreviveram mais de 30 dias após a infecção, contrastando com a ausência de sobrevivência dentre os não imunizados. Além disso, dentre os animais imunizados, foi observada redução de 68% no número de cistos cerebrais em relação aos não imunizados. Esses resultados indicam que a fração Lac+, constituída de MIC1 e MIC4, é capaz de gerar resposta imune protetora na toxoplasmose, podendo corresponder a preparação vacinal ou imunomoduladora indutora de proteção contra *T. gondii*.

O ESTUDO DO PAPEL DA GALECTINA-3 NA INFECÇÃO POR *TOXOPLASMA GONDII* REVELA SUA DUPLA FUNÇÃO REGULATÓRIA DA IMUNIDADE INATA E ADQUIRIDA

Emerson Soares Bernardes

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina R. Barreira
Tese de Doutorado apresentada em 14/09/2004

No presente trabalho propusémo-nos a avaliar o papel da galectina-3, uma lectina ligante de β -galactosídeos, amplamente estudada e conhecida princi-

palmente por suas atividades pró-inflamatórias e anti-apoptóticas. Apesar de sua aparente importância funcional, a geração de animais deficientes do gene da galectina-3 (KO) não resultou em defeito fenotípico, o que nos impulsionou a desafiar animais selvagens (WT) e (KO) a uma variedade de estímulos ambientais, na busca de desvendar as funções exercidas pela lectina.

Inicialmente, a existência de defeitos intrínsecos de macrófagos deficientes de galectina-3 foi avaliada, constatando-se que macrófagos de KO eram mais sensíveis ao estresse provocado pela permanência em baixa temperatura do que os de selvagens (WT), o que ocasionou queda da viabilidade de macrófagos KO sob tal estímulo. O tratamento de macrófagos KO com a lectina jacalina foi capaz de restaurar a viabilidade aos níveis encontrados nos macrófagos de WT.

Diante do importante papel exercido pelos macrófagos na defesa do hospedeiro contra agentes invasores, animais KO e WT foram ensaiados em modelos experimentais de infecção com os parasitas *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania major* e *Toxoplasma gondii*. Na infecção por *Trypanosoma cruzi* ou por *Leishmania major*, a participação da galectina-3 refletiu-se apenas numa tendência do animal KO a manifestar maior carga parasitária nas fases agudas da infecção e menor carga parasitária em fases mais tardias.

Diferentemente dos outros dois modelos avaliados, o papel da galectina-3 na infecção por *Toxoplasma gondii* foi mais destacadamente observado. Diferenças estatisticamente significantes ocorreram entre o número de cistos no cérebro de animais KO e WT. Essas diferenças foram máximas aos 14

dias de infecção, quando animais KO atingiram números de cistos dez vezes superiores aos verificados nos WT e permaneceram mais elevados em todos os períodos analisados. O papel pró-inflamatório da lectina ficou evidente pela menor intensidade de resposta inflamatória nos diversos órgãos e no SNC dos animais KO, em relação aos de WT. O pulmão constituiu-se em única exceção. A expressão de galectina-3 aumentou gradativamente nos órgãos de animais WT infectados, atingindo níveis máximos aos 14 dias de infecção e retornando aos níveis basais característicos de cada órgão ao fim do processo inflamatório. A única exceção foi o SNC, no qual a expressão de galectina-3 foi observada aos 14 dias de infecção e permaneceu elevada em todos os períodos analisados.

Apesar da carga parasitária no SNC de animais KO, esses animais haviam desenvolvido uma resposta imune tipo Th1, que caracterizou-se por níveis séricos mais elevados de IFN- γ , IL-12 e IgG2a do que o observado nos animais WT. Esses resultados nos levaram a avaliar, posteriormente, a produção de citocinas por células esplênicas de animais KO, não infectados. Elas produziram níveis mais elevados de IL-12 e IFN- γ do que as de WT não infectados, sob estímulos diversos.

As taxas de sobrevivência de animais KO e WT foram similares frente ao desafio oral com *T. gondii*. No entanto, quando o desafio foi feito via intraperitoneal, a taxa de sobrevivência de animais WT foi significativamente superior a de animais KO.

Nosso trabalho elege a galectina-3 como molécula moduladora da imunidade que exerce um papel duplo, regulando positivamente a resposta inata e negativamente a resposta adquirida.

MECANISMOS ENVOLVIDOS NA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS INDUZIDA POR mBSA EM CAMUNDONGOS IMUNIZADOS

Luciana Gabriel Nogueira

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha
Dissertação de Mestrado apresentada em 16/09/2004

No presente estudo, investigamos a participação dos linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e B, e de mediadores inflamatórios, tais como LTB₄, TNF- α , IL-12, IFN- γ e IL-4 no recrutamento de neutrófilos, observado no modelo de imunização e desafio com mBSA.

Inicialmente, observamos que o desafio i.p. com

mBSA induz recrutamento de neutrófilos de maneira dose e tempo dependentes em animais imunizados. Subseqüentemente, com a utilização de animais deficientes para linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e B, verificamos que essas linhagens não apresentam migração de neutrófilos quando comparados aos animais selvagens, após desafio com mBSA, sugerindo que essas células poderiam estar liberando mediadores importantes no recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal.

Sendo assim, nós passamos a investigar a parti-

cipação de mediadores inflamatórios em nosso modelo. Desta forma, os resultados demonstram que o tratamento com MK886 (inibidor da síntese de leucotrieno B₄) inibiu parcialmente a migração de neutrófilos, induzida por mBSA em animais imunizados; enquanto que animais tratados com dexametasona não apresentam migração de neutrófilos. Com a utilização de animais deficientes para o receptor p55 do TNF- α e animais deficientes da subunidade p40 da citocina IL-12, observamos que essas duas linhagens não apresentam migração de neutrófilos, quando imunizados e desafiados com mBSA. Esses resultados sugerem a indução de um padrão de resposta Th1, uma vez que foi verificada a participação da IL-12, e, além disso, o envolvimento de mediadores inflamatórios como TNF- α e LTB₄. Interessantemente, quando utilizamos animais deficientes para IFN- γ , observamos que essa citocina não participa da migração de neutrófilos em nosso modelo.

Visto que a IL-4 é descrita como uma importante citocina capaz de suprimir a resposta Th1 inibin-

do a diferenciação desta população de células, e conseqüentemente a produção de citocinas pró-inflamatórias, avaliamos o efeito dessa citocina neste modelo. Nossos resultados demonstram que animais deficientes de IL-4, quando submetidos ao protocolo de imunização e desafio com mBSA, apresentam potencialização da migração de neutrófilos quando comparados aos animais selvagens, sugerindo que a IL-4 regula negativamente a migração de neutrófilos no modelo de imunização e desafio com mBSA.

Em conclusão, os resultados demonstram que os linfócitos, TCD4⁺, T CD8⁺ e B, bem como os mediadores: LTB₄, TNF- α , IL-12p40 participam da migração de neutrófilos induzida por mBSA em animais imunizados. Enquanto que o IFN- γ não participa e a IL-4 modula de forma negativa a migração desses leucócitos para a cavidade peritoneal. Deste modo, esses resultados contribuem para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na migração de neutrófilos durante um processo inflamatório de origem imune.

SIMILARIDADE GENÉTICA E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE MARCADORES DE VIRULÊNCIA DE *Yersinia enterocolitica* DE BIO-SOROTIPOS E ORIGEM DIVERSOS. INVESTIGAÇÃO DE *quorum sensing* NA SUA PATOGÊNESE

Juliana Pfrimer Falcão

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Brocchi

Tese de Doutorado apresentada em 08/11/2004

Foram estudadas 144 amostras de *Yersinia enterocolitica*, sendo 71 do bio-soro-fagotipo 4/O:3/VIII, isoladas de fezes diarréicas humanas (37) e de material clínico de animais (34), e 73 pertencentes a bio-soro-fagotipos distintos, isoladas de alimentos (35) e do meio ambiente (38), pertencentes à coleção de cultura do Laboratório de Referência em *Yersinia* da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, Araraquara. Em todas as amostras, foram investigados o perfil de resistência a drogas, o comportamento frente aos testes de autoaglutinação a 37°C, dependência ao cálcio a 37°C, absorção do corante Vermelho Congo, atividade da pirazinamidase, fermentação da salicina, hidrólise da esculina e a presença dos genes *inv*, *ail*, *yst* e *virF* pela técnica do PCR. A similaridade genética entre as amostras, com exceção das isoladas do meio ambiente, foi verificada utilizando-se as técnicas de Eletroforese em Campo Pulsado (ECP) e ERIC-PCR. Adicionalmente, foram realizados experimentos para verificar a capacidade de produção das

moléculas de acyl-homoserina-lactonas e AI-2, envolvidas na sinalização dos sistemas *quorum sensing*, pelas cepas de *Y. enterocolitica* tipo selvagem ATCC8081(1B/O:8) e IP8240 (4/O:3). Também foi estudado se haveria alteração nos comportamentos de invasão de células HeLa e motilidade destas cepas quando expostas a concentrações crescentes dos autoindutores citados. Todas as amostras apresentaram resistência a duas ou mais das drogas testadas, com exceção de três (7,9%) das ambientais que foram resistentes apenas a uma droga. Todas apresentaram comportamento relacionado a virulência frente aos testes de hidrólise da esculina, fermentação da salicina e atividade da pirazinamidase, com exceção dos isolados de alimentos, onde apenas uma amostra (2,9%) teve este comportamento. Para os outros testes fenotípicos, 27 (73,0%) dos isolados de fezes humanas, 14 (41,2%) de animais, um (2,9%) de alimentos e 4 (10,5%) do ambiente foram positivos. O gene *inv* foi detectado em todas amostras. Os genes *ail* e *yst* foram detectados em praticamente todos isolados de material clínico humano, animais, ambiente e apenas em dois (5,7%) de alimentos. A presença do gene *virF* foi variável e detectada em 35 (94,6%), 21

(61,8%), uma (2,9%) e em 4 (10,5%) amostras isoladas de material clínico humano, animais, alimentos e ambiente, respectivamente. As duas amostras de alimentos, portadoras dos genes de virulência, foram agrupadas mais próximas às isoladas de humanos e animais pela técnica do ERIC-PCR. As amostras foram melhor discriminadas pela técnica de ECP do que por ERIC-PCR. As amostras isoladas de material clínico humano e animal apresentaram alta similaridade genética. Estudos de *quorum sensing* mostraram que as cepas estudadas produziram os autoindutores pes-

quisados e que um deles parece controlar a motilidade da cepa ATCC8081. Pelos resultados obtidos concluiu-se que alimentos contaminados com *Y. enterocolitica* de bio-sorotipos não comumente relacionados a doença podem causar infecção, amostras ambientais com potencial de virulência apresentam risco à população, a alta similaridade genética entre os isolados de material clínico humano e animais sugere que, em nosso meio, animais funcionam como reservatório de *Y. enterocolitica* e há indicações da participação dos sistemas *quorum sensing* na patogênese desta bactéria.

NEUROLOGIA

ANATOMIA MICROSCÓPICA DE NERVOS DO PLEXO BRAQUIAL DE RATOS WISTAR

Ana Paula Santos

Orientador: Prof. Dr. Amilton Antunes Barreira

Dissertação de Mestrado apresentada em 06/07/2004

Avaliações de parâmetros quantitativos dos nervos do plexo braquial do rato são escassas. Realizamos um estudo morfoquantitativo do nervo digital próprio lateral do terceiro dedo e de amostras proximais e distais dos nervos ulnar, mediano e radial. Foram utilizadas ratas Wistar, com 4 (N = 3) e 7 (N = 3) semanas. As amostras foram fixadas com glutaraldeído a 3% em tampão cacodilato de sódio 0,07 M, pós-fixadas com tetróxido de ósmio, desidratadas, incluídas em resina Epon 812®, cortadas a 0,25 µm de espessura e coradas com azul de toluidina. Foram analisados o número de fascículos e vasos capilares, a área do nervo e dos vasos, o diâmetro mínimo fascicular, o número e a densidade das fibras mielínicas, o diâmetro mínimo do axônio e da fibra mielínica, a área da bainha de mielina e a razão g. Histogramas de distribuição dos diâmetros mínimos das fibras mielínicas, respectivos axônios e da razão g foram construídos. Comparações entre as amostras proximais e distais e entre as idades foram realizadas. A área do nervo e o diâmetro mínimo fascicular foram maiores no segmento proximal comparado ao distal, em ambas as idades. Os segmentos distais apresentaram maior número de fascículos. Os demais parâmetros morfoquantitativos fo-

ram similares entre os segmentos. Os histogramas de distribuição dos diâmetros diferiram entre as idades. Esses acompanharam o crescimento do animal. Realizamos as primeiras medidas morfoquantitativas, com os métodos descritos aqui, dos nervos mediano e digital próprio lateral do terceiro dedo da pata dianteira. O nervo mediano foi monofascicular no segmento proximal e polifascicular no distal. No segmento proximal desse nervo, a área média foi de 0,13 mm² nos animais com 4 semanas e 0,16 mm² nos animais com 7. No distal essas medidas foram 0,08 mm² e 0,10 mm², respectivamente. Nas duas idades, o número de fibras mielínicas foi aproximadamente 3800 no segmento proximal e 2700 no distal. O nervo digital próprio lateral do terceiro dedo foi monofascicular, com uma área média de 0,005 mm² e 0,008 mm² nos animais com 4 e 7 semanas, respectivamente. O número médio de fibras mielínicas foi de 135 para os animais de 4 semanas e 162 para os de 7. No presente estudo, registramos a normalidade de parâmetros morfoquantitativos de nervos do plexo braquial de ratos. Estudos de normalidade são referenciais para a comparação com estudos similares e de reação a lesões ou doenças dos nervos, provocadas experimentalmente, com vistas, em última análise, à melhor compreensão da resposta do nervo do homem quando agredido por doença. O presente é o primeiro estudo que sistematiza parâmetros morfométricos dos principais nervos do plexo braquial do rato Wistar.

ANATOMIA MICROSCÓPICA DE NERVOS DO PLEXO LOMBOSSACRAL DE RATOS WISTAR

Carla Adelino Suaid

Orientador: Prof. Dr. Amilton Antunes Barreira

Dissertação de Mestrado apresentada em 06/07/2004

Estudos normativos dos nervos do membro traseiro de ratos são escassos. Sistemáticamente, estão implícitos como grupo controle em estudos das alterações dos principais nervos do plexo lombossacral. Até o momento não há qualquer relato sobre um modelo experimental, que enfoque o conhecimento da normalidade desses nervos. Por tais razões, o presente estudo visa sistematizar os parâmetros morfoquantitativos dos principais ramos do plexo lombossacral – nervo isquiático, tibial, fibular comum, fibular superficial, sural e digital próprio lado medial do 3º dedo, em ratos Wistar; e determinar a solução fixadora mais adequada para os nervos dos membros traseiros. Foram utilizadas ratas da linhagem Wistar, com 4 semanas de idade (N=3) e 7 semanas de idade (N=3). Os espécimes foram colhidos das regiões proximais e distais dos nervos citados acima, com exceção do digital próprio medial do 3º dedo (apenas um espécime), todos do membro traseiro direito. Esses foram fixados com a solução de glutaraldeído a 3% em tampão cacodilato de sódio com diferentes molaridades, pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1%, desidratados em concentrações crescentes de etanol, incluídos em resina Epon 812, cortados em secções transversais semifinas (espessura de 0,25µm) e corados com azul de toluidina. Selecionados as secções com morfologia melhor preservada, processava-se a análise morfométrica através do software KS 400 (Kontron) para obtenção dos

seguintes parâmetros: número de fascículos, área do nervo e dos vasos, diâmetro mínimo fascicular, número e densidade de fibras, diâmetro mínimo das fibras e dos axônios, área de bainha de mielina e razão G. A solução fixadora glutaraldeído a 3% em tampão cacodilato a 0,1M foi a mais adequada para a fixação dos nervos do membro traseiro. Não se observaram diferenças dos parâmetros morfométricos entre os segmentos proximais e distais, com exceção do número de fascículos e do diâmetro mínimo fascicular. Quando comparamos as idades de 4 e 7 semanas de idade evidenciamos uma tendência ao aumento da área fascicular com o aumento da idade do animal e uma conseqüente diminuição da densidade de fibras mielínicas. Nos histogramas de distribuição de frequência do diâmetro mínimo das fibras mielínicas, observamos um aumento do calibre das fibras (distribuição desviada à direita), indicando que o crescimento do nervo acompanha o do animal. Os demais parâmetros foram similares entre as idades. Observamos dados originais dos nervos fibular superficial e digital próprio do lado medial do 3º dedo. Por exemplo, o nervo fibular superficial apresenta fascículo único, com área e diâmetro mínimo fascicular de $0,016 \pm 0,001\text{mm}^2$ e $0,13 \pm 0,003\text{mm}$, respectivamente. O nervo digital próprio lado medial do 3º dedo também apresenta fascículo único, com 123 ± 15 fibras, distribuídas numa área fascicular de $0,006 \pm 0,001\text{mm}^2$. O presente estudo sistematizou parâmetros morfométricos de nervos do plexo lombossacral de ratos Wistar, podendo ser referencial para comparações com estudos experimentais que envolvem regenerações ou alterações patológicas dos nervos periféricos.

OBSERVAÇÕES SOBRE PADRÕES E INDIVIDUALIDADES DE MOVIMENTOS FETAIS ATRAVÉS DE ULTRASONOGRAFIA EM GESTANTES DE BAIXO RISCO

Theodolinda Mestriner Stocche

Orientadora: Profa. Dra Carolina A. R. Funayama

Dissertação de Mestrado apresentada em 13/07/2004

Introdução: A exploração visual em tempo real da atividade fetal intra-uterina teve início na década de 1960, com o advento da ultra-sonografia. Seu uso possibilitou grande progresso nos estudos do desenvolvimento fetal, tanto em condições normais, quanto

em patológicas.

Objetivos: Neste estudo propõem-se: avaliar aspectos do desenvolvimento motor fetal, através de gravações em vídeo cassete de exames regulares de ultrassom de fetos normais, produtos de gravidezes de baixo risco; verificar a presença de individualidade motora e comportamental fetal; descrever e discutir o comportamento dos pais durante a realização dos exames.

Material e Métodos: Foram selecionados seis

fetos de gravidezes de baixo risco, desejadas e espontâneas. Os fetos foram observados regularmente a cada quatro semanas, durante uma hora, a partir da 12ª semana gestacional até o final da gestação. A caracterização dos movimentos e comportamentos fetais foi realizada utilizando-se gravações em videocassete dos exames. Anotaram-se a presença ou ausência dos diversos tipos de movimentos baseando-se nos achados de Prechtl (1989). Foram também anotados os comportamentos individuais dos fetos e o comportamento dos pais durante a realização dos exames. Somente foram incluídos no estudo os fetos que deram origem a crianças com desenvolvimento neuro psico motor e comportamental normal, tendo sido essas crianças acompanhadas até os 8 anos.

Resultados: A análise em grupos de movimentos por períodos mostrou que alguns tipos de movimentos apresentaram maior frequência no início da gestação, dentre eles, os choques, movimentos generalizados e movimentos do tronco. Outros tipos de movimentos permaneceram com frequência estável, enquanto outros aumentaram sua frequência. Outros tipos de movimentos como cambalhota e pedalar ocorreram somente entre 16ª e 28ª semanas. Em análise transver-

sal dos diversos tipos de movimentos, pode-se concluir que no período próximo à 20ª semana gestacional ocorreu maior frequência de movimentos, seguido de diminuição dos movimentos fetais até o término da gestação. Quanto aos movimentos complexos, de maneira geral, foram pouco frequentes no início da gestação, aumentando da 20ª semana em diante (movimentos respiratórios, deglutição e sucção). Estas características comuns sugerem um padrão de desenvolvimento motor. Apesar de os fetos apresentarem um padrão motor geral, ocorreram variações individuais.

Conclusões: Existe um padrão motor determinado pelo aparecimento e desaparecimento dos diversos tipos de movimentos, conforme a idade pós-menstrual. O comportamento motor fetal apresentou variações individuais que sugerem individualidade. Existem semelhanças de comportamento entre as mães e entre os pais. Contudo, o comportamento dos pais apresenta características distintas do paterno. Os homens, mais silenciosos e preocupados com o bem-estar dos fetos e esposas, e as gestantes, reconhecendo e identificando características de seus futuros filhos. Todas as crianças apresentaram desenvolvimento neurológico e motor normal avaliados até oito anos de idade.

APLICAÇÃO DAS ESCALAS BAYLEY DE DESENVOLVIMENTO INFANTIL II PARA AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO EM CRIANÇAS COM CARÊNCIA NUTRICIONAL

Andréa Frizo de Carvalho Barbosa

Orientadora: Profa. Dra. Carolina Araújo R. Funayama
Dissertação de Mestrado apresentada em 19/07/2004

Carências nutricionais são ocorrências comuns em grande proporção de crianças do mundo e reconhecidamente um dos grandes problemas da saúde pública brasileira. Alguns estudos têm relatado que os escores mental e motor de crianças com carências nutricionais são mais baixos do que aqueles obtidos pelas crianças sem carências. As Escalas Bayley, publicadas pela primeira vez em 1969 e revisadas em 1993, constituem-se em instrumento adequado para a avaliação de crianças de um a quarenta e dois meses de idade, e são amplamente utilizadas em estudos que avaliam efeitos de carências nutricionais. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi verificar a aplicabilidade da Escala de Avaliação do Comportamento Infantil (BRS), uma das três escalas que constituem as Escalas Bayley, na avaliação de crianças de creche

com carência nutricional. A amostra foi constituída por 50 crianças de ambos os sexos, com idades que variaram entre 7 e 41 meses, provenientes de duas creches filantrópicas do município de Ribeirão Preto – SP. Um grupo de 23 crianças com deficiência proteico-calórica ou de ferro, consideradas de leve a moderada, segundo o Z-score < +1, proposto pela OMS e níveis de hemoglobina acima de 8 mg/dL, foi comparado a outro de 27 crianças sem estas deficiências. Através da avaliação do comportamento foram obtidos índices referentes ao comportamento geral, o controle emocional, a atenção/exitabilidade, a orientação/engajamento e a qualidade motora das crianças. Tais índices são apresentados em forma de percentil, sendo possível, segundo Bayley (1993), a classificação em: comportamento dentro dos limites normais (índice \geq percentil 26), ou seja, esperado para sua idade; comportamento questionável (índice entre o percentil 11 e o 25), que sugere possível prejuízo e merece maior investigação; e comportamento não-ótimo (índice \leq percentil 10), que evidencia atraso ou prejuízo em uma ou mais áreas

as importantes. Os resultados obtidos revelaram que o grupo controle era de maior faixa etária (30 meses) que o grupo carente nutricional (23 meses), e que as crianças do grupo controle apresentavam um comportamento geral frente a situação de teste melhor que do que as crianças do grupo carente nutricional ($p=0.03$), principalmente no fator Orientação/Engajamento ($p=0.01$): Afeto positivo ($p=0.03$), Energia ($p=0.005$), Entusiasmo acerca das tarefas ($p=0.04$), Engajamento social ($p=0.03$); e nos itens Afeto negativo ($p=0.04$) e Movimento lento e atrasado ($p=0.005$). Estes resultados são consistentes com aqueles já apresentados na literatura, nos quais as crianças com carências nutri-

cionais são descritas como menos ativas, mais inibidas e tímidas, menos responsivas, atentas, vocalizando e movimentando-se menos. Concluiu-se que os itens relacionados à avaliação comportamental, aplicados e cotados como proposto originalmente, foram sensíveis para diferenciar grupos com e sem alterações nutricionais leves ou moderadas, embora as Escalas Bayley do Desenvolvimento Infantil requeiram ainda adaptação às condições sociais e culturais brasileiras. Tais resultados sugerem ainda que esta escala pode ser útil em outras condições clínicas, assim como para a avaliação do desempenho de grupos pós procedimentos de recuperação nutricional.

AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO MENTAL E PSICOMOTOR DE CRIANÇAS DE CRECHE COM CARÊNCIAS NUTRICIONAIS

Patrícia de Souza Almeida

Orientadora: Profa. Dra. Carolina A. R. Funayama
Dissertação de Mestrado apresentada em 21/07/2004

O desenvolvimento infantil tem sido considerado como um processo, que envolve modificabilidade, transformação e interação com o ambiente social. A trajetória desse desenvolvimento, mesmo antes do nascimento, pode ser exposta a múltiplos e contínuos eventos adversos, os fatores de risco, que podem e, normalmente, ocorrem em conjunto, potencializando a gravidade das suas conseqüências.

Entre os fatores de risco mais estudados, estão as carências nutricionais, enfoque do presente estudo, cujos objetivos foram: 1- avaliar o desenvolvimento mental e psicomotor de crianças com carências nutricionais, através das Escalas Bayley de Desenvolvimento Infantil; 2- verificar se existe relação entre os resultados nas escalas mental e psicomotora das Escalas Bayley, com alguns fatores potenciais de risco ao desenvolvimento infantil.

A amostra foi constituída por 59 crianças de ambos os sexos, com faixa etária entre 4 e 42 meses, que freqüentavam duas creches do município de Ribeirão Preto. Foram realizadas entrevistas individuais com os pais ou responsáveis e as crianças foram submetidas às avaliações clínico-nutricional, hematológica, e do desenvolvimento infantil, utilizando-se as Escalas Bayley de Desenvolvimento Infantil - Segunda Edição. De acordo com a avaliação clínico-nutricional e hematológica as crianças foram distribuídas em dois grupos: Controle e Carente Nutricional, segundo o

z-escore proposto pela Organização Mundial de Saúde e níveis sanguíneos de hemoglobina.

A análise dos dados mostrou que desnutrição e anemia ferropriva são ocorrências comuns para uma grande proporção (46%) destas crianças. A análise estatística demonstrou não haver diferença significativa entre os índices médios dos dois grupos, tanto na avaliação do desenvolvimento mental, quanto psicomotor. Os valores médios do Índice de Desenvolvimento Mental (IDM) e Índice de Desenvolvimento Psicomotor (IDP), de ambos os grupos, encontraram-se na classificação de desenvolvimento normal. No entanto, em ambos os grupos, metade das crianças apresentou desempenho prejudicado na avaliação mental e, cerca de um terço, também mostrou prejuízo na avaliação psicomotora. Entre os antecedentes selecionados para análise (escolaridade do pai e da mãe; número de habitantes na casa; número de filhos; ordem de nascimento da criança; idade da mãe na época da gestação; problemas durante a gestação; condições alimentares da mãe durante a gestação; duração do período de amamentação; condições alimentares da criança em sua residência; condições de saúde da criança), as crianças cujos pais tinham maior nível de escolaridade, apresentaram valores de IDM maiores. O fator escolaridade pode estar relacionado à maior estimulação ambiental, ao maior acesso à informação, gerando também melhores cuidados oferecidos às crianças.

Os dados obtidos, no presente estudo, sugerem que nutrição e ambiente estão em interação, sendo que os prováveis efeitos do insulto nutricional são dependentes do contexto sócio-ambiental em que ocor-

rem. Além disso, demonstram que vários fatores ambientais e sócio-econômicos podem, por si só, levar a prejuízos no desenvolvimento infantil. Tais fatores, as-

sociados a alguma carência nutricional, podem se mostrar poderosos confundidores dos resultados na avaliação do desenvolvimento infantil.

POTENCIAS EVOCADOS AUDITIVOS DE MÉDIA LATÊNCIA, ESTUDO PARA DIFERENTES NÍVEIS DE INTENSIDADE SONORA COM ESTÍMULO TONE-BURST EM CRIANÇAS DE 10 A 13 ANOS DE IDADE

Ana Claudia Figueiredo Frizzo

Orientadora: Profa.Dra Carolina Araujo R. Funayama
Dissertação Mestrado apresentada em 23/07/2004

Introdução: A captação e o estudo de respostas cerebrais evocadas por um estímulo sonoro vem permitindo a investigação objetiva do processamento da informação auditiva e uma melhor compreensão da via auditiva central. A utilidade deste método diagnóstico tem sido cada vez mais valorizada pelos audiologistas, no entanto sua aplicação clínica corrente requer a realização de uma quantidade mais expressiva de estudos, especialmente na literatura nacional, para um conhecimento mais profundo deste método, sobretudo quanto a normatizações, critérios de identificação das ondas e interferências de variáveis como idade, sexo e parâmetros utilizados na aquisição. Os Potenciais Evocados Auditivos de Média Latência são compostos por uma seqüência de ondas com latências em torno de 10 a 80ms, com origem neurogênica múltipla (projeções tálamo-corticais e córtex auditivo, colículo inferior e formação reticular em menor escala). O presente estudo tem como objetivo pesquisar os componentes dos PEAMLs, numa população de crianças saudáveis, estudando a latência e amplitude das ondas, a fim de conhecer as características dos PEAMLs para esta faixa etária.

Metodologia: Participaram do estudo 32 crianças de ambos os sexos com idade entre 10 e 13 anos, otologicamente normais e sem histórias neurológicas. A análise estatística incluiu a realização da estatística descritiva (média e desvio-padrão) e análise da variância pelo teste *F*. Os PEAMLs foram pesquisados utilizando como estímulo *tone-burst*, nas

intensidades de 50, 60 e 70 dBNA.

Resultados e conclusão: Os valores médios de latência dos componentes foram Na=20,79ms, Pa=35,34ms, Nb=43,27ms e Pb=53,36ms. Para a amplitude Na-Pa os valores médios obtidos no estudo variaram entre 0,2 e 1,9mV (M=1,0mV). As formas de onda Na-Pa constituíram os componentes mais consistentes e mais facilmente identificáveis. Pode-se concluir que a amplitude aumenta e a latência diminui com o aumento da intensidade sonora. Na intensidade de 50dBNA as latências obtidas são significativamente maiores que as intensidades de 60 e 70 dBNA para a onda Na. A partir de 60dBNA os valores se estabilizam e não há mudanças significativas na latência ou morfologia da onda. Nas comparações inter e intra-individual foram observadas latências mais longas e amplitudes menores para o lado E (A1/Cz). Numa análise posterior dos dados segundo queixa de dificuldade escolar não foram observadas diferenças ao nível de significância para os componentes Na, Pa, Nb e Pb para os grupos de crianças com e sem queixa de dificuldades escolares. Nestas crianças foram observadas anormalidades na morfologia das ondas, as quais não foram atribuídas exclusivamente à queixa de dificuldade escolar, já que poderia haver também interferência da idade do sujeito avaliado e do neuro-desenvolvimento do Sistema Nervoso Auditivo Central. O presente estudo possibilitou um melhor conhecimento das características dos PEAMLs, o que contribuirá para a aplicação mais segura da técnica. Porém, outros estudos ainda se fazem necessários, principalmente na literatura nacional, a fim de estabelecer padrões normativos para o uso na rotina clínica.

RESSONÂNCIA MAGNÉTICA POR DIFUSÃO NA NEUROCISTICERCOSE

Paulo Samandar Jalali

Orientador: Prof.Dr. Osvaldo Massaiti Takayanagui
Dissertação de Mestrado apresentada em 19/08/2004

A neurocisticercose (NCC) é a doença parasitária mais freqüente do sistema nervoso central. A despeito de sua alta prevalência, o seu diagnóstico con-

tinua problemático. As manifestações clínicas são inespecíficas, os achados de neuroimagem são variados e os exames imunológicos no sangue e no líquido cefalorraquidiano (LCR) apresentam baixa sensibilidade e especificidade. Nesse presente trabalho, procurou-se estudar o comportamento do sinal das lesões cisticercóticas nas imagens ponderadas por difusão e calcular seus coeficientes de difusão aparente (CDA) com o intuito de definir um padrão capaz de contribuir no diagnóstico diferencial da NCC. Através de estudo prospectivo envolvendo 26 pacientes consecutivos, foram analisadas 62 lesões cisticercóticas, sendo 13 vesiculares, 45 coloidais e 4 granulares. Cin-

qüenta e seis (96,5%) das lesões císticas analisadas apresentaram sinal com intensidade igual ou discretamente superior ao LCR nas imagens ponderadas por difusão e hipersinal em relação ao parênquima nas imagens de CDA. O valor do CDA das lesões císticas foi de $2,45 \pm 0,60 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$, variando entre 1,14 e $3,86 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$. Abscessos e cistos epidermóides evidenciam comportamento de sinal similar às lesões cisticercóticas nas imagens convencionais e não podem ser diferenciados. No entanto, o padrão de sinal na difusão e no mapa de CDA, assim como o valor do CDA das lesões císticas cisticercóticas obtidos neste estudo permitem tal diferenciação.

ESTUDO QUANTITATIVO DAS CONTRATURAS MUSCULARES E AVALIAÇÃO FUNCIONAL NAS MIOPATIAS

Patricia de Sá Barros

Orientadora: Profa.Dra. Cláudia Ferreira da Rosa Sobreira

Dissertação de Mestrado apresentada em 15/09/2004

As miopatias resultam da disfunção de qualquer dos constituintes do músculo esquelético levando ao aparecimento de várias complicações incapacitantes. Uma dessas complicações é a contratura muscular que leva a deformidades e limitações funcionais. Estudos de quantificação do padrão das contraturas musculares nas diversas miopatias são escassos. O objetivo deste trabalho é quantificar o padrão das contraturas musculares em diversas miopatias e correlacionar a gravidade funcional e distribuição das articulações acometidas em cada uma das doenças estudadas. A mensuração da amplitude dos movimentos das articulações do ombro, cotovelo, rádio-ulnar, punho, quadril, joelho, tornozelo, coluna cervical e lombar foi realizada em 105 pacientes com diagnóstico clínico de miopatia. A distrofia muscular de Duchenne foi a miopatia com maior número de articulações acometidas pelas contraturas. Com relação à gravidade do comprometimento articular, os movimentos distais nos membros inferiores foram mais gravemente afetados em todas as doenças estudadas. Entretanto, em termos de frequência o acometimento dos movimentos proximais e distais foram semelhantes tanto nos membros superiores quanto inferiores na maioria dos grupos estudados. O presente é o primeiro estudo que

realizou a mensuração da amplitude do movimento articular em pacientes com doença mitocondrial. As correlações analisadas no estudo demonstraram uma relação significativa entre a gravidade de acometimento articular e grau funcional pelas escalas de Vignos & Archibald e de Vignos & Archibald modificada por Brooke. Nos grupos de pacientes com distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, distrofia muscular de cinturas, foram verificadas tais correlações em várias articulações. Já nos grupos de pacientes com distrofia facioescapuloumeral e doença mitocondrial não houve correlação entre a gravidade de acometimento articular e o grau funcional segundo as escalas de Vignos & Archibald e Vignos & Archibald modificada por Brooke. No grupo de pacientes com distrofia miotônica foi demonstrada uma correlação significativa entre a gravidade das contraturas na coluna lombar e o grau funcional segundo a escala de Vignos & Archibald. As contraturas nos membros superiores, inferiores e axiais podem comprometer de forma importante as atividades básicas de vida diária tais como vestir-se, pentear-se, comer e desempenhar tarefas motoras finas tornando a vida desses pacientes mais dependentes e incapacitantes. Estudos clínicos com ênfase na avaliação da amplitude de movimento de pacientes com diagnóstico de miopatia é fundamental e de extrema importância para os profissionais de saúde e para os pacientes acometidos, pois conhecendo melhor o comportamento das contraturas podemos preveni-las ou ameniza-las e proporcionar uma melhor qualidade de vida para esses pacientes.

ESTUDO SOBRE O ESTADO CLÍNICO NEUROFUNCIONAL E O ATENDIMENTO FISIOTERAPÊUTICO DE CRIANÇAS COM PARALISIA CEREBRAL

Emília Gomes Penedo Leme

Orientadora: Profa. Dra. Carolina Araújo R. Funayama
Dissertação de Mestrado apresentada em 20/09/2004

A compreensão sobre o desenvolvimento funcional e da atividade reflexa na criança com paralisia cerebral constitui importante substrato para as estratégias de atuação nas áreas de habilitação ou reabilitação. Neste trabalho, foram abordados conceito, etiologia, classificação e incidência da paralisia cerebral e sobre o conceito Bobath de tratamento e algumas noções de alguns outros métodos. O objetivo foi verificar alguns aspectos semiológicos neurofuncionais de crianças com Paralisia Cerebral atendidas em um hospital público e fazer uma análise crítica sobre os resultados da avaliação das condições motoras e as informações referentes ao atendimento fisioterapêutico, tais como: número de sessões; período de intervenção; período sem intervenção; participação da família no processo.

Foram avaliadas aleatoriamente crianças com paralisia cerebral com diagnóstico já estabelecido, por período superior a seis meses, em atendimento no ambulatório de Neurologia Infantil do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Após serem avaliadas, as crianças foram separadas por faixa etária para análise dos resultados.

Foi aplicado um protocolo de investigação clínica, cujo procedimento é baseado na Avaliação Físico/Funcional e de Reflexos Posturais que incluiu os seguintes itens: Observação livre, postura sustentação e controle da cabeça, função e uso dos membros superiores, mudança de decúbito, passar de deitado para a posição sentado, equilibrar sentado, reação extensora e protetora dos braços com a criança sentada, passar de sentado para a posição de 4 apoios, engatinhar, levantar-se do chão, equilibrar em pé e andar. O reflexo tônico cervical simétrico, reflexo tônico cervical assimétrico, reflexo de Landau e a reação extensora e protetora dos braços – paraquedas, com técnicas segundo vários autores.

Para verificar o desenvolvimento postural - físico/funcional em crianças com paralisia cerebral, foram considerados os parâmetros de normalidade.

Foram incluídas 31 crianças com idade no atendimento entre 9 e 66 meses, e em todas, exceto uma, a agressão cerebral ocorreu no período pré ou perinatal.

Houve predomínio do grupo tetraespástico, sendo 17 entre as 31 crianças avaliadas.

Todos os itens avaliados apresentaram importante comprometimento, sendo observado em apenas uma criança sinais de boa evolução. Na avaliação da motricidade, apenas 11 entre as 31 crianças apresentaram bom controle de cabeça, e somente 15 conseguiram usar as mãos para apanhar objetos. Nenhuma conseguiu levantar-se sozinha sem apoio e 5 se levantaram com ajuda do chão. Somente uma entre as 31 crianças avaliadas, conseguiu equilibrar sozinha em pé e caminhar livremente.

Na presente casuística, o reflexo tônico cervical simétrico estava presente em 3 crianças com mais de 30 meses, e o reflexo tônico cervical assimétrico estava presente (completo) em 5 entre as crianças do grupo tetraespástico e esteve presente apenas nesse grupo.

O reflexo de paraquedas apresentou resposta adequada em 7 entre as 31 crianças, e reduzida em três. Vinte e uma crianças não apresentaram a reação.

Considerando-se o período de assistência fisioterapêutica e que 30 entre as 31 crianças traziam seqüelas de problemas pré ou perinatais, foi observado que este período não correspondeu ao esperado. A maioria das famílias procurou tratamento fisioterapêutico há pouco tempo em relação à idade das crianças, com períodos longos sem intervenção.

Concluiu-se que as crianças com seqüelas graves apresentaram pouca evolução justamente na idade em que precisariam ter as melhores oportunidades para se desenvolver e que a participação da família durante todo o processo de tratamento não foi efetiva.

Foram feitas algumas sugestões para se tentar minimizar essa condição.

MIGRÂNEA NO IDOSO

Katia Maria Martins

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo Speciali
Dissertação de Mestrado apresentada em 20/10/2004

Os objetivos deste trabalho foram os de comparar os sintomas da crise migranosa em pacientes idosos (60-70 anos) com os que ocorrem em paciente

jovens (20-40 anos) e verificar se nos idosos as crises preenchem os critérios estabelecidos pela Sociedade Internacional de Cefaléia. Foram analisados de forma retrospectiva no período de janeiro de 1995 a dezembro de 2000, 144 prontuários de pacientes entre 60-70 anos (média de 63,4 anos) do Ambulatório de Cefaléia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, e aplicado o protocolo deste serviço. Foram aplicados os critérios diagnósticos da sociedade internacional de cefaléia – 1988. O grupo controle foi constituído do mesmo ambulatório, no mesmo período e idade entre 20-40 anos (média de 32,6anos). Foram avaliados 127 prontuários escolhidos de maneira aleatória. Os critérios de inclusão e exclusão foram idênticos nos grupos. Foram selecionados 36 pacientes (31 mulheres e 5 homens) no grupo de idosos e 37 pacientes (31 mulheres e 6 homens) no grupo de jovens. A proporção de mulheres e homens foi de 6:1, na nossa casuística. Foram anali-

sadas as características clínicas da migrânea com e sem aura nos dois grupos, nos seguintes aspectos: características; instalação; lateralização; topografia; qualidade; sintomas premonitórios; aura; sintomas neurológicos associados; localização temporal dos sintomas neurológicos; sintomas acompanhantes; fatores desencadeantes; fatores de melhora. Os itens estudados foram pareados e analisados. Para análise dos resultados foram utilizados o teste de probabilidade de Fischer e o teste do qui-quadrado. Todos os cálculos foram realizados com software SPSS 10.0 e o nível de significância foi de 0.05 em teste bicaudal. Pelo estudo concluiu-se que a migrânea no idoso é semelhante à do jovem e que os critérios da SIC são válidos quando aplicados aos idosos. A localização bilateral da dor foi mais freqüente (p 0.004) nos idosos. Manifestações de: palidez (p 0.0441); boca seca (p 0.0093) e anorexia (p 0.05) foram mais freqüentes nos idosos.

PATOLOGIA EXPERIMENTAL

DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR PARVOVÍRUS B19 POR MÉTODO HISTOLÓGICO, IMUNO-HISTOQUÍMICO E PCR EM TECIDOS FIXADOS EM FORMOL E INCLUÍDOS EM PARAFINA

Paulo Roberto Veiga Quemelo

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cesar Peres

Dissertação de Mestrado apresentada em 25/08/2004

O parvovírus B19 foi detectado em 1975, desde a sua descoberta ele tem se mostrado um agente infeccioso importante em seres humanos, principalmente quando surge durante a gestação, podendo levar ao comprometimento fetal. O diagnóstico da infecção pode ser feito em cortes histológicos corados pela hematoxilina e eosina (HE) de tecidos fetais ou placentários que contenham células eritróides com inclusões nucleares vermelho-tijolo. No entanto, estas células podem ser escassas ou não se apresentarem com as características típicas, dificultando o diagnóstico. Por outro lado, a confirmação específica pode ser feita com métodos mais seguros, como a Imuno-Histoquímica (IH) e a Reação em Cadeia de Polime-

rase (PCR). Entretanto, estas técnicas são mais dispendiosas. Este trabalho teve como objetivos verificar a freqüência do parvovírus B19, analisar qual método é mais sensível para a sua detecção e padronizar uma técnica que possa ser utilizada rotineiramente para o seu diagnóstico em material fixado em formol e incluídos em parafina. Foram analisados as placentas e órgãos fetais de 34 casos de hidropisia fetal ou edema placentário. Em dois casos (5,9%) houve positividade na placenta pela IH, PCR e análise histopatológica em cortes corados pela HE. No entanto, a PCR dos órgãos fetais foi negativa em um destes casos enquanto que a identificação pôde ser feita por IH e histologia. Em conclusão, o método diagnóstico que apresentou os melhores resultados foi a IH, pois ela garante uma identificação mais específica e segura, permitindo a identificação citoplasmática, o que não é possível pelo exame histopatológico e ainda revela

maior número de células positivas. A PCR pode apresentar falsa negatividade, provavelmente determinada pela fixação em formalina, não permite a identificação das características histológicas e células envol-

vidas, além de ser mais dispendiosa. Nesta casuística, o método histológico, utilizado por uma pessoa adequadamente treinada, foi eficiente para identificação dos casos positivos em material fixado em formalina.

HIPERPLASIA INTIMAL ARTERIAL DECORRENTE DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE ESTENOSE AÓRTICA INTRÍNSECA: ESTUDO MORFOLÓGICO, MORFOMÉTRICO E ULTRAESTRUTURAL

Cristina Tonin Beneli

Orientadora: Profa. Dra. Simone Gusmão Ramos
Dissertação de Mestrado apresentada em 24/09/2004

Reproduzimos um modelo *in vivo* de estenose de aorta a fim de compreender o desenvolvimento da lesão vascular em torno da obstrução, sacrificando os animais nos dias: 1, 7, 15 e 30 dias após a cirurgia. Estudamos a lesão observada através de estudo morfológico e morfométrico com microscopia óptica de alta resolução e ultraestrutural através de microscopia eletrônica de transmissão e varredura.

Neste estudo, vimos que a inserção de um pino acrílico no orifício da artéria renal esquerda gera um turbilhonamento sanguíneo e conseqüente lesão vascular, provocando desnudamento endotelial e rompimento da lâmina elástica interna, gerando intensa agregação plaquetária e desenvolvimento de um trombo. O trombo forma-se em torno do pino, sendo mais proeminente nas 24 horas após a cirurgia e, em seguida, apresenta lise parcial, fracionando-se numa porção proximal e outra distal. Assume então, forma triangular mais nítida na região distal (respeitando o vórtice formado pelo fluxo sanguíneo em decorrência da obstrução) e com 7 dias mostra sinais de organização. Simultaneamente, há migração de células musculares lisas da camada média subjacente e reendotelização, apresentando-se com 30 dias, completamente incorporado à parede arterial. A composição desta hiperplasia intimal é quase exclusivamente de células musculares lisas envoltas numa matrix extracelular

que se mostrava mais compacta com o decorrer do experimento.

Análises ultraestruturais confirmaram a modificação fenotípica das células musculares lisas subjacentes para um subtipo sintético e sua passagem pela lâmina elástica interna, migrando para constituir a principal célula da hiperplasia intimal neste modelo experimental. A participação de macrófagos no desenvolvimento desta hiperplasia foi mínima, estando diretamente relacionada à reabsorção de restos trombóticos, quando ainda observamos alguns raros macrófagos xantomatosos. Por outro lado, a permanência de um espessamento intimal onde antes tínhamos um trombo parece estar relacionada à participação de fenômenos diferentes dos iniciais decorrentes da lesão vascular. A análise do revestimento endotelial com microscopia eletrônica de varredura mostrou células endoteliais nas regiões próximas ao pino desorientadas em relação ao fluxo lamina, especialmente na região pós-estenótica. Estas alterações decorrem da formação de áreas de recirculação e estase geradas pela obstrução, concorrendo para modificações no estresse por cisalhamento (WSS – wall shear stress), fundamental na manutenção da homeostase vascular, assumindo então um papel relevante na manutenção do espessamento intimal. Este trabalho retoma a idéia inicial de Rokitansky em 1852 que espessamentos intimaais arteriais poderiam ser decorrentes de trombos arteriais não completamente resolvidos e que estas alterações poderiam servir de leito ideal para a formação de lesões ateroscleróticas.

ESTUDO IMUNISTOQUÍMICO DE EVENTUAIS MEDIADORES E EFETORES ENVOLVIDOS NA HIPERPLASIA INTIMAL ARTERIAL OBSERVADA EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE ESTENOSE AÓRTICA

Priscila Freitas Barbosa

Orientadora: Profa. Dra. Simone Gusmão Ramos
Dissertação de Mestrado apresentada em 04/10/2004

Reproduzimos um modelo *in vivo* de estenose de aorta a fim de compreender o desenvolvimento da lesão vascular em torno da obstrução, sacrificando os

animais nos dias: 1, 7, 15 e 30 dias após a cirurgia. Estudamos a lesão observada através de estudo morfológico e imunoistoquímico do material emblocado em parafina.

Neste estudo, vimos que a inserção de um pino acrílico no orifício da artéria renal esquerda gera um turbilhonamento sanguíneo e conseqüente lesão vascular, levando a uma intensa agregação plaquetária e desenvolvimento de um trombo. O trombo forma-se em torno do pino, sendo mais proeminente nas 24 horas após a cirurgia e, em seguida, apresenta lise parcial, fracionando-se numa porção proximal e outra distal. Assume então, forma triangular mais nítida na região distal (respeitando o vórtice formado pelo fluxo sanguíneo em decorrência da obstrução) e com 7 dias mostra sinais de organização. Simultaneamente, há migração de células musculares lisas da camada média subjacente e reendotelização, apresentando-se com 30 dias, completamente incorporado à parede arterial. A composição deste espessamento intimal é quase exclusivamente de células musculares lisas, comprovado imunoistoquimicamente, envoltas numa matrix extracelular que se mostra mais compacta com o decorrer do experimento.

O PDGF (platelet-derived growth factor) e o fibrinogênio, com marcação positiva em grande quantidade nos componentes do trombo e na parede arterial adjacente, parecem ter um papel relevante na migra-

ção de células musculares lisas da camada média subjacente. Além destes, observamos a participação notória da iNOS (óxido nítrico sintase induzível), expressa de forma proeminente no endotélio remanescente, nas células musculares lisas da camada média e em algumas células do espessamento intimal. Esta marcação foi diretamente relacionada à do peroxinitrito e da atividade proliferativa nas células musculares lisas observada na camada média através de um marcador específico (PCNA - *proliferating cell nuclear antigen*). Durante todo o nosso experimento, macrófagos xantomatosos e linfócitos não foram expressivos nem no desenvolvimento nem na composição final (até 30 dias) da hiperplasia intimal e a expressão de MCP-1 foi discreta, observada apenas nas células endotelias próximas à lesão.

A literatura pertinente tem relatado a associação entre a produção destes mediadores e lesões intimais proliferativas. Entretanto, o exato papel desta modulação ainda não está completamente esclarecido. Além da comprovação efetiva da participação de mediadores inflamatórios no desenvolvimento e manutenção desta lesão, este trabalho retoma a idéia inicial de Rokitsky em 1852 que espessamentos intimais arteriais podem ser decorrentes de trombos arteriais não completamente resolvidos e que estas alterações poderiam servir de leito ideal para a formação de lesões ateroscleróticas.

SAÚDE NA COMUNIDADE

USO PROBLEMÁTICO DE ÁLCOOL ENTRE PACIENTES PSIQUIÁTRICOS AMBULATORIAIS

Clarissa Mendonça

Orientador: Prof. Dr. Milton Roberto Laprega

Dissertação de Mestrado apresentada em 23/11/2004

O uso problemático de álcool tem sido apontado como problema de saúde pública. A prevalência de dependência de álcool é maior em pessoas com transtornos psiquiátricos. Esta comorbidade pode trazer sérias implicações para a identificação, tratamento e reabilitação do indivíduo doente. O presente estudo

teve como objetivo identificar o uso problemático de álcool em pacientes com transtornos psiquiátricos, a partir da realidade clínica assistencial terciária de um serviço universitário. Foi realizado um estudo transversal, com uma amostra clínica ambulatorial composta por 127 indivíduos em tratamento por um dos seguintes diagnósticos: esquizofrenia, transtorno afetivo bipolar, depressão e transtornos de ansiedade. Os dados foram colhidos através de entrevista com o paciente e também através do prontuário. As informações

coletadas foram: dados sócio-demográficos, história psiquiátrica, problemas de saúde, características familiares e registros do prontuário relacionados ao diagnóstico do paciente e ao consumo de álcool. Foi aplicado o instrumento de rastreamento CAGE e realizada a entrevista estruturada em conformidade com os diagnósticos da CID-10 para uso nocivo e dependência de álcool. A fim de aumentar a sensibilidade do CAGE, trabalhou-se com o ponto de corte ≥ 1 . Da amostra total, 6,3% fazem uso nocivo de álcool e 3,9% são dependentes, de acordo com os critérios da CID-10. Quarenta e três pessoas (33,9%) pontuaram positivo no CAGE, o que indica a possibilidade de uso problemático de álcool em algum momento de suas vidas. Os fatores sócio-demográficos que mostraram relação com o uso problemático de álcool foram: ser

homem, ter menos de 40 anos de idade, não ter companheiro(a) e não ser praticante de religião. Ao se comparar médias de escore no CAGE, entre os quatro grupos diagnósticos estudados, encontrou-se que a maior média foi a do grupo de esquizofrenia, seguida pelo de transtornos ansiosos, transtorno afetivo bipolar e, por último, depressão. Foi encontrada uma relação entre pontuação no CAGE e idade de início da enfermidade. Entre os pacientes que pontuaram positivo no CAGE, 65% não tinham registros, em seus prontuários, de uso de álcool. Sugere-se a disseminação de informações a respeito da comorbidade entre transtornos psiquiátricos e uso problemático de álcool na formação de profissionais de saúde, assim como treinamento para uso de instrumentos de rastreamento do uso problemático de álcool.

CONSUMO ALIMENTAR DE ALUNOS NAS ESCOLAS DE ENSINO FUNDAMENTAL EM RIBEIRÃO PRETO (SP)

Mariana de Senzi Zancul

Orientador: Prof. Dr. Amaury Lelis Dal Fabbro

Dissertação de Mestrado apresentada em 14/12/2004

A alimentação e a nutrição ocupam hoje um lugar de destaque no contexto mundial. Deficiências alimentares trazem muitos prejuízos provocando desequilíbrios nutricionais. Os adolescentes são considerados um grupo exposto ao risco nutricional, devido aos seus hábitos alimentares inadequados. Estudos apontam que atividades envolvendo alimentação dentro das escolas são muito importantes, pois podem possibilitar aos adolescentes o desenvolvimento de uma relação mais responsável com a própria saúde. Este trabalho tem como objetivos identificar e analisar comparativamente o consumo alimentar de alunos de 5^a à 8^a séries nas escolas de ensino fundamental das redes municipal, estadual e particular no município de Ribeirão Preto (SP), verificando o que é oferecido como opções pela cantina escolar, avaliando o estado nutricional dos estudantes e discutindo o espaço da escola como alternativa para a educação alimentar. Os estudantes responderam a um questionário sobre seu consumo alimentar na escola, foram pesados e medidos. O programa de software Epi Info 2002 foi usado para a organização dos dados. O questionário foi respondido por 401 alunos, de 5^a à 8^a séries, de ambos os sexos.

Alunos de diferentes escolas apresentaram um padrão de consumo alimentar muito semelhante. De maneira geral, os estudantes não trazem lanche de casa para a escola. Nas escolas municipais e estaduais a maior parte dos alunos come a merenda oferecida pela escola apenas ocasionalmente. Em média, 70% dos respondentes freqüentam as cantinas pelo menos uma vez por semana, e os alimentos mais consumidos nas cantinas das escolas municipais, estaduais e particulares são salgado, refrigerante, suco e bala. A disciplina Ciências foi a mais apontada pelos alunos como aquela na qual os conteúdos sobre alimentação são trabalhados. A classificação do estado nutricional dos estudantes, feita pelos percentis de acordo com o IMC para idade e sexo permitiu verificar que 12,6% dos escolares apresentam sobrepeso e 8,5% apresentam obesidade. Diante do que foi observado no estudo, considera-se que, dentro do contexto de vida dos adolescentes, no qual estão presentes diferentes variáveis como sedentarismo, grande apelo ao consumo, forte influência da família, da escola e da mídia, pode exercer um papel fundamental na promoção da educação nutricional, que deve ser abordada pelas diferentes disciplinas e trabalhada em atividades diversificadas, com objetivo de desenvolver atitudes e hábitos saudáveis. A cantina escolar pode constituir-se, também, num espaço de educação nutricional, possibilitando associar teoria e prática.

ESTUDO EVOLUTIVO DAS CRIANÇAS EXPOSTAS AO HIV E NOTIFICADAS PELO NÚCLEO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DO HCFMRP-USP

Adriana Nunes Fernandes da Silva

Orientador: Prof.Dr. Afonso Dinis Costa Passos

Dissertação de Mestrado apresentada em 23/12/2004

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a evolução de crianças nascidas de mães positivas para o HIV ou com AIDS no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, durante o período compreendido entre 1986 e 2001. Foram levantadas informações relativas ao tratamento pré-natal e tratamento da criança ao nascer, assim como à reversão sorológica, soropositividade e sobrevida. Dos 680 participantes, 67 (9,8%) se infectaram, 520 (76,5%) não se infectaram e 93 (13,7%) ficaram sem informação devido ao abandono de seguimento. Tratamento durante a gestação ocorreu em 144 mulheres com o uso de monoterapia (21,2%) e em 77 com a utilização de duas ou mais drogas (11,3%), não tendo se verificado em 459 gestantes (67,5%). Entre os recém nascidos, 205 (30,1%) receberam apenas AZT, 134 (19,7%) foram medicados com AZT+SMX/TMP e 341 (50,1%) não foram tratados.

Ocorreu óbito de 39 crianças (5,7%), com 559 (82,2%) tendo permanecido vivas e 82 (12,0%) cuja informação foi perdida. O percentual de óbito foi consideravelmente mais elevado entre os que não receberam tratamento (9,7%), em relação aos que receberam apenas AZT (2,9%). Não se verificou nenhuma morte entre as 134 crianças tratadas com AZT+SMX/TMP. As proporções de óbitos variaram de acordo com o tempo, atingindo 9,5% no período pré-tratamento (1986/1995) e caindo para 2,7% entre os anos de 1996 e 2001. Entre os 67 indivíduos infectados pelo HIV foram verificadas 22 mortes (33,8%), valor muito superior ao encontrado entre os 520 não infectados, nos quais ocorreram apenas 4 óbitos (0,8%). Os tempos medianos de reversão sorológica foram iguais a 589 dias para os nascidos de 1986 a 1995, e 451 dias, para os que nasceram no período 1996 a 2001. As curvas de sobrevivência demonstraram o evidente favorecimento dos indivíduos que foram submetidos a algum tipo de tratamento, indicando que a intervenção terapêutica trouxe ganhos inquestionáveis para os recém nascidos de gestantes positivas para o HIV ou com AIDS.

RESUMOS DE DISSERTAÇÕES DE MESTRADO E TESES DE DOUTORADO APRESENTADAS NA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - USP DE FEVEREIRO A JUNHO DE 2004

CLÍNICA CIRÚRGICA

FRAÇÃO DE RECUPERAÇÃO DO $^{13}\text{CO}_2$ AR EXPIRADO DE PACIENTES SÉPTICOS SOB VENTILAÇÃO MECÂNICA

Maria Auxiliadora Martins

Orientador: Prof.Dr. Aníbal Basile Filho

Tese de Doutorado apresentada em 30/04/2004

Apesar dos grandes esforços e avanços contínuos para melhorar a sobrevida de pacientes críticos

internados em unidades de terapia intensiva, vítimas de sepse e choque séptico, a taxa de mortalidade desses pacientes encontra-se ainda em níveis extremamente elevados. Além de aspectos hemodinâmicos, infecciosos e de resposta imune, aspectos metabólicos são considerados indicadores relevantes a serem considerados no estabelecimento da sepse. Nesse con-

texto, a administração endovenosa contínua de bicarbonato isotópico ($\text{NaH}^{13}\text{CO}_2$) tem sido sugerida como um instrumento que permite avaliar a fração de retenção orgânica ou de recuperação do $^{13}\text{CO}_2$ no ar expirado. Essa determinação é importante para a correção do cálculo de oxidação de substratos, aminoácidos em particular, devido a interligação entre os níveis de bicarbonato e os processos de oxidação celular. O objetivo desse estudo foi avaliar a fração de recuperação do $^{13}\text{CO}_2$ no ar expirado de pacientes críticos, vítimas de choque séptico em ventilação mecânica a partir da infusão endovenosa contínua de $\text{NaH}^{13}\text{CO}_2$. Nesse estudo foram incluídos prospectivamente 10 pacientes (quatro do sexo masculino e seis do sexo feminino) com diagnóstico de choque séptico entre o 2º e 5º dia de evolução. A idade média variou de $55,1 \pm 19$ anos. O índice prognóstico *APACHE II* médio foi de $25,9 \pm 7,4$ com risco de óbito calculado de $60 \pm 20\%$. O *SS (Sepsis Score)* médio foi de $19,1 \pm 4,2$. O protocolo teve duração média de seis

horas. Inicialmente foi realizada a coleta do CO_2 expirado basal e a calorimetria indireta. Uma dose inicial de 5mL de $\text{NaH}^{13}\text{CO}_2$ foi administrada, seguida de infusão contínua a $5\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$ durante 6 horas. Foram obtidas 6 medidas do VCO_2 (30 min cada), através de um calorímetro portátil acoplado a um respirador e amostras horárias de ar expirado através de sacos coletores de 750ml conectados ao circuito expiratório do respirador. O enriquecimento do $^{13}\text{CO}_2$ no ar expirado foi obtido através do espectrômetro de massa. Os pacientes apresentaram um valor médio de produção de CO_2 de $182 \pm 52 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ durante a fase de equilíbrio. A fração média de recuperação do $^{13}\text{CO}_2$ no ar expirado foi de $0,68 \pm 0,06$. Os resultados do presente estudo permitem concluir que a fração de recuperação do $^{13}\text{CO}_2$ em pacientes sépticos não é completa, indicando que ocorre retenção do isótopo no organismo. A gravidade do choque séptico, de acordo com o índice *APACHE II* e *Sepsis Score*, não está associada com a fração de recuperação do $^{13}\text{CO}_2$ no ar expirado.

AZUL DE METILENO NO TRATAMENTO DO CHOQUE ANAFILÁTICO: ESTUDO EXPERIMENTAL *in vivo* DAS ALTERAÇÕES HEMODINÂMICAS E *in vitro* DA REATIVIDADE DO ENDOTÉLIO VASCULAR DA AORTA ABDOMINAL DE COELHOS

Marcelo Augusto da Silva Buzato

Orientador: Prof.Dr. Carlos Eli Piccinato

Dissertação de Mestrado apresentada em 04/05/2004

Tendo como base a experiência clínica inicial com a utilização do azul de metileno (AM) no tratamento do choque anafilático, o presente estudo experimental teve por objetivos: 1) Avaliar experimentalmente *in vivo* a ação do AM em situações de choque anafilático em coelhos, utilizando-se como parâmetro hemodinâmico a pressão arterial média (PAM); 2) Avaliar experimentalmente *in vitro* as alterações do tono vascular dependente do endotélio de aortas abdominais, provocadas pelo choque anafilático em coelhos tratados, ou não, com o AM; 3) Avaliar os efeitos e a segurança da utilização endovenosa do AM; 4) Avaliar os possíveis efeitos do AM sobre a mortalidade em coelhos submetidos a choque anafilático experimental. Os achados fundamentais desta investigação foram: 1) Do ponto de vista hemodinâmico a inje-

ção endovenosa do AM não causou alterações da PAM, quando comparada com o grupo controle, sendo medicação segura na dose empregada; 2) O Composto 48/80 (C48/80) mostrou-se eficaz na produção do choque experimental; 3) A tentativa de prevenção do choque anafilático com o AM apresentou como resultado um prolongamento do tempo de sobrevivência dos animais; 4) O AM foi eficaz na reversão do choque anafilático; 5) O estudo *in vitro* da função endotelial da aorta abdominal dos animais, de um modo geral não revelou disfunção em todos os grupos estudados; 6) Os valores de nitrato plasmático, absolutos e percentuais, não mostraram diferenças nos grupos experimentais. A utilização do AM, nas doses estudadas, mostrou-se segura quer do ponto de vista hemodinâmico (medida da PAM), quer do ponto de vista da função endotelial. O seu efeito pressórico foi mais notado no grupo em que os animais se apresentavam em choque anafilático. Essas constatações confirmam a experiência clínica que demonstra a referida segurança terapêutica do AM.

ALTERAÇÕES COMPATÍVEIS COM O FENÔMENO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO EM RATOS COM OBSTRUÇÃO BILIAR EXTRA-HEPÁTICA SUBMETIDOS À DERIVAÇÃO BÍLIO-DUODENAL

Márcio Augusto Ferreira

Orientador: Prof.Dr. José Sebastião dos Santos
Dissertação Mestrado apresentada em 12/05/2004

As taxas de mortalidade e de morbidade após o tratamento cirúrgico da icterícia obstrutiva ainda são muito elevadas, o que justifica o esforço de melhorar a compreensão de suas causas. O objetivo deste estudo foi investigar alterações compatíveis com o fenômeno de isquemia-reperfusão hepática em ratos com icterícia obstrutiva submetidos à derivação bílio-duodenal. Foram estudados 36 animais divididos em 6 grupos: CO1 -grupo controle avaliado 6 horas após cirurgia simulada; CO2 - grupo controle avaliado 24 horas após cirurgia simulada; OB1 -grupo com icterícia obstrutiva avaliado 6 horas após cirurgia simulada; OB2 -grupo com icterícia obstrutiva avaliado 24 horas após cirurgia simulada; DBD1 -grupo com icterícia obstrutiva avaliado 6 horas após derivação bílio-duodenal; DBD2 -grupo com icterícia obstrutiva avaliado 24 horas após derivação bílio-duodenal. Foram avaliadas a excreção biliar por meio das dosagens séricas de bilirrubinas e da fosfatase alcalina, a lesão celular por meio das dosagens séricas de AST e ALT, o metabolismo energético do fígado por meio da fun-

ção mitocondrial, a atividade inflamatória com dosagens de TNF- α , IL-1, IL-6 e nitrato/nitrito, a peroxidação lipídica pela mensuração de malondialdeído hepático e a lesão do parênquima hepático mediante avaliação histológica. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis e as comparações múltiplas foram feitas pelo teste de Dunn ($p = 0,05$). As bilirrubinas séricas diminuíram após a decompressão biliar enquanto as aminotransferases aumentaram significativamente depois de 6 horas da derivação biliar ($p < 0,01$). O TNF- α dosado na 6^a hora após decompressão foi significativamente maior do que na 24^a hora ($p < 0,05$). O consumo de oxigênio nos estados 3 e 4 permaneceu elevado na fase inicial da decompressão biliar e a lesão hepatocelular piorou na 24^a hora após decompressão. A IL-1, a IL-6, o nitrato/nitrito e o malondialdeído não se alteraram de forma significativa entre os grupos. Os resultados demonstram que a decompressão biliar cirúrgica na icterícia obstrutiva se acompanha de alterações bioquímicas, metabólicas e histológicas compatíveis com o fenômeno de isquemia e reperfusão hepática e abrem perspectivas para ampliar a compreensão da fisiopatologia e do tratamento das complicações pós-operatórias precoces na icterícia obstrutiva.

MODELO EXPERIMENTAL DE OBSTRUÇÃO PARCIAL DA URETRA DISTAL EM RATAS

Marco Antônio Gonçalves

Orientador: Prof.Dr. Haylton Jorge Suaid
Dissertação de Mestrado apresentada em 14/05/2004

Introdução: A obstrução parcial da uretra é um meio utilizado para produzir disfunções vesicais em animais e leva a 3 respostas sequenciais na bexiga: hipertrofia, compensação e descompensação. O objetivo desse estudo foi desenvolver um novo modelo experimental de obstrução uretral que evitasse danos no colo vesical e na uretra proximal.

Material e métodos: Foram utilizadas 68 ratas da raça Wistar, peso médio de 250 gramas. Os ani-

mais foram distribuídos em dois grupos experimentais no momento inicial M0: Grupo 1 – controle operatório; Grupo 2 – obstrução uretral. No grupo 2 foi realizada a sondagem uretral com 2 cateteres e então produzida a obstrução de moderada intensidade (1,7 mm de calibre) através de uma ligadura ao redor da uretra distal, removendo-se em seguida os cateteres. No momento M1, 2 semanas após a cirurgia, os animais foram avaliados quanto aos seguintes parâmetros: creatinina sérica, cultura de urina e cistometria. Concluídos os registros urodinâmicos, realizou-se cistectomia total. A bexiga foi pesada e preparada para estudo histológico.

Resultados: Não houve variação significativa

nos níveis de creatinina sérica entre os dois grupos. A cultura de urina foi positiva em 61% do grupo com obstrução. No estudo urodinâmico, as ratas obstruídas apresentaram diminuição da pressão detrusora máxima e aumento da capacidade vesical significativos em comparação ao grupo controle, além da presença de resíduo pós-miccional. A obstrução uretral de mode-

rada intensidade produziu aumento do peso da bexiga e induziu mudanças nos parâmetros histológicos.

Conclusões: Esse modelo experimental é apropriado, de fácil execução e fornece dados histológicos e urodinâmicos para o estudo das alterações fisiopatológicas da bexiga em vigência de obstrução uretral.

FARMACOLOGIA

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE VIAS FORMADORAS DE ANGIOTENSINA II EM CARÓTIDAS DE RATOS

Christiane Becari

Orientadora: Profa.Dra. Maria Cristina O. Salgado
Dissertação de Mestrado apresentada em 06/02/2004

Uma atividade funcional para uma via alternativa de geração de angiotensina II, como a elastase-2 foi sugerida em estudos realizados anteriormente em nosso laboratório no leito arterial mesentérico isolado de rato. No presente estudo, caracterizamos com o uso de substratos e inibidores seletivos a presença de via alternativa de geração de Ang II, independente da ECA, em carótida de ratos. Determinamos ainda a expressão do RNA_m da elastase-2 nesta preparação arterial. Em anéis isolados de carótida de ratos analisamos o efeito vasoconstritor dos peptídeos Ang II, Ang I, TDP, [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I (um substrato resistente a ECA) na ausência e presença de inibidores de proteases. Ang II e seus precursores produziram efeito vasoconstritor dependente da concentração em carótidas de ratos, de forma sensível ao losartan (1 µM). Na presença de captopril (10 µM) a resposta vasoconstritora produzida pela Ang I foi inibida, mas a resposta contrátil induzida pelo TDP e

[Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I não foi alterada. Na presença de quimostatina (100 µM) o efeito produzido pelo TDP e [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I foi abolido enquanto que a curva cumulativa de Ang I foi significativamente deslocada para a direita. Inibidor Ac-AAPL-CK (seletivo para elastase-2) aboliu completamente a resposta contrátil induzida pelo PDA e não alterou o efeito vasoconstritor da Ang II. Na presença de captopril e quimostatina a resposta vasoconstritora dos peptídeos Ang I, TDP e [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I foram inibidas, enquanto a resposta contrátil da Ang II não foi alterada em artéria carótida. A presença de RNAm da elastase-2 na carótida, juntamente com os dados funcionais apresentados aqui sugerem a participação desta enzima na via alternativa de geração de Ang II em carótidas de ratos. Embora a formação de Ang II a partir Ang I seja descrita como essencialmente dependente da ECA, nossos resultados sugerem a existência de vias alternativas de geração de Ang II sensível a quimostatina e Ac-AAPL-CK em artéria carótida de ratos. Muito provavelmente a elastase-2 seja a enzima responsável pela geração de Ang II nessa preparação.

GINECOLOGIA E OBSTETRICIA**EFEITO DO IMPLANTE DE ETONOGESTREL SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA DE MULHERES HÍGIDAS****Carolina Sales Vieira Macedo**

Orientador: Prof. Dr. Marcos Felipe Silva de Sá

Dissertação de Mestrado apresentada em 28/06/2004

Introdução: Estudos iniciais sugeriram que o risco para tromboembolismo venoso (TV) era atribuído ao componente estrogênico dos contraceptivos de forma dose-dependente. Estudos epidemiológicos têm sugerido que o risco para TV é maior com contraceptivos combinados que contêm progestagênios de terceira geração (gestodeno, desogestrel) comparados com aqueles com progestagênios de segunda geração (levonorgestrel). Esses achados inesperados têm sido alvo de muitos debates sem uma explicação definitiva. Assim, a questão das diferenças nas propriedades de cada progestagênio sobre a hemostasia tem sido levantada. Apesar dos progestagênios não serem associados a alterações marcantes nos parâmetros hemostáticos, existem poucos estudos sobre os efeitos dessas drogas, especialmente os progestagênios de terceira geração, no sistema hemostático.

Objetivo: Avaliar o efeito do implante subdérmico de etonogestrel sobre a agregação plaquetária de mulheres hígidas, em seis meses de tratamento.

Casuística e Métodos: Vinte e quatro mulheres saudáveis e voluntárias foram selecionadas neste estudo longitudinal e prospectivo, para usar um im-

plante contraceptivo subdérmico de etonogestrel (metabólito biologicamente ativo do desogestrel). A agregação plaquetária foi avaliada em todas as mulheres, exceto uma, no período pré-inserção e após um, três e seis meses da inserção do implante. A agregação plaquetária foi induzida com adrenalina 50 μ M, colágeno 10 μ g/ml, colágeno 5 μ g/ml, ADP 35 μ M e ADP 17,5 μ M. A análise estatística foi feita com o teste de Wilcoxon para comparar a diferença entre cada período de tratamento com os valores pré-tratamento.

Resultados: Houve uma redução transitória, estatisticamente significativa, na mediana do percentual máximo de agregação plaquetária de 27%, 14% e 11%, respectivamente, com colágeno 5 μ g/ml, adrenalina 50 μ M e colágeno 10 μ g/ml, observada um mês após a inserção do implante comparado ao valor pré-inserção ($p < 0,05$). A agregação plaquetária com esses agonistas retornou ao seu valor basal, após seis meses da inserção. Com outros agonistas, como o ADP 35 μ M e ADP 17,5 μ M, não se observou o mesmo fenômeno.

Conclusão: Os resultados deste estudo mostram, pela primeira vez, que o uso do implante de etonogestrel está associado à redução transitória, mas significativa, da agregação plaquetária, observada em um mês de uso do contraceptivo, a qual retorna a seus valores normais em seis meses da inserção do implante.