

## RESUMOS DE DISSERTAÇÕES DE MESTRADO E TESES DE DOUTORADO APRESENTADAS NA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - USP DE OUTUBRO A DEZEMBRO DE 2008

### BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

#### IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES CODIFICANDO MEMBROS DA FAMÍLIA NEPH-RST EM GALLUS GALLUS

**José Eduardo Baroneza**

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Guelerman Pinheiro Ramos  
Dissertação de Mestrado apresentada em 13/10/2008

Proteínas da família das imunoglobulinas têm sido relatadas como fundamentais na regulação de eventos relacionados com a formação de órgãos tanto em invertebrados como em vertebrados. Em *Drosophila melanogaster*, por exemplo, um subgrupo desta família, que inclui as proteínas Roughest (Rst), Kin-of-Irre (Kirre), Sticks-and-stones (Sns) e Hibris (Hbs), é necessário à formação de olho, cérebro, túbulo de malpighi e tecido muscular. Proteínas homologas em vertebrados, Neph1, Neph2, Neph3 e Nefrina participam do processo de filtração da urina nos podócitos e sua falta acarreta em proteinúria, síndrome nefrótica congênita e morte perinatal. Este trabalho teve como objetivos identificar, por meio de análises *in silico*, possíveis membros da família Neph em *Gallus gallus*, isolar os fragmentos genômicos correspondentes e analisar a dinâmica de seu padrão de expressão, tanto temporal como espacial durante o desenvolvimento embrionário e em adultos, contribuindo assim para as análises comparativas da evolução e diversificação estrutural e funcional desta família gênica ao longo da escala

filogenética. Nossos resultados levaram a concluir a existência em galinha de apenas dois genes inequivocamente pertencentes a família Neph que denominamos chkNeph1 e chkNeph. Ambos são funcionais e transcrevem rRNAs de aproximadamente 2 kb Primeiramente observados nos estágios HH-22 e HH-24 do desenvolvimento de *G.gal/us*. Em adultos, podem ser encontrados transcritos de ambos os genes em coração, fígado, rim, testículo e retina, com diferenças quanto ao perfil de expressão em ovário, pâncreas e pulmão onde apenas foi observado o mRNA de chkNeph1 e córtex parietal cerebral onde observamos somente a expressão de chkNeph2. A comparação de sequências de proteínas da família Neph de *Gallus* e de outros vertebrados com seus homólogos em *Drosophila* suporta a hipótese de que os genes Neph são o resultado de divergência evolutiva do grupo formado por Roughest e Kirre, enquanto as Nefrinas seriam oriundas do grupo formado por Hibris e Sns. Além disso, propomos que Neph3, ausente em galinha, seja provavelmente uma molécula alternativa a Neph2 em pâncreas de mamíferos. Consideramos que os resultados obtidos até o momento formam uma base a partir da qual experimentos específicos visando estabelecer as diferentes funções destes loci em *Gallus* poderão ser realizados.

#### CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DOS GANGLIOSÍDEOS NA ENDOCITOSE DO FcεRI EM MASTÓCITOS DEFICIENTES NA EXPRESSÃO DOS GANGLIOSÍDEOS DERIVADOS DO GD1B

**Vivian Marino Mazucato**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Constance Oliver  
Dissertação de Mestrado apresentada em 17/10/2008

*Lipid rafts* são microdomínios especializados da membrana plasmática. Quando os mastócitos são ativados via FcεRI, estes receptores se agregam e se deslocam para dentro dos *Lipid rafts* onde se associam com outros componentes dos *rafts*, tais como: a LAT e os gangliosídeos derivados do GD1b específicos de mastócitos. Em células RBL-2H3, após a estimulação, estes gangliosídeos específicos de mastócitos são internalizados juntamente com FcεRI, em uma vesícula coberta por clatrina. No presente

trabalho foi investigado o papel dos gangliosídeos específicos de mastócitos na modulação da via endocítica do FcεRI em células RBL-2H3 e em duas linhagens celulares mutantes B6A4A2III-E5 (E5) e B6A4C1III-D1 (D1). As células E5 expressam 35% dos gangliosídeos específicos de mastócitos encontrados nas células RBL-2H3 e as células D1 expressam menos de 1%. O mAb BC4 conjugado com FITC, que se liga na subunidade α do FcεRI, foi conjugado com FITC e utilizado tanto para ativar as células quanto na análise da internalização do FcεRI. As células RBL-2H3 e E5, após incubadas por 30 minutos de incubação com o mAb BC4-FITC continham vesículas endocíticas dispersas por todo o citoplasma. Com 1 hora as vesículas endocíticas

das células RBL-2H3 começaram a se fundir e formar agregados e, após 3 horas a maioria dos FcεRI estava presente em grandes agregados. Nas células E5 a formação de agregados pela fusão de vesículas endocíticas foi mais lenta, sendo observados somente com 3 horas de incubação. Em contraste, mesmo com 3 horas de incubação, nas células D1 as vesículas endocíticas eram menores e a maioria delas permanecia próxima à membrana plasmática. As diferenças observadas entre a endocitose das três linhagens celulares, despertou o interesse em melhor caracterizar a via endocítica destas células. Quando as linhagens celulares foram incubadas com o mAb BC4-FITC e, posteriormente, imonumarcadas com LAT (um marcador de *Lipid rafts*),  $\alpha$ -adaptina (uma proteína adaptadora envolvida na formação das vesículas cobertas por clatrina), clatrina (uma cobertura protéica para as vesículas endocíticas), Rab5 (um marcador de endossomo primário), CD63 (presente na membrana lisossomal e de grânulos secretores), ficou claro que havia um defeito na via endocítica do FcεRI nas células E5 e D1, que tem início na formação das vesículas endocíticas na membrana plasmática e se reflete por toda a via endocítica. O impedimento na formação das vesículas e no seu trans-

porte é mais severo nas células D1, onde quase todas as vesículas endocíticas foram encontradas próximas à membrana plasmática. Estas diferenças na endocitose e no transporte foram confirmadas por microscopia eletrônica. O nível de expressão do FcεRI e das diferentes proteínas envolvidas na endocitose foram analisadas por *Western Blotting* e por citometria de fluxo. As células D1 apresentaram uma redução significativa (79,8%) na expressão do FcεRI e, ambas as células E5 e D1 apresentaram uma superexpressão de LAT. Não houve diferença na expressão de  $\alpha$ -adaptina, clatrina e Rab 5. A quantidade de lisossomos foi encontrado por *Lysotracker Red e Green*, também foi o mesmo nas três linhagens celulares. O defeito visto nas linhagens celulares mutantes não foi limitado para a endocitose do FcεRI. A endocitose de marcadores da superfície celular, a concanavalina A (ConA), bem como a pinocitose de fase fluida também foi examinada. As células D1 mostraram defeitos significantes na endocitose dos marcadores da ConA e na pinocitose de fase fluida. Portanto o defeito endocítico visto, principalmente nas células D1, parece ser um defeito geral que está relacionado com a ausência dos gangliosídeos na membrana plasmática.

## O PAPEL DA LECTINA ARTIN M NA ATIVAÇÃO DE MASTÓCITOS

**Valéria Cintra Barbosa**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gabriela Silva Bisson

Dissertação de Mestrado apresentada em 27/10/2008

Estudos anteriores demonstraram que Artin M induz a ativação de mastócitos na presença ou na ausência de IgE ligada ao FcεRI e que os domínios de reconhecimento de carboidrato (CRDs) da lectina estavam envolvidos nessa atividade. No presente trabalho estudou-se a interação da lectina Artin M com glicoconjugados da superfície de mastócitos. A ligação de Artin M biotinilada à superfície de células RBL-2H3, avaliada por ensaios de citometria de fluxo, ocorreu em 97% das células. Tal ligação foi inibida em 98 e 99%, respectivamente, por D-manose (25 e 50 mM) e metil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo (25 e 50 mM). Através de microscopia de fluorescência, observou-se marcação positiva distribuída na superfície de células RBL-2H3. Não houve marcação quando Artin M foi previamente incubada com D-manose (25 mM), contrariamente ao observado quando a lectina foi pré-incubada com D-galactose (25 mM). A desgranulação de células RBL-2H3 induzida por Artin M foi verificada através de ensaio de detecção de atividade  $\beta$ -hexosaminidase, onde se verificou que a liberação da enzima ocorre na ausência ou presença de IgE, e que, nesse último caso, há um aumento expressivo da atividade enzimática detectada. A liberação de  $\beta$ -hexosaminidase foi inibida em aproximadamente 97% quando Artin M foi previamente incubada com metil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo (50 mM).

Tais resultados são sugestivos de que a desgranulação de mastócitos induzida por Artin M possa ser decorrente da interação entre os CRDs da lectina e componente (s) glicosilado (s) da superfície dessas células, como FcεRI. Ou ainda, de uma possível interação entre Artin M e a IgE ligada ao FcεRI. A possível ligação de Artin M a IgE foi averiguada através de ensaios em micropelotas, onde verificou-se que Artin M se liga à IgE de maneira dose-dependente. Investigou-se ainda se o receptor de alta afinidade para IgE - FcεRI - seria reconhecido por Artin M. Através da separação eletroforética de proteínas de lisados de células RBL-2H3, ativadas ou não, seguida da eletrotransferência para membrana de nitrocelulose e incubação com Artin M biotinilada, observou-se o reconhecimento, pela lectina, de diversos componentes que apresentam massas moleculares aparentes variáveis. Entretanto, dentre estes componentes, encontra-se uma banda protéica de aproximadamente 35 kDa, coincidente com aquela reconhecida por mAbs BE's, específicos para a subunidade  $\beta$  de FcεRI, fato que sugere que esta subunidade do receptor seja reconhecida por Artin M. A análise da expressão de FcεRI, através de citometria de fluxo, mostrou que células RBL-2H3 estimuladas por Artin M e sensibilizadas ou não por IgE, mantiveram o nível de expressão de FcεRI, contrariamente às células sensibilizadas pela imunoglobulina e estimuladas por DNP48-HSA, que apresentaram uma redução de 40% na expressão de FcεRI. Através de ensaios de microscopia confocal e *Western Blot*, observou-se um aumento na in-

tensidade da marcação pelo anticorpo anti-fosfotirosina, após estímulo por Artin M, que pode ser devido a um aumento da fosforilação de tirosinas induzido pela lectina, na presença de IgE, sugerindo que FcεRI esteja de fato envolvido no processo de ativação celular induzido por Artin M. Através de ensaios imunoenzimáticos - ELISA- verificou-se um aumento de 43% na produção de MCP-1 em células sensibilizadas por IgE e estimuladas por Artin M, durante 1 hora, comparado às células estimuladas via FcεRI. Foi observado um aumento de 92% na produção da TGF-β em células não sensibilizadas por IgE e estimuladas por Artin

M, durante 8 horas, em relação às células estimuladas via FcεRI; em adição, houve um aumento de 68% na produção de TGF-β em células sensibilizadas por IgE e estimuladas por Artin M durante 8 horas, em relação às células estimuladas via FcεRI.

O conjunto dos resultados obtidos sugere que Artin M, ao ligar-se apropriadamente a carboidratos da superfície de mastócitos, possivelmente àqueles presentes no receptor de alta afinidade para IgE e/ou na própria IgE ligada ao FcεRI, induza a transdução de sinal intracelular, responsável pela ativação dos mastócitos.

### PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS E DETERMINAÇÃO DO PADRÃO SUBCELULAR DE DISTRIBUIÇÃO DE JAZIGO DURANTE A MORTE CELULAR PROGRAMADA EM GLÂNDULAS SALIVARES DE *Drosophila melanogaster*

**Ana Paula Saita**

Orientador: Prof. Dr. Claudio Roberto Simon

Dissertação de Mestrado apresentada em 28/10/2008

Em estudos anteriores em nosso grupo, um *screen* genético de uma coleção de inserções únicas de elemento-P de *Drosophila melanogaster*, permitiu a identificação de uma mutação que provoca um severo fenótipo defectivo de morte celular de glândulas salivares larvais. Animais homozigotos mutantes para a inserção de elemento P morrem como pupas tardias e apresentam glândulas salivares persistentes. Em animais selvagens a glândula salivar larval é destinada a morrer durante o estágio pupal num processo de morte celular autofágico mediado por esteróide. O locus mutado pela inserção do elemento-P foi identificado e nomeado jazigo. Análises bioinformáticas demonstraram grande homologia do gene e de seu produto com componentes de uma família de proteínas denominada forminas (proteínas FH ou *Formin Homology*) que foram conservadas em eucariotos e cuja função foi relacionada com o remodelamento ativo do citoesqueleto de actina e microtúbulos em distintos processos celulares. Nesse trabalho demos início à caracterização bioquímica e funcional de JAZIGO utili-

zando análises de bioinformática e produção de anticorpos policlonais capazes de detectar o padrão de localização subcelular de JAZIGO na glândula salivar larval durante o período de morte celular programada. (MCP). Com base nas análises de bioinformática verificamos que as duas isoformas de JAZIGO são essencialmente hidrofílicas e que essas proteínas possuem um alto grau de similaridade com forminas da subfamília FHOD, as quais foram envolvidas na apoptose artificialmente induzida em células HeLa. A localização de JAZIGO durante a morte celular programada é inicialmente citoplasmática, mas com o progresso do processo de morte celular a proteína é translocada para o núcleo progressivamente. Nossos dados sugerem que JAZ possui comportamento similar a formina FHOD1 e que JAZ, similarmente a FHOD1, poderia desempenhar um papel na regulação de eventos de morte celular. Esses dados sugerem que JAZ e FHOD poderiam hipoteticamente compor um grupo distinto de forminas relacionadas a processos de morte celular. Também utilizamos o anticorpo para determinar a localização subcelular de JAZ em glândulas salivares persistentes de animais mutantes. Notamos que a localização nuclear de JAZ foi observada apenas nas células cujo processo de MCP foi interrompido mais tardiamente.

### PCR EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO ESPECÍFICA DE RNAs (+) E (-) DE VÍRUS OROPOUCHE

**Andrei Furlan da Silva**

Orientador: Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto

Dissertação de Mestrado apresentada em 03/11/2008

O vírus Oropouche é reconhecido como a segunda causa mais frequente de arbovirose febril no Brasil, só sendo superado em número de casos pelo vírus da dengue. O vírus Oropouche se destaca pelo elevado número de casos de infecção aguda febril, que ocorrem em surtos epidêmicos

em áreas urbanas da Amazônia, assim como pelo seu potencial de disseminação para outras regiões do Brasil e da América do Sul. Apesar de sua importância nunca foi determinada a existência de componentes do vírus Oropouche, estruturais ou não, que estejam relacionados a sua patogenicidade. Diante da ausência desses marcadores, o presente estudo procurou desenvolver uma metodologia que fosse capaz de analisar acúmulos das espécies de RNAs virais ao longo da replicação em um único ciclo. No presente estudo foi determinada a curva biológica do vírus Oropouche em um

único ciclo com MOI > 1 em células Hela I e desenvolvido um ensaio de RT-PCR em tempo real capaz de detectar RNAs (+) e RNAs (-) durante o ciclo replicativo. Nesse estudo também observamos a presença de cDNAs formados mesmo sem a adição de primers exógenos, aos quais chamamos de cDNA<sup>primer(-)</sup>, e que geram falso-positivos. Para solucionar este problema desenvolvemos um ensaio de RT-PCR em

tempo real específico, utilizando na etapa da RT primers biotinilados que permitem purificar o cDNA no qual se incorporam por meio de separação magnética. Com isso conseguimos desenvolver um método de detecção específico diferencial para RNAs positivos e negativos produzidos durante ciclo e replicativo e pode vir a ser uma importante ferramenta nos estudos de atogêneses.

### O PAPEL FUNCIONAL DA ENZIMA FOSFOLIPASE D2 (PLD2) NAS CÉLULAS DA LINHAGEM DE MASTÓCITOS RBL-2H3

**Claudia Maria Meirelles Marchini**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Constance Oliver

Dissertação de Mestrado apresentada em 11/11/2008

Os mastócitos participam do sistema imunológico liberando mediadores farmacologicamente ativos. A principal via de ativação dos mastócitos é através do receptor de alta afinidade para a imunoglobulina E (FcεRI). A ativação dos mastócitos via FcεRI culmina com a liberação de mediadores. A enzima PLD atua sobre fosfolipídios hidrolisando a fosfatidilcolina em ácido fosfatídico e colina. A PLD é ativada após o estímulo via FcεRI e possui um papel importante na transdução do sinal em mastócitos. Existem duas isoformas da enzima PLD, a PLD1 e a PLD2 que são expressas, diferentemente, de acordo com o tipo celular. Ambas as isoformas podem estar expressas numa mesma célula, apenas uma ou nenhuma. Neste estudo foram utilizadas células RBL-2H3 transfectadas para a super expressão PLD2 nas formas catalítica ativa (CA) e inativa (CI). O papel da PLD2 foi examinado nestas células com o objetivo de elucidar sua atuação no processo de secreção incluindo o aparelho de Golgi e os grânulos secretores. As células CA e CI possuem maior atividade de β-hexosaminidase total, porém quando estimuladas mostram uma deficiência na liberação desta enzima, quando comparadas com as células selvagens. A PLD2 nas células CA, CI, VET e RBL-2H3 está localizada no citosol, sendo abundante na região justanuclear, principalmente nas células CI, sugerindo uma associação com o aparelho de Golgi. A dupla marcação com o

mAb AA4, que imunomarca gangliosídeos derivados do GD<sub>1b</sub> da membrana plasmática e com anti-PLD2, mostrou que esta enzima não se localiza na membrana plasmática. A dupla marcação com anti-PLD2 e anti-GM130 mostrou que as áreas de maior concentração da PLD2 se co-localizam com o aparelho de Golgi, especialmente nas células CI. A marcação com anti-GM130 e os experimentos com microscopia eletrônica de transmissão mostraram que o aparelho de Golgi está organizado nas células CA e desorganizado nas células CI, onde se encontra disperso no citoplasma. Ainda, as células CI expressam menos GM130 em comparação com as demais linhagens celulares. Quando a produção de PA pela PLD está inibida pelo 1-Butanol, as células CA apresentam as mesmas características fenotípicas das células CI. A incubação das CI com PA resulta na reestruturação do aparelho de Golgi. A manutenção estrutural do aparelho de Golgi, também está relacionada com os microtúbulos. Nas células CI o centro organizador de microtúbulos é dificilmente identificado. Os microtúbulos nas células CI são desordenados em comparação com as demais linhagens celulares. Estes resultados mostram que a produção de PA pela PLD2 é importante na organização de microtúbulos e na manutenção da estrutura do aparelho de Golgi. As alterações celulares relacionadas com os microtúbulos e o aparelho de Golgi afetam o processo secretor nestas células e, provavelmente, em outros tipos de células secretoras. Estes achados poderão levar a novas estratégias terapêuticas para controlar a liberação de mediadores durante processos alérgicos e inflamatórios.

### CARACTERIZAÇÃO DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA À TERBINAFINA EM DIFERENTES ESPÉCIES DE *Leishmania*

**Fabrcio César Dias**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Orsini Tosi

Tese de Doutorado apresentada em 24/11/2008

O fenômeno de amplificação gênica é um mecanismo de auto-preservação celular observado com frequência no

protozoário parasita *Leishmania* quando submetido a estímulos negativos como, por exemplo, a presença de drogas. A região H do genoma de *Leishmania (Leishmania) major* é um dos loci mais estudados que leva à amplificação em resposta a drogas não relacionadas, como a terbinafina. Foram isoladas linhagens de *L. (L.) major* e *Leishmania (Viannia)*

*braziliensis* resistentes à terbinafina. Análises por corridas curtas de eletroforese em campo pulsado (PFGE) e Southern blotting revelaram que a resistência observada nestas linhagens não foi gerada pela amplificação do locus H. Sendo assim, a resistência ao inibidor da esqualeno epoxidase está sendo gerada por um outro mecanismo uma vez que outros loci podem estar envolvidos na resistência à terbinafina e através da análise diferencial do perfil de proteínas, os mutantes resistentes apresentaram diferenças na expressão de proteínas. O alvo inicial para a elucidação da resistência à terbinafina nas linhagens selecionadas foi a via de biossíntese de ergosterol. Foram escolhidos os genes da 3-cetoacil-CoA tiolase (*ERG10*), esqualeno sintase (*ERG9* ou *SQS1*), esqualeno epoxidase (*ERG1*), oxidoesqualeno-lanosterol ciclase (*ERG7*) e lanosterol 14 -demetilase (*ERG11*), de *L. major* e *L. braziliensis*, além do gene *YIP1* de *L. braziliensis*. Para isso foram sintetizados oligonucleotídeos a partir das sequências geradas pelo projeto genoma destas espécies depositadas em bancos de dados.

Os genes *ERG10*, *SQS1*, *ERG1*, *ERG7* e *ERG11* de *L. major* e de *L. braziliensis* além do *YIP1* de *L. braziliensis* amplificados por PCR foram clonados no vetor pGEM-T Easy, que possibilitou a construção de reagentes para ruptura de todos genes pela inserção da marca HYG e, com exceção do gene *ERG7* de *L. braziliensis*, os genes foram subclonados no vetor pXG1. Fragmentos de restrição dos

genes clonados no vetor pGEM-T Easy foram utilizados para analisar o nível de seus transcritos por northern blot. Também verificamos através de corridas curtas de PFGE e análises de Southern, que as linhagens em estudo não apresentam amplificação dos loci em estudo. A participação de genes da via de biossíntese de ergosterol de *L. major* e *L. braziliensis* e do gene *YIP1* de *L. braziliensis* na resistência ou susceptibilidade à terbinafina e/ou anfotericina B foi verificada através de experimentos funcionais. Com esse objetivo, os genes *YIP1*, *ERG10* e *ERG1* de *L. braziliensis* foram transfectados na linhagem LB2904 de *L. braziliensis*, e os genes *ERG10*, *SQS1*, *ERG1*, *ERG7* e *ERG11* e a ruptura do gene *ERG1* pelo cassete *HYG* de *L. major* foram transfectados na linhagem LT252 de *L. major*.

Foram realizados experimentos para analisar a susceptibilidade à anfotericina B associada ou não à terbinafina, das linhagens selvagens de *L. major* e *L. braziliensis*, e a partir destes experimentos iniciais, foram selecionadas linhagens destas duas espécies resistentes à anfotericina B.

Para analisar a possível função regulatória dos elementos RIME 5/2/6 de *L. braziliensis*, foi feita a amplificação por PCR da repetição invertida LbRIME 5/2/6b que permitiu a clonagem deste fragmento no vetor pGEM-T Easy e a sua ruptura pela marca SAT. A clonagem no vetor pGEM possibilitou a análise da interação de proteínas nucleares à repetição LbRIME 5/2/6b através do gel shift.

## IDENTIFICAÇÃO DE FOSFOPROTEÍNAS EM CÉLULAS DE UMA LINHAGEM DE LINFOMA DO MANTO

**Germano Aguiar Ferreira**

Orientador: Prof. Dr. Lewis Joel Greene

Dissertação de Mestrado apresentada em 27/11/2008

O estudo fosfoproteômico de células linfóides pode contribuir para a compreensão de sua origem através da elucidação das vias responsáveis pelo escape dessas do controle celular. A abordagem proteômica foi utilizada no estudo inicial da linhagem GRANTA-519, uma linhagem celular estabelecida de linfoma de células do manto, através da criação de um inventário inicial de identificação de proteínas com possíveis modificações pós-traducionais, especialmente fosforilações. Inicialmente as células de GRANTA-519 foram cultivadas em condições adequadas. Proteínas foram extraídas com tampão de lise contendo 7,7 M de uréia, 2,2 M de tiouréia, 4,4 % de CHAPS e uma mistura de *cocktail* inibidor de proteases. Após extração das proteínas do extrato celular, alíquotas de proteínas foram tratadas com IPPase e submetidas a focalização isoeletrica em faixa de pH de 4,0 – 7,0 e eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS preparados em nosso laboratório. Proteínas foram detectadas através de coloração com coomas-

sie coloidal G-250, coloração específica para fosfoproteínas e anticorpos específicos contra resíduos fosforilados de serina e tirosina. Mapas bidimensionais foram analisados utilizando o *software* ImageMaster Platinum. Vinte oito *spots* de um total de duzentos, cerca de  $\pm 14\%$ , desapareceram após o tratamento com fosfatase alcalina. Proteínas modificadas pelo tratamento passaram por digestão *in situ* com tripsina e os peptídeos tripsínicos submetidos a espectrometria de massas em equipamentos do tipo MALDI-ToF e ESI triplo quádruplo. Doze proteínas dos *spots* digeridos, selecionados após o tratamento com  $\epsilon$ PPase, foram identificados. As seguintes proteínas foram identificadas em mais de um *spot* alinhado horizontalmente: Nucleofosmina, uma proteína fosforilada envolvida com acetilação nucleolar e Anexina A6, uma proteína reguladora de cálcio extremamente conservada. Outras proteínas escolhidas após o tratamento com IPPase foram identificadas como Heat shock 70 kDa, Stress-70 protein, mitochondrial, Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H, Tumor protein D52, Actin-related protein 2/3 complex subunit 5, Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 e Rho GDP-dissociation inhibitor 1.

## CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DOS GENES *PGA13* E *PGA58* DE *Candida albicans*

**Fabrcio Freitas Fernandes**

Orientador: Prof. Dr. Paulo Srgio Rodrigues Coelho  
Dissertao de Mestrado apresentada em 15/12/2008

A incidncia de infeces por fungos oportunistas na populao de pacientes imunocomprometidos tem aumentado nos ltimos anos, e estas so, principalmente, causadas por *Candida albicans*. Este patgeno oportunista pode crescer em diferentes formas, variando de levedura, pseudohifa e hifa e essa transio morfolgica est associada com a virulncia. Na transio de levedura para hifa, genes hifa-especficos so expressos e muitos deles codificam proteinas que possuem uma molcula de GPI (glicosilfosfatilinositol), mas a maioria (66%) das proteinas preditas ancoradas por GPI (*PGAs*), ainda possuem funo desconhecida. Portanto, o objetivo deste trabalho, foi iniciar a caracterizao funcional dos genes *PGA13* e *PGA58* atravs de anlises *in silico*, da expresso diferencial dos RNAm sob condies ambientais diversas, e nos mutantes

nulos *TUP1* e *EFG1*, e a obteno e caracterizao fenotpica dos mutantes de *PGA13*: homozigoto nulo e de superexpresso.

Os estudos realizados *in silico* indicam que *PGA13* e *PGA58* so reguladas pelos fatores transcricionais Efg1, Tec1 e Nrg1 e que possuem stios potenciais de glicosilao. A anlise transcricional desses genes mostra que ambos so regulados por Tup1 e que respondem aos estmulos NaCl (Cloreto de sdio), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Perxido de hidrogenio), etanol, cafena, HCl (cido Clordrico) e as condies hipo e hiperosmtica. Os mutantes nulos e de superexpresso de *PGA13* e *PGA58* foram obtidos e as linhagens que perderam o gene *PGA13* tiveram um padro de crescimento da colnia diferente da linhagem CAI-4 e foram mais sensveis aos compostos SDS, Higromicina B e pH cido, enquanto o mutante que superexpressava foi mais resistente. Estes resultados sugerem que *PGA13* deve ter papel importante na parede celular, visto que a falta dela ocasionou maior sensibilidade a compostos que agridem a parede celular.

## COMPARAO DE UM TESTE RPIDO IMUNOCROMATOGRFICO (DIRECTIGEN EZ RSV) COM IMUNOFLORESCNCIA INDIRETA, ISOLAMENTO EM CULTURA E SEMI-NESTED-RT-PCR PARA A DETECO DE VRUS SINCIAL RESPIRATORIO HUMANO

**Flvia Escremim de Paula**

Orientador: Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto  
Dissertao de Mestrado apresentada em 17/12/2008

O diagnstico rpido de infeco do trato respiratrio por HRSV est importante para definio de conduta bem como para a identificao de surtos. No presente estudo ns avaliamos o desempenho do teste rpido Directigen EZ<sup>TM</sup> RSV (BD Diagnostic Systems, Sparks, USA.), em comparao com a imunofluorescncia indireta (IF), isolamento em cultura e semi-nested-RT-PCR, para a deteco do vrus sincial respiratrio humano (HRSV) em amostras de secreo respiratria de crianas atendidas no Hospital das Clnicas da Faculdade de Medicina de Ribeirao Preto, Universidade de So Paulo, Brasil. De fevereiro a dezembro de 2005 foram coletadas 191 amostras de aspirados nasais de crianas com idade entre oito dias e 50 meses, atendidas por

doena respiratria na unidade de emergncia. Os critrios de incluso foram sintomas e sinais de infeco respiratria, incluindo coriza, obstruo nasal, febre, tosse, dispnria, taquipnria, sibilos e sinais de bronquiolite ou pneumonia.

Ao todo 191 amostras foram testadas por todos os mtodos. O Directigen EZ RSV detectou HRSV em 73/191 (38%) amostras, enquanto imunofluorescncia indireta, isolamento em cultura e o semi-nested-RT-PCR identificaram respectivamente 63/191 (33%), 62/191 (32%) e 82/191 (43%). Em comparao com todos os outros testes tomados em conjunto, o Directigen EZ RSV obteve 80% de sensibilidade, 99% especificidade, 99% valor preditivo positivo (PPV), 85% valor preditivo negativo (NPV) e 90% acurcia.

Os resultados mostraram que o teste Directigen EZ RSV est uma boa alternativa para o diagnstico de HRSV, pela sua facilidade e rapidez de execuo, sendo especialmente til em servios de ateno primria de sade.

## CARACTERIZAO MOLECULAR DO GENE *NCSA* DE *Aspergillus fumigatus*

**Andr Oliveira Mota Jnior**

Orientador: Prof. Dr. Gustavo H. Goldman  
Tese de Doutorado apresentada em 18/12/2008

O foco do trabalho est direcionado para a construo da linhagem "knock-out" do gene *ncsA* de *A. fumigatus*, bem como a caracterizao do fenotipo da linhagem  $\Delta$ *ncsA* e a investigao de interaes deste gene com vias de sina-

lizao importantes para o desenvolvimento do fungo. A linhagem mutante  $\Delta$ *ncsA* foi construda atravs da transformao do WT (ku80) com o gene marcador *pyrG* de *A. fumigatus*. Foi confirmada a deleo por Southern blot e as alteraes fenotpicas da linhagem foram analisadas. O gene *ncsA* em *A. fumigatus* no est essencial e a linhagem  $\Delta$ *ncsA* apresentou-se sensvel EGTA e SDS, al, de tolerante a altas concentraes de ons clcio. Na linhagem *NcsA*:mRFP

foi localizado a proteína *NcsA* no citoplasma das células e sua localização não é alterada pela em resposta ao aumento da concentração de cálcio. A linhagem  $\Delta ncsA$  foi sensível a drogas que afetam a biossíntese e a manutenção da membrana plasmática, tais como voriconazole, anfotericina e itraconazole. O crescimento polarizado em presença de lovastatina nessa linhagem foi consideravelmente mais afetado que no tipo selvagem. O Spitzenkörper não foi

visualizado no mutante  $\Delta ncsA$ , e existe uma significativa diminuição de estruturas vacuolares e endossomos. Os resultados obtidos em ensaios de TRPCR em tempo real sugerem que *NcsA* modula a expressão dos genes *pmcA* e *pmcB*, que codificam proteínas ATPases transportadoras de íons cálcio. Os ensaios de virulência no modelo animal revelaram que a mutação do gene *ncsA* não causa perda de virulência no *A. fumigatus*.

## BIOQUÍMICA

### IDENTIFICAÇÃO DE GENES NO FUNGO FILAMENTOSO *Aspergillus nidulans* MODULADOS POR PaIA, UM COMPONENTE DE UMA CASCATA SINALIZADORA EM RESPOSTA AO pH AMBIENTE

**Janaína Silva de Freitas**

Orientador: Prof. Dr. Antonio Rossi Filho

Tese de Doutorado apresentada em 30/10/2008

A via transdutora de sinal mediada pelo fator de transcrição PacC atua em muitos eventos metabólicos envolvidos na resposta adaptativa ao pH alcalino em *Aspergillus nidulans*. O gene *pacC* codifica um fator de transcrição zinc-finger, e os seis genes *paI* (A, B, C, F, H e I) são membros putativos de uma cascata sinalizadora que promovem a ativação proteolítica de PacC em ambiente alcalino. A proteína PaIA interage com os motivos YPXL/I em PacC, o que é necessário para a ação de PaIB, uma protease da família das calpaínas. Este modelo implica que mutações acarretando perda de função em qualquer dos genes *paI* levariam a mimetização do fenótipo ácido (selvagem) independentemente do pH ambiente. Assim, qualquer que seja o pH de cultivo, a mutação *pa/A1* deveria mimetizar o fenótipo selvagem, o que não foi observado na linhagem mutante *biA1 paA1*. Experimentos simples foram designados para identificar a influência dos nutrientes no pH final das culturas e na secreção da fosfatase ácida em *Aspergillus nidulans*. A linhagem mutante *pa/C4* foi selecionada pelo seu aumento substancial da atividade da fosfatase ácida e diminuição da atividade da fosfatase alcalina, quando cultivada em meio mínimo sólido, Pi limitante, pH 6.5. Foi

demonstrado que o crescimento pobre e a conidiação da linhagem mutante *pa/C4* em meio sólido, pH alcalino, foram hiper sensíveis ao tampão Tris (hydroxymethyl). A secreção da fosfatase ácida foi reprimida em ambas as linhagens parental *biA 1* e mutante *pa/C4 biA 1* quando cultivadas em meio líquido de extrato de levedura, Pi limitante, pH 5.0. Essa condição indica que a secreção da fosfatase ácida não é necessária para regenerar fosfato inorgânico a partir do fosfato orgânico presente no extrato de levedura. Os resultados apresentados não invalidam a hipótese da cascata de sinalização governada por PacC em resposta fisiológicas ao pH alcalino. Entretanto, está claro que a percepção do pH alcalino pode não ser sua única função. Com a finalidade de identificar genes envolvidos na resposta adaptativa ao pH ambiente e avançar no entendimento da funcionalidade do gene *paIA* em pH ácido, a hibridação subtrativa por supressão foi realizada a partir dos mRNAs isolados das linhagens *biA 1* e *biA 1 paA 1* de *A. nidulans* cultivadas em condições de fosfato limitante, pH 5,0. Este estudo revelou genes com expressão diminuída na linhagem mutante *biA1 paA1* envolvidos na defesa celular, resposta ao estresse, transcrição, síntese de proteínas, comunicação celular e etc. A expressão diferencial de nove desses genes, confirmada por Northern blot, indica que o gene *paIA* tem função metabólica específica em pH ácido em *A. nidulans*.

### PROGRAMA DE TRIAGEM DE COMPOSTOS E ESTRATÉGIA PARA PROSPECÇÃO E DESENVOLVIMENTO EM LARGA ESCALA DE NOVOS BIOATIVOS COM POTENCIAL ANTIMICOBACTERIANO

**Fabio Cícero de Sá Galetti**

Orientador: Prof. Dr. Celio Lopes Silva

Tese de Doutorado apresentada em 03/11/2008

O atual tratamento da tuberculose (TB) implica na terapia combinada de quatro diferentes drogas por pelo

menos seis meses o que pode levar a não adesão do paciente ao regime terapêutico. O abandono da terapia é um dos principais fatores que favorecem o aumento dos casos de tuberculose multidroga resistente (MDR- TB) e tuberculose extremamente resistente (XDR- TB), que somados aos problemas de co-infecção com HIV/AIDS, diminuem dras-

ticamente a eficácia anti- TB das drogas de primeira escolha. Estes fatores indicam a necessidade urgente para descoberta de uma nova droga para ser-aplicada no tratamento da TB. Desta forma o Núcleo de Pesquisas em Tuberculose (NPT), estabeleceu o programa de triagem de compostos, utilizando a estratégia de triagem aleatória de compostos em larga escala, para prospecção de potenciais novos bioativos anti- TB, tanto de produtos naturais (biodiversidade brasileira) como de produtos de origem sintética. Basicamente a plataforma é constituída de três etapas principais: (i) determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das amostras contra o bacilo da TB; (ii) realização de estudos de citotoxicidade ( $IC_{50}$ ) e atividade biológica em macrófagos infectados; e (iii) determinação da atividade biológica em modelos de TB experimental. Foram realizados bioensaios *in vitro* de concentração inibitória mínima frente à cepa de Mtb (H37Rv ATCC 27294) com um total de 2076 amostras: 81,41 % de extratos brutos de produtos naturais, 13,34% de amostras fracionadas ou isoladas dos produtos naturais e 5,25% de compostos sintéticos. Os resultados selecionaram 60 extratos com CIM inferior a 125  $\mu\text{g/mL}$  que levaram ao isolamento de dois bioativos do extrato bruto da esponja

marinha *Aplysina cauliformis*. Estes extratos apresentaram inédita atividade anti- TB *in vitro*, ausência de citotoxicidade em células de mamíferos e capacidade de reduzir em 3,53 log de UFCs a carga bacilar intracelularmente semelhante à droga padrão RFP. Resultados semelhantes também foram encontrados para três compostos sintéticos, dois análogos heterocíclicos da nitrofurazona com  $CIM=16 \mu\text{Mol}$  e um derivado análogo da INH (composto 227) com  $CIM=2 \mu\text{Mol}$ . Todas os três compostos apresentaram excelentes índices de seletividade sendo o melhor deles caracterizado para o composto 227 ( $IS > 250$ ). O mesmo composto também apresentou resultado promissor em teste pré-clínico em modelo murino de TB experimental ao reduzir significativamente a carga bacilar de tecido pulmonar em 3,27 log de UFC quando comparado ao controle negativo (animais não tratados). Por fim, testes preliminares detectaram uma atividade imunomoduladora em potencial para o composto na resposta contra a TB. As análises dos resultados indicaram o sucesso do Programa de Triagem de compostos e a eficácia da estratégia de triagem aleatória em larga escala em identificar potenciais novos bioativos anti- TB em curto período de tempo e baixo investimento de capital.

#### ATIVIDADE DA FOSFOLIPASE $A_2$ SECRETADA HUMANA DO GRUPO IID (HSPLA $_2$ -IID) CONTRA MEMBRANAS ARTIFICIAIS E BIOLÓGICAS

**Raquel Gomes Fonseca**

Orientador: Prof. Dr. Richard John Ward

Dissertação de Mestrado apresentada em 19/11/2008

As fosfolipases  $A_2$  (PLA $_2$ s, EC 3.1.1.4) são enzimas envolvidas em uma ampla variedade de processos fisiológicos que compreendem digestão fosfolipídica, remodelagem de membranas, regulação do sistema imunológico e processos patofisiológicos. As PLA $_2$ s secretadas do grupo II (PLA $_2$ -II) são proteínas do sistema imune presentes na resposta de fase aguda e na atividade bactericida, participando na ativação e liberação de citocinas e de outros mediadores pré-inflamatórios. Apesar dos estudos recentes sobre os efeitos farmacológicos e mecanismo catalítico da PLA $_2$  do grupo IIA humana (PLA $_2$ -IIA), pouca atenção tem sido dada à PLA $_2$  do grupo IID humana (hsPLA $_2$ -IID), uma proteína associada ao progresso do processo inflamatório. O presente trabalho representa um estudo para avaliar uma eventual correlação entre o mecanismo de permeabilização de membranas modelos e a atividade bactericida de hsPLA $_2$ -IID. A sequência codificadora da hsPLA $_2$ -IID foi inserida no vetor de expressão pET3a, e a proteína heteróloga foi produzida na forma de corpos de inclusão em *Escherichia coli* BL21 (DE3). Um protocolo de enovelamento da proteína recombinante foi desenvolvido que permitiu a produção de hsPLA $_2$ -IID na conformação nativa. Para avaliar o papel de atividade catalítica no efeito de permeabilização de membranas modelos e na atividade

bactericida, as mutantes H48Q, D49K e G30S na região de sítio ativo foram produzidos com o intuito de reduzir ou eliminar a atividade catalítica da enzima. A proteína hsPLA $_2$ -IID tipo selvagem e a mutante H48Q apresentaram atividade hidrolítica de 58,45 e 7,7  $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  respectivamente, e demonstraram uma atividade de danificação de membranas artificiais. Em contraste, as mutantes G30S e D49K perderam completamente a atividade catalítica, mas mantiveram a capacidade de danificar membranas artificiais, demonstrando que a atividade hidrolítica e a danificação de membranas modelos não estão correlacionadas. A proteína hsPLA $_2$ -IID tipo selvagem demonstrou um efeito bactericida contra bactérias Gram-negativa (*E. coli* K12) e Gram-positiva (*Micrococcus luteus*). As mutantes H48Q e D49K reduziram, mas não aboliram a atividade bactericida contra a *E. coli*, demonstrando que a atividade independente da atividade catalítica contribui para o efeito contra este linhagem. As mesmas mutantes causam uma redução maior na atividade contra *M. luteus*, mostrando que os mecanismos do efeito bactericida são diferentes entre bactérias Gram negativas e positivas. Os efeitos das mutações da hsPLA $_2$ -IID foram comparados com os efeitos das mesmas mutações na hsPLA $_2$ -IIA e com botropstoxina-I, uma Lys49-PLA $_2$  isolado do veneno da serpente *Bothrops jararacussu*, indicando que além da atividade catalítica e a atividade independente de catalise, acesso a membrana interna da bactéria pode ser um fator na determinação da atividade bactericida das fosfolipases  $A_2$  de classe II.



## CLÍNICA CIRÚRGICA

### ESTUDO COMPARATIVO ENTRE ECOENDOSCOPIA E ENDOSCOPIA DIGESTIVA ALTA NO DIAGNÓSTICO DOS TUMORES SUBEPITELIAIS DO ESÔFAGO ESTÔMAGO E DUODENO

#### Spencer Vaiciunas

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo Ceneviva

Dissertação de Mestrado apresentada em 30/10/2008

A descoberta endoscópica de um tumor subepitelial (TSE) é frequente. Geralmente o aspecto corresponde à de uma compressão extrínseca (CE) ou ao de um tumor intramural (TI). O diagnóstico dessas lesões, por vezes, é difícil, mesmo após a obtenção de biópsias pela endoscopia digestiva alta (EDA). A ecoendoscopia (EE) tem apresentado importante papel na elucidação diagnóstica. A proposta nesse estudo foi comparar os resultados da EDA com os da EE no diagnóstico diferencial entre TI e CE do esôfago, estômago e duodeno e avaliar o desempenho da ecoendoscopia no diagnóstico diferencial dos TSE. Foi feita análise retrospectiva dos exames de 176 pacientes (93 mulheres), com média de idade de 62,5 (10- 89) anos, de janeiro de 2000 a maio de 2006, que foram estudados por EDA e EE por apresentar abaulamento subepitelial ao exame endoscópico do trato gastrointestinal alto. O tamanho, mobilidade, localização e o diagnóstico de presunção foram registrados no momento da EDA. Durante a EE foram analisados o tama-

ngo, a ecogenicidade do tumor, as camadas da parede da víscera e o diagnóstico presuntivo. Todos os pacientes foram avaliados consecutivamente pela EDA e EE. Os tumores intramurais representaram 87% dos casos e dentre eles, o tumor estromal gastrointestinal foi a maioria (62%), enquanto as compressões extrínsecas representaram 13%, das quais a compressão pelo fígado foi a mais frequente (31 %). Para a avaliação dos TI a sensibilidade, especificidade e acurácia da EDA foram menores de 50 % com  $p=0,25$  e para a EE de 95%, 100% e 95% respectivamente, com  $p=0,0003$  (teste de Fisher). Na avaliação das CE, a sensibilidade, especificidade e acurácia da EDA foram de 87%, 50% e 86% com  $p=0,43$  e a EE de 95%, 100% e 95% respectivamente, com  $p=0,08$  (teste de Fisher). Conclui-se que a endoscopia digestiva é um bom exame para diagnosticar a presença de tumores intramurais do trato digestivo, mas tem fraco desempenho em identificar o tipo específico do tumor, e é um mau exame para o diagnóstico das compressões extrínsecas. Por outro lado, a ecoendoscopia é um bom exame para o diagnóstico diferencial dos tumores subepiteliais, podendo fornecer com precisão a localização do tumor além de permitir biópsias dirigidas.

### AVALIAÇÃO DA ISQUEMIA RENAL EM RATOS WISTAR PELA ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER, PELA ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E PELA FUNÇÃO RENAL E MITOCONDRIAL

#### Beatriz Flávia Moraes Trazzi

Orientador: Prof. Dr. Luís Fernando Tirapelli

Tese de Doutorado apresentada em 31/10/2008

**Objetivos:** Avaliar a associação da gravidade da lesão renal isquêmica determinada pela histopatologia, espectroscopia de fluorescência induzida por laser (FIL - 442nm e 532nm), função renal, respiração mitocondrial e intumescimento osmótico da membrana mitocondrial e função renal.

**Material e Métodos:** Cinquenta ratos Wistar foram submetidos à isquemia renal esquerda quente durante 20, 40, 60 e 80 minutos. A FIL foi realizada antes da isquemia (controle) e repetida aos 20, 40, 60 e 80 minutos de isquemia. Amostras de tecido para histologia e análise mitocondrial (estado 3 e 4 da respiração, razão de controle respiratório e intumescimento osmótico da membrana mitocondrial) fo-

ram colhidas do rim esquerdo após determinação da FIL.

**Resultados:** A associação da espectroscopia óptica com o dano histológico foi: FIL -442nm -  $r^2 = 0,39$ ,  $p \leq 0,001$  e 532nm -  $r^2 = 0,18$ ,  $P = 0,003$ ; FFI (fator de fluorescência da isquemia -laser refletido / fluorescência induzida) -442nm -  $r^2 = 0,20$ ,  $P = 0,002$  e 532nm -  $r^2 = 0,004$ ,  $P = 0,67$ . As associações entre a função mitocondrial e o dano tecidual foram: estado 3 da respiração -  $r^2 = 0,43$ ,  $P = 0,0004$ , estado 4 da respiração -  $r^2 = 0,03$ ,  $P = 0,38$ , RCR -  $r^2 = 0,28$ ,  $P = 0,007$ , e intumescimento da membrana mitocondrial -  $r^2 = 0,02$ ,  $p = 0,43$ .

**Conclusões:** A intensidade de fluorescência emitida pelo tecido excitado por laser, especialmente no comprimento de onda 442nm, foi capaz de determinar, em tempo real, a gravidade das lesões teciduais provocadas pela isquemia renal. O estado 3 da respiração mitocondrial e a RCR (razão do controle respiratório) também mostraram uma boa correlação com o grau de lesão do tecido isquêmico.

## **AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DA VIABILIDADE HEPÁTICA, APÓS ISQUEMIA NORMOTÉRMICA, PELA ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER (efil)**

**Jorge Luiz Fernandes**

Orientador: Prof. Dr. Ajith Kumar Sankarankutty  
Dissertação de Mestrado apresentada em 31/10/2008

Novos métodos para a caracterização de tecidos ou para investigar e analisar diversos, parâmetros teciduais têm sido buscados ultimamente. A avaliação da viabilidade do fígado de ratos pela "espectroscopia de fluorescência induzi da por laser" após isquemia normotérmica visa mostrar a eficácia do método e delinear critérios objetivos na sua utilização. A função mitocondrial, provas bioquímicas e a morfometria foram utilizadas como indicadores da viabilidade hepática. Estudos recentes mostram a eficácia do método em condições de hipotermia. Outros estudos foram realizados com outros parâmetros. Os animais foram divididos em dois grupos: G1(isquemia parcial de 1 hora), com 12 animais, G2(isquemia parcial de 2 horas), também com 12 animais. A isquemia parcial foi realizada com oclusão vascular do lobo mediano e do lobo lateral esquerdo, permitindo fluxo sanguíneo para o lobo caudado e para o lobo lateral direito. Após o período de isquemia a pinça vascular

foi removida e as leituras da espectroscopia de fluorescência foram realizadas antes da isquemia, após o período de isquemia e 24 horas após a reperfusão. Imediatamente após as leituras espectroscópicas, foram realizadas coletas de sangue para dosagem das bilirrubinas, AST, ALT e DHL. Após a última coleta de sangue o tecido hepático, do lobo submetido à isquemia, foi retirado e encaminhado parte para o exame histopatológico (morfometria) e parte para avaliação da função mitocondrial. Foi possível comparar os padrões espectrais com a área de necrose. Os padrões espectrais foram distintos nas 3 fases e foi possível avaliar evidências de associação das respostas da espectroscopia de fluorescência com relação à Morfometria, pelo Teste Exato de Fisher ( $p < 0,01$ ), e também em relação à sua concordância, pelo Coeficiente Kappa, variando de concordância moderada à concordância quase perfeita. Valores semelhantes foram obtidos na avaliação do Potencial de Membrana mitocondrial. A "espectroscopia de fluorescência induzida por laser" após isquemia normotérmica mostrou ser um método rápido e eficaz na avaliação de lesões isquêmicas e de tecidos viáveis.

## **AVALIAÇÃO DA IMPLANTAÇÃO DE UM PROTOCOLO DE PREVENÇÃO EM EQUIPES DA ATENÇÃO BÁSICA EM RIBEIRÃO PRETO, SÃO PAULO**

**Anderson Soares da Silva**

Orientador: Prof. Dr. Orlando de Castro e Silva Júnior  
Tese de Doutorado apresentada em 10/11/2008

**Introdução:** Ainda que a prevenção represente o cerne do trabalho dos médicos da Atenção Básica, as taxas de emprego de medidas de prevenção, por mais simples que sejam, ainda sem encontram em níveis inadequados. O desafio que é posto aos profissionais de saúde é o emprego de um rol mínimo de medidas de prevenção a pacientes elegíveis, baseados em uma avaliação rigorosa de fatores de risco individuais e familiares, associado à aplicação de medidas baseadas em sólidas evidências científicas. De forma a atingir esse objetivo, a literatura científica tem fornecido uma série de ferramentas (intervenções não eletrônicas, tais como tabelas de prevenção, cartas-lembrete e cartões de saúde para os pacientes), que tem se mostrados eficientes no curto prazo para o aumento do emprego de medidas de prevenção.

**Objetivos:** Dado a escassa disponibilidade de pesquisas sobre estratégias voltadas para a melhoria da provisão de serviços preventivos por equipes do Programa Saúde da Família, o pesquisador estudou os valores e atitudes atribuídos à prevenção pelos profissionais de saúde e avaliou a implementação de um protocolo de promoção de saúde e prevenção de doenças em cinco equipes do Programa Saúde da Família do município de Ribeirão Preto, São Paulo.

**Material e Métodos:** Um protocolo contendo 22 medidas de prevenção foi elaborado tendo como base as recomendações do US Preventive Services Task Force, do Canadian Task Force on Preventive Health Care, do Programa de Atividades Preventivas y de Promocion de Ia Salud (PAPPS) da Sociedade Espanhola de Saúde da Família e Comunidade e das recomendações do Ministério da Saúde, todas adaptadas as condições locais. Os profissionais de saúde foram entrevistados e logo depois treinados, em dezembro de 2007, para a aplicação do protocolo. Após cinco meses do treinamento, a aplicação das 22 medidas foram avaliadas.

**Resultados:** Apesar de afirmarem conhecer as medidas de promoção de saúde e prevenção de doenças e de se mostrarem motivados a empregá-las, o registro de muitas medidas de prevenção ficou muito abaixo daquilo preconizado por organismos oficiais e a análise dos índices de performance de medidas apropriadas e inapropriadas, antes a após o treinamento das equipes, mostrou que a estratégia proposta não conseguiu melhorar o emprego das medidas de prevenção analisadas.

**Conclusões:** Mudar o comportamento dos profissionais de saúde de forma que empreguem mais medidas de prevenção é uma tarefa bastante complexa. Além de mais investimentos em pesquisas, é preciso que governos e escolas médicas enfatizem a importância do emprego de medidas de prevenção por profissionais da Atenção Básica.

## CLÍNICA MÉDICA

### APETITE, EQUILÍBRIO ENERGÉTICO E TRÂNSITO GASTRINTESTINAL EM INDIVÍDUOS GASTRECTOMIZADOS

**Mayra Mayumi Kamiji**

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Brandt de Oliveira

Tese de Doutorado apresentada em 13/10/2008

No presente estudo, foram avaliados, em indivíduos submetidos previamente à gastrectomia, os níveis plasmáticos de grelina total e de PYY<sub>3-36</sub>, as sensações de apetite e o trânsito gastrointestinal após a ingestão de uma refeição líquida, e também o gasto energético de repouso (GER) e a ingestão energética. Foram estudados sete indivíduos com gastrectomia total (GT), 14 com gastrectomia parcial (GP) e 10 indivíduos saudáveis. O Índice de Massa Corporal (IMC) não era diferente entre os grupos [grupo controle: 25 (20-34) kg/m<sup>2</sup>, GP: 22 (18-30) kg/m<sup>2</sup>, GT: 23 (18-32) kg/m<sup>2</sup>]. Os pacientes haviam sido operados por câncer ou por úlcera, há pelo menos 1 ano, e não apresentavam suspeita ou diagnóstico de neoplasia. O GER foi medido por calorimetria indireta e comparado ao calculado pela fórmula de Harris-Benedict (% GERm/GERT). A ingestão alimentar habitual foi avaliada por recordatório de 24h e por registro alimentar de 3 dias. As sensações de apetite (fome, plenitude e consumo prospectivo) foram medidas por um questionário que incluía uma escala analógica visual, aplicado aos participantes em jejum e durante o estudo cintilográfico do trânsito gastrointestinal após uma refeição teste (361 kcal). A dosagem dos hormônios foi realizada por radioimunoensaio. A relação % GERm/GERT foi mais alta no grupo GP (P < 0,05) comparativamente ao grupo controle. A ingestão energética

habitual foi mais alta no grupo GT em comparação ao GP e ao controle, e semelhante entre esses dois grupos. Os valores basais de grelina total foram mais baixas (P < 0,05) no grupo GT, e os de PYY não foram diferentes entre os grupos. A grelina basal se correlacionou positivamente (r = 0,74, P < 0,01) com o GER no grupo GP e negativamente (r = -0,87, P < 0,05) com o GER no grupo GT. Após a refeição teste, nos grupos GP e GT, não houve variação nas concentrações de grelina pós-prandial, diferentemente dos níveis de PYY, que aumentaram aos 15min. A recuperação de fome e consumo prospectivo, e o pico de plenitude ocorreram mais precocemente nos grupos GP e GT em comparação aos indivíduos saudáveis. O esvaziamento gástrico foi mais rápido no grupo GP que no grupo controle, e o trânsito gastrointestinal foi acelerado nos grupos GP e GT. As concentrações de grelina e de PYY<sub>3-36</sub> não se correlacionaram com as pontuações de apetite. Nossos resultados indicam que indivíduos com GP ou GT, com IMC normal, apresentam um GER aumentado, que, nos indivíduos com GT, parece ser compensado por maior ingestão energética. As sensações de apetite estão preservadas nesses pacientes, e a plenitude pós-prandial é mais intensa e precoce, o que parece estar associado ao trânsito gastrointestinal acelerado, e não depender da integridade de nervos vagais. Nos indivíduos com GP ou GT, a grelina e o PYY<sub>3-36</sub> exercem influência pequena ou nula sobre apetite e ingestão alimentar, e a grelina parece exercer papel importante na regulação do GER.

### MORFOLOGIA, FENÓTIPO, POTENCIAL PROLIFERATIVO E EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS MESENQUIMAIS ESTROMAIS MULTIPOTENTES OBTIDAS DA MEDULA ÓSSEA DO ADULTO, DA VEIA DO CORDÃO UMBILICAL E DE DIVERSOS TECIDOS FETAIS

**Ana Valéria Gouveia de Andrade**

Orientador: Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas

Dissertação de Mestrado apresentada em 23/10/2008

As células mesenquimais estromais multipotentes (CTM) são células derivadas do mesoderma que podem ser isoladas de diversos tecidos adultos e fetais. Estudos prévios do nosso grupo isolaram CTM de medula óssea, veia de cordão umbilical, veia safena e, diversos tecidos fetais. Estas células apresentam perfil imunofenotípico característico e potencial de diferenciação em osteócito, adipócito e condrócito. As CTM podem ser utilizadas para as mais diversas aplicações na terapia celular em função da plasticidade, baixo risco de induzir tumores, do status imunológico

e da capacidade destas células em migrar e regenerar a longo prazo o tecido específico. Partindo da hipótese de que CTM de diferentes tecidos têm potencial proliferativo e expressão gênica distintos, comparamos CTM de medula óssea do adulto (CTM-MO), CTM de veia de cordão umbilical (CTM-VCU) e CTM derivadas de cinco tecidos fetais (carótida, fáscia, fígado, gônada e pele). Observamos que CTM-MO, CTM-VCU e CTM derivadas de diversos tecidos fetais (CTM-TF) apresentaram perfil imunofenotípico similar bem como capacidade de diferenciação *in vitro* em osteócito e adipócito. Nossos dados mostraram que as CTM-TF são menores e possuem maior potencial proliferativo quando comparadas às CTM-MO e CTM-VCU. A partir de resultados de expressão gênica global de CTM-MO e CTM-VCU,

escolhemos genes hiper ou hipoexpressos para serem analisados nas CTM. Os genes escolhidos estavam relacionados ao homing (SDF1, CXCR4, VCAM1, ITGA4), à osteogênese (RUNX2 e BMP2), à angiogênese (VEGFC) e à imunomodulação (TGF $\beta$ 1). A expressão gênica relativa mostrou que o SDF1 estava significativamente mais expresso nas CTM-MO do que nas CTM-VCU e nas CTM-TF. Este resultado significativo para o SDF1 nas CTM-MO pode estar relacionado com o suporte da hematopoese. O CXCR4 foi detectado em quase todas as CTM-TF, em todas as CTM-VCU e não foi detectado em algumas CTM-MO. O VCAM1 encontrou-se mais expresso tanto nas CTM-MO quanto nas CTM-VCU quando comparadas às CTM-TF. O ITGA4 encontrou-se mais expresso nas CTM-VCU do que nas CTM-TF. O RUNX2, importante iniciador da osteogênese, assim como o BMP2, encontraram-se mais expressos nas CTM-MO do que nas CTM-TF, enfatizando a participação destas

células na diferenciação osteogênica. O TGF $\beta$ 1, potente imunossupressor, estava mais expresso nas CTM-MO do que nas CTM-TF. O VEGFC, por sua vez, encontrou-se mais expresso nas CTM-MO e nas CTM-VCU do que nas CTM-TF. Estes achados indicam que as CTM possuem uma ampla distribuição no organismo, que as CTM-TF possuem um maior potencial proliferativo e sugerem que as CTM-TF e as CTM-VCU podem possuir uma maior habilidade migratória. Estes dados também sugerem que as CTM-MO podem ser mais eficientes na osteogênese e como fonte imunossupressora do que as CTM-TF na terapia celular. Por fim, estes resultados mostram que CTM obtidas de fontes diferentes, embora semelhantes do ponto de vista imunofenotípico e funcional, apresentam diferenças morfológicas e na expressão de vários genes. Estas diferenças podem ser decorrentes da especialização funcional do estroma que pode ocorrer nos diversos tecidos em decorrência de sua função.

## INFLUÊNCIA DO TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS SOBRE O COMPORTAMENTO FUNCIONAL DO PULMÃO E A RESPOSTA ATÓPICA

**Elisa Cristina Vendramini Nogueira**

Orientador: Prof. Dr. João Terra Filho

Tese de Doutorado apresentada em 29/10/2008

Apesar do interesse crescente na investigação da reconstituição do sistema imune após o transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH) em humanos, há uma escassez de informação sobre a transferência da imunidade a um antígeno específico dos doadores aos receptores.

**Objetivo:** Avaliar a função pulmonar e a responsividade brônquica após o TCTH alogênico; verificar a influência da inibição ou transferência da resposta atópica cutânea entre receptores e doadores do TCTH alogênico.

**Material:** Foram avaliados 16 voluntários receptores do TCTH alogênico e seus respectivos doadores, dos quais sete foram posteriormente afastados do estudo por motivo de óbito e/ou sustação do TCTH.

**Métodos:** Questionário padrão para história de atopia. Avaliação da função pulmonar (em espirômetro Collins modelo GS Plus) com obtenção dos seguintes parâmetros: Volumes (inclusive residual) e capacidades pulmonares: capacidade vital forçada e fluxos expiratórios máximos; capacidade de difusão pulmonar (DLCOSB). No estudo da responsividade brônquica (teste de broncoprovocação) utilizamos o cloreto de metacolina (Sigma) em doses crescentes diluídas em solução salina tamponada, administrada pelo Sistema Koko Digi Doses, pds Instrumentation. Assim, obtivemos as curvas dose (concentração de metacolina mg/ml) x resposta (queda VEF<sub>1</sub>) e a concentração necessária para provocar queda de 20% no volume expiratório forçado no primeiro segundo (PC<sub>20</sub> VEF<sub>1</sub>). Teste Cutâneo (Prick Test) foi realizado para 19 alérgenos. Indução de escarro com solução hipertônica foi empregada para caracterizar o perfil

celular. Dosagem sérica de IgE total medida por Fluoroenzimaimunoensaio (Feia) no sistema UniCAP 100 (Pharmacia & UpJohn Diagnostics AS, Uppsala, Suécia). Doadores e receptores foram avaliados no período pré transplante. Nos receptores as avaliações foram repetidas no D+100, D+180 e um ano após o TCTH.

**Resultados:** Foram avaliados nove receptores e seus respectivos doadores. Não houve redução das capacidades e volumes pulmonares nas diferentes etapas estudadas. A redução da capacidade de difusão pulmonar foi observada em 44% dos receptores. Houve aumento dos fluxos expiratórios máximos em 55% dos receptores após o HSCT. Observamos hiperresponsividade em um receptor na avaliação basal e no D+360. Esse mesmo receptor apresentou distúrbio ventilatório obstrutivo somente na avaliação basal. Observamos que, em cinco receptores (55%) que exibiam resposta atópica antes do TCTH, esta resposta se normalizou na avaliação realizada um ano após e não houve relação com a resposta do doador. O percentual de linfócitos no escarro induzido foi maior após o TCTH em comparação com a etapa basal.

**Conclusão:** No grupo de pacientes estudados o TCTH não induziu o aparecimento de distúrbio ventilatório. Em metade dos pacientes houve queda da capacidade de difusão pulmonar após o TCTH, queda esta que persistiu até a avaliação ao término de um ano. Houve aumento dos fluxos expiratórios máximos após o TCTH. O TCTH não esteve associado ao aumento da responsividade brônquica à metacolina mesmo nos pacientes que apresentaram OECH. Nossos resultados indicam sugerem que a normalização da resposta atópica pode estar relacionada a um melhor controle da produção de IgE pelos linfócitos T. Houve persistência de um maior percentual de linfócitos no escarro induzido após o TCTH.

## EFEITOS DA PARACENTESE TERAPÊUTICA NOS PARÂMETROS DE FUNÇÃO PULMONAR EM PACIENTES CIRRÓTICOS COM ASCITE TENSA

Lívia Maria Camargo Silva

Orientador: Prof. Dr. Alex Vainey Callado França

Dissertação de Mestrado apresentada em 29/10/2008

É frequente a presença de dispnéia em pacientes cirróticos com ascite. Além disto, parâmetros de função respiratória podem estar alterados, bem como disfunção alvéolo-capilar. Um desequilíbrio na relação ventilação/perfusão pode ser a principal causa destes achados. No tratamento da ascite, a paracentese terapêutica é um método seguro e eficaz para redução do líquido ascítico, sem que haja necessidade de permanência hospitalar. A utilização deste método terapêutico parece interferir positivamente nos parâmetros de função pulmonar e de trocas gasosas. Os objetivos deste estudo foram avaliar os parâmetros de função pulmonar e dos gases sanguíneos arteriais de pacientes cirróticos com ascite tensa e avaliar os efeitos da paracentese terapêutica nos parâmetros de função pulmo-

nar e dos gases sanguíneos arteriais. Seis pacientes do sexo masculino, com idade média de 62 anos (de 46 a 72 anos) com diagnóstico de cirrose hepática e ascite tensa foram incluídos neste estudo. Foram realizadas 15 avaliações de prova de função pulmonar e 10 de gasometria arterial antes e após a paracentese, para verificar os valores dos volumes e capacidades pulmonares e dos gases sanguíneos arteriais. Houve melhora significativa nos valores da espirometria de capacidade vital, capacidade residual funcional, volume de reserva expiratório e volume respiratório forçado no primeiro segundo. Não houve mudança significativa nos valores dos gases sanguíneos arteriais. Concluímos que, pacientes com cirrose e ascite tensa, apresentam diminuição dos volumes pulmonares e disfunção alveolo-capilar leve, porém não foram notadas alterações nos valores dos gases sanguíneos arteriais. Após a paracentese terapêutica, somente os valores de função pulmonar melhoraram significativamente.

## ESTUDO DA ATIVAÇÃO DA COAGULAÇÃO E SUA RELAÇÃO COM AS CITOCINAS REGULADORAS DA INFLAMAÇÃO NUM MODELO TRANSGÊNICO DE LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA

Maria Carolina Tostes Pintão

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Magalhães Rego

Tese de Doutorado apresentada em 29/10/2008

**Introdução:** A coagulopatia associada à leucemia promielocítica aguda (LPA) é caracterizada por ativação difusa da coagulação, fibrinólise e proteólise. Os blastos da LPA produzem citocinas inflamatórias como TNF e IL1 $\beta$ , as quais regulam negativamente as propriedades anticoagulantes do endotélio vascular normal e estimulam suas propriedades pró-coagulantes. Entretanto, o papel *in vivo* das citocinas pró-inflamatórias na coagulopatia associada à LPA é desconhecido. Camundongos transgênicos hCG-PML/RAR $\alpha$  desenvolvem uma forma de leucemia mielóide aguda semelhante a LPA humana do ponto de vista morfológico, molecular e quanto a resposta a diferentes terapias, entretanto nenhum estudo até hoje determinou se há e quais são as alterações da hemostasia neste modelo.

**Objetivos:** a) investigar a existência de alterações laboratoriais sugestivas de coagulação intravascular disseminada (CIVD) por meio da dosagem do complexo trombina-antitrombina (TAT) e do inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI1); b) pesquisar a presença de trombos e/ou hemorragia por meio da análise histopatológica e da histoquímica; c) determinar os níveis séricos de citocinas pró e antiinflamatórias (IL6, IL10, MCP1, INF $\gamma$ , TNF e IL12p70); d) correlacionar estes parâmetros (quando alterados) com o tamanho da massa tumoral. Métodos: Foram avaliados 12 animais leucêmicos e 22 animais selvagens como controles. O sangue foi coletado por punção cardíaca

utilizando seringa com citrato 3,2%, e o plasma obtido por centrifugação e estocado -80°C até a realização dos testes. A dosagem do TAT e da atividade do PAI1 foram feitas por ELISA. As citocinas foram dosadas usando o teste "BD™ CBA Mouse Inflammation Kit" (do inglês, *Cytometric Bead Array, kit inflamatório de camundongos*). A análise histológica foi realizada em cortes de medula óssea, baço, fígado, pulmão, rim, cérebro e coração incluídos em parafina e corados com HE, enquanto a deposição de fibrina foi avaliada por histoquímica usando a técnica da hematoxilina ácida fosfotúngstica de Mallory (PTAH). Os dados foram expressos pela mediana (25°-75° percentis), as comparações entre animais leucêmicos e controles foram feitas pelo método de Mann-Whitney (bicaudal), e as correlações entre as variáveis por meio da correlação de Pearson.

**Resultados:** Os níveis plasmáticos do TAT estavam elevados nos animais leucêmicos em comparação aos selvagens [48,1 ng/ml (37,7 ng/ml - 61,4 ng/ml) *versus* 17,7 ng/ml (10,9 ng/ml - 34,3 ng/ml) respectivamente; p=0,010]. Atividade do PAI1 também estava elevada nos animais leucêmicos em comparação aos controles [10,4 ng/ml (2,3 ng/ml - 21,5 ng/ml) *versus* 0,8 ng/ml (0,6 ng/ml - 1,5 ng/ml), respectivamente; p=0,002]. Análise histológica confirmou o diagnóstico de leucemia, mas não houve sinais de trombose ou sangramento nos cortes analisados. Também não houve sinais de deposição de fibrina pela coloração PTAH. Dentre as citocinas avaliadas apenas os níveis de TNF foram significativamente diferentes nos animais leucêmicos em comparação aos controles [18,7 pg/ml (13,8 pg/ml - 26,6 pg/

ml) *versus* 3,9 pg/ml (3,5 pg/ml - 5,8 pg/ml) em leucêmicos e controles respectivamente;  $p < 0,002$ ]. Os níveis do TAT não se correlacionaram aos do TNF, ao peso do baço (expresso como fração do peso corporal) ou ao número de blastos na medula óssea. Ao contrário observamos correlação direta entre os níveis de PAI1 e o TNF ( $p = 0,008$ ). Conclusões: Demonstramos pela primeira vez que os camundongos transgênicos hCG-PML/RAR $\alpha$  leucêmicos apresentam ativação espontânea da coagulação com elevação do TAT e

do PAI1, mas sem evidências histológicas de deposição de fibrina. Níveis aumentados de TNF também foram detectados, e correlacionaram-se diretamente com os níveis de PAI1. Estes dados sugerem que o TNF, mas não as demais citocinas testadas, tem papel relevante na patogênese da LPA. Além disto, nossos resultados demonstraram a utilidade do modelo transgênico para o estudo da fisiopatologia da coagulopatia associada à LPA, e sendo de valia no desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas.

## ESTRESSE ORGÂNICO E ATIVIDADE ANTI E PRÓ-OXIDANTE NA QUEIMADURA AGUDA E NO PÓS-OPERATÓRIO DE CIRURGIA REPARADORA DE SEQUELAS DO TRAUMA TÉRMICO

**Paula Pileggi Vinha**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Selma Freire de Carvalho da Cunha  
Dissertação de Mestrado apresentada em 31/10/2008

**Introdução:** O estresse orgânico decorrente da queimadura é intenso e prolongado. O hipermetabolismo e o hipermetabolismo secundários alteram o sistema de pró e antioxidantes. Pela necessidade de reepitelização da área doadora e receptora, a cirurgia reparadora pode desencadear ou perpetuar o estresse oxidativo.

**Objetivos:** Em pacientes vítimas de trauma térmico agudo (Grupo Queimadura) e naqueles em pós-operatório de sequelas de queimaduras (Grupo Sequela), comparar o estresse oxidativo e os níveis de anti e pró-oxidantes com os obtidos no pré-operatório de pacientes com sequelas de queimaduras (Grupo Controle).

**Casística e métodos:** O estudo foi conduzido na Unidade de Queimados do HCFMRP-USP. O Grupo Queimadura ( $n = 11$ ) incluiu pacientes com  $\leq 48$  horas do trauma térmico agudo, SCQ  $\geq 10\%$ . Os pacientes que necessitaram de correção cirúrgica das sequelas do trauma térmico, ocorrido  $\geq 1$  ano ( $n = 8$ ), foram avaliados no pré-operatório (Grupo Controle) e após 48 horas-da cirurgia (Grupo Sequela). Todos os voluntários foram submetidos à antropometria e quantificação da ingestão alimentar. Foi realizada a avaliação laboratorial do estado nutricional, dos marcadores da atividade inflamatória e dos anti e pró-oxidantes.

**Resultados:** Em pacientes vítimas de trauma térmico agudo, foi documentado estresse orgânico caracterizado

pelo aumento das proteínas de fase aguda como a PCR [8,76 (0,91 - 34,54) vs 0,40 (0,01 - 0,97)mg/dL,  $p = 0,0004$ ] e ferritina (254,45  $\pm$  84,25 vs 145,10  $\pm$  88,80ng/mL,  $p = 0,014$ ), além da diminuição da albumina (3,55  $\pm$  0,65 vs 4,16  $\pm$  0,26g/dL,  $p = 0,004$ ), da transferrina (110,67  $\pm$  55,13 vs 238,70  $\pm$  67,99mg/dL,  $p = 0,0003$ ), do colesterol (126,82  $\pm$  32,19 vs 193,75  $\pm$  51,64mg/dL,  $p = 0,002$ ) e triglicérides séricos (95,54  $\pm$  36,84 vs 168,75  $\pm$  54,83mg/dL,  $p = 0,003$ ), ferro [30,00 (6,00-73,00) vs 109,00 (70,00 -252,00)] $\mu$ g/dL,  $p = 0,0004$ ] e zinco (63,55  $\pm$  23,34 vs 92,72  $\pm$  16,65mg/dL,  $p = 0,014$ ). O estresse oxidativo diminuiu os níveis séricos das vitaminas C [0,45 (0,34-1,30) vs 0,93 (0,48 - 1,30)mg/dL,  $p = 0,016$ ], A (1,55  $\pm$  0,87 vs 3,35  $\pm$  0,72) $\mu$ mol/L,  $p = 0,0002$ ) e da vitamina E (9,49  $\pm$  3,4 vs 4,96  $\pm$  1,60) $\mu$ mol/g lipídeo,  $p = 0,003$ ). Não houve modificação nos níveis do GSH [40,37 (30,27 -87,46) vs 49,90 (10,09 - 54,95)] $\mu$ mol/L,  $p = 0,48$ ] e do MOA [1,75 (1,15 -2,74) vs 1,77 (1,62 -6,82)nmol/g proteína,  $p = 0,043$ ]. O procedimento cirúrgico para correção das sequelas de queimaduras determinou aumento da proteína C reativa [0,40 (0,01 - 0,97) vs 2,53 (0,56 -4,70)mg/dL,  $p = 0,01$ ], mas não alterou os níveis de anti e pró-oxidantes, exceto a diminuição dos níveis séricos de vitamina A (3,35  $\pm$  0,72 vs 2,52  $\pm$  0,90)-mol/L,  $p = 0,006$ ).

**Conclusões:** O estresse orgânico decorrente do trauma térmico agudo diminuiu as respostas anti-oxidantes. Exceto pela queda nos níveis séricos de vitamina A, a cirurgia para correção das cicatrizes das queimaduras acarretou estresse orgânico, sem modificação na resposta anti e pró-oxidante.

## PROGRAMAS DE HIDROGINÁSTICA PARA PERDA DE PESO E MELHORA DE PERFIL METABÓLICO EM OBESAS

**Renata Pereira Calhau**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paula Garcia Chiarello  
Dissertação de Mestrado apresentada em 31/10/2008

A hidroginástica é uma modalidade de exercício com mínimo impacto em articulações, frequentemente utilizada

na busca por perda de peso, especialmente por grandes obesos. Neste trabalho, foram comparados os efeitos de dois tipos de programas de hidroginástica (contínuo e intervalado) em tempos inicial e final para as variáveis: peso, composição corporal, gasto energético de repouso, parâmetros bioquímicos, registro alimentar e qualidade de vida.

Foram selecionadas 27 mulheres entre 30 e 53 anos, com IMC entre 30 e 54,2 Kg/mm<sup>2</sup>, acompanhadas em dois programas: Grupo A, hidroginástica com exercícios contínuos de intensidade moderada, duração de dois meses com 3 sessões por semana; e Grupo B: hidroginástica com exercícios intervalados de intensidade alta, com mesma duração e quantidade de sessões. Antes e ao final dos programas foram realizados exames de calorimetria indireta, coletados dados antropométricos (peso, altura, e circunferências), sangue em jejum para análise de glicemia e perfil lipídico e aplicado registro alimentar e questionário de qualidade de vida SF-36. As voluntárias não foram orientadas a fazer dieta hipocalórica durante a intervenção da hidroginástica, porém foram convidadas a assistir quatro aulas de 50 minutos sobre a importância da reeducação alimentar após quatro semanas de intervenção. Foi utilizado um modelo de Wilcoxon para analisar e comparar os dados, considerando  $p < 0,05$  para resultados estatisticamente significativos. Quando comparado o valor das médias nos tempos inicial (T0) e final (T1) houve diferença significativa no grupo A

para reduções de peso, IMC, massa gordurosa, circunferência do braço, circunferência do quadril, circunferência da coxa, gasto energético de repouso e aumentos nos aspectos sociais, dor e vitalidade. No grupo B, quando comparados T0 e T1, foi apresentada diferença significativa para reduções de massa gorda, circunferência do braço, ingestão de energia total e carboidratos, e aumentos nos aspectos vitalidade e estado de saúde e na glicemia de jejum, embora esta tenha se mantido dentro dos níveis de normalidade, conforme preconizado. Não foram observadas outras alterações significativas em medidas corporais e parâmetros bioquímicos após ambos os programas. Exercícios contínuos na água, de intensidade moderada, são mais eficientes para perda de peso e massa de gordura do que exercícios intervalados na água, de intensidade alta; e em geral, programas curtos de hidroginástica, sem restrição energética orientada, são ineficientes para se alcançar perda de peso considerável, mudança em gasto energético ou alterações em glicemia e lipídios sanguíneos, mas pode melhorar a vitalidade para os praticantes.

### **TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA DE CRÂNIO NO ATENDIMENTO AO TRAUMATIZADO NUM SERVIÇO UNIVERSITÁRIO: CORRELAÇÕES ENTRE NÍVEIS DE GRAVIDADE, INDICAÇÕES E CUSTOS**

**Marcus Vinicius Nascimento Valentin**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ângela Delete Bellucci

Dissertação de Mestrado apresentada em 17/11/2008

O trabalho consiste na caracterização do nível de gravidade e na investigação radiológica utilizada no atendimento ao paciente traumatizado, por meio da análise sistemática de todas as tomografias computadorizadas de crânio realizadas em pacientes vítimas de trauma, atendidos ao longo do ano de 2005. Trata-se de estudo retrospectivo, em que foram analisados todos os pacientes de todas as faixas etárias atendidos na Sala de Trauma da Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, no período de 01 de janeiro a 31 de dezembro de 2005. A média mensal de atendimento foi de 228 traumatizados, tendo sido analisados um total de 2735 prontuários. Foram excluídos do estudo os pacientes traumatizados que faleceram antes da realização de qualquer avaliação radiológica e pacientes sem registro no sistema de laudos de tomografia de crânio emitidos eletronicamente. Os objetivos do estudo foram caracterizar a gravidade dos pacientes em termos de índices de trauma, avaliar as indicações e o resultado das tomografias de crânio por meio dos relatórios eletrônicos emitidos e estimar os custos, em moeda nacional, dispendidos com o número de exames tomográficos de crânio solicitados para o traumatizado, seguindo os protocolos básicos recomendados pelo ATLS® e a literatura médica científica disponível. Do total de 2735 pacientes vítimas de trauma

atendidos na Unidade de Emergência, foram realizados 1123 exames de TC de crânio em 763 pacientes no ano de 2005. Os índices de trauma, que são sistemas de pontuação criados para avaliar as alterações fisiológicas, a gravidade das lesões anatômicas e a probabilidade de sobrevivência dos pacientes traumatizados, também foram coletados neste estudo. Os índices usados foram o RTS (*Revised Trauma Score*), o ISS (*Injury Severity Score*) e o TRISS (*Trauma Score and Injury Severity Score*). Os resultados do estudo foram obtidos por meio da coleta de dados dos índices de trauma, que foram correlacionados com os resultados das tomografias de crânio, pontuação na escala de coma de Glasgow e custos dispendidos com estes exames. Assim, foi possível caracterizar o perfil de gravidade do trauma cranioencefálico como leve (Glasgow 14-15), moderado (Glasgow 9-13) e grave (3-8), inclusive com análise pormenorizada na população pediátrica ( $\leq 12$  anos) e idosa ( $\geq 60$  anos), que costumam trazer consequências graves para serviços de atendimento a trauma. Depois da análise dos dados coletados, observamos que o número de solicitações de tomografia de crânio em pacientes com pontuação 15 na escala de coma de Glasgow foi elevado, quando comparamos com os critérios recomendados pela literatura médica científica, assim como as solicitações para exames-controle, que também foi exagerada, pois nem sempre houve constatação de piora do estado neurológico do paciente que justificasse a solicitação de novo exame. O trabalho conclui que o uso da tomografia de crânio na admissão hospitalar não deve ser utilizado em pacientes assintomáticos com pontuação 15

na escala de coma de Glasgow, optando-se por conduta observatória/expectante e que exames-controle apenas devem ser solicitados quando houver piora clínica durante a

observação do paciente com TCE. Desta maneira, os recursos financeiros, humanos e tecnológicos poderão ser mais bem aproveitados.

### **CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDOS GRAXOS E DE AMINOÁCIDOS EM TECIDO TUMORAL E TECIDO NORMAL ADJACENTE DE PACIENTES COM CARCINOMA ESPINOCELULAR DE MUCOSA DE CABEÇA E PESCOÇO**

**Izabel de Arruda Leme**

Orientador: Prof. Dr. Júlio Sérgio Marchini

Dissertação de Mestrado apresentada em 02/12/2008

A alta taxa de replicação celular no tumor, aumenta a demanda de ácidos graxos para composição de membrana e de nucleotídeos para síntese de DNA. Visto que a síntese de ambos depende de intermediários do ciclo de Krebs e que no tumor a maior parte da glicose disponível é convertida a ácido láctico (e não a acetil-coA, como ocorre na célula normal), a glutamina passa a ser a principal fonte de intermediários do ciclo de Krebs para síntese de ácidos graxos e de nucleotídeos. Além da glutamina, outros aminoácidos têm seu metabolismo alterado no tumor. Assim, os objetivos do trabalho foram comparar o perfil de ácidos graxos e de aminoácidos em tecido tumoral e tecido normal adjacente de pacientes com carcinoma espinocelular de mucosa de cabeça e pescoço, quantificar lipídeos totais nas amostras e avaliar o estado nutricional dos pacientes. Participaram da pesquisa pacientes internados junto ao Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. As amostras de tecido tumoral e de tecido normal foram coletadas durante procedimento cirúrgico, após excisão do tumor. A

extração dos lipídeos e dos aminoácidos livres foi realizada pelo método de Folch. A determinação de ácidos graxos livres e totais foi realizada por cromatografia gasosa/espectrometria de massa. A análise de aminoácidos foi realizada por cromatografia gasosa com detector de chama. A avaliação nutricional incluiu: aferição de peso, estatura, dobras cutâneas e exame de impedância bioelétrica para estimativa de composição corporal, além de avaliação da ingestão alimentar por questionário de frequência alimentar. Não foi verificada diferença na concentração de lipídeos totais e dos ácidos palmítico, esteárico e oléico. Quanto à análise de aminoácidos, apenas a alanina, metionina e a lisina não mostraram diferença entre tecido tumoral e normal. Os demais aminoácidos apresentaram-se aumentados no tumor em relação à margem. A extração de aminoácidos a partir do método de Folch (desenvolvido para extração de lipídeos) possibilita a determinação de ácidos graxos e de aminoácidos livres em fragmentos bastante reduzidos de tecido, como, por exemplo, material obtido a partir de biópsia. O estado nutricional dos pacientes variou de eutrofia a sobrepeso, predominando excesso de gordura corporal, avaliado por impedância bioelétrica. A ingestão alimentar de macronutrientes mostrou-se adequada na maior parte da população avaliada.

### **ESTUDO DOS GENES DA PROOPIOMELANOCORTINA E DO RECEPTOR DA MELANOCORTINA 4 EM PACIENTES COM OBESIDADE DESDE A INFÂNCIA**

**Daniela de Godoy Nery**

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lucila Leico Kagohara Elias

Dissertação de Mestrado apresentada em 04/12/2008

A regulação da homeostase energética envolve o hipotálamo e a participação de circuito de sinais orexígenos e anorexígenos. Entre esses últimos, destaca-se a participação do sistema da melanocortina em que o  $\alpha$ -MSH, neuropeptídeo derivado da proopiomelanocortina (POMC), tem efeitos anorexígenos que são mediados pelo receptor 4 da melanocortina (MC4-R). Mutações e polimorfismos nesses genes têm sido associados à obesidade grave de início precoce. Os objetivos do presente estudo foram avaliar a ocorrência de co-morbidades e realizar a análise molecular dos genes POMC e MC4R em pacientes com obesidade de início precoce. Foram incluídos 88 pacientes obesos (41/

45% do sexo feminino) com idade de  $11,9 \pm 4,2$  anos (0,8 - 21,2 anos) com início de obesidade anteriormente aos 10 anos de idade, acompanhados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP e 88 indivíduos controles com peso normal e sem história familiar de diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Nos pacientes foi realizada coleta das amostras de sangue para análise bioquímica e molecular, enquanto que nos indivíduos controles realizou-se apenas a análise molecular. A resistência à insulina foi estimada pelo índice de resistência insulínica *Homeostasis Model Assessment* (HOMA-IR) e pela relação glicose/insulina. No presente estudo 42% dos pacientes avaliados se tornaram obesos no primeiro ano de vida. A obesidade grave (Score Z do IMC > 3) foi encontrada em 16% dos casos. Doenças relacionadas à obesidade tiveram uma frequência elevada, com HAS em 38%, dislipidemia (DLP) em 63%, DM2



em 5%, GJA em 8%, hiperinsulinemia em 36% e resistência insulínica (HOMA-IR) em 51% dos casos. A concentração plasmática de leptina foi maior nos pacientes do sexo feminino, não havendo diferença entre o estágio puberal, tanto entre as meninas quanto entre os meninos. Foram encontrados dois polimorfismos no gene POMC, g.4512C > T (p.=Cys6Cys; rs8192605; frequência alélica de 0,0056) e g.8246C > T (rs1042571; frequência alélica de 0,0056), em pacientes obesos e duas alterações no gene MC4R, g.497A > G (p. Tyr35Cys; frequência alélica de 0,0056) e g.987C > T (p.=Ile198Ile; frequência alélica de 0,012), em pacientes obe-

sos e um polimorfismo, g.700G > A (p. Val103Ile; rs2229626; frequência alélica de 0,0056), em um indivíduo controle. Assim, o presente estudo indica que a obesidade de início precoce está associada à resistência insulínica, dislipidemia e hipertensão arterial sistêmica. Portanto, medidas de intervenção nutricional e mudança de estilo de vida devem ser introduzidas precocemente, visando a redução de comorbidades associadas à síndrome metabólica na vida adulta. Neste grupo de pacientes com obesidade desde a infância mutações ou polimorfismos nos genes POMC e MC4R não foram encontrados em frequência significativa.

## DISTRIBUIÇÃO DE GORDURA CORPORAL E PERFIL METABÓLICO EM OBESAS COM SÍNDROME DO OVÁRIO POLICÍSTICO

**Fernanda Rodrigues de Oliveira Penaforte**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Paula Garcia Chiarello

Dissertação de Mestrado apresentada em 04/12/2008

A Síndrome do Ovário Policístico (SOP) é uma das desordens endócrinas mais comuns no gênero feminino, afetando entre 5-10% das mulheres em idade reprodutiva. Grande parte das mulheres com diagnóstico de SOP, entre 50-90% (dependendo do critério diagnóstico utilizado), apresenta resistência a insulina (RI), e tal quadro torna-se mais grave na presença de obesidade. Diante disto, o objetivo do trabalho foi avaliar a composição corporal total e segmentada, especialmente em região abdominal, e suas relações com o perfil metabólico de mulheres obesas com Síndrome do Ovário Policístico. A amostra foi composta por 31 indivíduos com SOP, obesas e com RI. Foram também avaliadas 15 mulheres obesas sem SOP (grupo controle), controladas em relação à idade, peso e IMC, para comparação das variáveis relacionadas à composição corporal perfil metabólico. Realizaram-se medidas antropométricas de peso, estatura, cálculo do IMC, circunferências da cintura, abdômen, quadril, tronco e pescoço e a avaliação da composição corporal, feita pelo método da impedância bioelétrica (BIA) total e

dos segmentos do braço, perna e tronco. A tomografia computadorizada foi realizada para avaliar a gordura abdominal, visceral, do tronco e da perna. Não foram observadas diferenças em nenhum dos parâmetros antropométricos e de composição corporal avaliados entre os grupos SOP e grupo controle. Mesmo estando em uso de medicamento para melhora da sensibilidade à insulina, 64,5% das mulheres com SOP apresentaram exames compatíveis com RI. Mulheres obesas com SOP e RI apresentaram maiores quantidades de gordura visceral ( $78,4 \pm 23,5\text{g} \times 60,2 \pm 20,3\text{g}$ ) e gordura no tronco ( $374,0 \pm 78,1\text{g} \times 282,4 \pm 83,4\text{g}$ ), ambas avaliadas pela TC, do que as sem RI, além de apresentarem menores quantidades de gordura na região do braço ( $16,0 \pm 2,6\text{kg} \times 18,1 \pm 2,1\text{kg}$ ). O consumo alimentar das mulheres com SOP mostrou inadequado principalmente em relação ao consumo abaixo do recomendado de fibras, cálcio e folato e distribuição dos tipos de lipídios na dieta (alto consumo de gorduras saturadas e baixo de gorduras mono e poli-insaturadas). Os resultados do trabalho indicam que o acúmulo de gordura no gênero feminino parece estar sendo preferencialmente localizado na região central do corpo, independente da presença da SOP. Já a presença de RI associada à SOP foi acompanhada de aumentos da adiposidade tanto na região visceral quanto do tronco.

## ETIOPATOGENIA DA OSTEODISTROFIA HEPÁTICA: ANÁLISE BIOMECÂNICA, HISTOMORFOMÉTRICA E IMUNOISTOQUÍMICA DE FATOR I DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA (IGF-I) E DE RECEPTOR DE HORMÔNIO DE CRESCIMENTO (R-GH), EM MODELO EXPERIMENTAL DE COLESTASE

**Francisco de Assis Pereira**

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Albuquerque de Paula  
Tese de Doutorado apresentada em 08/12/2008

A fisiopatologia da osteodistrofia hepática (OH) permanece pouco compreendida. Nosso objetivo foi avaliar por

meio de ensaio biomecânico, de histomorfometria óssea e de imunistoquímica de IGF-I e de R-GH em tecido hepático e em cartilagem de crescimento a etiopatogenia da OH. Quarenta e seis ratos machos da linhagem Wistar foram divididos em dois grupos: grupo controle operado (GCO: n = 23) e grupo colestase (GCol: n = 23). Os animais foram sacrificados no 30º dia pós-operatório. A imuno-istoquímica de

IGF-I e de R-GH foi realizada em tecido hepático e em cartilagem de crescimento da tíbia esquerda; a análise histomorfométrica foi realizada na tíbia direita e o ensaio biomecânico foi realizado no fêmur direito. Todos os animais do grupo colestase apresentaram alterações histopatológicas compatíveis com cirrose biliar secundária. A rigidez e a força máxima para ocasionar a fratura na diáfise do fêmur foram respectivamente, 24% ( $p < 0,01$ ) e 53% ( $p < 0,003$ ) menor no GCol comparado ao GCO. A avaliação histomorfométrica mostrou menor volume ósseo trabecular e menor conectividade no GCol, compatível com osteoporose. Este grupo também mostrou aumento no tempo de mineraliza-

ção, caracterizando distúrbio de mineralização. As concentrações séricas de IGF-I foram menores no sacrifício quando comparado ao basal no GCol (Início do experimento: GCol =  $1816 \pm 336$  vs Final do experimento: GCol =  $1062 \pm 191$  ng/ml;  $p < 0,0001$ ). Este grupo apresentou maior expressão de IGF-I ( $p < 0,0002$ ) e menor expressão de R-GH ( $p < 0,0001$ ) no tecido hepático do que o grupo GCO. Na cartilagem de crescimento, a expressão de IGF-I ( $p < 0,0001$ ) e R-GH ( $p < 0,04$ ) foram significativamente maiores no GCO. Nossos dados reforçam que a osteoporose é o principal componente da OH e que alterações no sistema IGF-I endócrino e parácrino têm papel chave neste processo.

### ESTUDO DO POLIMORFISMO GENÉTICO Val/Leu<sup>247</sup> DA $\beta$ 2-GLICOPROTEÍNA I EM PACIENTES COM SÍNDROME DO ANTICORPO ANTIFOSFOLÍPIDE

**Juliana Maria Pernambuco Clímaco**

Orientador: Prof. Dr. Paulo Louzada Júnior

Dissertação de Mestrado apresentada em 10/12/2008

A Síndrome do Anticorpo Antifosfolípide (SAF) é caracterizada por eventos trombóticos arteriais e/ou venosos e/ou complicações obstétricas associados à persistente presença de anticorpos antifosfolípidos. A  $\beta$ 2-glicoproteína I ( $\beta$ 2GPI) é o principal auto-antígeno para a produção de anticorpos antifosfolípidos envolvidos na doença. Estudos prévios sugerem que o polimorfismo genético da  $\beta$ 2GPI pode influenciar a produção de auto-anticorpos na SAF. O presente trabalho tem por objetivo estudar o polimorfismo do códon 247 do gene que expressa a  $\beta$ 2GPI em 61 pacientes com SAF primária e 33 pacientes com SAF secundária e em 100 controles, e sua associação com as manifestações clínicas e laboratoriais da SAF, incluindo os anticorpos anti- $\beta$ 2GPI. O polimorfismo genético Val/Leu<sup>247</sup>

foi determinado pela reação da polimerase em cadeia e digestão de seu produto por enzima específica. A presença de anticorpos anti- $\beta$ 2GPI foi detectada por teste imunoenzimático (ELISA). Foi utilizado o teste exato de Fischer para análise dos resultados. Observou-se aumento na frequência do alelo V e do genótipo VV no grupo total de pacientes com SAF em comparação com o grupo controle ( $P = 0,0068$ ; OR = 1,781 e  $P < 0,0001$ ; OR = 6,413, respectivamente). Os pacientes com trombose arterial e venosa apresentaram o genótipo VV significativamente mais frequente que o grupo controle saudável (52% e 44%, respectivamente, vs. 13%). Os pacientes com SAF com anticorpos anti- $\beta$ 2GPI presentes apresentaram o genótipo VV mais frequentemente que o controle saudável ( $P < 0,0001$ ; OR = 8,179). Os resultados deste estudo sugerem que o genótipo VV do códon 247 do gene da  $\beta$ 2GPI pode desempenhar papel na produção de anticorpos anti- $\beta$ 2GPI e, talvez, na expressão de trombose arterial e venosa nos pacientes com SAF.

### EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM TUMORES HIPOFISÁRIOS SECRETORES DE ACTH

**Fernando Colbari do Amaral**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Margaret de Castro

Tese de Doutorado apresentada em 15/12/2008

**Introdução:** A patogênese dos tumores hipofisários tem sido extensivamente estudada, porém ainda é pouca esclarecida. São descritas alterações em genes que controlam o ciclo celular, em genes envolvidos na diferenciação e no desenvolvimento hipofisário, na apoptose, além de fatores hipotalâmicos e de crescimento. Recentemente, a expressão diferencial de microRNAs (miRNAs) também tem sido associada à tumorigênese hipofisária.

**Objetivos:** avaliar a expressão gênica diferencial em corticotrofinomas em relação ao tecido hipofisário normal,

para selecionar genes candidatos envolvidos no processo de tumorigênese; validar alguns dos genes candidatos diferencialmente expressos; analisar a expressão relativa de um painel de miRNAs nas amostras de corticotrofinomas em comparação ao tecido normal; analisar a associação de genes e miRNAs diferencialmente expressos com diâmetro tumoral e remissão após-cirurgia transesfenoidal.

**Material e Métodos:** utilizamos a técnica de análise seriada da expressão gênica (SAGE). Para confecção das bibliotecas de cDNA três amostras de hipófises normais e duas de corticotrofinomas foram utilizadas. Por análise de bioinformática, selecionamos os genes diferencialmente expressos T-PIT, RASD1, GLUL, PCDH21, GJA1, F11R e DLK1 para validação por PCR em tempo real (qPCR). A expressão

dos miRNAs let-7a, miR-15a, miR-16, miR-21, miR-141, miR-143, miR-145 e miR-150 também foi analisada por qPCR. Para validação desses genes e miRNAs foram utilizadas 14 amostras tumorais e 7 hipófises normais.

**Resultados:** Não houve validação dos genes T-PIT, RASD1, GLUL, PCDH21, GJA1, F11R nas amostras de corticotrofinomas pela qPCR; o gene DLK1 apresentou uma hipotensão em relação ao tecido normal. Não houve associação entre a expressão de nenhum desses genes com tamanho tumoral ou remissão pós-cirurgia. Nosso trabalho demonstrou uma redução significativa da expressão dos miR-145 (1,8x), miR-21 (2,2x), miR-141 (2,8x), miR-150 (3,2x), let-7a (3,4x), miR-16 (4,6x), miR-15a (5,0x) e miR-143 (8,0x) nas amostras de corticotrofinomas em relação ao tecido normal. Houve uma associação entre a expressão do miR-141 e remissão pós-cirurgia, assim como a expressão do miR-143 e tamanho tumoral. Observamos, ainda, uma correlação negativa da expressão de let-7a com a de GLUL e uma correlação positiva com a expressão de DLK1; a expressão de miR-16 apresentou correlação negativa apenas com a de

TPIT; a expressão de miR-21 apresentou uma correlação negativa com as de TPIT, RASD1 e GLUL; a expressão de miR-141 apresentou uma correlação negativa com a de GLUL e de GJA1, além de uma correlação positiva com a de DLK1. As expressões de miR-15a, miR-143, miR-145 e miR-150 não apresentaram correlação com as de nenhum dos genes estudados.

**Conclusões:** Nossos resultados demonstram que o critério de escolha dos genes diferencialmente expressos não foi útil para validação dos possíveis genes envolvidos na gênese dos corticotrofinomas. A expressão reduzida dos miRNAs e a associação da expressão de alguns deles com genes envolvidos na proliferação e diferenciação celular, assim como com remissão e tamanho tumoral sugerem um possível papel dos mesmos na tumorigênese corticotrófica. Entretanto, a necessidade de aprimoramento na seleção de genes candidatos diferencialmente expressos e o desconhecimento de genes alvo para cada miRNA dificultam o entendimento das funções biológicas desses genes e dos miRNAs na tumorigênese corticotrófica.

## AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TIAMINA OU BENFOTIAMINA SOBRE SISTEMA ANTIOXIDANTE HEPÁTICO EM MODELO EXPERIMENTAL AGUDO DE ALCOOLISMO

**Guilherme Vannucchi Portari**

Orientador: Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior

Tese de Doutorado apresentada em 15/12/2008

Os mecanismos propostos para a gama de ações deletérias provocadas pelo etanol são decorrentes de alterações bioquímicas ocorridas nos hepatócitos tais como: 1) aumento da geração de radicais livres; 2) produção exacerbada de intermediários de alta reatividade vindos de peroxidação de macromoléculas, e 3) depleção de substâncias da defesa antioxidante. A utilização de antioxidantes visando restaurar o sistema antioxidante é uma das linhas de tratamento para os danos provocados pelo etanol. Recentemente, estudos têm apontado para um possível papel antioxidante da tiamina e benfotiamina com efeitos benéficos principalmente em doenças crônicas-degenerativas.

Assim este estudo verificou o papel da tiamina ou benfotiamina no sistema antioxidante hepático em ratos com intoxicação aguda por etanol. Verificou-se que o tratamento com tiamina e benfotiamina teve influência no metabolismo do etanol ficando este mais circulante sem metabolização. Os tratamentos foram eficazes em aumentar os valores hepáticos de tiamina, o que resultou em diminuição dos danos hepáticos e diminuição de vitaminas antioxidantes do fígado. Além disso, a benfotiamina foi capaz de aumentar em 25 vezes os níveis eritrocitários de tiamina não fosfatada em relação à administração de tiamina hidrocloreto. Desta maneira ficou constatada a atividade antioxidante da tiamina frente ao estresse oxidativo provocado pela intoxicação aguda por etanol e a alta biodisponibilidade da benfotiamina. Assim sendo seria recomendada a utilização da benfotiamina como antioxidante mais biodisponível que a tiamina.

## ESTUDO VIDEOFLUOROSCÓPICO DA DEGLUTIÇÃO NA DOENÇA DE CHAGAS

**Carla Manfredi dos Santos**

Orientador: Prof. Dr. Roberto Oliveira Dantas

Dissertação de Mestrado apresentada em 17/12/2008

**Introdução:** As alterações motoras do esôfago presentes na doença de Chagas podem ocasionar sintomas de alteração da deglutição como a disfagia. A disfagia na doença de Chagas está relacionada ao envolvimento esofágico,

entretanto, alterações orofaringenas têm sido demonstradas nestes pacientes.

**Objetivo:** Estudar as fases oral e faríngea da deglutição em pacientes com sorologia positiva para doença de Chagas e comparar com indivíduos voluntários assintomáticos.

**Metodologia:** Foram estudados 17 pacientes com doença de Chagas (idades entre 31-67 anos, média 53,3

anos) e 15 sujeitos saudáveis (idades entre 35-69 anos, média 55,2). Todos os doentes apresentavam queixa de disfagia e possuíam o diagnóstico de megaesôfago a partir da radiografia contrastada. Os dois grupos responderam a um questionário sobre a história pregressa da queixa de deglutição e posteriormente foram submetidos a uma avaliação clínica fonoaudiológica. Após este procedimento, foi realizado o exame videofluoroscópico da deglutição a fim de observar sua conformação anatômica e funcional, com registro na velocidade de 60 quadros por segundo. Foram realizadas deglutições em duplicata nos volumes de 5 e 10 ml de sulfato de bário na consistência líquida e pastosa, nos dois grupos. Este exame permitiu analisar a deglutição de forma qualitativa e quantitativa, sendo possível a observação dos seguintes parâmetros: movimento da base da língua, trânsito oral, trânsito faríngeo, duração do movimento do osso hióide, trânsito pelo esfíncter superior do esôfago, depuração faríngea e trânsito orofaríngeo. Além disso, pôde-se observar ocorrência de escape posterior do alimento, resíduo oral, resíduo faríngeo, penetração e aspiração laringotraqueal.

**Resultados:** Quanto aos resultados da avaliação clínica fonoaudiológica, a elevação laríngea foi reduzida na deglutição do alimento líquido e pastoso no grupo chagásico em relação ao grupo controle ( $p < 0,01$ ). O grupo cha-

gásico realizou manobras de deglutição múltipla nas consistências líquida e pastosa em comparação ao grupo saudável ( $p < 0,01$ ). Os pacientes com megaesôfago grau II apresentaram mais queixa de alteração respiratória durante a deglutição ( $p < 0,05$ ) e de perda de peso ( $p < 0,01$ ) quando comparados aos pacientes com megaesôfago grau I. O exame videofluoroscópico mostrou diferenças estatísticas significativas para os seguintes tempos das variáveis estudadas: trânsito oral, trânsito faríngeo, trânsito pelo esfíncter superior do esôfago, depuração faríngea e trânsito orofaríngeo ( $p < 0,05$ ), sendo o tempo mais prolongado para o grupo de doentes. Essas diferenças foram encontradas para a consistência pastosa e no volume de 10ml, exceto para o TOF cuja diferença também ocorreu para a consistência líquida, no volume de 5ml e no TO, na consistência líquida e no volume de 10ml. Qualitativamente, houve sobre de resíduo oral na deglutição de pastoso e no volume de 10ml para o grupo chagásico ( $p < 0,02$ ).

**Conclusão:** Conclui-se nesse trabalho que o tempo de trânsito do alimento foi mais prolongado no grupo de doentes em relação ao grupo controle, principalmente na consistência pastosa e em volume maior (10ml). Esses resultados sugerem a existência de mecanismos compensatórios nos pacientes com doença de Chagas a fim de amenizar os sintomas de disfagia decorrentes da doença do esôfago.

## AValiação CLÍNICA, LABORATORIAL E MOLECULAR DE PACIENTES COM DOENÇA ADRENOCORTICAL NODULAR PIGMENTADA PRIMÁRIA OU COMPLEXO DE CARNEY

**Marcelo Pinho Bittar**

Orientador: Prof. Dr. Ayrton Custódio Moreira  
Dissertação de Mestrado apresentada em 17/12/2008

O Complexo de Carney (CNC) é uma neoplasia endócrina múltipla que cursa com tumores endócrinos, cardíacos e neurais, além de lesões mucocutâneas pigmentadas. Entre os tumores endócrinos, a doença adrenocortical nodular pigmentada primária (PPNAD) é o mais frequente. A transmissão é autossômica dominante, enquanto que alguns casos são esporádicos. O gene PRKAR1A foi identificado no locus 17q22-24 e mutações nesse gene são observadas em 60% dos pacientes com CNC. O objetivo deste trabalho foi a avaliação clínica, laboratorial e molecular de 1 paciente com PPNAD isolado e 4 com CNC, pertencentes a 4 famílias seguidas no ambulatório de Endocrinologia do HCFMRP-USP. Os dados clínicos e os achados anatomo-patológicos das adrenais foram avaliados, retrospectivamente, por meio de consulta aos prontuários; a presença de doenças endócrinas pela realização de exames laboratoriais específicos. A presença de doenças associadas foi avaliada por meio de ecocardiograma, ultra-som de tireóide e imagem da sela túrcica. Para avaliação molecular, DNA genômico foi extraído dos pacientes com PPNAD, os éxons

codificadores do gene PRKAR1A e suas regiões de transição éxon/intron foram amplificadas por PCR (reação em cadeia de polimerase) e os fragmentos submetidos ao sequenciamento automatizado. Para comparação, este gene também foi sequenciado em 50 indivíduos normais. A idade ao diagnóstico variou de 4 a 25 anos ( $16,4 \pm 7,8$  anos). Três pacientes apresentaram manchas pigmentadas; dois pacientes apresentaram mixomas cutâneo-mucosos e 1 paciente desenvolveu mixoma cardíaco; 1 paciente apresentou tumor testicular de células de Leydig. A avaliação por imagem das adrenais identificou a presença de micronódulos em 4 pacientes e volume aumentado em três deles. Encontramos 2 novas mutações no gene PRKAR1A, IVS4+5G > A e g.149A > G, em 2 de 4 famílias estudadas. Observamos uma distribuição etária bimodal da PPNAD, com grande variabilidade nas manifestações clínicas e laboratoriais. Em 75% das famílias, a PPNAD esteve associada ao Complexo de Carney. O estudo genético, com o achado da mutação g.149A > G, permitiu o diagnóstico de Complexo de Carney em uma paciente previamente diagnosticada como PPNAD isolada. Possibilitou, ainda, a detecção de mutação IVS4+5G > A no gene PRKAR1A em 2 filhas assintomáticas de outra paciente, permitindo aconselhamento genético apropriado.

## ESTUDO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DO TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

**Danielle Fernandes Godoi**

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Voltarelli

Tese de Doutorado apresentada em 18/12/2008

**Introdução e Objetivos:** O transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH) assim como quimioterapia em altas doses tem sido explorado como terapia para várias condições refratárias imuno-mediadas humanas, incluindo as doenças inflamatórias intestinais (DII). Apesar disso, o exato mecanismo imunológico pelo qual as células de medula óssea ou a imunossupressão levam à remissão destas doenças ainda não está claro. Neste trabalho, nós investigamos o papel destas terapias na modulação da inflamação da mucosa do intestino em um modelo experimental de DII.

**Métodos:** A colite experimental foi induzida em camundongos pela infusão intra-retal de 2,4,6-ácido trinitrobenzenesulfônico (TNBS). Após 24 horas os animais foram submetidos a imunossupressão com ciclofosfamida (Cy -200mg/Kg) ou por irradiação corporal total (ICT -7Gy). Após 24 e 12 horas da imunossupressão com Cy e ICT

respectivamente,  $1,6 \times 10^7$  células de medula óssea foram infundidas nos grupos TCTH. Os animais dos diferentes grupos foram estudados por 60 dias.

**Resultados:** Tanto os grupos que receberam TCTH como os que receberam imunossupressão por Cy e ICT isoladamente tiveram redução significativa do quadro clínico e histológico da colite experimental mas somente o TCTH resultou em aumento da sobrevida comparado com o grupo não tratado. Um decréscimo acentuado nas células CD4<sup>+</sup> no infiltrado inflamatório nos dias + 7 e +14 e nas células CD8<sup>+</sup> no dia 7 foi encontrado em ambos os tratamentos aliado a marcante redução nas citocinas pro-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL 12p70 e IL-17, sobretudo nos grupos Cy e Cy + TCTH.

**Conclusões:** Nossos achados indicam que a Cy em alta dose assim como a ICT associadas ou não com TCTH são efetivas em reduzir os quadros clínico e patológico associados à DII por uma proeminente contra-regulação do perfil de citocinas inflamatórias Th1 porém apenas o TCTH resultou em diminuição da taxa de mortalidade associada à colite.

## INFLUÊNCIA DA DOENÇA PERIODONTAL E SEU TRATAMENTO NA ATIVIDADE DA ARTRITE REUMATÓIDE

**Márcia de Noronha Pinho**

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Voltarelli

Tese de Doutorado apresentada em 18/12/2008

**Objetivo:** Este estudo avaliou a influência da doença periodontal (DP) na artrite reumatóide (AR), através de exames clínicos e laboratoriais, antes e depois do tratamento periodontal não cirúrgico.

**Materiais e Métodos:** 75 pacientes, entre 35-60 anos, divididos em 5 grupos, foram analisados de acordo com a situação sistêmica e periodontal. Os parâmetros clínicos e laboratoriais coletados nos exames: inicial, 3 e 6 meses receberam tratamento estatístico. As correlações para averiguar a associação das reduções da profundidade de sondagem (PS), placa microbiana (PM) e sangramento à sondagem (SS) com as reduções de  $\alpha$ -1-glicoproteína ácida (alfa1), proteína C-reativa (PCR), velocidade de hemossedimentação (VHS), questionário de saúde para avaliação de doenças reumáticas (HAQ), avaliação da atividade da doença (DAS28) e SF-36 foram também analisadas.

**Resultados:** Comparando os grupos com AR e DP, Grupo 1 (AR+DP+TR+) e Grupo 2 (AR+DP+TR-), aqueles que receberam tratamento periodontal tiveram reduções estatisticamente significativas em relação a PS aos 3 meses

( $p=0,0055$ ) e aos 6 meses ( $p=0,0066$ ). Em relação a % de sangramento à sondagem as reduções foram estatisticamente significantes aos 6 meses ( $p=0,0128$ ) e para % de placa microbiana aos 3 meses ( $p=0,0128$ ) e aos 6 meses ( $p=0,0002$ ) em favor do grupo raspado. A melhora no Grupo 1 após o tratamento periodontal não-cirúrgico (TPNC) foi estatisticamente significativa no controle periodontal, mas os exames sistêmicos, embora reduzidos, não foram significativos. O tratamento periodontal não apresentou correlação com a melhora dos exames laboratoriais, nem com os exames de qualidade de vida (HAQ, DAS 28, SF 36), mas uma melhora nos exames foi evidente nas comparações intra-grupos. A melhora periodontal influenciando os exames laboratoriais foi mais fácil de ser observada no Grupo 4 (AR-DP+TR+). Comparando o Grupo 1 com Grupo 3 (AR+PT) houve diferença estatisticamente significativa somente no DAS28 no tempo inicial e aos 3 meses. Aos 6 meses essa diferença não foi estatisticamente significativa.

**Conclusões:** Não foi possível verificar uma correlação direta do tratamento periodontal na atividade da doença sistêmica, mas pode-se constatar a sua importância, evitando a extração múltipla dos dentes nos pacientes com AR, o que, obviamente, ocasionará maior conforto para os mesmos, evitando uma possível situação de estresse.

## INADEQUAÇÃO TERAPÊUTICA DA ANTICOAGULAÇÃO COM ENOXAPARINA EM DECORRÊNCIA DE ERRO NA ESTIMATIVA INICIAL DE PESO CORPORAL

**Leon Gustavo dos Reis Macedo**

Orientador: Prof. Dr. Antonio Pazin Filho

Dissertação de Mestrado apresentada em 19/12/2008

A enoxaparina vem ganhando espaço como anticoagulante de eleição em situações para as quais se utilizava heparina não fracionada previamente. Além das evidências que sugerem igualdade ou até superioridade em termos de desfechos clínicos, a grande vantagem da enoxaparina reside na facilidade de sua posologia. Para a anticoagulação plena ela deve ser prescrita de acordo com o peso corporal. Porém, na maioria das vezes utiliza-se o peso estimado pelo médico ao invés do peso real. Já existem evidências de que em síndromes coronarianas agudas de alto risco os pacientes que não estão anticoagulados adequadamente com enoxaparina (atividade anti-Xa  $\leq 0,5$  UI/ml) apresentam risco aumentado de evolução desfavorável semelhante a idade avançada ou a disfunção ventricular esquerda. Este estudo tem como objetivo primário avaliar a adequação da anticoagulação com a enoxaparina quando se utiliza o peso estimado para sua prescrição (fase I) (atividade anti-Xa colhido após a segunda dose) e como secundário avaliar outros métodos de estimativa de peso, como peso relatado e peso obtido por fórmulas antropométricas em comparação ao peso real e evolução do nível de anticoagulação após reajuste de dose em três grupos (A: dose mantida; B: ajuste pelo peso real; C: ajuste pelo peso obtido pela fórmula) (fase II) (anti-Xa colhido após duas doses já corrigidas). Vinte e oito pacientes foram analisados na fase I, e divididos em dois grupos: grupo 1 (ausência de subdose de enoxaparina com erro  $>10\%$  em relação ao peso

real, ou seja, dose recebida  $\geq 0,9$  mg/Kg/dose) e grupo 2 (presença de subdose de enoxaparina com erro  $>10\%$  em relação ao peso real, ou seja, dose recebida  $< 0,9$  mg/Kg/dose) uma vez que a dose adequada seria de 1 mg/Kg/dose de 12/12 horas. Das características basais dos dois grupos, não houve diferença em relação a idade, sexo e creatinina e houve diferença em relação à média de peso (grupo 1:  $67,1 \pm 14,0$  Kg e grupo 2:  $86,1 \pm 18,8$  Kg) ( $p=0,04$ ). Vinte e um pacientes foram do grupo 1 (75%) e todos eles estavam adequadamente anticoagulados (atividade anti-Xa  $\geq 0,5$  UI/mL). Sete pacientes foram do grupo 2 (25%) e destes, quatro (57%) estavam inadequadamente anticoagulados (atividade anti-Xa  $< 0,5$  UI/mL) ( $p < 0,05$ ). Dos vinte e oito pacientes, apenas 24 (85,7%) souberam relatar seu peso, e destes, dois (8,3%) o subestimaram com erro  $>10\%$ . Dos vinte e oito pacientes analisados, quatro (14,3%) tiveram seu peso subestimado pela fórmula, com erro  $>10\%$  em relação ao peso real. Na fase II do estudo (após duas doses iniciais mais duas doses corrigidas), todos os 24 pacientes atingiram nível adequado de atividade anti-Xa ( $\geq 0,5$  e  $< 1,2$  UI/mL) independente da forma utilizada para ajuste da dose (grupos A, B e C). Como conclusão, o presente trabalho salienta a necessidade da avaliação objetiva do peso corporal (pesagem dos pacientes) para prescrição de enoxaparina com o objetivo de heparinização plena (atividade anti-Xa  $\geq 0,5$  e  $< 1,2$  UI/ml), uma vez que a estimativa subjetiva deste peso determinou uma inadequação da anticoagulação em cerca de 14% do total dos pacientes analisados. Na impossibilidade de pesar o paciente, o peso relatado seria a segunda opção e para os que não souberam relatar seu peso a terceira opção seria a fórmula que utilizamos.

## FARMACOLOGIA

### ENVOLVIMENTO DAS NEUROTRANSMISSÕES GLUTAMATÉRGICA E NITRÉRGICA DA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSOLATERAL E DO NÚCLEO PRÉ-MAMILAR DORSAL NA ELABORAÇÃO DE RESPOSTAS DEFENSIVAS

**Daniela Cristina de Aguiar**

Orientador: Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães

Tese de Doutorado apresentada em 03/10/2008

O óxido nítrico (NO), sintetizado pela sintase do óxido nítrico neuronal (NOSn), possui um papel modulador em reações defensivas, possivelmente facilitando a ansiedade. A NOSn está localizada em estruturas envolvidas com

reações defensivas, como por exemplo, a substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (SCPdl) e o núcleo pré-mamilar dorsal (PMd). Antagonistas de receptores NMDA (rNMDA) de glutamato e inibidores da NOS injetados intra-SCPdl produzem efeitos ansiolíticos. A exposição a estímulos ameaçadores induz a ativação de células produtoras de NO nesta região. A SCPdl recebe uma densa projeção do PMd, também envolvido com reações de defesa. Lesões

bilaterais desse núcleo abolem a expressão de respostas defensivas durante a exposição ao predador. Pouco se sabe a respeito dos neurotransmissores envolvidos na mediação desses comportamentos pelo PMd, o qual também expressa receptores ionotrópicos de glutamato. Assim, o objetivo geral do presente trabalho foi de investigar a participação do NO e do glutamato na SCPdl e no PMd nas respostas defensivas. Para tanto, testou-se a hipótese de que a administração de inibidores da NOSn (7-nitroindazole, 7-NI, ou N-propil-L-arginina, NP) intra-SCPdl atenuaria as respostas defensivas promovidas pela exposição a um evento ameaçador inato, um gato. Verificou-se também, a hipótese de que o tratamento com AP-7 (antagonista de rNMDA) ou NP intra-SCPdl poderiam diminuir as reações comportamentais defensivas, além do número de células ativadas, bem como a ativação de neurônios NOSn positivos em regiões relacionadas com o comportamento defensivo após a exposição ao gato. A ativação neuronal foi verificada pela detecção da imunorreatividade à proteína c-FOS (IR-Fos) e a presença da NOS através da imunorreatividade à proteína NOS. Por último, testou-se a hipótese de que o tratamento com AP-7 ou NP intra-PMd atenuaria as reações comporta-

mentais promovidas pela presença do gato. A exposição ao gato promoveu respostas defensivas que foram atenuadas pelo tratamento intra-SCPdl com inibidores da NOSn e com o AP7. Adicionalmente, houve aumento das células IR-Fos da SCPdl, no PMd e no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), e aumento na porcentagem de células duplas (% duplas) marcadas na SCP e no PMd. O tratamento com AP-7 e com o NP intra-SCPdl atenuou a ativação celular na SCP e no PVN observada pela exposição ao gato, enquanto que houve aumento nas células IR-Fos e na % duplas no PMd. Além disso, observamos que o tratamento de AP-7 ou NP intra-PMd também atenuou as reações defensivas observadas pela exposição ao predador. Em conclusão, os resultados do presente trabalho sugerem que o antagonismo da neurotransmissão glutamatérgica e nitrérgica na SCPdl e no PMd pode atenuar as respostas comportamentais induzidas pela exposição ao predador. Além disso, a administração intra-SCPdl de AP-7 ou NP é capaz de reduzir a ativação celular promovida pela exposição ao gato nesta estrutura, sem alterar, ou mesmo aumentando, essa ativação em outras regiões relacionadas com o comportamento defensivo como o PMd.

### ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DA PGE<sub>2</sub> NA RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR LPS, ENDOTELINA-1 E VENENO DE *Tityus Serrulatus*

**David do Carmo Malvar**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Glória Emília Petto de Souza  
Dissertação de Mestrado apresentada em 07/10/2008

Vários trabalhos demonstram que a febre induzida pelo LPS requer a produção periférica de citocinas e central de prostaglandina (PG)E<sub>2</sub> e PGF<sub>2</sub>α por uma via sensível à indometacina. Entretanto, vários estudos de nosso grupo sugerem a existência de uma via insensível à indometacina e independente de PGE<sub>2</sub>, devido ao fato de que não existe relação entre a febre induzida pela endotelina (ET)-1 e o aumento das concentrações de PGE<sub>2</sub> no fluido cerebrospinal (CSF). Além disso, também mostramos que o veneno de *Tityus Serrulatus* (vTs) causa uma resposta febril que não é alterada pelos inibidores de ciclooxigenase (COX) ibuprofeno e celecoxib. Adicionalmente, a febre induzida pela ET-1 ou vTs foi abolida pela dipirona, uma droga antipirética que parece produzir seu efeito por mecanismo independente da inibição de COX. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar a relação entre a quantidade de PGE<sub>2</sub> no CSF e no hipotálamo durante a febre induzida pelo LPS, ET-1 e vTs em ratos, bem como o efeito da indometacina e da dipirona nesses parâmetros. Além disso, a participação do receptor EP<sub>3</sub> para PGE<sub>2</sub> na febre induzida pelo LPS, ET-1 e vTs também foi avaliado. O CSF e o hipotálamo foram coletados de acordo com a curva-temporal da resposta febril induzida por cada um desses estímulos. O presente es-

tudo demonstrou que a injeção de LPS (5μg/kg, i.v.) e ET-1 (1 pmol/rat, i.c.v.) induziu uma resposta febril acompanhada de um aumento das concentrações de PGE<sub>2</sub> no CSF e no hipotálamo, enquanto que a injeção de vTs (150 μg/kg, i.p.) induziu febre sem alterar as concentrações de PGE<sub>2</sub> no CSF e no hipotálamo. A indometacina (2 mg/kg, i.p.) somente reduziu a resposta febril induzida pelo LPS na terceira hora, entretanto preveniu o aumento de a PGE<sub>2</sub> no hipotálamo e no CSF na segunda e terceira horas após a injeção de LPS. Como esperado, a indometacina não modificou a febre induzida pela ET-1 e vTs, porém diminuiu a concentração de PGE<sub>2</sub> no CSF e no hipotálamo induzido pela ET-1. Por outro lado, a dipirona (120 mg/kg, i.p.) inibiu a resposta febril induzida pelo LPS, ET-1 e vTs e reduziu a concentração de a PGE<sub>2</sub> no CSF durante a febre induzida pelo LPS e ET-1, sem modificar a quantidade de PGE<sub>2</sub> no hipotálamo após a injeção de LPS e ET-1. Adicionalmente, observamos que a injeção intracerebroventricular do antagonista seletivo de receptores EP<sub>3</sub> L-826266 inibiu a febre induzida pela PGE<sub>2</sub> (35%), mas não alterou a febre induzida pelo LPS, ET-1 ou vTs. Em síntese, esses resultados indicam que nem todas as febres dependem de PGE<sub>2</sub> para o seu desenvolvimento (ex., febre induzida pela ET-1 e vTs) e que a dipirona exerce seu efeito antipirético sem reduzir a quantidade de PGE<sub>2</sub> no hipotálamo. Uma vez que a dipirona aboliu a febre insensível à indometacina induzida pela ET-1 e a febre induzida pelo vTs, que não aumenta a concentração de PGE<sub>2</sub> no CSF ou

tecido hipotalâmico, é possível enfatizar que o efeito antipirético da dipirona pode depender do bloqueio da síntese/liberação de outros mediadores que não a PGE<sub>2</sub>. Além disso,

nosso resultados demonstram que o receptor EP<sub>3</sub> está envolvido na febre induzida pela PGE<sub>2</sub>, mas não apresenta relevância crucial na febre induzida pelo LPS, ET-1 ou vTs.

## ENVOLVIMENTO DE CANABINÓIDES ENDÓGENOS NA RESPOSTA FEBRIL

### Daniel Fraga

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Glória Emília Petto de Souza  
Tese de Doutorado apresentada em 08/10/2008

O envolvimento dos endocanabinóides no controle da temperatura corporal e na resposta febril ainda não estavam bem claros. Por esta razão, o presente estudo teve como objetivo investigar o envolvimento dos canabinóides endógenos no controle da temperatura corporal e na resposta febril. As alterações na temperatura corporal foram medidas em intervalos de 30 minutos até a sexta hora após a administração do tratamento, através de uma sonda retal em ratos Wistar machos. Todos os pré-tratamentos foram administrados 30 minutos antes do tratamento. Tanto a administração intracerebroventricular (0,01, 0,1, 1 e 10 µg/2 µl, i.c.v.) como intrahipotalâmica (0,1, 1, 10 e 100 ng/0,2 µl, i.h.) de nandamida (AEA) induziram aumentos dose-dependentes na temperatura corporal. O aumento na temperatura corporal induzido pela AEA (1 µg, i.c.v.) foi precedido e acompanhado por uma redução da temperatura da pele da cauda dos animais o que foi causado por uma significativa vasoconstrição representada pelo índice de perda de calor (IPC). A dose de 1 µg, i.c.v. de AEA foi selecionada para os demais experimentos. O URB597 (0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100 e 1000 ng/2 µl, i.c.v.), inibidor da enzima amido hidrolase dos ácidos graxos (FAAH, do inglês fatty acid amide hydrolase), promoveu uma curva em forma de sino. O agonista CB<sub>1</sub> seletivo ACEA (0,001, 0,01, 0,1 e 1 µg/2 µl, i.c.v.) também induziu um aumento na temperatura corporal em forma de sino. O pré-tratamento dos animais com o antagonista CB<sub>1</sub> seletivo, AM251 (1,0, 5,0 e 10,0 µg/2 µl, i.c.v.) reduziu de forma dose-dependente a resposta febril induzida pela ABA e ACEA 0,01 µg, i.c.v. A dose 5 µg de AM251 foi

selecionada para os demais experimentos. A injeção i.c.v. do agonista CB<sub>2</sub> seletivo AM1241 (0,01, 0,1 e 1 µg/2 µl, i.c.v.) não promoveu nenhuma alteração significativa da temperatura corporal. O pré-tratamento com o antagonista CB<sub>2</sub> seletivo AM630 (10 µg/2 µl, i.c.v.), assim como com o antagonista dos receptores vanilóides capsazepina (1, 3 e 10 µg/2 µl, i.c.v.), não alteraram a resposta febril induzida pela AEA. O inibidor não seletivo das enzimas ciclooxigenase (COX) indometacina (2 mg/kg, i.p.), e o inibidor seletivo da COX-2 celecoxib (5 mg/kg, p.o.), reduziram a febre induzida pela AEA. A AEA induziu um aumento significativo na concentração de PGE<sub>2</sub> no fluido cerebrospinal (CSF) que foi abolido pelo pré-tratamento com o AM251. O antagonista não seletivo dos receptores opióides, naloxona (1 mg/kg, s.c.), aboliu a febre induzida pela AEA. Por sua vez, a AEA aumentou a concentração no CSF de β-endorfina. O pré-tratamento com AM251 foi capaz de reduzir este aumento induzido pela AEA. O AM251 também reduziu a febre induzida pelo lipopolissacarídeo (LPS 50 µg/kg, i.p.), interleucina (IL)-1β (3 ng, i.c.v.), fator de necrose tumoral (TNF)-α (250 ng, i.c.v.), IL-6 (300 ng, i.c.v.), fator liberador de corticotrofina (CRF 2,5 µg, i.c.v.) e da endotelina (ET-1 1 pmol, i.c.v.). Porém, o AM251 não foi capaz de reduzir a resposta febril induzida pelas prostaglandinas PGE<sub>2</sub> 250 ng, i.c.v.) e PGF<sub>2</sub> α (250 ng, i.c.v.) Em conjunto, estes dados sugerem que a AEA, pela ativação dos receptores CB<sub>1</sub>, é capaz de induzir febre. Esta resposta é dependente da síntese/liberação de prostaglandinas e opióides endógenos. Além disso, os endocanabinóides estão envolvidos no desenvolvimento da resposta febril induzida pelo LPS e por diversos mediadores que orquestram esta resposta incluindo IL-1β, TNF-α, IL-6, CRF e ET-1, mas não PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> ou a PGF<sub>2</sub> α.

## MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO PRODUZIDO PELA AÇÃO PERIFÉRICA DOS OPIÓIDES : ATIVAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR PI3KγAKT/ÓXIDO NÍTRICO

### Thiago Mattar Cunha

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha  
Tese de Doutorado apresentada em 09/10/2008

O aumento da intensidade dolorosa durante o processo inflamatório (hiperalgesia/hipernocicepção) é causado, principalmente, pela sensibilização de uma classe específica de neurônios nociceptivos primários (nociceptores), devido à ação direta de um conjunto de mediadores infla-

matórios, descritos como mediadores hipernociceptivos finais (prostaglandinas e aminas simpáticas). Neste sentido, o controle farmacológico periférico da dor inflamatória baseia-se em duas estratégias principais: a) uso de fármacos que previnem a sensibilização dos nociceptores (ex: inibidores de COX), ou seja, inibem a liberação e/ou ação de substâncias que os sensibilizam; b) fármacos que revertem diretamente à sensibilização dos nociceptores já instalada, como a dipirona e principalmente os opióides. Em relação



aos efeitos analgésicos produzidos pela ação periférica dos opióides, demonstrou-se que este é dependente da ativação da via óxido nítrico/GMPc, a qual culmina na abertura de canais de potássio sensíveis ao ATP, restaurando o potencial de membrana dos neurônios nociceptivos. No entanto, os mecanismos intracelulares envolvidos na ativação desta via, ainda não estão estabelecidos. No presente estudo, foram descritas tanto evidências *in vivo* quanto *in*

*vitro* de que a ativação desta via de sinalização depende da estimulação da via intracelular PI3K $\gamma$ /AKT. Estes resultados revelam um até então desconhecido papel da via PI3K $\gamma$ AKT para o efeito periférico dos opióides. Além disso, os resultados obtidos abrem uma nova perspectiva no mecanismo molecular de ação de velhas drogas analgésicas com efeito periférico e também no desenvolvimento de novas drogas.

### CONSEQUÊNCIAS DA RESPOSTA NEUROCOMPENSATÓRIA À LESÃO POR CATETER BALÃO SOBRE A REATIVIDADE À ENDOTELINA EM ARTÉRIA CARÓTIDA DE RATO

**Lilian Rialto Gimenes**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Maria de Oliveira

Dissertação de Mestrado apresentada em 10/10/2008

A angioplastia por cateter balão é um procedimento amplamente utilizado para desobstrução de artérias coronárias e periféricas a partir da remoção de placas ateroscleróticas e restauração do fluxo sanguíneo nestes locais. A passagem do cateter balão pelo lúmen do vaso gera um estresse mecânico na parede vascular, como a remoção de células endoteliais, que resulta em resposta neurocompensatória que tem reflexos sobre a reatividade não só do próprio vaso, mas também da artéria carótida contra-lateral à lesão (CCA). A endotelina-1 (ET-1) participa da regulação do tônus vascular e também da formação da camada neointima. A lesão por cateter balão em artérias carótidas promove um aumento na expressão de ET-1, bem como de seu receptor ET<sub>A</sub> na artéria lesada, e resulta em alterações na reatividade da CCA à fenilefrina e angiotensina II, 4 e 15 dias após a lesão, respectivamente. Os objetivos do presente estudo foram avaliar: (a) a relação concentração-efeito da ET-1 em CCA isoladas, obtidas de ratos Wistar macho, com o intuito de obter os parâmetros de E<sub>max</sub> (efeito máximo) e pD<sub>2</sub> da ET-1; (b) as consequências da lesão por cateter balão sobre esses parâmetros na CCA, após 2, 8, 16, 30 e 45 dias da lesão, na presença e na ausência do endotélio. Os resultados mostraram um aumento do E<sub>max</sub> da ET-1 a partir do 16º dia na CCA com endotélio. Alterações morfológicas não estão relacionadas ao aumento da resposta contrátil induzida pela ET-1, uma vez que a integridade estrutural da CCA foi mantida. A participação da população

de receptores ET<sub>B</sub> da CCA na resposta à lesão parece estar comprometida pelos mecanismos neurocompensatórios que se seguem à lesão por cateter balão. Por outro lado, a participação de receptores ET<sub>A</sub> da CCA na contração desencadeada pela ET-1 foi semelhante à da artéria controle. O influxo de cálcio, bem como a mobilização de cálcio dos estoques intracelulares, participaram do aumento do E<sub>max</sub> induzido por ET-1 na CCA. A reatividade à ET-1 na CCA com endotélio não foi alterada na presença de L-NAME (N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina metil ester), um inibidor não-seletivo de óxido nítrico sintases, sugerindo uma redução na biodisponibilidade de NO. Os resultados também sugerem o comprometimento do efeito modulatório da NNOS (óxido nítrico sintase neuronal) e INOS (óxido nítrico sintase induzida) sobre a ação vasoconstritora da ET-1 na CCA com endotélio. Por outro lado, a 'eNOS' (óxido nítrico sintase endotelial) modulou negativamente a ação desencadeada pelo peptídeo na CCA, todavia, a magnitude dessa modulação foi menor quando comparada com a do grupo controle. Os prostanóides parecem não participar da contração induzida pela ET-1 em artérias controle e CCA com endotélio, uma vez que o E<sub>max</sub> do peptídeo não foi alterado na presença de indometacina. As espécies reativas de oxigênio parecem contribuir para o aumento do E<sub>max</sub> desencadeado pela ET-1 na CCA em resposta à lesão por cateter balão. Assim, alterações na biodisponibilidade de NO, na formação de espécies reativas de oxigênio e nas vias de sinalização de cálcio fazem parte do conjunto de fatores intracelulares que levaram ao aumento do E<sub>max</sub> da ET-1 na CCA com endotélio a partir do décimo sexto dia após a lesão vascular por cateter balão.

### ALTERAÇÕES DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE METALOPROTEINASES-2 E 9 DA MATRIZ EXTRACELULAR E DE SEUS INIBIDORES ENDÓGENOS EM PACIENTES COM MIGRÂNEA

**Alisson Martins de Oliveira**

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

Dissertação de Mestrado apresentada em 23/10/2008

A migrânea é uma desordem neurológica comum, tendo maior prevalência em mulheres do que em homens.

Acomete a população durante os anos mais produtivos das suas vidas, sendo uma causa importante de faltas ao trabalho e de aumentos dos custos com "cuidados médicos. A crise de migrânea é composta de ataques severos de cefaléia associados à fotofobia, náusea, vômitos e sintomas autonômicos. Embora a fisiopatologia da migrânea ain-

da não esteja totalmente elucidada, disfunções vasculares, neurológicas e mecanismos neuro-inflamatórios têm sido propostos. Alguns estudos mostram a presença de alterações vasculares na migrânea. Algumas evidências apontam uma possível associação de alterações na integridade da barreira hematoencefálica em pacientes com migrânea. Contudo, estudos mostram uma provável associação da migrânea a um risco aumentado destes pacientes desenvolverem eventos cardiovasculares. As metaloproteinases de matriz extracelular modificam a estrutura dos vasos sanguíneos e são associadas a várias patologias do sistema cardiovascular. A metaloproteinase-2 (MMP-2) é constitutivamente expressa nos vasos sanguíneos, já a metaloproteinase-9 (MMP-9) é uma protease liberada durante processos inflamatórios em resposta a estimulação de citocinas. A MMP-2 e a MMP-9 promovem aumento de permeabilidade da barreira hematoencefálica por degradarem as proteínas da lâmina basal (laminina, fibronectina, colágeno do tipo IV e gelatina) presentes nos vasos sanguíneos cerebrais. Alguns estudos recentes mostram que os pacientes com mi-

grânea possuem aumentos nas concentrações plasmáticas de MMP-9. Baseado nestas informações, o objetivo do nosso estudo foi avaliar possíveis alterações nas concentrações plasmáticas de MMP-2 e MMP-9, bem como de seus inibidores endógenos (TIMP-1 e TIMP-2) em pacientes com migrânea, com e sem aura, e em indivíduos saudáveis. Os resultados deste estudo mostraram que os indivíduos com migrânea sem aura apresentam aumento das concentrações plasmáticas das metaloproteinases-2 e 9, enquanto que pacientes com migrânea com aura tem maiores concentrações plasmáticas de MMP-2 quando comparados aos controles saudáveis. O estudo dos inibidores das MMPs mostraram maiores concentrações plasmáticas de TIMP-1 em pacientes com aura quando comparados aos pacientes sem aura ou controles sadios. As concentrações de TIMP-2 foram similares nos três grupos experimentais. Esses achados sugerem haver aumentos da MMP-2 no plasma de pacientes com migrânea com aura, o que poderia ser um indicativo fisiopatológico que associa migrânea com risco aumentado de desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

### **EFEITOS DO CANABIDIOL SOBRE ESTRUTURAS ENCEFÁLICAS ENVOLVIDAS COM A RESPOSTA EMOCIONAL CONDICIONADA CONTEXTUAL**

**José Inácio Lemos Monteiro Carvalho**

Orientador: Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães  
Tese de Doutorado apresentada em 31/10/2008

Estudos prévios do laboratório mostraram que o tratamento sistêmico com canabidiol (CBD) atenuou as alterações cardiovasculares (pressão arterial e frequência cardíaca) bem como os efeitos comportamentais (congelamento) provocados pela reexposição ao contexto previamente pareado com choques nas patas (Resstel et al. 2006). Entretanto, pouco se sabe sobre quais áreas cerebrais podem estar envolvidas no efeito ansiolítico do CBD no modelo experimental presentemente estudado. Assim, o objetivo do presente estudo foi identificar, através da técnica de imunoreatividade à proteína c-Fos, quais áreas encefálicas ativadas pelo protocolo experimental poderiam ser alteradas pelo tratamento sistêmico com CBD antes da re-exposição ao contexto aversivo. Observou-se que os animais condi-

onados tratados com CBD apresentaram menor imunoreatividade à proteína c-Fos nas regiões pré- límbica (PL) e infralímbica (IL) do córtex pré-frontal medial (CPFm), bem como nas regiões medial anterior, lateral dorsal e ventral do leito do núcleo da estria terminal, sendo que houve correlação positiva entre o tempo de congelamento e a densidade de células marcadas para c-Fos apenas nas regiões medial anterior e ventral dessa estrutura. Em experimentos posteriores, observou-se que microinjeções de CBD diretamente no PL atenuaram o congelamento, enquanto que microinjeções no IL apresentaram efeito oposto. Portanto, os resultados do presente estudo sugerem que as regiões medial anterior e ventral do núcleo do leito da estria terminal e também a região pré-límbica do CPFm podem estar envolvidas no efeito do tratamento sistêmico do CBD sobre a resposta emocional condicionada (REC) contextual. Palavras-chaves: canabidiol, medo condicionado contextual, c-Fos, córtex pré-frontal, núcleo do leito da estria terminal.

### **MEDIADORES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA PELA SEPSE (CLP) EM RATOS**

**Maria José Figueiredo**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Glória Emília Petto de Souza  
Tese de Doutorado apresentada em 31/10/2008

Embora a injeção de LPS seja um modelo razoável de infecção real, a febre induzida pelo LPS não é uma febre

típica. Este é usualmente removido da circulação 1 h após a injeção intravenosa e induz uma febre de duração curta. Na maioria dos casos de febre induzida e mantida por um longo período pela estimulação pirogênica contínua (Gourline et al., 1998). O CLP (modelo de ligação e perfuração cecal) primeiramente descrito por Chaudry et al. (1979, 1980),

é amplamente aceito por muitos investigadores como um modelo de sepse, infecção aguda e peritonite bacteriana (Fink et al., 1990; Villa et al., 1995), que melhor reflete a complexa resposta desta síndrome em humanos (De Maio et al., 2005). O CLP envolve uma estimulação pirogênica contínua e simula uma infecção real muito melhor que a infusão de quantidades constantes de LPS (infecção simulada). Desta forma este trabalho objetivou: -padronizar o modelo de CLP capaz de induzir resposta febril, -investigar como a terapia antipirética influencia a mortalidade de animais no modelo de sepse: -investigar quais mediadores estão envolvidos na estimulação pirogênica contínua, induzida pelo CLP, bem como relacionar os níveis de mediadores pirogênicos no fluido cerebrospinal (CSF) com a febre e com a sobrevida. Para indução do modelo, utilizamos vários calibres de agulha e diferentes números de perfurações. Os animais que receberam 4 furos com a agulha 16G no ceco, apresentaram aumento significativo da temperatura e índice de sobrevida de aproximadamente 50%. Então este estímulo foi escolhido para avaliar o efeito dos antipiréticos na resposta febril. O tratamento com os antipiréticos promoveu diferentes efeitos sobre o aumento da temperatura e taxa de sobrevida dos animais sépticos. Sendo que a antipirese foi mais, evidente nos animais tratados com o celecoxibe e dipirona e a melho-

ra significativa da sobrevida nos animais tratados com paracetamol. O CLP induziu aumento na concentração de PGE2 no CSF 6; 12; 24 e 48 horas após o estímulo, sendo que o pico deste aumento coincidiu com o pico da resposta febril (6h). Este estímulo também promoveu aumento significativo dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 no foco infeccioso e soro, mas não no CSF dos animais sépticos. Estas citocinas parecem não participar centralmente na resposta febril induzi da por CLP, uma vez que o tratamento com o antagonista de receptores de IL-1 (IL-1ra), com o receptor solúvel de TNF (sTNFr) e com o anticorpo anti IL-6 não alteraram a febre induzida por CLP. O tratamento com os antipiréticos aumentou os níveis de IL-1 $\beta$  e IL-6 no foco infeccioso e diminuiu no soro. Entretanto a maior diminuição foi vista no soro dos animais tratados com celecoxibe e paracetamol. Com base nos achados descritos acima, é possível concluir que o modelo de febre induzido por CLP reproduz bem um quadro infeccioso, os mediadores diferem daqueles envolvidos na febre do LPS. A melhora na sobrevida nos animais tratados com paracetamol deve envolver outro mecanismo que a inibição sérica de IL-6. Entretanto, mais estudos são necessários para entendermos melhor os mecanismos envolvidos na indução desta resposta, bem como o mecanismo de ação evocado pelos antipiréticos.

## PARTICIPAÇÃO DAS METALOPROTEINASES DA MATRIZ EXTRACELULAR NAS ALTERAÇÕES VASCULARES ASSOCIADAS À HIPERTENSÃO RENOVASCULAR: EFEITOS DE ANTIOXIDANTES

**Michele Mazzaron de Castro**

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos  
Tese de Doutorado apresentada em 07/11/2008

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é considerada um grande problema de saúde pública no mundo, e está amplamente relacionada a significativas alterações morfológicas e funcionais no aparelho cardiovascular. Metaloproteinasas (MMPs) são endopeptidases cálcio-dependente, contendo zinco, que apresentam um papel importante na disfunção endotelial e no remodelamento tecidual de várias doenças cardiovasculares, inclusive a hipertensão. Aumentos na atividade destas enzimas podem levar à degradação excessiva das proteínas da matriz extracelular (MEC), além de acentuar a migração de células musculares lisas e monócitos. Isto pode contribuir para as alterações estruturais observadas nos vasos sanguíneos durante a hipertensão. Neste contexto, estudos clínicos e em modelos animais de hipertensão mostraram um aumento significativo da expressão e atividade da MMP-2 (72-kDa gelatinase A) e MMP-9 (92-kDa gelatinase B), tanto no plasma quanto em tecidos cardíacos e vasculares. Interessantemente, estudos *in vitro* mostraram que o aumento da atividade destas MMPs pode estar relacionado diretamente ao estresse

oxidativo gerado pela ativação de enzimas pro-oxidantes, tais como a NADPH oxidase vascular e a xantina oxidase. Neste contexto, o modelo experimental 2R-1C foi proposto para este estudo por apresentar concentrações elevadas de EROs associadas ao aumento da renina plasmática e angiotensina II. Estas ações, associadas a um aumento da pressão intra-luminal, podem ser muito importantes para ativação das MMPs, o que pode contribuir para as alterações vasculares observadas neste modelo de hipertensão. Desta maneira, os objetivos deste trabalho foram: 1) verificar se aumentos na expressão e atividade destas MMPs podem contribuir para o aumento da pressão arterial e para as alterações vasculares observadas neste modelo; 2) verificar se aumentos nas concentrações das EROs podem contribuir para esta maior ativação enzimática. Para isto, foi utilizada a doxiciclina, um inibidor inespecífico de MMPs, e diferentes tipos de antioxidantes. A atividade e expressão das MMPs foram avaliadas por zimografia em gel e *in situ*, pelo método de captura de anticorpo e imuno-histoquímica. Já a expressão do RNAm da MMP-2 e do TIMP-2 foi analisada por Real Time RT-PCR. Os parâmetros funcionais e estruturais da aorta foram determinados por reatividade vascular e morfologia, respectivamente. Por fim, as concentrações vasculares de EROs foram analisadas usando o dihidroetídeo

(DHE) *in situ* e por citometria de fluxo. O tratamento com a doxíciclina atenuou o aumento da pressão arterial nos animais 2R-1C ( $p < 0,01$ ) e preveniu a redução do relaxamento dependente do endotélio nestes animais. Além disso, a doxíciclina preveniu aumentos na espessura da camada média da aorta ( $p < 0,01$ ) e a deposição elevada de colágeno e elastina. Houve um aumento significativo da expressão e atividade da MMP-2 nas aortas destes animais hipertensos (todos,  $p < 0,05$ ) em paralelo a um aumento da razão da expressão do RNA da MMP-2/TIMP-2 ( $p < 0,01$ ). Da mesma maneira, o tratamento com ambos os antioxidantes atenuou o aumento da pressão arterial nos animais 2R-1C

(ambos,  $p < 0,05$ ) e preveniu a redução do relaxamento dependente do endotélio pela acetilcolina. O tempol, mas não o apocinina ( $p > 0,05$ ), também preveniu o remodelamento vascular hipertrófico observado nestes animais ( $p < 0,01$ ). Além disso, o tratamento com o tempol atenuou aumentos na atividade e expressão da MMP-2 (ambos,  $p < 0,05$ ) em paralelo à diminuição do estresse oxidativo ( $p < 0,05$ ). Estes resultados sugerem que 1) as MMPs podem contribuir para o aumento da pressão arterial e para as alterações vasculares observadas neste modelo experimental. 2) Aumentos nas concentrações de EROs podem estar diretamente relacionados com esta atividade aumentada da MMP-2.

## PARTICIPAÇÃO DE RECEPTORES TOLL-LIKE 2 E 4, CITOCINAS E QUIMIOCINAS NA HIPERNOCICEPÇÃO MECÂNICA EM UM MODELO DE INFLAMAÇÃO ARTICULAR

**Ana Tereza Gomes Guerrero**

Orientador: Prof. Dr. Sergio Henrique Ferreira

Tese de Doutorado apresentada em 04/12/2008

Existem evidências experimentais e clínicas da participação de diferentes receptores e mediadores no desenvolvimento e manutenção da artrite reumatóide. Corroborando o caráter multifatorial dessa patologia, cerca de 30% dos pacientes não respondem a terapia anti-TNF- $\alpha$ . Dessa forma, a investigação dos mediadores envolvidos na patogênese da artrite pode contribuir para abordagens terapêuticas mais eficientes. Além disso, apesar da dor articular ser um dos sintomas clínicos mais importantes dessa doença devido à incapacitação motora ainda existe um longo caminho para sua compreensão. Dados da literatura demonstram a participação das citocinas TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$ , IL-18, quimiocinas KC e MIP-1 $\alpha$ , e receptores TLR-2 e TLR-4 em quadros de artrite tanto em animais quanto em humanos. Assim, como a artrite reumatóide é caracterizada pela intensa dor articular e infiltrado inflamatório crônico no tecido sinovial, este estudo teve por objetivo investigar o efeito nociceptivo articular e a migração leucocitária articular, bem como a inter-relação entre esses efeitos e a hierarquia entre os mediadores envolvidos neste modelo de inflamação articular. Primeiramente, detectou-se que a injeção intra-articular de zimosan ou LPS induziu resposta hipernociceptiva mecânica articular. A hipernocicepção mecânica articular induzida por zimosan ou LPS foi inibida pelo pré-tratamento com um antagonista de receptores CXCR1/2-DF2162 e IL1Ra. Ademais, a hipernocicepção articular induzida por zimosan ou LPS foi reduzida em camundongos deficientes para o receptor p55 do TNF- $\alpha$ , Toll-like 2, deficientes na via de sinalização para Toll-like 4 e molécula MyD88. Ao avaliar a migração leucocitária articular utilizando o método da mieloperoxidase (MPO) observou-se redução da migração leucocitária

articular tanto nos tratamentos quanto nos animais deficientes acima mencionados. Assim, esses resultados sugerem uma correlação entre resposta hipernociceptiva articular e migração leucocitária articular. Além disso, para confirmar a participação de TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$  e KC utilizando a técnica de ELISA foram detectadas a presença significativa destas citocinas nos tempos de 3-5 horas após injeção intra-articular de zimosan ou LPS. Ademais, observou-se que o TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$  e KC induziram resposta hipernociceptiva articular de maneira dose-tempo-dependentes. A hipernocicepção articular induzida pelo TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$  e KC foram parcialmente inibida pelo pré-tratamento com indometacina, guanetidina, associação entre indometacina e guanetidina, IL-1Ra e DF2162. Além disso, detectou-se que animais deficientes para o receptor TNFR1 do TNF- $\alpha$ , apresentaram redução da resposta hipernociceptiva articular. Dando continuidade ao estudo, foi detectado que a administração intra-articular de TNF- $\alpha$  induziu a produção de IL- $\beta$  e quimiocina KC. De maneira complementar, as concentrações de TNF- $\alpha$  e IL- $\beta$  estavam elevadas nas articulações de animais que receberam administração intra-articular de KC. Também foi observado que a administração intra-articular de IL- $\beta$  induziu aumento das concentrações articulares de TNF- $\alpha$  e quimiocina KC. Avaliando-se os resultados acima descritos podem-se sugerir a participação de prostanóides, aminas simpáticas, TNF- $\alpha$  agindo via receptores TNFR1, IL- $\beta$  e KC. Em conjunto, os resultados acima descritos, sugerem o conceito de que na resposta hipernociceptiva articular induzida pelo TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$  e quimiocina KC, estas citocinas e quimiocina estão agindo de maneira retro-alimentativa ou se auto-regulando e também precedem a liberação dos mediadores finais da hipernocicepção inflamatória (prostanóides e aminas simpáticas). O segundo objetivo deste estudo foi investigar a existência de uma inter-relação entre o fenômeno hipernociceptivo articular e a migração leucocitária articular induzidas

pelas citocinas (TNF- $\alpha$  e IL- $\beta$ ) e quimiocina KC. E observou-se que estes mediadores pró-nociceptivos apresentaram aumento da migração leucocitária articular. Foi observado que o pré-tratamento com fucoïdina (inibidor da migração leucocitária) inibiu tanto a resposta hipernociceptiva articular induzida pelo TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$  e KC quanto a migração leucocitária articular induzida pelo TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$  e KC. Assim, esses resultados sugerem uma correlação entre respos-

ta hipernociceptiva articular e migração leucocitária articular induzidas pelo TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$  e quimiocina KC. Concluindo, este trabalho contribuiu para a elucidação, pelo menos em parte, dos mecanismos envolvidos na resposta hipernociceptiva articular induzida pelo zimosan (agonista toll-like 2) e LPS (agonista toll-like 4). Além de sugerir que as citocinas TNF- $\alpha$  e IL- $\beta$  e quimiocina KC estão agindo de maneira retro-alimentativa neste modelo de inflamação articular.

## FISIOLOGIA

### PARTICIPAÇÃO DOS GLICOCORTICÓIDES NA SECREÇÃO DOS NEUROPEPTÍDEOS OCITOCINA E VASOPRESSINA EM RESPOSTA ÀS ALTERAÇÕES DE VOLUME E OSMOLALIDADE DO LÍQUIDO EXTRACELULAR

**Andréia Lopes da Silva**

Orientador: Prof. Dr. José Antunes-Rodrigues

Dissertação de Mestrado apresentada em 29/10/2008

A regulação da homeostase hidroeletrólítica é uma função mantida sob controle restrito no organismo animal. Mamíferos respondem às alterações na osmolalidade do líquido extracelular alterando comportamentos e a fisiologia do organismo. O comportamento requer regulação na resposta de ingestão de sal e água, através de alterações no apetite ao sódio e na sede. As respostas fisiológicas necessitam de modulação da excreção renal de água e sódio, o que acontece por alterações nas concentrações plasmáticas de hormônios antidiuréticos e natriuréticos. O principal sistema neuroendócrino pelo qual o cérebro mantém a homeostase dos líquidos corporais é o sistema hipotálamo-neuro-hipofisário. Este sistema consiste de neurônios magnocelulares localizados no núcleo supra-óptico do hipotálamo (SON) e no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), sendo que seus axônios terminam em capilares sanguíneos na neuro hipófise. O PVN e o SON estão diretamente envolvidos com o controle do balanço hidroeletrólítico, pois são extremamente sensíveis às alterações da osmolalidade e seus neurônios são células especializadas na síntese e secreção de vasopressina (AVP) e ocitocina (OT). Com o aumento da osmolalidade plasmática mecanismos são ativados, inibindo a ingestão de sal e induzindo a excreção de sódio através da OT, e ativando mecanismos de sede e redução da excreção urinária de água, mediados pela AVP. Estas respostas são vistas como estressores pelo sistema nervoso central e são moduladas pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). Um fator conhecido por

participar dos efeitos dos glicocorticóides é o NF-kappa B, podendo, então, participar desta modulação hormonal frente às alterações osmóticas do líquido extracelular. Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar as alterações promovidas pelo estímulo osmótico causado pela sobrecarga salina de quatro dias (SL4) e pela restrição hídrica de três dias (WD3), procurando avaliar a participação do eixo HHA nestas respostas. Os resultados apresentados mostram que tanto a SL4 quanto a WD3 aumenta o sódio plasmático, a osmolalidade plasmática, as concentrações plasmáticas de OT, AVP e corticosterona e a expressão do RNAm de AVP e OT no SON, PVN e NH. Após a injeção de dexametasona (1mg/kg, subcutâneo), as concentrações plasmáticas de OT, AVP e corticosterona diminuem, assim como a expressão do RNAm de AVP e OT no SON e no PVN. A dexametasona não altera o sódio e a osmolalidade plasmáticos no grupo SL4; diminui o sódio plasmático e não altera a osmolalidade plasmática no grupo controle; e diminui o sódio plasmático e aumenta a osmolalidade plasmática no grupo WD3. A dexametasona também diminui a expressão do RNAm de AVP, mas não altera a expressão do RNAm da OT na NH no grupo SL4; e diminui a expressão de RNAm de OT e aumenta a expressão do RNAm da AVP na NH do grupo WD3. No grupo controle, a dexametasona diminui a expressão do RNAm da OT e da AVP na NH. Dados imunistoquímicos mostram que a subunidade p65 do fator de transcrição NF-KB está presente no SON e no PVN, sendo que não há alteração do conteúdo desta subunidade no PVN e no SON promovidos pela desidratação. Mas ambos os modelos de desidratação diminuem a expressão do RNAm de p65 no SON, e a dexametasona diminui ainda mais a expressão do RNAm de p65 no SON e PVN nos animais I controles e com

WD3. A expressão do inibidor do NF-kappa B, o 'iota'kappa B  $\beta$ , está aumentada no SON de animais SL4, e a dexametasona reverte esse efeito. A dexametasona também diminui a expressão do RNAm do 'iota'kappa B  $\beta$  no PVN de animais SL4 e WD3. Nos animais com WD3 a expressão do RNAm de 'iota'kappa B  $\beta$  no PVN está diminuída; e a dexametasona aumenta a expressão do RNAm do 'iota'kappa B  $\beta$  apenas no SON destes animais. No grupo SL4 há um aumento da concentração plasmática de IL-1  $\beta$  e TNF- $\alpha$ , e a dexame-

tasona reverte este efeito; já no grupo WD3 só há um aumento da concentração plasmática de IL-1  $\beta$ , efeito que é revertido pela dexametasona. Em conjunto esses dados sugerem que o eixo HHA exerce um controle sobre os peptídeos neuro-hipofisários diminuindo sua produção e secreção ante um estímulo osmótico. Esta inibição pode estar relacionada à diminuição da sinalização do sistema nervoso central, dada pelas citocinas periféricas, ou também por uma possível ativação da via do NF-kappa B.

### **EXPRESSÃO AUMENTADA DE NPY APÓS STATUS EPILEPTICUS INDUZIDO POR ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DO COMPLEXO AMIGDALÓIDE EM RATOS : PROVÁVEL PARTICIPAÇÃO EM UM SISTEMA ANTICONVULSIVO ENDÓGENO**

**Artur Fernandes**

Orientador: Prof. Dr. Norberto Garcia-Cairasco

Dissertação de Mestrado apresentada em 29/10/2008

As epilepsias são as desordens neurológicas mais comuns entre humanos e, de longe, as mais estudadas. Dentre elas a Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) se destaca por apresentar grande número de pacientes refratários aos tratamentos medicamentosos e apresenta como características gerais: 1) a ocorrência de um evento gatilho que deflagra, 2) os processos epileptogênicos responsáveis pelo surgimento das, 3) crises recorrentes espontâneas (CREs). O modelo animal utilizado neste estudo mimetiza as três etapas descritas acima e consiste na estimulação elétrica do complexo amigdalóide e consequente estabelecimento do quadro de Status Epilepticus Auto Sustentado (SEAS). Neste modelo foram descritos dois tipos de SEAS com gravidades de crises comportamentais e características morfológicas distintas. O SEAS-Típico é mais grave, apresenta crises comportamentais mais severas e um quadro de morte celular bilateral em hipocampo e outros núcleos correlatos. O SEAS-Deambulatório é menos grave, apresenta crises comportamentais leves e perfil de mortes celulares com lesões exclusivamente unilaterais em hipocampo e núcleos correlatos. O objetivo do estudo foi diferenciar os dois tipos de SEAS através de: marcadores eletroencefalográficos (EEGráfico) e moleculares a fim de estabelecermos alguns dos possíveis mecanismos responsáveis pela ocorrência dos dois tipos de SEAS. O traçado EEGráfico das crises foi avaliado através da análise de frequências sustentadas ao longo do tempo em HIP e AMY. Como a atividade elétrica cerebral depende da ativação de grupos neuronais específicos, foi avaliada em paralelo a expressão da proteína c-Fos, como indicadora da atividade neuronal durante o evento de SEAS. Por outro lado, a ocorrência de SEAS e a atividade neuronal aumentada promove modificações plásticas que envolvem alterações em neurotransmissores, neuropeptídeos, fatores de crescimento neuronal, entre outros. Neste sentido foram

avaliadas as expressões do fator neurotrófico derivado do cérebro (Brain Derived Neurotrophic Factor -BDNF) e neuropeptídeo- Y (NPY), um neuropeptídeo produzido por interneurônios inibitórios no hilus do giro denteado (GD) do hipocampo que apresenta ações anticonvulsivantes em vários modelos de estudo. A análise do eletroencefalograma (EEG) deixou claro que durante comportamentos exploratórios há a predominância de frequências sustentadas, tanto em HIP quanto em AMY, na faixa entre 5-9 Hz. Por outro lado, durante os comportamentos de crise, não importando sua gravidade, as frequências sustentadas reduzem para entre 3-5 Hz em ambos os núcleos. A análise da atividade neuronal através da expressão de c-Fos mostrou-se diferente entre os animais controle e os dos grupos experimentais, com muito maior expressão nos animais com SEAS. Foi observada expressão de c-Fos em 17 regiões cerebrais com diferenças em córtex ipsilateral, com maior número de células no SEAS-T e em amígdala baso-lateral e amígdala medial contralaterais com maior número de células em SEAS-D. O NPY foi avaliado em três tempos pós-SEAS (3 h, 24 h e 14 dias). Em todos os tempos estudados houve diferença entre o número de células no hilus do GD entre os grupos de SEAS e controles com maior número nos animais SEAS. Entre os dois tipos de Status, de maneira geral, houve diferença no número de células com maior expressão em SEAS-D. A ativação neuronal durante o período de SEAS parece não ser o fator determinante que diferencia ambos os tipos de Status uma vez que a expressão de c-Fos entre os grupos é semelhante. A ocorrência de frequência sustentadas nos diferentes comportamentos de crise foi idêntica, independentemente de sua gravidade. Por outro lado, a expressão de NPY foi diferente entre os grupos e parece ser um fator importante na determinação da gravidade das crises nos animais. Futuros estudos poderão auxiliar na compreensão da relevância da expressão do NPY como sendo resultado da ativação de um sistema anticonvulsivo endógeno, se não for observada a ocorrência de CREs em tempos mais prolongados de análise

## AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE MECANISMOS GABAérgicos, NITRÉrgicos, GLUTAMATÉrgicos E PURINÉrgicos NO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO (PVN) NA MODULAÇÃO AUTÔNOMICA BASAL E NAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES À ATIVAÇÃO DO QUIMIORREFLEXO EM RATOS NÃO ANESTESIADOS

**Josiane de Campos Cruz**

Orientador: Prof. Dr. Benedito Honorio Machado

Tese de Doutorado apresentada em 17/12/2008

As células quimiossensíveis do corpúsculo carotídeo são ativadas em situações de alteração na  $pO_2$  do sangue arterial. A primeira sinapse das aferências dos quimiorreceptores periféricos ocorre no núcleo do trato solitário (NTS). A partir do NTS duas vias autonômicas e distintas são ativadas; a via simpato-excitatória e a via parassimpato-excitatória, desencadeando assim as respostas cardiovasculares à ativação do quimiorreflexo. Além disso, são também geradas respostas respiratórias e comportamentais. Estudos farmacológicos sugerem a participação do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) na via simpato-excitatória do quimiorreflexo. O PVN é um importante centro de controle autonômico e neuroendócrino. Vários trabalhos sugerem a participação de mecanismos GABAérgicos, nitrérgicos e glutamatérgicos na modulação tônica da atividade simpática no PVN, sugerindo a existência de um balanço entre os receptores excitatórios e inibitórios no PVN sobre a modulação tônica da atividade simpática. Recentes estudos sugerem o envolvimento dos receptores purinérgicos do PVN na modulação autonômica simpática. O objetivo do nosso estudo foi avaliar a participação de mecanismos GABAérgicos, nitrérgicos, glutamatérgicos e purinérgicos do PVN na modulação tônica cardiovascular e nas respostas cardiovasculares à ativação do quimiorreflexo em ratos não anestesiados. Para tanto, utilizamos ratos Wistar (300-320g); cânulas-guia foram implantadas em direção ao PVN 4-5 dias antes dos experimentos. A artéria e a veia femoral esquerda dos animais foram canuladas, um dia antes dos experimentos. O quimiorreflexo foi ativado com KCN (80  $\mu$ g/0,05 ml, iv) antes e em diferentes tempos após a microinjeção bilateral de bicuculina (antagonista  $GABA_A$ ), L-NAME (inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase), ácido quinurênico [KYN (antagonista inespecífico dos receptores ionotrópicos do L-glutamato)] e PPADS (antagonista dos receptores puri-

nérgicos P2). Realizamos também a microinjeção bilateral do coquetel PPADS + KYN no PVN de ratos não anestesiados. Os resultados mostraram que a microinjeção bilateral de bicuculina no PVN ( $n=7$ ) promoveu um aumento significativo na PAM basal ( $F_{5,34}=3$ ;  $p=0,04$ ) e na FC basal ( $F_{5,32}=8,2$ ;  $p<0,001$ ), contudo não promoveu alterações significativas nas respostas pressora ( $F_{5,36}=0,5$ ;  $p=0,8$ ) ou bradicárdica ( $F_{5,32}=1$ ;  $p=0,7$ ) à ativação do quimiorreflexo. A microinjeção bilateral de L-NAME ( $n=8$ ) no PVN promoveu um aumento significativo na PAM basal ( $F_{6,45}=5$ ;  $p=0,0005$ ) e na FC basal ( $F_{6,45}=5$ ;  $p=0,0009$ ), contudo não promoveu alterações significativas nas respostas pressora ( $F_{6,45}=0,2$ ;  $p=0,95$ ) ou bradicárdica ( $F_{6,45}=1$ ;  $p=0,45$ ) à ativação do quimiorreflexo. A microinjeção bilateral do ácido quinurênico ( $n=6$ ) não promoveu alterações significativas na PAM basal ( $F_{6,31}=0,9$ ;  $p=0,54$ ), FC basal ( $F_{6,32}=0,6$ ;  $p=0,75$ ) ou nas respostas pressora ( $F_{6,29}=1$ ;  $p=0,4$ ) e bradicárdica ( $F_{6,32}=0,8$ ;  $p=0,4$ ) à ativação do quimiorreflexo. A microinjeção de PPADS no PVN ( $n=6$ ) promoveu um aumento significativo na PAM basal ( $F_{4,22}=5$ ;  $p=0,04$ ) e na FC basal ( $F_{4,18}=3$ ;  $p=0,04$ ), contudo não promoveu alterações significativas nas respostas pressora ( $F_{4,18}=0,4$ ;  $p=0,8$ ) e bradicárdica ( $F_{4,18}=1$ ;  $p=0,4$ ) à ativação do quimiorreflexo. A microinjeção do coquetel PPADS + KYN ( $n=6$ ) no PVN não promoveu alterações significativas na PAM ( $F_{4,23}=2$ ;  $p=0,2$ ), FC basal ( $F_{4,24}=1$ ;  $p=0,4$ ) ou nas respostas pressora ( $F_{4,23}=1$ ;  $p=0,4$ ) e bradicárdica ( $F_{4,24}=2$ ;  $p=0,2$ ) à ativação do quimiorreflexo. Concluímos que a) os receptores  $GABA_A$ , o óxido nítrico e os receptores purinérgicos no PVN de ratos não anestesiados estão envolvidos com a modulação tônica cardiovascular, mas aparentemente não estão envolvidos com as respostas cardiovasculares à ativação do quimiorreflexo em ratos não anestesiados e b) que os receptores ionotrópicos de L-glutamato no PVN de ratos não anestesiados não estão envolvidos com a modulação tônica cardiovascular e também não parecem estar envolvidos com as respostas cardiovasculares à ativação do quimiorreflexo em ratos não anestesiados.

## EXPRESSÃO DE microRNAs NO SISTEMA NOCICEPTIVO DE CAMUNDONGOS

**Ricardo Kusuda**

Orientador: Prof. Dr. Guilherme de Araújo Luccas

Dissertação de Mestrado apresentada em 22/12/2008

MicroRNAs (miRs) representam uma nova classe de RNAs não codificadores (ncRNA) que agem como potentes reguladores da expressão de diversos genes. A iden-

tificação e caracterização da ação de miRs têm oferecido uma visão completamente nova dos mecanismos de regulação pós-transcricional, influenciando diversos mecanismos celulares como diferenciação, crescimento, apoptose, metabolismo e atividade sináptica. A descoberta dos miRs e de seus mecanismos de ação têm alterado fundamentalmente a nossa compreensão da fisiologia de órgãos e siste-

mas e da fisiopatologia de diversas doenças. A expressão de miRs ocorre de maneira específica nos diferentes tecidos, sendo que, no sistema nervoso, miRs foram descritos no córtex, cerebelo e no mesencéfalo. Este estudo investigou a expressão de miRs no gânglio da raiz dorsal e na coluna dorsal da medula espinal onde a informação nociceptiva é inicialmente processada. Foi analisada a expressão de miR-1, miR-16, miR-122a e miR-206 que possuem complementaridade parcial ao gene *bdnf*. O BDNF (brain-derived neurotrophic factor) é um fator neurotrófico responsável pela manutenção das características fenotípicas de diferentes populações neuronais no gânglio da raiz dorsal e na coluna dorsal da medula espinal, participando tanto da transmissão da informação nociceptiva, quanto dos mecanismos de plasticidade neural induzidos pela lesão de nervo periférico ou doença inflamatória crônica. Utilizando RT-PCR em tempo real, foram investigados: 1) a expressão destes

miRs após estimulação aguda de fibras nociceptivas do tipo C, 2) o perfil temporal e especificidade tecidual de expressão de miRs após a lesão parcial, 3) axotomia de nervo periférico, e 4) durante inflamação crônica no gânglio da raiz dorsal de no corno dorsal da medula espinal de camundongos. As amostras foram normalizadas com o controle endógeno *snoR-202*. Com exceção do miR-122a, todos os demais miRs encontraram-se robustamente expressos tanto no gânglio da raiz dorsal como no corno dorsal da medula espinal. Todos os modelos foram capazes de induzir alterações na expressão dos miRs que apresentaram ora redução, ora aumento dependendo do tecido, da duração ou da qualidade da estimulação, caracterizando um alto grau de especificidade espacial e temporal no sistema nociceptivo. Nossos resultados sugerem a participação destes miRs nos diferentes mecanismos de regulação gênica associados, tanto à dor nociceptiva, quanto à fisiopatologia da dor crônica.

## GENÉTICA

### ESTUDO DO PROCESSAMENTO ALTERNATIVO E ANÁLISE DO SILENCIAMENTO DAS METILTRANSFERASES ESPECÍFICAS DO PISTILO DE *Nicotiana Tabacum L.*

**Cristiane de Paula Gomes Calixto**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>.Dr<sup>ª</sup>. Maria Helena de Souza Goldman  
Dissertação de Mestrado apresentada em 03/10/2008

A biologia da reprodução das plantas é uma área de crescente interesse. O pistilo é um órgão de importância central no processo reprodutivo. A espécie *Nicotiana tabacum*, linhagem Petit Havana SR-1, foi escolhida como modelo para o estudo do pistilo, por possuir flores especializadas e grandes, apresentando todos os principais órgãos facilmente identificáveis. Há diversos genes que são exclusivamente expressos no pistilo. Entre estes, foi encontrado, por nosso grupo de pesquisa, vários transcritos que codificam proteínas com alta similaridade às metiltransferases do ácido salicílico, jasmônico e benzóico. Os ésteres metilados destes ácidos são largamente difundidos no reino vegetal, atuando na regulação do desenvolvimento da planta, reprodução, defesa e sinalização. Este trabalho visou estudar a estrutura destes transcritos e o papel da metiltransferase no processo reprodutivo. Os objetivos específicos foram: 1) realizar experimentos de 5'RACE para estudar a extremidade 5' completa, incluindo a região 5' não traduzida, dos diferentes transcritos da metiltransferase expressa no pistilo; 2) realizar experimentos de 3'RACE para estudar a extremidade 3' e identificar os sítios alternativos de poliadenilação nos diferentes transcritos da metiltransferase; 3) analisar a função das metiltransferases por meio

do estudo das alterações acarretadas pelo bloqueio de um de seus transcritos, utilizando a técnica do RNAi. Os dados de 5' e 3' RACE obtidos, juntamente com os diferentes trabalhos realizados em nosso laboratório, indicam que todos os transcritos da metiltransferase possuem o exon 1 para iniciar a tradução, mas diferem significativamente no restante de sua composição de exons e nas escolhas dos sítios de poliadenilação. Análises realizadas com o DNA genômico, confirmaram a presença de pelo menos 2 genes e 3 pseudogenes para a metiltransferase específica do pistilo. Como a linhagem Petit Havana SR-1 em estudo é homocigota para a maioria dos genes, a presença de 5 sequências distintas sugere a existência de duplicações no genoma, durante a evolução deste gene. Estes genes são formados por 8 exons hipotéticos, divididos em três ou quatro blocos de fase aberta de leitura, intercalados por dois ou três introns, respectivamente. Assim, com os resultados disponíveis até o momento e com todas as análises realizadas neste trabalho, é proposto que as metiltransferases do pistilo de *N. Tabacum* sofrem um complexo mecanismo de processamento alternativo, o que pode representar uma vantagem adaptativa no processo reprodutivo desta espécie. Para o estudo da função dos transcritos da metiltransferase específica do pistilo, parte da região codificadora do clone de cDNA 046B11 foi inserida no vetor de expressão em plantas pK7GWIWG2(I) (RNAi), resultando no plasmídeo pGC2. Este plasmídeo foi utilizado para transfor-



mar discos foliares de *N. Tabacum* via *Agrobacterium tumefaciens*. Um total de 10 plantas transgênicas independentes foram obtidas. A quantificação por RT-PCR em tempo real demonstrou que todos os transgênicos pGC2 apresentaram níveis variáveis na redução da expressão da metiltransferase no pistilo. Todas as plantas presentes na casa de vegetação apresentaram formação e disposição de todas as estruturas reprodutivas corretas, quando comparadas a plantas do grupo controle (linhagem Petit Havana SR-1). Com relação às análises do processo reprodutivo das plantas transgênicas, foram observados baixa taxa de fertilidade em 2 plantas e baixo peso de sementes/flor em 5 plantas ( $p$ -valor < 0,01). No entanto, estas observações não foram correlacionadas de maneira convincente ao silenciamento da metiltransferase, pois há a possibilidade disto ter sido causado pelas infecções adquiridas pelas plantas durante as análises. Paralelamente a estes experimentos, a região 5' regulatória de uma das sequências genômicas da metiltransferase (cerca de 2,7 kb) foi clonada no vetor pPR97, para regular a expressão do gene *gus*, resultando no plasmídeo pCC2. Este plasmídeo foi utilizado para transformar discos foliares de *N. Tabacum* via *A. tumefaciens*. Órgãos florais e

vegetativos de 13 plantas transformadas com esta construção foram coletados e usados para extração de proteína total e realização de cortes histológicos. Os extratos foram analisados em ensaio fluorimétrico para detecção da atividade da proteína GUS. Os resultados mostraram que a sequência 5' regulatória da metiltransferase, utilizada por esse projeto, dirigiu a expressão do *gus* na antera de 12 das 13 plantas transgênicas analisadas. Em 9 dessas mesmas 12 plantas também foi detectada expressão de *gus* no pistilo, como era esperado. O ensaio histoquímico de duas plantas pCC2 mostram que a expressão no pistilo ocorre nos tecidos vascular e transmissor, e que na antera ocorre no estômio, tecido vascular e grãos-de-pólen. A expressão do gene *gus* na antera das plantas transgênicas foi inesperada. Este trabalho sugere que os diferentes transcritos das metiltransferases específicas do pistilo de *N. Tabacum* possuem uma importante função biológica nesta espécie. No entanto, experimentos de silenciamento gênico ainda não foram conclusivos para se desvendar suas funções na reprodução. Assim, experimentos adicionais são necessários para elucidar o papel do gene da metiltransferase na biologia da reprodução de *N. Tabacum*.

### EXPRESSION DIFERENCIAL DE GENES EM RESPOSTA A LIMITAÇÃO DE FOSFATO INORGÂNICO NO FUNGO FILAMENTOSO *Neurospora Crassa*: ANÁLISE FUNCIONAL DOS GENES *preg* E *nuc-1*

**Juliana Leal**

Orientador: Prof.Dr. Antonio Rossi Filho

Tese de Doutorado apresentada em 09/10/2008

O sistema de aquisição de fosfato inorgânico (Pi) em *N. Crassa* é mediado por quatro genes regulatórios: *nuc-2*, *preg*, *pgov* e *nuc-1*. Quando o Pi é limitante, NUC-2 inibe a ação do complexo PREG-PGOV, permitindo o transporte do fator de transcrição NUC-1 para o núcleo e a expressão de fosfatases Pi-repressíveis. No presente estudo, foi investigado o perfil de expressão gênica das linhagens mutantes *pregC* e *nuc-1RIP* cultivadas em pH alcalino e ácido, sob condições de limitação de Pi. O objetivo desse trabalho foi contribuir para o entendimento da resposta adaptativa à limitação de Pi e identificar genes regulados pela ciclina PREG e pelo fator de transcrição NUC-1. Utilizando as técnicas de *Differential Display (DDRT-PCR)* e Híbridação Subtrativa Supressiva (*SSH*) foram isolados transcritos diferencialmente expressos nas linhagens mutantes *pregC* e *nuc-1RIP* cultivadas em Pi-limitante, pH 7.8 e 5.4. Dentre os genes diferencialmente expressos na linhagem mutante *pregC* que tiveram sua expressão validada por *Northern Blot*, estão transcritos similares a genes que codificam para ubiquinona C-metiltransferase, envolvida na biossíntese de coenzima Q; iso-orotato decarboxilase, implicada na via de reciclagem de pirimidinas (*thymidine salvage pathway*), uma via alternativa a via de

biossíntese *de novo* de pirimidinas; galactose-1-fosfato uridililtransferase, a qual atua convertendo galactose-1-fosfato e UDP-glicose em glicose-1-fosfato e UDP-galactose. Por outro lado, dentre os genes com expressão diferencial na linhagem mutante *nuc-1RIP*, os quais tiveram a expressão confirmada, estão aqueles que codificam para as seguintes proteínas: hexagonal-1, principal componente dos corpos de Woronin; proteína de choque térmico HSP70, a qual atua como chaperona numa variedade de processos celulares; proteína carreadora de ADP/ATP, responsável pela importação de ADP presente no citosol e exportação de ATP para fora da matriz mitocondrial; proteínas ribossomais L16 e L30, envolvidas na biossíntese de ribossomos; proteína da via biosintética de tiamina NMT-1, implicada na biossíntese de tiamina; proteína bifuncional ARGJ, a qual participa da biossíntese de arginina; guanilato quinase, envolvida na via de reciclagem de purinas (*guanine salvage pathway*), uma via alternativa a via de biossíntese *de novo* de purinas. Além disso, genes como *hsp-70* apresentaram expressão alterada na linhagem mutante *pacCKO* cultivada em pH ácido. Estes resultados revelam novas vias metabólicas envolvidas na resposta adaptativa à limitação de Pi e reforçam a existência de uma convergência entre o sistema de aquisição de Pi, o circuito regulador do pH e o metabolismo de nucleotídeos. Além disso, esses resultados indicam que o fator de transcrição PACC também tem funções metabólicas em pH ácido.

## IDENTIFICAÇÃO DE GENES REGULADOS PELO MECANISMO DE METILAÇÃO DURANTE A EXPANSÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E NA FASE INICIAL DA OSTEOGÊNESE

**Patrícia Santos Pereira Lima**

Orientador: Prof.Dr. Wilson Araújo da Silva Junior

Tese de Doutorado apresentada em 13/10/2008

A medula óssea de adultos contém células-tronco mesenquimais (CTMs) que atuam na regeneração dos tecidos mesenquimais tais como ósseo, cartilaginoso, adiposo e muscular, além de ligamentos e tendões. Essas características elegem as CTMs como excelentes candidatas para o uso nos protocolos de medicina regenerativa. Os aspectos moleculares que governam a regulação para cada via de diferenciação são uma área de investigação ainda em estudo e a identificação de genes cuja expressão promova, por exemplo, a diferenciação osteoblástica ou iniba a diferenciação em outros tipos celulares é uma estratégia amplamente utilizada no esforço para a compreensão dos processos moleculares envolvidos na diferenciação tecidual. O objetivo deste estudo é identificar genes regulados pelo mecanismo de metilação durante a expansão e a diferenciação inicial em osteoblastos das CTMs. As CTMs foram obtidas da medula óssea de dois diferentes doadores, expandidas e tratadas por quatro dias com o agente demetilante 5-aza-2'-deoxicitidina. A diferenciação osteogênica foi estimulada por sete dias, sendo os quatro últimos dias de tratamento. Todos os experimentos foram realizados com seus respectivos controles. Ao final dos quatro dias de tratamento, as células foram coletadas para extração de RNA e DNA. Para a identificação de genes com expressão aumentada após o

tratamento foi utilizada a plataforma de *microarrays CodeLink*. A validação da expressão dos genes selecionados foi realizada por RT-PCR em tempo real e o padrão de metilação da região promotora dos genes foi analisado por sequenciamento após a modificação do DNA pelo bissulfito de sódio. Três genes de cada etapa foram selecionados para a análise: os genes *FBLN2*, *LAMB2* e *ADFP* na expansão e na diferenciação foram selecionados *TBKBPI*, *ARHGEF17* e *ALPL*. Os genes *SAA2* e *MMP7*, cuja expressão aumentou durante a diferenciação (amostras controle), também foram selecionados. A expressão de todos os genes foi validada por qRT-PCR embora, em muitos casos, a diferença de expressão entre as amostras tratada e controle tenha sido maior pela metodologia do *microarray*. No entanto, a expressão destes genes nas amostras de diferentes indivíduos foi semelhante, com exceção para os genes *ADFP* e *ALPL*. A análise de metilação na ilha CpG dos genes *FBLN2*, *LAMB2*, *ADFP* e *ALPL* revelou a presença de metilação apenas na ilha CpG do gene *FBLN2*. A diminuição na densidade de metilação do gene *FBLN2* favoreceu o aumento da sua expressão, embora a metilação não pareça ser o único mecanismo responsável pela expressão deste gene. O aumento da expressão de genes que codificam para componentes da matriz extracelular (*FBLN2*, *LAMB2*, *SAA2* e *MMP7*) e de genes relacionados à diferenciação celular (*ADFP* e *ALPL*) assim como o perfil destas expressões após os sete dias de diferenciação em osteoblastos, indicam que a hipometilação favorece a diferenciação das CTMs.

## POLIMORFISMOS DOS GENES *XRCCI* E *XRCC3* E A RESPOSTA AOS DANOS INDUZIDOS NO DNA PELO ETOPOSIDO EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA

**Ana Claudia Teixeira**

Orientador: Prof<sup>ª</sup>.Dra<sup>ª</sup>. Catarina Satie Takahashi

Dissertação de Mestrado apresentada em 17/10/2008

Apesar de intensivos estudos e substanciais progressos no entendimento dos fatores de risco e suscetibilidade ao câncer de mama (CM), esta neoplasia permanece como importante causa de morte entre mulheres. Idade, história familiar, menarca precoce, menopausa tardia, ocorrência da primeira gravidez após os 30 anos e da nuliparidade constituem fatores de risco. Além disso, polimorfismos nos genes envolvidos no reparo de danos no DNA, como os genes *XRCCI* e *XRCC3*, podem contribuir para o aumento da suscetibilidade ao CM. Os objetivos do presente trabalho foram avaliar pelo Teste do MN e Ensaio Cometa os danos basais e a resposta celular aos danos induzidos, *in vitro*, no DNA pelo quimioterápico Etoposido em pacientes

com CM, virgens de qualquer tipo tratamento e em mulheres saudáveis utilizadas como controles e além disso, estabelecer as frequências dos polimorfismos nos genes *XRCCI* e *XRCC3* na amostra de pacientes com CM e em mulheres saudáveis e associação destes dois polimorfismos com a suscetibilidade ao CM. No Teste do MN, foi observada uma sensibilidade maior do grupo de pacientes aos danos induzidos pelo Etoposido. O Ensaio Cometa mostrou que pacientes e mulheres saudáveis respondem de modo semelhante ao tratamento com o Etoposido. Também foi observado que pacientes acima de 45 anos apresentaram um grau maior de sensibilidade aos danos induzidos pelo Etoposido na concentração de 25  $\mu$ M quando comparadas com pacientes abaixo de 45 anos avaliadas no Ensaio Cometa. Quanto ao hábito tabagista, este se mostrou um fator de contribuição ao aumento de sensibilidade a indução de danos pelo Etoposido no Ensaio Cometa no grupo de mu-

lheres saudáveis, para os tratamentos com esta droga nas concentrações de 10 e 25  $\mu\text{M}$ . Na análise molecular, o alelo variante *241Met* do gene *XRCC3* mostrou-se mais frequente no grupo de pacientes tanto na amostra estudada na análise citogenética quanto na amostra estudada na análise molecular, sugerindo uma diminuição da capacidade de reparo destas pacientes, o que poderia conferir um risco

aumentado ao CM. Quanto ao hábito tabagista, somente as pacientes não fumantes, portadoras do alelo *241Met* do gene *XRCC3*, possuem um risco aumentado para o CM. Não foi encontrada associação do polimorfismo *Arg399Gln* do gene *XRCC1* com o risco ao CM mesmo quando associado à fatores de risco como hábito tabagista e a presença de familiares com câncer.

## INFLUÊNCIA DA HIPERGLICEMIA NOS NÍVEIS DE DANO NO DNA E NA EXPRESSÃO DE GENES DE DEFESA AO DANO OXIDATIVO EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2

**Danilo Jordão Xavier**

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elza Tiemi Sakamoto Hojo

Dissertação de Mestrado apresentada em 24/10/2008

O Diabetes é uma das maiores causas de mortalidade no mundo, chegando a afetar cerca de 150 milhões de pessoas atualmente, sendo que esse número tende a aumentar, principalmente devido à obesidade, fator intimamente relacionado ao Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2). Entretanto, o desenvolvimento da doença depende de diversos fatores de risco, tanto genéticos quanto ambientais, que ainda necessitam ser elucidados. Uma característica marcante dos pacientes diabéticos é um alto nível de estresse oxidativo, resultante principalmente da hiperglicemia e diminuição da defesa anti-oxidante. No presente trabalho, foi proposta a detecção dos níveis de dano no DNA pelo ensaio do cometa, assim como comparar os níveis de expressão de genes relacionados com a defesa, sinalização e reparo do DNA em resposta ao estresse oxidativo (*ATM*, *ATR*, *SOD1*, *OGG1*, *XRCC1*, *APEX1* e *FEN1*) em pacientes DM2 hiperglicêmicos (PAH) e não hiperglicêmicos (PANH). Adicionalmente, o mesmo estudo foi realizado em pacientes DM2, cujas amostras foram coletadas em dois momentos: antes (PI) e após (PPI) um período de internação (sete dias) para compensação da doença e normalização dos níveis glicêmicos, comparativamente ao grupo controle. Na análise pelo ensaio do Cometa, o grupo PAH apresentou níveis significativamente ( $p < 0,05$ ) maiores de danos no DNA em relação ao grupo PANH, sendo que o último apresentou

níveis de dano semelhantes ao grupo controle, demonstrando que a hiperglicemia é o principal fator na indução do estresse oxidativo em pacientes DM2. Com relação aos pacientes submetidos à internação por 7 dias, o grupo PPI apresentou níveis significativamente ( $p < 0,05$ ) menores de dano em relação ao grupo PI, embora estes tenham se apresentado acima dos observados para o grupo controle. A análise por qRT-PCR revelou perfis de expressão gênica diferenciados entre os grupos de pacientes estudados, embora as diferenças não tenham sido estatisticamente significativas. Observou-se uma repressão de genes de reparo e de sinalização (*ATM*, *ATR*, *OGG1*, *XRCC1*, *FEN1* e *APEX1*) nos grupos PAH e PI, que apresentaram altos níveis de danos no DNA. Esse resultado pode apresentar um significado biológico relevante, sendo que na literatura, foram relatados resultados compatíveis com o estado de repressão transcricional de alguns desses genes, como os genes *ATM* e *ATR*. Os resultados obtidos demonstram a influência da hiperglicemia na indução de dano oxidativo no DNA. Além disso, os dados acerca da expressão gênica sugerem que pacientes DM2 regulam diferencialmente genes envolvidos com os processos de defesa, sinalização e reparo do DNA em resposta ao estresse oxidativo, o que pode estar relacionado com os níveis de dano observados em cada grupo analisado. Os mecanismos envolvidos na regulação desses processos são complexos e ainda necessitam ser elucidados, mas os dados do presente trabalho mostram informações relevantes que podem contribuir na compreensão desses mecanismos.

## DESEQUILÍRIOS CROMOSSÔMICOS EM NOVE CASOS DE OSTEOSSARCOMA DETECTADOS ATRAVÉS DE HIBRIDAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA (CGH)

**Angel Mauricio Castro Gamero**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone

Dissertação de Mestrado apresentada em 30/10/2008

O osteossarcoma (OS) é o tumor ósseo maligno mais frequente da infância e adolescência com uma taxa de sobrevivência livre de eventos de 50 – 70% após 3 anos. O pico de incidência ocorre na segunda década da vida, característi-

ca que sugere uma relação entre o rápido crescimento ósseo da adolescência e o desenvolvimento da neoplasia. Ainda, o conhecimento das bases genéticas é insuficiente. Estudos de citogenética clássica têm demonstrado que o OS caracteriza-se por exibir alta heterogeneidade cariotípica, incluindo altos graus de aneuploidia e rearranjos estruturais complexos. A técnica de CGH constitui uma ferramenta valiosa na análise do perfil genômico de tumores sólidos, e

tem confirmado a complexidade das alterações cariotípicas em OS, descrita pela citogenética convencional. Não obstante, os estudos existentes são divergentes, e poucos têm estudado as informações obtidas por CGH em relação com a progressão tumoral. O objetivo do presente estudo foi identificar a presença de desequilíbrios cromossômicos em amostras de OS por meio da técnica de CGH. Os experimentos de CGH foram realizados de acordo com o descrito por Kallioniemi *et al* (1994). Foram analisadas nove amostras (3 biópsias, 5 ressecções após quimioterapia e 1 metástase). O CGH detectou desequilíbrios cromossômicos em todas as amostras. Os ganhos foram mais frequentes que as perdas. Muitas alterações cromossômicas foram observadas, especialmente ganhos nos cromossomos 1q, 2, 3p,

4, 5p, 6, 7, 8, 11p, 14q, 16, 21q e X; e perdas nos cromossomos 1p, 2q, 3q, 5q, 9q, 11q e 17q. As regiões mínimas de sobreposição mais frequentes foram ganhos de 2p13-p14, 2q36-q37, 4q21 e 8p22, e perdas de 1p34.2, 3q22-q23 e 3q24. Três pacientes apresentaram amostras pareadas, e as alterações cromossômicas detectadas foram muito variadas, refletindo a heterogeneidade cromossômica intratumoral em cada caso. A mais alta divergência clonal entre as amostras pareadas foi observada entre a amostra de ressecção e a amostra metastática correspondente, mostrando a complexidade cromossômica adquirida durante a progressão e metastatização no caso descrito. Ainda são necessárias investigações adicionais, que contribuíssem para a caracterização completa dos genes localizados nessas regiões.

### BUSCA DE INIBIDORES NATURAIS CONTRA O VENENO DE *Apis mellifera*

**Daniel Macedo de Melo Jorge**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvana Giuliatti

Dissertação de Mestrado apresentada em 31/10/2008

Os insetos são os mais numerosos animais encontrados no mundo, com mais de 675 mil espécies conhecidas. Pertencentes à ordem Hymenoptera, da superfamília Apoidea, as abelhas são encontradas distribuídas em aproximadamente 20 mil espécies. No Brasil estima-se que existam 1.700 espécies. Uma das principais espécies é a *Apis mellifera*, com ocorrência cosmopolita. A *Apis mellifera*, popularmente conhecida como abelha africanizada, é agressiva, enxameia várias vezes ao ano e utiliza uma grande variedade de locais para nidificar. Esse comportamento aumenta o contato direto entre o inseto e a população, aumentando o número de acidentes. Os acidentes com abelhas representam um problema de saúde pública em diversos países do mundo pela frequência com que ocorrem e pela mortalidade que ocasionam. O presente estudo propõe a busca por inibidores naturais contra o veneno de abelhas. Um sistema e uma base de dados foram desenvolvidos para a integração entre dados de plantas medicinais antivenenos e os venenos de abelhas. As atividades anti-hemorrágica, anti-proteolítica, anti-miotóxica, anti-fosfoli-

pase e anti-edema de plantas medicinais antiveneno foram analisadas por meio de ensaios farmacológicos. As possíveis interações entre as toxinas Melitina e Fosfolipase A2 com inibidores foram avaliadas, através do *docking* virtual. O banco de dados, denominado *Bee Venom*, foi implementado e os dados de bancos de dados públicos foram inseridos no sistema. O sistema foi liberado para acesso público no endereço eletrônico <http://gbi.fmrp.usp.br/bee venom/>. Durante a análise da proteína Melitina foram encontradas as regiões da proteína em que os possíveis inibidores devem interagir e identificadas as propriedades químicas que os inibidores devem possuir para interagir corretamente com a Melitina. Nas análises *in silico* foi possível identificar 10 possíveis inibidores que interagiram corretamente com o sítio ativo da Fosfolipase A2. Algumas espécies do Banco de Germoplasma da FMRP/USP foram obtidas e utilizadas nos experimentos de atividade fosfolipásica indireta e de Edema, sendo possível observar inibição do veneno total e da proteína Fosfolipase A2. Os compostos sintéticos e inibidores avaliados não causaram inibição em todos os experimentos avaliados. Já as plantas obtidas no laboratório de Toxinas Animais e Inibidores Naturais e Sintéticos causaram inibição do veneno total e da proteína Fosfolipase A2.

### ASPECTOS MOLECULARES DA EVOLUÇÃO DO GENE DARC EM PRIMATAS

**Thiago Yukio Kikuchi Oliveira**

Orientador: Wilson Araújo da Silva Junior

Dissertação de Mestrado apresentada em 10/12/2008

Genes envolvidos com a interação hospedeiro-patógeno são fortemente afetados pela seleção natural positiva. O gene codificante do antígeno sanguíneo Duffy, tam-

bém conhecido como DARC (*Duffy Antigen Receptor for Chemokines*), tem um importante papel na invasão dos eritrócitos pelos parasitas causadores da malária, *Plasmodium vivax* em humanos e *Plasmodium knowlesi* em outros primatas. A estrutura do gene DARC já é conhecida, estando este presente na região 1q22-q23 do cromossomo 1, e sendo composto por dois éxons separados por um grande

íntron. Em uma população africana a deleção de um nucleotídeo no domínio GATA-1 da região promotora do gene é responsável pela não expressão de DARC nos eritrócitos e pela resistência à invasão pelo *P. vivax*. Além disso, o antígeno DARC age como um receptor promíscuo de quimiocinas, sendo expresso nos eritrócitos, células endoteliais de vênulas e outros tecidos. Devido a esse papel dual, no presente estudo sequenciou-se regiões homólogas do gene DARC em macacos do Novo e Velho Mundo e utilizando métodos estatísticos procurou-se indícios da seleção natural positiva na sua história evolutiva. Nenhuma nova mutação foi encontrada no promotor ou na região codificante. As árvores filogenéticas pelos métodos de máxima parcimônia, máxima verossimilhança e neighbor-join apresentaram topologias semelhantes com três grandes clados monofiléticos reconhecíveis e com a espécie *Macaca fascicularis* apresentando um perfil polifilético. O teste de

seleção positiva pelos métodos de Nei-Gojobori, máxima verossimilhança por ramos e máxima verossimilhança por sítios não demonstraram, estatisticamente, a ação da seleção positiva sobre o gene DARC. Porém, o teste de máxima verossimilhança por sítio em domínios demonstrou que existem regiões do gene DARC sujeitas à diferentes pressões seletivas, mas também falhou em detectar a assinatura da seleção positiva. Os resultados indicam a presença da seleção darwiniana sobre a região de ligação do *P. vivax*, porém os testes de máxima verossimilhança utilizados, aparentemente, não possuem poder suficiente para detectar a sua assinatura. Além disso, os resultados sugerem que a região de ligação do *P. vivax* está sob influência de duas pressões seletivas antagônicas (seleção positiva exercida pelo parasita e seleção purificadora exercida pelas quimiocinas) o que pode, também, explicar a não detecção da seleção positiva.

### ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA NO DERMATÓFITO *Trichophyton rubrum* MIMETIZANDO A INFECÇÃO *in vitro*: PH E DIFERENTES FONTES DE CARBONO REGULANDO GENES

**Fernanda Cristina de Albuquerque Maranhão**

Orientador: Nilce Maria Martinez Rossi

Tese de Doutorado apresentada em 12/12/2008

Dermatófitos são fungos filamentosos com a habilidade de invadir substratos queratinizados e causar dermatofitoses em humanos e animais, penetrando profundamente apenas em hospedeiros imunocomprometidos. *Trichophyton rubrum* é um fungo antropofílico e cosmopolita, o mais comum agente de micoses superficiais, que usa componentes celulares como proteínas e lipídeos após uma específica regulação de sua expressão gênica governada pelo pH ambiente e sensoriamento celular. A virulência de *T. rubrum* é relacionada com a secreção de enzimas proteolíticas, um importante fator determinante na invasão, utilização e subsequente disseminação através do estrato córneo. O objetivo desse estudo foi identificar através de Hibridização Substrativa Supressiva (SSH) genes de *T. rubrum* preferencialmente expressos durante o crescimento na presença de queratina e lipídeos, quando *T. rubrum* degrada fontes de carbono tipicamente encontradas em células epidérmicas. Inicialmente, nós avaliamos as mudanças no pH extracelular durante seu crescimento em queratina e lipídeo (depois de 6, 12, 24, 48, 72 h e 7 dias) em pH inicial 5,0, onde foi observado um gradual aumento do pH basal sob ambas as condições de teste, comparado com a condição glicose (controle). Também identificamos 576 transcritos de *T. rubrum* diferencialmente expressos por SSH usando confídios cultivados por 72 h em queratina como teste e em glicose como controle. Os genes de *T. rubrum* ativados codificam proteí-

nas putativas que foram validadas por cDNA *dot-blot* e *northern blot*, mostrando similaridade com proteínas fúngicas envolvidas no metabolismo básico, crescimento e virulência, p. ex., transportadores ABC-MDR, MFS e ATPase de cobre, permease, NIMA *interactive protein*, poliproteína Gag-Pol, fatores de virulência subtilisinas serino-proteases (Sub 3 e 5) e metaloproteases (Mep 3 e 4) e Hsp30. Adicionalmente, entre os 762 clones obtidos na biblioteca da condição lipídeo (72 h), 80 transcritos superexpressos foram confirmados por cDNA *dot-blot*, revelando 14 *unigenes* similares à proteínas de vários organismos patogênicos, como glicoproteína 43 kD, transportador MDR, proteína G, quitina sintase e serino/treonina fosfatase. Transcritos do gene *TruMDR2*, codificador de um transportador ABC, foi isolado tanto na presença de queratina quanto em lipídeo, e a análise da linhagem mutante  $\Delta TruMDR2$  de *T. rubrum* mostrou uma redução na atividade infectante, caracterizada pelo baixo crescimento em unhas humanas comparada com o tipo selvagem. A alta expressão de transportadores por *T. rubrum* em condições que mimetizam a infecção e a redução na virulência de  $\Delta TruMDR2$  durante o modelo *in vitro* sugerem que transportadores estão envolvidos na patogenicidade de *T. rubrum*. Outro linhagem mutante ( $\Delta pacC-1$ ) com um nocaute no gene *pacC* que codifica um fator de transcrição regulado pelo pH local, mostrou a expressão de proteases (Sub 3 e 5 e Mep 4) diminuída após o crescimento em queratina em comparação com o tipo selvagem em análises de *northern blots*. Essas proteases tem uma atividade ótima em pH alcalino, e nossos resultados indicam uma regulação defectiva do gene *pacC* de *T. rubrum* na ativação de

proteases. Em conclusão, através do uso de SSH foi possível identificar genes de *T. rubrum* ativados após tratamentos específicos, o que sugere a importância dos mesmos na interação dermatófito-hospedeiro, instalação e manutenção da doença. Esses resultados disponibilizam novos da-

dos sobre *T. rubrum* que levarão a um melhor entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos no crescimento, metabolismo geral e patogenicidade, e também auxiliar na identificação de novos e efetivos alvos de drogas para dermatófitos.

## GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA

### DIAGNÓSTICO DO FATOR RHD UTILIZANDO A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE CONVENCIONAL

**Conrado Milani Coutinho**

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Duarte

Dissertação de Mestrado apresentada em 10/10/2008

A aplicação dos métodos de biologia molecular tem acrescentado benefícios aos métodos convencionais de diagnóstico do grupo sanguíneo *Rhesus* (Rh). Alguns estudos evidenciaram a superioridade prática da genotipagem *RhD* por reação em cadeia da polimerase (PCR) em relação às técnicas de identificação do fenótipo dos antígenos do grupo Rh obtidas pela hemaglutinação. Esta análise molecular tem sido realizada utilizando-se várias sequências cromossômicas e diferentes tipos de técnicas. O grupo Rh contém dois genes homólogos, um codificando o antígeno D e o outro os antígenos C/c e E/e. Os objetivos deste projeto foram: 1) Detectar a presença de sequência *RhD* específica dos indivíduos Rh positivo; 2) Comparar a presença/ausência destas sequências com o grupo sanguíneo detectado pela hemaglutinação e calcular a sensibilidade e a especificidade da PCR. Para cumprir estes objetivos, foram analisadas amos-

tras de DNA extraídas de sangue periférico de 23 indivíduos (4 homens e 19 mulheres) Rh positivo (11) e negativo (12) para amplificação de sequências dos genes *RhD* e *RhCE* utilizando a técnica de PCR convencional. Nestas amostras, a comparação dos resultados da PCR com os da hemaglutinação demonstrou total concordância entre os testes. A sensibilidade do método foi avaliada pela realização da PCR em amostras de sangue Rh positivo diluídas em água e em sangue Rh negativo, amplificando o DNA na concentração de até 4 pg/μl. Estes resultados indicaram que a técnica de PCR mostrou-se efetiva no diagnóstico da genotipagem do fator Rh, vislumbrando-se a possibilidade de sua utilização em outros tecidos de origem embrião-fetal para orientação de diagnóstico fetal invasivo e do uso profilático da imunoglobulina anti-D apenas nos casos de incompatibilidade Rh materno-fetal. Adicionalmente, indicaram que havendo melhora da sensibilidade desta técnica será possível detectar quantidades objetivamente menores de DNA fetal na circulação materna, fundamentando um importante passo rumo ao diagnóstico do fator Rh fetal por técnica não invasiva.

### INFLUÊNCIA DA ENDOMETRIOSE SOBRE A RESPOSTA OVARIANA EM CICLOS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA: PROVÁVEL ASSOCIAÇÃO COM PREJUÍZO DO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR, MAS NÃO DO *pool* DE RESERVA

**Bruno Ramalho de Carvalho**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Carolina J. de Sá Rosa e Silva  
Dissertação de Mestrado apresentada em 13/10/2008

**Introdução:** A avaliação da reserva ovariana em reprodução assistida (RA) busca identificar mulheres em que a exaustão folicular determine as dificuldades reprodutivas. Além da idade, a presença de causas outras de subfertilidade, como a endometriose (EDT), implica interferências negativas potenciais sobre a resposta ovariana.

**Objetivo:** Avaliar a reserva folicular ovariana de mulheres subférteis portadoras de endometriose e determinar o melhor preditor de má resposta em RA.

**Métodos:** Foram analisados 87 ciclos de RA em mulheres com idade inferior a 40 anos, ciclos menstruais regulares, sem patologias endócrinas e com ambos os ovários, sendo 30 ciclos em portadoras de EDT (casos) e 57 ciclos em mulheres subférteis por fator masculino exclusivo (controles). A reserva ovariana foi inferida pelas dosagens basais dos hormônios anti-mülleriano (AMH) e folículo estimulante (FSH), a contagem de folículos antrais pequenos (CFA) e a medida do volume ovariano médio (VOM). Curvas *Receiver Operating Characteristic* (ROC - AUC) foram traçadas para avaliação da capacidade discriminatória de cada teste em identificar má resposta.

**Resultados:** Pacientes com EDT apresentaram

FSH basal significativamente maior em relação aos controles ( $9,13 \pm 5,09$  mUI/mL vs.  $6,28 \pm 2,45$  mUI/mL;  $p < 0,05$ ), sem diferenças para AMH, CFA e VOM. O número total de oócitos aspirados foi menor na EDT em relação aos controles ( $5,33 \pm 3,43$  vs.  $8,28 \pm 5,8$ ;  $p < 0,05$ ) e correlacionou-se significativamente com o AMH em ambos os grupos (EDT:  $r = 0,61$ ; Controles:  $r = 0,58$ ;  $p < 0,0001$ ). O FSH basal apresentou correlação significativa com o total de oócitos aspirados apenas na EDT ( $r = -0,48$ ;  $p < 0,01$ ); também na EDT, o AMH basal foi o marcador individual com melhor potencial discriminatório para má resposta (AUC = 0,875), seguido de FSH basal (AUC = 0,682) e VOM (AUC = 0,665), enquanto no grupo controle, o AMH foi o melhor marcador

(AUC = 0,8372), seguido do VOM (AUC = 0,709) e da CFA (AUC = 0,686).

**Conclusões:** O FSH basal foi significativamente maior nas pacientes subférteis com EDT e correlacionou-se com a resposta em RA apenas nas portadoras da doença. O AMH basal foi o marcador com o melhor potencial discriminatório de má resposta, independentemente da presença da endometriose. CFA e VOM não se apresentaram como bons preditores de má resposta. Sendo assim, a associação entre endometriose e subfertilidade deve estar vinculada a alterações do crescimento/desenvolvimento adequado do folículo ovariano e não a prejuízos sobre a reserva folicular gonadal propriamente dita.

## PERFIL DA SECREÇÃO DE PROGESTERONA EM RATAS NO PROESTRO: UMA NOVA PROPOSTA PARA O CONTROLE DO PICO PRÉ-OVULATÓRIO DE LH

**Fernanda Vieira Rodovalho Callegari**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Janete A. Anselmo Franci  
Tese de Doutorado apresentada em 04/12/2008

A ocorrência do pico pré-ovulatório de LH no proestro depende da pré-exposição aos estrógenos seguida da ação aguda da progesterona, hormônio responsável pela deflagração e amplitude desse pico. No entanto, a origem da progesterona durante essa fase do ciclo ainda é incerta. Enquanto alguns estudos sugerem que a adrenal contribui significativamente para secreção de progesterona nesse período, outros apontam a ovário como a fonte principal. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi estudar o perfil e a origem da secreção de progesterona durante o proestro e a sua relação com o pico pré-ovulatório de LH. Para tanto, às 7h da manhã do proestro ratas Wistar adultas foram submetidas apenas à canulação da veia jugular (controle) ou a esse procedimento seguido pela cirurgia fictícia de retirada do ovário e adrenal (Sham), ou pela ovariectomia (OVX) ou pela adrenalectomia (ADX). Amostras sanguíneas foram coletadas a cada 15 minutos das 11h00 às 13h45 para dosagem de progesterona, estradiol e corticosterona e a cada hora das 14h às 19h para dosagem desses três hormônios e do LH. Adicionalmente, 7 dias depois da ovariectomia, ratas foram tratadas com óleo milho (OVO) ou 17- $\beta$ -estradiol (OVE) por 3 dias consecutivos, para compreender melhor o padrão de secreção de progesterona pela adrenal e verificar essa secreção se essa secreção poderia ser modulada pelos estrógenos. Um, dois ou três dias depois da última injeção amostras de sangue foram coletadas conforme descrito acima. No proestro, nenhuma diferença significativa foi detectada entre os grupos controle e Sham em relação ao número de animais que apresentaram o pico pré-ovulatório de LH, ao número de oócitos presentes nos ovidutos na manhã do estro, bem como às concentrações plasmáticas de LH, progesterona, estradiol e corticostero-

na, sendo os dados referentes a esses dois grupos apresentados em um único grupo denominado **Controle**. A secreção de estradiol foi similar nos grupos Controle e ADX e significativamente reduzida no grupo OVX. Como esperado, a secreção de corticosterona foi completamente abolida no grupo ADX, enquanto foi similar nos grupos Controle e OVX. Em todos os grupos experimentais as concentrações basais de progesterona foram em média de 2 pg/mL. Entre às 12h e 14h o grupo Controle apresentou um aumento discreto, mas significativo, da secreção de progesterona (pico 1: de  $3,5 \pm 1,1$  para  $22,3 \pm 2,7$  ng/mL), e após às 15h um segundo pico de progesterona (pico 2: de  $10,5 \pm 2,2$  para  $43,0 \pm 2,5$  ng/mL), como também o pico de LH ( $25,4 \pm 2,4$  ng/mL). Embora o grupo OVX não tenha apresentado o pico 2 de progesterona (de  $5,7 \pm 2,2$  para  $6,5 \pm 1,2$  ng/mL), o pico de LH ( $26,5 \pm 3,9$  ng/mL) foi similar ao do grupo **Controle**. Nessas ratas o pico 1 de progesterona foi atenuado para  $12,3 \pm 1,9$  ng/mL. Ambos picos de progesterona 1 e 2 como o pico de LH, foram praticamente abolidos nas ratas ADX (pico 1: de  $2,0 \pm 0,3$  para  $4,5 \pm 0,7$  ng/mL; pico 2: de  $2,2 \pm 0,4$  para  $8,9 \pm 3,6$  ng/mL). Nas ratas OVX, tratadas ou não com estradiol, um pico de progesterona (provavelmente de origem adrenal) foi observado diariamente por volta das 12h00, sendo que a amplitude desse pico não foi influenciada pelo estradiol (OVO:  $19,0 \pm 5,7$  ng/mL; OVE:  $22,9 \pm 5,3$  ng/mL). Esses dados, em conjunto, sugerem que: 1) o pico 1 de progesterona é de origem adrenal e está envolvido na gênese do pico de LH; 2) esse pico parece ser circadiano uma vez que ratas OVX apresentam um ritmo diário de secreção de progesterona, com um pico por volta das 12h00; 3) o pico 2 de progesterona é de origem ovariana e não é necessário para ocorrência do pico de LH; 4) existe uma comunicação endócrina entre ovário e a adrenal de forma que o ovário participa da regulação da secreção de progesterona pela adrenal e 5) o estradiol não está envolvido na regulação da secreção de progesterona pela adrenal.

## INFLUÊNCIA DO ESTROGÊNIO NA HISTOMORFOMETRIA DA PAREDE VAGINAL: REPERCUS- SÕES NA FUNÇÃO SEXUAL

**Lúcia Alves da Silva Lara**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina J. de Sá Rosa e Silva  
Dissertação de Mestrado apresentada em 11/12/2008

**Introdução:** O hipoestrogenismo causa alteração estrutural na vaginal que pode levar a alterações na resposta sexual. Tem sido reportado o afinamento da parede vaginal após a menopausa, porém, sem comprovação morfométrica.

**Objetivos:** Verificar a espessura da parede vaginal em condições normo e hipoestrogenicas, correlacionar disfunção sexual com espessura da parede, expressão do receptor estrogênico e estradiol sérico.

**Métodos:** Espécimes cirúrgicos da vagina de 31 mulheres, sendo 18 normoestrogênicas e 13 na pós-menopausa, submetidas a colpoperineoplastia por prolapso genital I e II. Aferidos: FSH e estradiol, prolactina e TSH. Realizou-se: tricrômico de Masson e HE, histomorfometria, imunohistoquímica para receptores estrogênicos  $\alpha$ , semiquantifi-

cados pelo *H-score*, função sexual aferida pelo GRISS. Resultados: A parede vaginal é mais espessa no grupo menopausa em relação ao grupo menacme (parede anterior  $2,72 \pm 0,72$ mm e  $2,16 \pm 0,43$ ,  $p=0,01$  e parede posterior  $2,63 \pm 0,71$ mm e  $2,07 \pm 0,49$ mm,  $p=0,01$ , respectivamente). A espessura e a fração de área da camada muscular são maiores no grupo menopausa (parede anterior:  $1,54 \pm 0,44$  e  $1,09 \pm 0,3$ mm,  $p=0,02$  e posterior  $1,45 \pm 0,47$  e  $1,07 \pm 0,44$ mm,  $p=0,03$  e  $0,51 \pm 0,10$  e  $0,42 \pm 0,11$ mm<sup>2</sup>,  $p=0,03$  e  $0,40 \pm 0,10$  e  $0,49 \pm 0,08$  mm<sup>2</sup>,  $p=0,02$ ). O epitélio vaginal do segmento proximal é mais espesso do que o segmento médio na parede posterior ( $0,17 \pm 0,07$ mm,  $0,15 \pm 0,05$ mm,  $0,24 \pm 0,09$ mm,  $p=0,02$ ). Não houve correlação entre dor coital, espessura da parede e concentrações do estradiol nos dois grupos. Conclusão: A parede vaginal é mais espessa após a menopausa. Neste estudo, não ocorreu associação entre disfunção sexual genital concentrações estrogênicas e espessura da parede vaginal.

## IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

### ESTUDO DA DETECÇÃO DA INTERFERÊNCIA VIRAL ENTRE OS VÍRUS DENGUE-2 E FEBRE AMARELA

**Emiliana Pereira Abrão**

Orientador: Prof. Dr. Benedito Antônio Lopes da Fonseca  
Tese de Doutorado apresentada em 27/10/2008

A dengue é a mais importante doença causada por um arbovírus. Anualmente as infecções com o vírus dengue ocasionam aproximadamente 100 milhões de casos de dengue clássico e mais de 500 mil de dengue hemorrágico em todo o mundo (Halstead, 2007)). O principal vetor urbano dos vírus dengue é o mosquito *Aedes aegypti* (*Ae aegypti*), que se caracteriza por seu perfil altamente doméstico. Da mesma forma que a dengue, outra arbovirose de semelhante importância é a febre amarela. Esta se caracteriza por ser uma doença infecciosa aguda, prevalente nas Américas e África. Manifesta-se nas modalidades urbana e silvestre e é causada pelo vírus da febre amarela, um arbovírus transmitido pelos mosquitos *Aedes aegypti* (no caso da modalidade urbana) e *Ae. africanus*, *Haemagogus* -e outros (no caso da modalidade silvestre). Com relação à febre amarela, embora uma vacina segura esteja disponível há 60 anos, houve um aumento no número de pessoas infectadas desde o início da década de 1980 em países da América do Sul, incluindo o Brasil. No entanto, o ciclo urba-

no da doença não tem sido detectado por mais de meio século no país. Algumas hipóteses têm sido investigadas para se tentar explicar essa ausência de epidemias no Brasil, embora nenhuma delas tenha sido efetivamente comprovada. Este trabalho teve como objetivo estudar este achado epidemiológico através da análise *in vitro* de um fenômeno conhecido como interferência viral, uma situação em que a infecção por um determinado tipo viral impede a infecção das mesmas células por um vírus diferente. Desta forma, foi estudada a influência dos vírus dengue sorotipo 2 (DENV-2) e febre-amarela-cepa vacinal 17U (VFA 170) e selvagem (BeH111) em uma mesma cultura de células C6/36 (células provenientes de *Aedes albopictus*) e células U937, analisando-se as dinâmicas de replicações virais. Observamos que células derivadas de *Ae albopictus* cronicamente infectadas com DENV-2 não se apresentam permissivas à replicação do VFA, cepas 17D e BeH111. Porém, em ensaios de competição entre os dois vírus observamos uma maior eficiência de replicação de VFA 17D e VFABeH111 em relação ao DENV-2. Finalmente, os ensaios de interferência viral envolvendo linhagens de células de mamífero U937 demonstraram uma ligeira diminuição da replicação de VFA 17D em células cronicamente infectadas com DENV2.



## EFEITO TERAPÊUTICO DA VACINA DNA-Hsp65 EM MELANOMA B16F10

**Giovanna Ribeiro-Santos**

Orientador: Prof. Dr. Celio Lopes Silva

Tese de Doutorado apresentada em 05/11/2008

O câncer é um importante problema de saúde pública mundial e uma das causas mais relevantes de morbidade e mortalidade em crianças e adultos. Apesar dos inúmeros progressos no tratamento, incluindo aprimoramentos cirúrgicos, quimioterápicos e radioterápicos, a cura da maior parte das neoplasias ainda depende da identificação precoce da afecção, não sendo, muito frequentemente, possível após a disseminação metastática da doença. Assim, novas abordagens terapêuticas são continuamente investigadas e dentre elas, a imunoterapia representa uma forma de crescente relevância. Dentre as novas estratégias imunológicas para imunoterapia de tumores, vale a pena ressaltar o uso de imunomoduladores como as proteínas de choque térmico (Hsp). As características das Hsps em facilitar a apresentação de peptídeos tumorais, estimular a secreção de citocinas inflamatórias por células apresentadoras de antígenos e mediar a maturação de células dendríticas, fazem delas excelentes candidatas para o desenvolvimento de vacinas contra o câncer e doenças infecciosas. Nosso grupo vem desenvolvendo uma vacina de DNA (DNA-Hsp65) que se mostrou eficiente na profilaxia e terapia de doenças infecci-

osas, doenças autoimunes, alergia e câncer. No presente trabalho, decidimos analisar mais detalhadamente, do ponto de vista imunológico, a ação da vacina DNA-Hsp65 em modelo experimental em camundongos inoculados com melanoma B16F10. Num grupo de animais o DNA-Hsp65 foi inoculado por via intratumoral e no outro foi feita transferência de células B16F10 previamente transfectadas com a vacina DNA-Hsp65. A vacina DNA-Hsp65 mostrou capacidade de retardar o desenvolvimento do tumor e aumentar a sobrevivência dos animais. Essa atenuação do crescimento tumoral e o aumento da taxa de sobrevivência foram correlacionados com o aumento da porcentagem de linfócitos T CD4 e T CD8 ativados, considerados importante indicador de resposta contra tumores. A vacina também induziu aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias na superfície de células dendríticas no sítio tumoral, favorecendo uma apresentação antigênica eficiente num ambiente ativador da resposta imune. Além disso, foi observado aumento significativo da porcentagem de lise específica das células de melanoma B16F10 mediada por linfócitos T CD8 citotóxicos. Assim sendo, os dados aqui apresentados mostram o potencial antitumoral da vacina DNA-Hsp65 por meio da estimulação da resposta imunológica e ao mesmo tempo abrem perspectivas para estudos futuros que possam aumentar a efetividade dessa vacina no combate a tumores.

## MORTE DE LINHAGEM CELULAR DE LEUCEMIA MIELÓIDE HUMANA INDUZIDA PELA LECTINA ARTIN M DE *Artocarpus integrifolia*

**Fernanda Caroline de Carvalho**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Cristina R. Antunes Barreira

Tese de Doutorado apresentada em 18/12/2008

Artin M, uma lectina ligante de manose presente nas sementes de *Artocarpus integrifolia* Gaca), induz hapotaxia de neutrófilos, produção de IL-12 por macrófagos e células dendríticas, e induz degranulação de mastócitos. Todos estes eventos são mediados pelo reconhecimento de glicanas, contendo manose, presentes na superfície celular. Devido alterações nos oligossacarídeos da superfície celular serem associadas a transformações malignas, objetivamos testar o efeito de Artin M de jaca (jArtinM) e recombinante (rArtinM), quando a atividade citotóxica em células transformadas. A capacidade anti-proliferativa foi testada, pelo método MTT, nas linhagens leucêmicas (NB4, K562 e U937), linfoma (Granta 519) e carcinomas (HT29, MKN45 e AGS). Somente a lectina de jaca apresentou capacidade citotóxica após 48 horas de tratamento. A linhagem celular NB4 foi a mais sensível ao tratamento com jArtinM e apresentou exposição de fosfatidil serina e a quebra do potencial de membrana de mitocôndria,

características de apoptose. Contudo, não foi observado ativação de caspas e 9, 8 e 3 e fragmentação do DNA genômico, sugerindo um evento de morte celular programado independente da ativação de caspases. Adicionalmente, as células NB4 tratadas com jArtinM expressaram marcador granulocítico CD11b, embora não fossem capazes de realizar "burst" oxidativo, característico de granulócitos maduros. Considerando, então, a diferenciação promovida por jArtinM insuficiente para promover a morte celular por maturação, investigamos a produção de peróxido de hidrogênio pelas células tratadas e observamos um aumento considerável deste reativo intermediário de oxigênio. Tal evento, foi abolido com o tratamento com anti-oxidante, bem como restaurou parte da viabilidade celular. O evento de morte celular e indução da produção de peróxido de hidrogênio são eventos desencadeados por jArtinM nas células NB4 de modo dependente da interação de jArtinM com as N-glicanas da célula leucêmica. De modo distinto, verificamos que a mesma dose capaz de induzir apoptose em células leucêmicas NB4 é a mesma capaz de promover a imunestimulação de células normais maduras como os monócitos humanos a produzirem IL-12.

## NEUROLOGIA

### A LECTINA artinM É ATIVA NA REGENERAÇÃO DO NERVO PERIFÉRICO

**Ana Paula Santos**

Orientador: Prof. Dr. Amilton Antunes Barreira

Tese de Doutorado apresentada em 02/12/2008

A capacidade regenerativa do sistema nervoso periférico é conhecida, todavia em lesões onde há grande perda de tecido nervoso, há limitações ou impossibilidade em relação à regeneração. A lectina artinM é capaz de acelerar o processo de regeneração do tecido epitelial. O objetivo do presente estudo foi verificar se a lectina artinM é também ativa na regeneração do tecido nervoso, tendo em vista que se trata de tecido originário do mesmo folheto embrionário (ectoderma) que o tecido epitelial. No presente estudo 10 mm do nervo isquiático de ratas Wistar adultas foram retirados e os cotos proximal e distal suturados em um tubo de silicone. Houve melhor resposta a doses menores de artinM (1 a 5 µg). Não foi observada regeneração com doses de 10, 12 e 24 µg e essa foi precária com doses intermediárias (6 e 8 µg). Os animais foram alocados em 4 grupos, tratados com tubos contendo artinM (1 a 5 µg) em gel de agarose, gel de agarose, Matrigel® ou artinM + Matrigel®. Análises macroscópica, histológica e morfométrica foram realizadas 10 semanas - tempo de observação associado à regeneração de um número significativo de fibras mielínicas

no segmento distal - após a cirurgia. A formação do cabo de tecido entre os cotos foi estatisticamente semelhante entre os grupos artinM e matrigel e entre artinM e artinM + matrigel, assemelhando-se a uma estrutura de nervo normal. Nesses grupos, a análise histológica dos segmentos centrais do tubo revelou uma camada epi-perineural espessa envolvendo a área endoneural, minifascículos, vários capilares endoneurais em maior número na periferia, fibras mielínicas de vários diâmetros e mastócitos. Os segmentos distais ao tubo foram semelhantes aos nervos normais, porém com bainha de mielina mais fina. Nos segmentos distais, os resultados morfométricos revelaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) nos diâmetros de axônios e fibras mielínicas, área da bainha de mielina e número de capilares entre os grupos artinM e matrigel, com o grupo artinM mostrando valores mais altos. O número de fibras mielínicas e capilares no segmento distal foi significativamente maior no grupo artinM do que no grupo artinM + matrigel. Não houve regeneração axonal significativa no grupo agarose, tendo havido apenas filamentos ligando os cotos. Os resultados indicam que a lectina artinM é capaz de induzir o crescimento dos componentes do nervo periférico, potencialmente podendo ser usada para a indução de regeneração de nervos no homem.

### AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA FADIGA MUSCULAR EM PACIENTES COM DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DE MIOPATIA MITOCONDRIAL

**Patrícia de Sá Barros**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Ferreira da Rosa Sobreira

Tese de Doutorado apresentada em 03/12/2008

A fadiga muscular é definida como qualquer perda da capacidade de produzir força induzida por exercício, que reduz o desempenho muscular. Estudos de quantificação da fadiga muscular nas diversas formas clínicas de miopatia mitocondrial (MM) são escassos. O objetivo deste trabalho é obter um método confiável, reprodutível, de baixo custo e fácil aplicação para avaliação objetiva e comparativa da fadiga muscular em grupos de pacientes com diferentes formas clínicas de MM. Neste estudo, foram selecionados 71 pacientes adultos com miopatia, apresentando fraqueza muscular ou intolerância ao exercício (IE). A amostra controle foi composta por 123 voluntários saudáveis. Os pacientes selecionados para o estudo foram divididos em 4 grupos: MM com oftalmoplegia externa progressiva (PEO);

MM com IE sem PEO; outras miopatias com IE e endonopatias com IE. O grupo controle foi subdividido, uma vez que cada subgrupo participou como controle em diferentes experimentos do estudo. As avaliações realizadas consistiram de quantificação da fadiga pelos testes dinâmométricos, avaliação da gravidade da fadiga (FSS), escala numérica da fadiga, mensuração da dor pelo inventário breve da dor (IBD), avaliação da capacidade funcional (Brooke e Vignos) e das atividades da vida diária (Barthel), bem como a qualidade de vida relacionada à saúde (SF-36). A presença da fadiga muscular foi avaliada através da realização da contração voluntária da máxima (CVM) de preensão palmar, no lado dominante do paciente. Neste estudo foi realizado 3 testes dinâmométricos: teste da CVM durante 5 minutos, teste de 10 minutos utilizando 45% da CVM sustentada durante 60 segundos. Nossos resultados demonstraram que a proporção de mulheres foi superior à de homens tanto no grupo de pacientes como no grupo controle. Não houve

diferença significativa entre as idades dos pacientes e controles. A maioria dos pacientes e controles apresentava como lado dominante o lado direito. A força muscular de preensão palmar no início do teste foi maior nos controles que nos pacientes. A CVM inicial dos pacientes com MM com PEO diferiram significativamente dos controles, enquanto que os pacientes com MM sem PEO, outras miopatias com IE e endocrinopatias permaneceram iguais aos controles. O teste de CVM durante 5 minutos demonstrou coeficientes de correlação bastante significativos, o que indica que as medidas obtidas no teste são estáveis e reprodutíveis. Quanto ao teste de 10 minutos utilizando 45% da CVM, os resultados demonstraram que as medidas que se referem às CVM na metade e no final do teste apresentam coeficientes de correlação consistentes e significativos. No teste da CVM sustentada durante 60 segundos, os índices de correlação apresentaram magnitude moderada. A comparação do teste da CVM durante 5 minutos entre os grupos demonstrou a ocorrência de fadiga precoce no grupo de pacientes. A comparação entre o grupo de pacientes separadamente e controles no teste da CVM durante 5 minutos não demonstrou diferença significativa. No

teste de 10 minutos utilizando 45% da CVM a comparação entre pacientes e controles demonstrou haver diferença significativa, indicando haver maior fadigabilidade no grupo dos pacientes. Em adição, o grupo denominado outras miopatias com IE diferenciaram do grupo controle, não sendo visível esta diferença nos demais grupos. A comparação entre o grupo com MM com PEO, pacientes com IE e grupos controles demonstraram diferença significativa. No teste da CVM sustentada durante 60 segundos não houve diferença significativa entre os grupos analisados. A média da FSS em todos os grupos foi similar. Os grupos demonstraram resultados similares com relação à escala numérica de fadiga. Nossos achados não demonstraram diferença significativa entre os grupos com relação à IBD. A maioria dos pacientes avaliados apresenta mínima ou nenhuma incapacidade funcional. A qualidade de vida dos pacientes demonstrou estar muito comprometida. Concluímos que entre os 3 testes dinamométricos de medida da fadiga muscular realizados, apenas o teste de CVM sustentada durante 5 minutos apresentou elevada confiabilidade. O teste da CVM sustentada durante 60 segundos não foi capaz de induzir fadiga precoce nos grupos de pacientes.

#### COMORBIDADES PSIQUIÁTRICAS NOS PACIENTES COM EPILEPSIA FARMACORESISTENTES DE ACORDO COM A ZONA EPILEPTOGÊNICA: ESTUDO COM 490 PACIENTES

**Charles Luis Dalmagro**

Orientador: Prof. Dr. Américo Ceiki Sakamoto

Tese de Doutorado apresentada em 16/12/2008

**Introdução:** Epilepsia é definida pela presença de crises epiléticas recorrentes, podendo apresentar durante seu estudo, um espectro bem variado de associações, dentre elas as anormalidades cognitivas e do comportamento. A associação das comorbidades psiquiátricas (CPs) com as epilepsias tem sido investigada, tipicamente nos pacientes com crises epiléticas refratárias os quais foram avaliados em um centro terciário especializado no tratamento desta forma de epilepsia. **Objetivos:** Este estudo relatará os resultados da prevalência e os fatores de risco associados à presença das CPs em quatrocentos e noventa pacientes com crises epiléticas farmacoresistentes e sua correlação com as diferentes zonas epileptogênicas (ZEs). **Resultados e conclusões:** De acordo com os critérios do DSM-IV, 198

(40,4%) dos pacientes apresentaram CPs. As CPs do Eixo I foram evidenciadas em 154 (31,4%) pacientes e as CPs do Eixo II em 44 (8,9%) pacientes. As mais comuns CPs do Eixo I foram representadas pelos transtornos do humor, diagnosticados em 94 pacientes (19,2%). Os transtornos de ansiedade em 21 (4,3%) pacientes e a psicose interictal em 39 (7,9%) pacientes. Nesta série de pacientes, foi observado que a epilepsia do lobo temporal mesial, associada à esclerose hipocampal, a história familiar de transtorno psiquiátrico, a presença de transtornos psiquiátricos do Eixo II, foram fatores de risco independentes para associação com CPs do Eixo I. Por outro lado, a idade de início da epilepsia, a duração da epilepsia, o sexo, a frequência de crises secundariamente generalizadas, a média do QI, a etiologia (quando excluída a epilepsia do lobo temporal mesial, associada à esclerose hipocampal) e o lado da lesão foram variáveis que não associaram estatisticamente com as CPs neste estudo.

#### INFLUÊNCIA DO GÊNERO E DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA PRION CELULAR SOBRE ASPECTOS COMPORTAMENTAIS E HISTOPATOLÓGICOS EM UM MODELO DE ANORMALIDADES DO DESENVOLVIMENTO CORTICAL EM CAMUNDONGOS

**João Carlos Xikota**

Orientador: Prof. Dr. Roger Walz

Tese de Doutorado apresentada em 17/12/2008

Malformações do desenvolvimento cortical frequentemente estão associadas com condições neurológicas incluindo déficits neuropsicológicos, atraso do desenvolvi-

mento intelectual, retardo mental, dislexia, autismo e epilepsia. Malformações semelhantes à microgiria de 4 camadas observadas em humanos podem ser induzidas por dano hipóxico-isquêmico da placa cortical em roedores recém nascidos através da criolesão, a qual destrói a maioria dos neurônios presentes no momento da lesão, induzindo modificações permanentes na estrutura e função da circuitaria cortical. Há estudos indicando que o sexo do indivíduo possa estar associado à extensão, padrão estrutural e comprometimento funcional de lesões cerebrais ocorridas precocemente no desenvolvimento. A proteína prion celular (PrPC) tem sido implicada com processos envolvidos no desenvolvimento cortical incluindo a modulação da apoptose neuronal, adesão, crescimento e manutenção dos neuritos, além da proteção contra estresse oxidativo. No presente estudo investigamos a gravidade da lesão e susceptibilidade a prejuízos na aprendizagem, memória, e locomoção em camundongos machos e fêmeas das linhagens selvagem (Prnp+/+) e portadores da deleção do gene Prnp que codifica a PrPC (Prnp0/0). Os animais foram submetidos à criolesão unilateral no primeiro dia pós-natal (P0). Grupos controle receberam manipulações experimentais semelhantes, com exceção da indução da criolesão. Entre 12-14 semanas após o procedimento os animais foram submetidos a testes comportamentais (atividade locomotora espontânea, labirinto em cruz elevado, memória social e esquiiva inibitória do tipo step-down) e sacrificados para análise morfológica dos cérebros. A análise macroscópica re-

velou que a criolesão, independente do sexo ou linhagem dos animais, resultou na formação de uma área microgírica focal com uma destacada invaginação da superfície cortical determinando uma pequena lesão intracortical ou uma lesão profunda alcançando a substância branca. Não houve evidência de lesão cortical em nenhum animal do grupo sham (falso operado). Esta lesão não afetou a função motora dos animais. Entretanto, nos animais selvagens, observamos uma desordem seletiva na memória de curto prazo no teste de reconhecimento social em camundongos machos criolesados, enquanto a memória de longo prazo da esquiiva inibitória não foi afetada pelo procedimento ou sexo dos animais. Estes resultados indicam uma menor susceptibilidade das fêmeas aos prejuízos de memória de curto prazo induzidos pelo modelo de microgiria por criolesão neonatal, sugerindo que os déficits cognitivos induzidos pela criolesão em roedores podem não ser inteiramente relacionados à gravidade da lesão cerebral. Além disso, camundongos fêmeas de ambos os genótipos apresentaram atividade locomotora similares, porém as fêmeas Prnp0/0 demonstraram uma tendência aumentada de respostas relacionadas à ansiedade comparadas aos animais Prnp+/+. Finalmente, fêmeas Prnp0/0 tiveram um baixo rendimento na tarefa de reconhecimento social comparadas aos animais sham e aqueles Prnp+/+. Esses dados sugerem que a deleção gênica da PrPC confere um aumento da susceptibilidade ao déficit de memória social de curto prazo induzido pelo modelo de microgiria por criolesão

### **ANÁLISE COMPARATIVA, QUALITATIVA E QUANTITATIVA DAS FIBRAS MIELÍNICAS DO NERVO SURAL DE RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS E NORMOTENSOS, MACHOS E FÊMEAS**

**Luciana Sayuri Sanada**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Valéria Paula Sassoli Fazan  
Dissertação de Mestrado apresentada em 22/12/2008

As alterações vasculares importantes ocorrem em decorrência da hipertensão, afetando inclusive os nervos periféricos. Estudos relatam que as diferenças entre gêneros influenciam na remielinização, na sensibilidade dolorosa, na regulação neural da função vascular, no crescimento axonal *in vitro*, na condução nervosa, entre outros. Entretanto, são escassos os relatos de literatura a respeito de diferenças morfológicas e/ou morfométricas nas estruturas dos nervos periféricos de mamíferos de diferentes gêneros e das alterações consequentes a hipertensão. O objetivo do presente estudo foi comparar os aspectos morfológicos e morfométricos dos diferentes segmentos e lados do nervo sural de ratos das linhagens ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e Wistar-Kyoto (WKY), machos e fêmeas. Os animais (n=6 em cada grupo) foram pesados, anestesiados e

a sua pressão arterial aferida. Após o preparo do nervo sural com técnicas histológicas convencionais, secções transversais dos segmentos proximais e distais, dos lados direito e esquerdo, foram obtidas para análise em microscopia de luz. A morfometria dos fascículos, das fibras miélicas e seus respectivos axônios foi realizada com o auxílio de um sistema analisador de imagens computacional. Os resultados mostraram que os SHR e WKY machos apresentam peso (325 ± 16 g e 388 ± 20 g) e pressão arterial média (201 ± 18 mmHg e 136 ± 6 mmHg) maiores, quando comparados às fêmeas (194 ± 13 g e 218 ± 14 g; 180 ± 18 mmHg e 143 ± 14 mmHg, respectivamente). Foi observado também que, para os dados ponderais, os animais SHR apresentaram-se significativamente menores em relação aos ratos WKY de mesmo gênero. Entretanto, quando se compara os dados pressóricos, verifica-se que os ratos SHR se apresentaram significativamente maiores em relação aos ratos WKY de mesmo gênero. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas na morfologia e na morfometria entre os lados e segmentos tanto em fêmeas como em machos, nos grupos

WKY e SHR. Não foram observadas diferenças significativas na maioria dos parâmetros morfológicos e morfométricos quer dos fascículos ou das fibras mielínicas analisadas nos diferentes gêneros de WKY e SHR. Quando se compara os animais das linhagens WKY e SHR de mesmo gênero observa-se diferença significativa quanto aos parâmetros morfológicos (vasos mais espessos e colabados em ratos SHR), diâmetro mínimo da fibra mielínica e da razão G, indicando que a hipertensão foi capaz de gerar alterações nos

parâmetros morfométricos relevantes para estudos funcionais. A comparação entre machos e fêmeas das linhagens SHR e WKY permite-nos concluir que os parâmetros morfológicos e morfométricos do nervo sural não se alteram sob influência dos gêneros. Alguns parâmetros morfológicos e morfométricos do nervo sural de ratos SHR, machos e fêmeas, em relação aos animais WKY de mesmo gênero permitem-nos concluir que a hipertensão foi capaz de gerar alterações neste nervo

## OFTALMOLOGIA, OTORRINOLARINGOLOGIA E CIRURGIA DE CABEÇA E PESCOÇO

### ESTIMULADOR PIEZELÉTRICO PARA AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS EVOCADOS CÓCLEO-VES-TIBULARES E REGISTRO DE IMAGENS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA FUNCIONAL

**Ricardo David**

Orientador: Prof. Dr. José Fernando Colafêmina  
Tese de Doutorado apresentada em 17/10/2008

O objetivo deste trabalho é apresentar os resultados da construção de um protótipo de estimulador auditivo para uso em câmaras de ressonância magnética, mostrando sua viabilidade técnica e funcional de forma a melhorar a acurácia e eficiência dos registros de ressonância magnética funcional a partir de estímulos auditivos. Foram projetados e construídos um transdutor especial, compondo caixa de ressonância e cristal piezolétrico, além de todos os circuitos de geração de sinais, amplificação e controle, capazes de gerar estímulos auditivos em dois canais, cobrindo toda a faixa do espectro auditivo, com intensidade máxima de 122 dB Na.

São apresentados os detalhes construtivos, bem como os cuidados necessários para contornar as dificuldades inerentes ao ambiente interno das câmaras de ressonância magnética. Os testes de instrumentação confirmaram excelente resposta acústica de todo o sistema. O protótipo foi testado com um *phantom* no interior da câmara de ressonância, mostrando índice de interferência dentro dos parâmetros de normalidade. Este trabalho abre caminhos para o desenvolvimento de outros instrumentos e acessórios para uso em registros de imagens de ressonância magnética funcional. Abrem-se promissoras oportunidades de trabalho nas aplicações de uso do próprio instrumento, quando será possível melhor investigar inúmeras vias neurais relacionadas com o trato auditivo e vestibular, não somente nos aspectos sensorio-motores, mas também cognitivos.

### EXPRESSÃO DE ANTÍGENOS CÂNCER-TESTICULARES EM CARCINOMA ESPINOCELULAR DE LARINGE: ANÁLISE POR IMUNO-HISTOQUÍMICA

**David Livingstone Alves Figueiredo**

Orientador: Prof. Dr. Rui C. Martins Mamede  
Tese de Doutorado apresentada em 03/11/2008

**Introdução:** O câncer de laringe ocasiona cerca de 90.000 mortes por ano em todo o mundo, sendo que o carcinoma espinocelular de laringe (CECL), responsável por 95% dos casos, se caracteriza por apresentar evoluções indefinidas, e que, apesar de todo o avanço na laringologia, a sobrevida não se alterou nos últimos 30 anos. Com base nisso, os pesquisadores procuram marcadores que possam servir como fatores prognósticos ou imunoterápicos.

**Objetivos:** Analisar a expressão de antígenos câncer-testiculares (ACT) em CECL e correlacioná-los com características clínico-patológicas e de sobrevida.

**Casística e Métodos:** Foram avaliados 63 pacientes com diagnóstico histopatológico de CECL, tratados cirurgicamente no período de 2001 a 2005. Seus respectivos espécimes foram submetidos a reações de imunohistoquímica com os anticorpos MA454 (anti MAGE-A1), M3H67 (anti MAGE-A3), 57B (anti MAGE-A4), CT 7-33 (anti MAGE-C1), CT10.5 (anti MAGE-C2), anti GAGE, E978 (anti NY-ESO-1).

**Resultados:** A expressão de, pelo menos, um antíge-

no foi observada em 66,6% dos casos. Eles foram expressos com frequências variáveis: MAGE-A1 (47,62%), MAGE-A3 (36,5%), MAGE-A4 (60,32%), MAGE-C1 (22,2%), MAGE-C2 (7,93%), GAGE (20,64%) e NY-ESO-1 (9,52%). A expressão de um antígeno ou de múltiplos (2 ou mais) e a expressão de MAGE-A4 são significativamente maiores em tumores avançados. Há expressão significativamente maior de MAGE-A1 e de MAGE-A3 em tumores com recidivas cervicais e não houve relação da expressão com o tempo de sobrevida.

**Discussão:** Nossos resultados mostram que os CECL estão entre os tumores que mais expressam ACT, o que torna esse câncer um potencial alvo para tratamento imunoterápico. Observamos, conforme a literatura, que a expressão

está frequentemente associada aos tumores avançados, que apresentam prognóstico ruim com os tratamentos hoje estabelecidos.

**Conclusão:** Com base nos dados obtidos neste estudo, conclui-se que nos CECL, os ACT - MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-C1, MAGE-C2, GAGE e NY-ESO-1 são expressos em proporções variáveis (7,93% a 60,32%), e que em 66,6% dos casos ocorre a expressão de, pelo menos, um desses antígenos. Encontrou-se correlação da expressão e co-expressão dos antígenos estudados com a presença de tumores avançados. Houve correlação dos antígenos MAGE-A1 e MAGE-A3 com a presença de recidivas cervicais e o MAGE-A4 se correlaciona com tumores avançados.

### O PAPEL DA ASPIRINA NA PREVENÇÃO DAS ALTERAÇÕES DA GLÂNDULA LACRIMAL E SUPERFÍCIE OCULAR DE RATOS DIABÉTICOS

**Angélica Gobbi Jorge**

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha

Tese de Doutorado apresentada em 03/11/2008

As alterações na glândula lacrimal e superfície ocular após Diabetes mellitus (DM) crônico foram correlacionadas com ativação da sinalização inflamatória. O objetivo deste estudo foi determinar se o tratamento com AAS inibe alterações na glândula lacrimal e superfície ocular provocadas pelo DM. O DM foi induzido em ratos Wistar machos com streptozotocina e um subgrupo foi tratado com AAS. Após 10 semanas, a glândula lacrimal e superfície ocular destes três grupos (n=5/grupo) foram comparadas em termos da morfologia e expressão de peroxidase. A impressão citológica foi utilizada para comparar o epitélio da córnea e o teste de Schimer para avaliar a secreção lacrimal. A análise por *Western blot* foi utilizada para avaliar a expressão das proteínas desacopladoras (UCPs) e IKKs (IKK- $\alpha/\beta$ ). A

impressão citológica não revelou diferenças na morfologia do epitélio da córnea embora o DM reduza a secreção lacrimal, um efeito que foi prevenido pelo tratamento com AAS (P<0.01). Alterações na morfologia da glândula lacrimal e aumento no número de grânulos de lipofuscina foram observados nos animais diabéticos na décima semana de manifestação do DM considerando que estas características foram similares no controle e diabéticos tratados com AAS. Os níveis de peroxidase foram maiores nos ratos diabéticos, mas semelhante no controle e diabético tratados com AAS (P=0.002). Há expressão de UCPs e IKK- $\alpha/\beta$  na glândula lacrimal, mas somente UCP-2 e 3 foram reduzidas pelo DM (P<0.05). Estes dados sugerem que o estresse oxidativo relacionado com hiperglicemia possa participar da síndrome do olho seco em diabéticos. Estes eventos podem ser parcialmente prevenidos pela AAS, pela a qual talvez tenha um efeito inibitório direto sobre as vias oxidativas na glândula lacrimal ou em suas consequências inflamatórias.

### AValiação Cócleo-Vestibular por Meio de Ressonância Magnética Sequência 3DFT-CISS na Síndrome do Aqueduto Vestibular Alargado

**Carolina Ferreira Marques**

Orientador: Prof. Dr. José Fernando Colafêmina

Dissertação de Mestrado apresentada em 17/11/2008

**Objetivos:** Analisar variáveis estruturais cócleo-vestibulares nos pacientes com Síndrome do Aqueduto Vestibular Alargado (SAVA) através da sequência "*Three Dimensional Fourier Transformation- Constructive Interference in Steady State Sequence*" (3DFT-CISS) de Ressonância Magnética (RM), e compará-las com um grupo controle. As mesmas variáveis foram, ainda, comparadas entre as orelhas direitas e esquerdas, de ambos os grupos.

**Casística e Métodos:** Foram selecionados, para realização de RM dos ouvidos, dez pacientes (20 orelhas) com diagnóstico clínico e tomográfico de SAVA unilateral ou bilateral, que formaram o grupo SAVA. Foram selecionados, também, dez indivíduos (20 orelhas) para o grupo controle, que foram encaminhados ao serviço de RM para realização de exame do encéfalo, onde após exclusão de sintomas auditivos e/ou vestibulares e história prévia de doença do aparelho auditivo ou vestibular e com o consentimento do mesmo, foi incluída a sequência 3DFT-CISS para avaliação dos ouvidos. Assim, a avaliação foi realizada por dois observadores independentes de modo randomizado e

cego. Foram analisadas as variáveis: Área do modíolo, Diâmetro Transverso do Vestíbulo (A), Diâmetro Interno ao Canal Semicircular Lateral (B) e relação A/B; posteriormente foi realizada comparação entre os grupos e entre orelhas direitas e esquerdas.

**Resultados:** Ao comparar os grupos SAVA e controle, todas as variáveis analisadas apresentaram uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ ). Foi constatado, ainda, que aproximadamente 35% das orelhas do grupo SAVA obtiveram uma área modiolar inferior à mínima área modiolar descrita na literatura, sugerindo uma possível deficiência modiolar. Observado também que 85% das orelhas do grupo SAVA apresentaram uma relação A/B maior que 1,2 (limite da normalidade estabelecido por diversos autores), sugerindo, talvez, um alargamento do vestíbulo. Ao comparar as variáveis entre orelhas direitas e esquerdas, de ambos os grupos, não foi verificada diferença estatisticamente significativa.

**Conclusões:** 1) A análise das variáveis estruturais cócleo-vestibulares, sendo elas: área modiolar, diâmetro transverso do vestíbulo (A), diâmetro interno ao canal lateral (B) e relação A/B mostrou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos SAVA e controle. Os resultados conferem indícios, porém não afirmam o encontro de deficiência modiolar em pelo menos 35% das orelhas do grupo SAVA e aumento da relação entre diâmetro transverso do vestíbulo e diâmetro interno ao canal lateral em 85% das orelhas, sugerindo alargamento do vestíbulo. Esses resultados corroboram com a teoria da presença de defeitos estruturais mínimos na orelha interna com capacidade de contribuir para o quadro clínico na SAVA; 2) Ao compararmos as variáveis estruturais entre as orelhas direitas e esquerdas de ambos os grupos não encontramos diferença significativa, sugerindo, provavelmente, não haver diferença de comportamento entre orelhas, mesmo considerando casos de SAVA unilateral e bilateral.

## EFEITO DA OBSTRUÇÃO NASAL NA FASE ORAL DA DEGLUTIÇÃO EM CRIANÇAS

**Tais Helena Grechi**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luciana Vitaliano Voi Trawitzki  
Dissertação de Mestrado apresentada em 26/11/2008

A obstrução nasal crônica pode causar efeitos negativos no crescimento e desenvolvimento craniofacial, além de modificações na musculatura orofacial, com impacto sobre a deglutição. O objetivo do presente estudo foi verificar os efeitos da obstrução nasal na fase oral da deglutição em crianças na fase de dentição decídua. Participaram deste estudo 31 crianças do Ambulatório de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto - USP. Estas crianças foram divididas em dois grupos: 21 crianças respiradoras bucais, sendo 8 do gênero feminino e 13 do gênero masculino, com idade média de 4,5 anos (grupo bucal) e 10 crianças respiradoras nasais, 4 do gênero feminino e 6 do gênero masculino, com idade média de 4,6 anos (grupo controle). Ambos os grupos foram submetidos à avaliação otor-

rinolaringológica para diagnóstico respiratório, avaliação odontológica para diagnóstico do padrão oclusal e dentário, avaliação clínica fonoaudiológica e avaliação videofluoroscópica da deglutição. Para avaliação ideofluoroscópica foi utilizada a consistência líquida em volume livre e 3 ml de consistência pastosa modificadas com sulfato de bário. Avaliou-se na fase oral da deglutição o volume, a consistência e a organização do bolo, o tempo de trânsito oral, a ejeção, a postura dos lábios, o número de deglutições e a presença de movimentos associados durante a deglutição. Observou-se que a consistência pastosa e o padrão de organização do bolo influenciaram no tempo de trânsito oral, embora não ocorresse diferença entre os grupos. Em relação aos outros aspectos avaliados durante a fase oral da deglutição não foi constatada diferença significativa entre os grupos bucal e controle. Os resultados indicaram que a obstrução nasal não influenciou significativamente a fase oral da deglutição em crianças na fase de dentição decídua.

## AVALIAÇÃO PROSPECTIVA DE AUDIÇÃO E LINGUAGEM DE CRIANÇAS TRIADAS AO NASCIMENTO

**Cristiane Fregonesi Dutra Garcia**

Orientadora: Profa. Dra. Myrian de Lima Isaac  
Tese de Doutorado apresentada em 17/12/2008

**Introdução:** O Potencial Evocado Auditivo de Longa Latência denominado de Mismatch Negativity (MMN) é um potencial endógeno que reflete o processamento de diferenças ocorridas no estímulo acústico.

**Objetivos:** estimar a prevalência de alteração da fun-

ção auditiva periférica e central de crianças nascidas a termo e pré-termo, adequadas e pequenas à idade gestacional; discutir o estado de desenvolvimento de fala, linguagem e aprendizagem destas crianças.

**Casística e Métodos:** estudo de prevalência, descritivo, observacional, transversal, comparativo, prospectivo, com enfoque em diagnóstico. Amostra constituída por 19 sujeitos nascidos a termo; 32 sujeitos nascidos prematuros e adequados à idade gestacional; 18 sujeitos nascidos

prematureos e pequenos à idade gestacional. Foram realizados os seguintes procedimentos: análise do prontuário e entrevista com a mãe ou responsável; exame otorrinolaringológico, avaliação auditiva por meio de Audiometria Tonal Liminar, Limiar de Recepção de Fala, Imitancimetria, Potencial Evocado Auditivo do Tronco Encefálico, Potencial Evocado Auditivo de Longa Latência, MMN. Na análise estatística foram usados os testes Kruskal-Wallis, Qui-Quadrado, de Dunn.

**Resultados:** a audição periférica apresentou-se dentro da normalidade na maioria das crianças dos três grupos do estudo. A função auditiva central apresentou indicação de alteração no registro do Reflexo Estapediano e Potencial Evocado Auditivo do Tronco Encefálico na maioria das crianças dos três grupos estudados. No exame MMN, a latência média para a orelha direita, em crianças nascidas a termo, foi de 207,6 milissegundos; para as crianças nascidas pré-termo e adequadas à idade gestacional foi de 158,51 milissegundos; para as crianças nascidas pré-termo e pequenas à idade gestacional foi de 181,80 milissegundos; a latência média para a orelha esquerda, para as crianças nascidas a

termo foi de 200 milissegundos; para as crianças nascidas pré-termo e adequadas à idade gestacional foi de 167,76 milissegundos; para as crianças nascidas pré-termo e pequenas à idade gestacional foi de 174,1 milissegundos. A amplitude para a orelha direita, em crianças nascidas a termo, apresentou média de -3,044 microVolts; de -3,584 microVolts para as crianças nascidas pré-termo e adequadas à idade gestacional; de -3,165 microVolts para as crianças nascidas pré-termo e pequenas à idade gestacional. Na orelha esquerda, a média da amplitude foi de -3,407 microVolts para as crianças nascidas a termo; de -5,22 microVolts para as crianças nascidas pré-termo e adequadas à idade gestacional; de -3,863 microVolts para as crianças nascidas pré-termo e pequenas à idade gestacional. O desenvolvimento de fala, linguagem, audição e aprendizagem apresentaram-se dentro da normalidade para a maioria das crianças avaliadas nos três grupos.

**Conclusão:** o exame MMN deve ser instrumento complementar na avaliação e monitoramento de crianças de risco para alterações no desenvolvimento de fala, linguagem e audição.

## ORTOPEDIA, TRAUMATOLOGIA E REABILITAÇÃO

### AÇÃO DO TREINAMENTO FÍSICO ANTES E APÓS A INSTALAÇÃO DA OSTEOPENIA EM RATAS OVARIETOMIZADAS

**Priscila Angelotti Simões**

Antônio Carlos Shimano

Dissertação (Mestrado) 03/10/2008

A contra medida mais estudada para prevenir e/ou minimizar a reabsorção óssea e aumentar a tolerância à solicitação mecânica é a prática de exercício físico. O objetivo deste estudo foi (1) analisar o efeito do exercício físico em fêmures de ratas submetidas à ovariectomia através de ensaios mecânicos e análise densitométrica e, (2) verificar as alterações nos níveis de calcemia. Foram utilizadas 60 ratas adultas da raça Wistar que foram separadas em 6 grupos (n=10): Cont I: controle; OVX I: ovariectomizadas; OVXT I: ovariectomizadas e treinadas após 72 horas de ovariectomia; Cont II: controle; OVX: ovariectomizadas e OVXT II: ovariectomizadas e treinadas após oito semanas de ovariectomia. Os animais do subgrupo I foram submetidos à eutanásia após 13 semanas a partir do início do experimento e os do subgrupo II com 21 semanas. O protocolo de treinamento consistia em 15m/min da 1ª a 6ª semana e 18 m/min da 7ª a 12ª com 4 sessões por semana. Foi coletado sangue no início e final do experimento para a dosagem de calcemia.

Foram analisadas a força máxima e a rigidez do terço proximal do fêmur direito. O fêmur esquerdo foi submetido à análise densitométrica. Os resultados mostraram uma redução da resistência mecânica, densidade óssea e calcemia no grupo OVX I em relação aos grupos Cont I e OVXT I, porém não foi observada diferença estatística entre esses dois últimos grupos. O grupo OVX II demonstrou diminuição significativa de calcemia em relação aos grupos Cont II e OVXT II, nas demais comparações não houve diferença significativa. A densidade óssea foi menor no grupo OVX II foi menor que no grupo Cont II e, entre os grupos OVXT II e Cont II não foi observada diferença estatística. A força máxima entre os grupos Cont I, OVX I e OVXT I, não foi significativamente diferente, porém foi menor nos grupos OVX II e OVXT II que no grupo Cont II. A rigidez dos grupos OVX I e OVX II foi menor que dos grupos Cont I e Cont II, respectivamente. O grupo OVXT I apresentou maior rigidez que o grupo OVX I e semelhante ao grupo Cont I. Já o grupo OVXT II não apresentou diferença estatística em relação aos grupos OVX II e Cont II. Estes resultados sugerem que o treinamento físico foi eficaz na profilaxia da perda de massa óssea. No entanto, não foi eficaz no controle da osteopenia.



## ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DA PLACA VERTEBRAL TERMINAL E DO DISCO INTERVERTEBRAL EM DIFERENTES NÍVEIS VERTEBRAIS DA COLUNA VERTEBRAL E DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS EM HUMANOS

**Juliano Silveira Luiz Vieira**

Orientador: Prof. Dr. Helton Luis Aparecido Defino  
Tese de Doutorado apresentada em 08/10/2008

A placa vertebral terminal (PVT) é uma estrutura anatômica que mantém relação funcional com a nutrição do disco intervertebral (DI). O objetivo do estudo foi avaliar por meio de histomorfometria, a espessura da placa vertebral terminal, a espessura do disco intervertebral e a sua correlação nas diferentes faixas etárias e em diferentes níveis vertebrais. Foram avaliados os segmentos vertebrais C4-C5, C5- C6, T7- T8, T12-L 1, L4-L5 e L5-S1 de 50 cadáveres humanos, de ambos os sexos, divididos em 5 grupos com intervalo de faixa etária de 10 anos, a partir dos 21 anos de idade. A avaliação da espessura da PVT e do disco intervertebral foi

realizada por meio de avaliação histomorfométrica dos cortes histológicos corados pela Hematoxilina e Eosina. As espessuras das PVT foram comparadas entre si e também com a espessura do disco intervertebral interposto entre as respectivas PVT. A espessura das placas vertebrais terminais adjacentes ao mesmo DI não apresentou diferença estatística. No entanto, a comparação da espessura das placas vertebrais superior e inferior da mesma vértebra cervical (C5) e lombar (L5), apresentou diferença estatística em todos os grupos e em todas as faixas etárias avaliadas. Foi observado coeficiente de correlação estatística, maior que 75%, entre a espessura da placa vertebral terminal e o disco intervertebral adjacente, com proporcional redução de espessura de ambas estruturas, nos diferentes níveis vertebrais avaliados, e também nas diferentes faixas etárias avaliadas.

## EFEITOS DOSE DEPENDENTES DO ULTRA-SOM TERAPÊUTICO NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DO TENDÃO FLEXOR. ANÁLISE BIOMECÂNICA EM TENDÕES DE COELHOS

**Cristiane Vitaliano Graminha Romano**

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Henrique Barbieri  
Tese de Doutorado apresentada em 09/10/2008

A literatura revela indícios de que o ultra-som terapêutico favorece a cicatrização tendinosa, embora os resultados dos estudos sejam ainda contraditórios. O objetivo deste trabalho foi investigar as propriedades mecânicas nos reparos de tendões flexores profundos de coelhos submetidos a tenotomia seguida de tenorrafia e aplicação do ultra-som terapêutico com diferentes intensidades. Para tanto, foram utilizados 44 coelhos fêmea, da raça Nova Zelândia, adultos jovens com peso corpóreo médio de 2,5 Kg. Todos os animais foram operados sob anestesia geral e submetidos à tenotomia do tendão flexor profundo do terceiro dedo da pata direita dianteira e imediatamente reparado com a técnica de Kessler modificada. As patas operadas foram imobilizadas com uma órtese de material termoplástico durante todo o período do experimento (31 dias) e os animais foram distribuídos em quatro grupos (A, B, C e D) de acordo com o tratamento pós-operatório. Os animais do grupo A receberam aplicação do ultra-som com uma intensidade de 1,4 W/cm<sup>2</sup>, os do grupos B de 0,6 W/cm<sup>2</sup>, ambos no modo contínuo, os do C de 0,6 W/cm<sup>2</sup> SATA (spatial average and temporal average) no modo pulsado a 50% e os animais do grupo D, não receberam tratamento ultrassônico algum. A frequência ultra-sônica empregada foi de 1 MHz, a aplicação foi diária, com duração de 6 minutos cada, iniciando no quarto dia pós-operatório, por 10 dias conse-

cutivos. No trigésimo primeiro dia pós-operatório, os animais foram sacrificados e o tendão operado foi dissecado ressecado, sendo que 40 tendões (10 de cada grupo) foram submetidos aos testes de resistência à tração na máquina universal de ensaio e um tendão de cada grupo foi submetido à análise histológica qualitativa. A partir dos gráficos força *versus* deformação foram calculadas as seguintes propriedades mecânicas: força máxima, deformação na força máxima e rigidez. Ainda para a propriedade mecânica força máxima, foram estabelecidos quatro valores de referência (8, 16, 20 e 24 N), e verificou-se a porcentagem de tendões de cada grupo experimental que suportava uma carga maior ou igual a cada um desses valores. Os resultados mostraram que, embora não houvesse diferenças estatisticamente significante entre os grupos experimentais, a força máxima e a deformação na força máxima foram maiores para o grupo irradiado com ultra-som contínuo a uma intensidade de 0,6 W/cm<sup>2</sup>, sugerindo que o ultra-som melhorou as propriedades mecânicas desses tendões. Especificamente para a propriedade mecânica força máxima, procurou-se verificar a porcentagem de tendões de cada grupo experimental que suportava uma carga maior ou igual 8, 16, 20 e 24 N. Os resultados mostraram que os tendões do grupo tratado com ultra-som contínuo a uma intensidade de 0,6 W/cm<sup>2</sup>, toleraram carga maior que os tendões dos demais grupos. A análise histológica mostrou que o tendão desse mesmo grupo apresentou fibras colágenas totalmente densas, diferentemente dos demais tendões que apresentaram fibras frouxas entremeadas às demais fibras.

## MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA ÁREA ÓSSEA ADJACENTE AOS PARAFUSOS CERVICAIS, EM DIFERENTES TEMPOS DE FIXAÇÃO

**João Paulo Chierogato Matheus**

Orientador: Prof. Dr. Helton Luis Aparecido Defino

Tese de Doutorado apresentada em 23/12/2008

As técnicas de preparo do orifício piloto durante as cirurgias de coluna, como a variação do diâmetro e a realização do macheamento, têm sido apontadas como determinantes no aumento da interface osso/implante dos parafusos cervicais e, conseqüentemente, maior estabilidade. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência do diâmetro e do macheamento do orifício piloto na área óssea trabecular entre os passos de rosca, na área paralela ao implante e na superfície de contato osso/implante, por meio de microscopia eletrônica de varredura e em diferentes tempos de fixação. Para tanto foram utilizados seis carneiros, com massa corporal média de  $28 \pm 04$  kg e 72 parafusos cervicais de titânio (Synthes®) com diâmetro externo de 3,5 mm, diâmetro interno de 2,5 mm e 14,0 mm de comprimento. Os parafusos foram implantados por acesso anterior no corpo das vértebras cervicais dos carneiros em dois procedimentos cirúrgicos. Durante os procedimentos foram confeccionados, com brocas, orifícios piloto de 2,0 e 2,5 mm de diâmetros. Além disso, em metade dos orifícios de 2,5 mm foi realizado o macheamento com instrumental específico (Synthes®), semelhante ao perfil dos parafusos. Na primeira cirurgia os parafusos foram implantados nas vértebras cervicais C2, C3 e C4, conforme os grupos experimentais, e os animais foram mantidos vivos por oito semanas (Crônico). Passado esse período, foi realizada nova cirurgia para implantação dos parafusos nas vértebras cervicais C5, C6 e C7 e em seguida o animal foi submetido à eutanásia por meio de overdose

anestésica (Agudo). A partir destas cirurgias foram formados os seguintes grupos experimentais: agudo com orifício 2,0 mm (A 2,0); agudo com orifício 2,5 mm (A 2,5); agudo com orifício macheado de 2,5 mm (A 2,5 M); crônico com orifício 2,0 mm (C 2,0); crônico com orifício 2,5 mm (C 2,5) e crônico com orifício macheado de 2,5 mm (C 2,5 M). Terminados os procedimentos cirúrgicos, o material foi preparado e conduzido para análise por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As imagens obtidas foram então qualificadas e quantificadas segundo as áreas: intra passo de rosca, projeção em espelho e contato osso/implante. Nos grupos agudos, o orifício de menor diâmetro (A 2,0) gerou grande fragmentação e compactação intra passo de rosca e o macheamento (A 2,5 M) removeu parte do material na região do parafuso. Nos grupos crônicos, o orifício com maior área óssea intra passo e contato osso/implante foi aquele com o mesmo diâmetro interno do parafuso e não macheado (C 2,5). Portanto, no momento de implantação dos parafusos cervicais, a maior área óssea intra passo de rosca e de contato foi obtida ao se realizar orifícios piloto com diâmetro interno menor que o diâmetro dos implantes sem a realização da técnica de macheamento. Entretanto, na fase crônica, os resultados obtidos sugerem que a melhor técnica seja a realização do orifício piloto com mesmo diâmetro do parafuso, sem a realização do macheamento. Levando-se em consideração que a fixação de um segmento em uma abordagem terapêutica permanecerá por um tempo prolongado, muitas vezes acima de oito semanas, é I adequado sugerir que a confecção de um orifício piloto de mesmo diâmetro interno do parafuso, sem o macheamento, seja a melhor técnica de fixação dos implantes em coluna cervical.

## PATOLOGIA

## EXPRESSÃO DA CHECKPOINT KINASE 2 NOS CARCINOMAS MAMÁRIOS: ESTUDO CLÍNICO-PATOLÓGICO E IMUNOISTOQUÍMICO

**Michel Antonio Kiyota Moutinho**

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Ribeiro-Silva

Dissertação de Mestrado apresentada em 23/10/2008

A Checkpoint quinase 2 (Chk2) é uma proteína de checagem do ciclo celular que pode atuar como um supressor tumoral devido ao seu importante papel na sinalização ao dano ao DNA e na regulação do ciclo celular. O papel do Chk2 na tumorigênese mamária, entretanto, ainda é pouco

compreendido. Este estudo foi realizado para avaliar a relação entre a expressão do Chk2 e fatores prognósticos bem estabelecidos, incluindo sobrevida livre de doença e sobrevida global; e vários reguladores da proliferação celular e progressão tumoral nos carcinomas mamários, incluindo oncogenes, genes supressores tumorais, proteínas relacionadas à apoptose e marcadores relacionados a angiogênese. Um painel imuno-histoquímico com 27 anticorpos primários foi realizado em 100 amostras de carcinomas ductais

invasores sem outras especificações (SOE), previamente fixadas em formalina e emblocados em parafina. Os dados clínicos foram obtidos dos prontuários médicos. No parênquima mamário normal adjacente ao tumor, o Chk2 marcou o núcleo das células epiteliais. Uma baixa expressão do Chk2 foi observada em 23 carcinomas e essa expressão correlacionou-se com doença avançada. Entre os reguladores da proliferação celular e progressão tumoral avalia-

dos, a baixa expressão do Chk2 correlacionou-se com baixa expressão do p27 e da telomerase. Não houve diferença entre a sobrevida global e sobrevida livre da doença de acordo com a marcação do Chk2. Em conclusão, A expressão diferencial do h-TERT e do p27 pode contribuir na fisiopatogênese dos carcinomas mamários Chk2- positivos. A expressão do Chk2 não interferiu com a evolução das pacientes.

## SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

### INFLUÊNCIA DO TAMANHO AO NASCER E DE ALGUMAS VARIÁVEIS SOCIODEMOGRÁFICAS SOBRE O ESTADO NUTRICIONAL DE CRIANÇAS ENTRE 10 E 11 ANOS DE IDADE, PERTENCENTES À COORTE DE 1994, RIBEIRÃO PRETO-SP

**Ieda Regina Lopes Del Ciampo**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>.Dr<sup>ª</sup>. Heloisa Bettiol

Tese de Doutorado apresentada em 30/10/2008

O baixo peso ao nascer (BPN) e a restrição de crescimento intra-uterino (RCIU) são indicadores de comprometimento do estado nutricional durante a vida pré-natal e estariam associados a fatores de risco para doenças cardiovasculares na vida adulta. Atualmente, acredita-se que este risco também esteja presente em idades mais precoces. Para avaliar a influência do peso ao nascer e de outras variáveis ao nascimento e entre 10 e 11 anos de idade sobre o estado nutricional de escolares em Ribeirão Preto-SP, foram avaliadas por meio de questionário e medidas antropométricas, uma amostra de 874 crianças em idade escolar, provenientes de um estudo de coorte iniciado em 1994. Foram considerados subnutridos os escolares com índice de massa corporal (IMC) < percentil (P) 5 e com excesso de peso aqueles com  $IMC \geq P85$  por duas referências: Must *et al.* e NCHS/CDC. A associação do IMC com o peso ao nascer e demais variáveis de controle foi avaliada por modelo de regressão logística nominal, sendo a faixa entre o P5 e o P85 considerada como referência. As variáveis de controle foram: sexo, idade, cor da pele, nascimento pré-termo, tabagismo materno durante a gestação, situação conjugal materna no parto, idade da mãe ao nascimento da criança, idade da introdução de leite artificial, tipo de escola que a criança frequenta escolaridade materna atual e número atual de moradores por

domicílio. Após o ajuste final do modelo para o BPN e para a RCIU, ambos não favoreceram o excesso de peso na idade escolar tanto pela referência de Must *et al.* como pela do NCHS/CDC e ainda tiveram associação positiva com a subnutrição nos escolares, com a RCIU pela referência de Must *et al.* com Odds Ratio (OR) de 2,33 e intervalo de confiança de 95%, (IC95%) de 1,34;4,07) e do NCHS/CDC com OR=2,23 (IC95% 1,29;3,84); e o BPN pelos critérios de Must *et al.* com OR=1,81 (IC95% 1,02;3,21) e NCHS/CDC com OR=1,78 (IC95% 1,01;3,12). A associação positiva do sexo masculino com o excesso de peso (OR=1,47; IC95% 1,02;2,13) e a tendência de associação positiva do maior número de moradores no domicílio com o excesso de peso não foram suficientes para retirar a associação positiva do tamanho ao nascer com a subnutrição na idade escolar. Houve, ainda, associação negativa da RCIU com o excesso de peso pela referência do NCHS/CDC (OR=0,57; IC95% 0,34; 0,93). O excesso de peso como um dos fatores de risco para a síndrome metabólica nos indivíduos com BPN e com RCIU, independente das referências de IMC utilizadas, parece ainda não estar presente na idade escolar. Os resultados encontrados são importantes e demonstram que este município, como outras regiões de países em desenvolvimento, encontra-se em fase de transição nutricional. Devido aos altos índices de excesso de peso sem a diminuição dos níveis de subnutrição para aqueles dos países desenvolvidos, o efeito de associação do BPN e da RCIU com o excesso de peso na faixa etária entre 10 e 11 anos de idade ainda não ocorreu.

### ESTUDO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DOS GENES RELACIONADOS A APOPTOSE EM LEUCEMIAS LINFÓIDES AGUDAS DA INFÂNCIA POR PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (RQ-PCR)

**Juliana França da Mata**

Orientador: Prof.Dr. Carlos Alberto Scrideli

Tese de Doutorado apresentada em 05/11/2008

**Introdução:** Anormalidades na regulação da apoptose, resultando tanto na sua inibição quanto aumento, tem sido descritas como tendo um papel central no desenvolvi-

mento de diversas malignidades onco-hematológicas. A associação dos níveis de expressão destes genes com variáveis biológicas e sobrevida em crianças com LLA não tem sido bem estabelecida. O objetivo do estudo foi de comparar níveis de expressão dos genes pró-apoptóticos *CASP3*, *CASP8*, *CASP9* e *FAS* e do gene anti-apoptótico *BCL2* em crianças com leucemia linfóide aguda (LLA) e correlacioná-los com prognóstico e variáveis clínicas e biológicas.

**Métodos:** Foram analisadas 140 amostras consecutivas de medula óssea de crianças com LLA ao diagnóstico, classificadas e tratadas nas instituições participantes segundo os protocolos propostos pelo GBTLI-99. O perfil de expressão gênica foi analisado por PCR quantitativa em tempo-real (RQ-PCR) utilizando-se SYBR Green como marcador de fluorescência e o gene *GUS* como controle interno. O valor de expressão relativa de cada gene foi avaliado pela técnica 2-DDCT (com eficiências variando de 1,9-2,1). Foram comparados os níveis de expressão dos genes estudados com as variáveis: idade, número de glóbulos brancos (GB) ao diagnóstico, citogenética molecular, velocidade na resposta ao tratamento de indução (respondedores rápidos ou lentos), grupo de risco (risco básico-RB ou alto risco-AR), imunofenotipagem e sobrevida livre de eventos

(SLE). O tempo de seguimento variou de 26 a 66 meses. A associação entre as variáveis e os valores de expressão de cada gene foi analisada pelo teste de Mann-Whitney. A SLE foi analisada através de curvas de Kaplan-Meier e teste log-rank e a correlação entre os valores de expressão pelo teste de Spearman. Foram considerados como aumentados os valores de expressão acima da mediana.

**Resultados:** SLE em 4 anos foi de 76% (RB-82% x AR-66%) no grupo analisado. Foi observada uma correlação significativa entre os genes *CASP3*, *CASP8*, *CASP9* e *FAS* ( $P < 0.001$ ) e associação estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre hiperexpressão do gene *BCL2* e GB  $< 50000/dL$  ao diagnóstico e risco básico. Hiperexpressão dos genes *CASP3*, *CASP8* e *FAS* esteve associada a contagem de GB  $< 5000/dL$  no D7 da terapia de indução. Não foi verificada associação entre o nível de expressão destes genes e SLE em 4 anos.

**Conclusões:** Os resultados sugerem que o nível de expressão de genes relacionados a apoptose pode estar associado a variáveis clínicas e biológicas em crianças com LLA. O nível de expressão destes genes medidos ao diagnóstico, no entanto, não parece ter associação significativa com sobrevida e chance de recaída em crianças com LLA.

## DA SAÚDE PERINATAL À SAÚDE DO ADULTO JOVEM : ESTUDO DOS FATORES DE RISCO PARA A SÍNDROME METABÓLICA NA COORTE NASCIDA EM 1978/79 NOS HOSPITAIS DE RIBEIRÃO PRETO, SP

**Viviane Cunha Cardoso**

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Barbieri  
Tese de Doutorado apresentada em 19/11/2008

**Introdução:** Diversos estudos sugerem que baixo peso ao nascer associado a sobrepeso na infância pode aumentar o risco de resistência insulínica e Síndrome Metabólica (SM) na vida adulta. SM é um transtorno complexo representado por um conjunto de fatores de risco para doença cardiovascular, relacionados à deposição central de gordura e à resistência insulínica. A prevalência da SM é alta, variando entre 10% e 40%, dependendo da idade e sexo.

**Objetivos:** Estimar a prevalência da SM e seus componentes entre adultos jovens nascidos na coorte de Ribeirão Preto/SP em 1978/79, e avaliar em que medida fatores indicativos de nutrição intra-uterina (PIG e GIG) e excesso de peso na infância são associados com SM.

**Métodos:** De 6827 nascidos de parto único hospitalar em 1978/79 foram avaliados 2063 participantes aos 23/25 anos para estabelecer a prevalência de SM na coorte adulta. Esta avaliação dos adultos jovens constou de coleta de sangue, medidas antropométricas, aferição de pressão arterial e aplicação de questionários padronizados. Destes 2063 sujeitos, 1138 tiveram informações coletadas em 3

momentos de avaliação: ao nascimento (sexo do recém-nascido, tabagismo, escolaridade e situação conjugal maternas, paridade e relação de peso ao nascer para idade gestacional, classificada como adequado - AIG, pequeno - PIG e grande - GIG), na idade escolar (excesso de peso ou não) e aos 23/25 anos (ocupação do chefe da família, situação conjugal, escolaridade, tabagismo e história familiar de doenças cardiovasculares). SM foi definida pelo consenso da International Diabetes Federation (IDF). Foi aplicada análise de regressão logística múltipla, passo a passo, sendo SM a variável dependente. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto -USP, processo nº 5587/2007.

**Resultados:** A prevalência de SM da coorte adulta, pelos critérios da IDF, foi 11,9% (18,1% nos homens e 6,1% nas mulheres). Entre os componentes da síndrome encontrou-se: circunferência de cintura aumentada em 32%, hipertensão em 22,8%, HDL baixo em 42%, hiperglicemia em 3,1%, e hipertrigliceridemia em 12,8%. Houve diferença entre os sexos em relação a todos os componentes da SM, sendo que os homens apresentaram maiores prevalências de alteração nas medidas de cintura, níveis pressóricos, glicemia de jejum e triglicérides (36,1%, 40,6%, 4,5% e 16%; respectivamente) do que as mulheres (28,1%, 6,3%, 1,8% e

9,8%; respectivamente). Em relação ao HDL colesterol baixo, as mulheres apresentaram maior porcentagem (44,4%) do que os homens (39,4%). O cálculo de tendência linear mostrou que o risco para SM aumentava conforme o aumento da relação de peso para idade gestacional. Na análise não-ajustada recém-nascidos GIG apresentaram risco para SM, associação esta que não se manteve com o ajuste pe-

las outras variáveis. Indivíduos do sexo masculino (OR 4,24), com excesso de peso na idade escolar (OR 2,81) e tabagistas (OR 3,03) tiveram um risco maior de SM.

**Conclusões:** A prevalência de SM foi elevada, considerando-se que a população é jovem. Ganho de peso na idade escolar mostrou-se associado a risco de SM, ao contrário das condições de nascimento.

### **PERFIL NUTRICIONAL DE ADOLESCENTES EUTRÓFICOS, COM DIAGNÓSTICO DE SOBREPESO E OBESIDADE, ATENDIDOS NO CENTRO MÉDICO SOCIAL COMUNITÁRIO VILA LOBATO, RIBEIRÃO PRETO (SP), BRASIL**

**Virgínia Pavesi Miguel**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jacqueline Pontes Monteiro  
Dissertação de Mestrado apresentada em 25/11/2008

A obesidade pode ser definida como um distúrbio metabólico caracterizado por aumento da massa adiposa do organismo que se reflete em aumento do peso corpóreo (OMS, 2004). Na adolescência, esta se associa ao aparecimento precoce de doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, problemas psicológicos, além de comprometer a postura, causar alterações no aparelho psicomotor entre outros (Terres et al., 2006). A adolescência traz consigo algumas peculiaridades que podem fazer com que este seja um grupo de risco para o excesso de peso, uma vez que as práticas alimentares dessa faixa etária compreendem alta ingestão de alimentos energéticos tais como fast foods, salgadinhos, doces e refrigerantes (Del Ciampo; Tomita, 2007) e baixa ingestão de frutas, vegetais e laticínios (Neumark-Sztalner et al., 1999). O presente estudo teve como objetivos descrever e comparar o perfil nutricional de três grupos de adolescentes de mesma idade e gênero, com diagnóstico de sobrepeso, obesidade e eutrofia determinado pelo Índice de Massa Corporal (IMC). Para avaliação do consumo alimentar, foi utilizado questionário semiquantitativo de frequência alimentar, e as informações relativas aos hábitos associados à alimentação foram coletadas por meio de um questionário. Foram avaliados 141 adolescentes, com idade entre 10 e 19 anos, atendidos no Centro Médico Social Comunitário Vila Lobato, cidade de Ribeirão Preto, São Paulo. Em relação à antropometria, observou-se que houve diferença estatística significativa entre o IMC, peso, circunferência da

cintura e do braço, dobras cutâneas e composição corporal entre os grupos ( $p=0,000$ ). A circunferência da cintura apresentou correlação estatisticamente significativa com o IMC ( $0,947$ ;  $p=0,000$ ), porcentagem de gordura corporal ( $0,757$ ;  $p=0,000$ ), dobra cutânea triéptica ( $0,723$ ;  $p=0,000$ ), dobra cutânea subescapular ( $0,815$ ;  $p=0,000$ ) e dobra cutânea supra-ilíaca ( $0,841$ ;  $P=0,000$ ). Entre os grupos não foi observada diferença estatística significativa em relação à ingestão energética e à contribuição percentual de macronutrientes, porém todos os grupos apresentaram percentual lipídico da dieta acima do recomendado. Além disso, não houve diferença estatística significativa entre os três grupos para o consumo de micronutrientes. Quanto à análise qualitativa da dieta, observa-se em geral consumo frequente de arroz e feijão, pães, salgados, refrigerante, suco artificial, café com açúcar e embutidos. As frutas mais consumidas foram laranja, maçã e banana, e os vegetais mais consumidos foram alface e tomate. No que se refere ao estilo de vida, observou-se que o tempo gasto em frente à televisão ( $p=0,018$ ) foi maior entre os adolescentes obesos, o hábito de fazer dieta ( $p=0,023$ ) e o menor número de refeições ( $p=0,014$ ) foi mais prevalente entre os com sobrepeso e a presença familiar de obesidade ( $p=0,000$ ) foi menos comum entre os eutróficos. Os nossos resultados mostram que os três grupos de adolescentes apresentaram semelhança em relação ao padrão alimentar. Do ponto de vista qualitativo, o padrão alimentar de todos os adolescentes pesquisados mostrou-se inadequado para a maioria dos grupos de alimentos. Os resultados referentes ao estilo de vida e presença de obesidade na família mostram que, além do padrão alimentar, estes devem ser considerados ao tratar obesidade na adolescência.

### **IMPACTO DA SUPLEMENTAÇÃO MATERNA DE VITAMINA A DURANTE O PUERPÉRIO NO BINÔMIO MÃE-FILHO: ENSAIO CLÍNICO ALEATORIZADO DUPLO-CEGO PLACEBO-CONTROLADO**

**Thalia Manfrin Martins**

Orientador: Prof. Dr. Ivan Savioli Ferraz  
Dissertação de Mestrado apresentada em 28/11/2008

**Introdução:** A deficiência de vitamina A (DVA) constitui grave problema de saúde pública em muitas regiões do mundo, atingindo principalmente o grupo materno-infantil

e aumentando a morbimortalidade na infância. A suplementação materna pode ser uma estratégia eficaz no combate ao problema.

**Objetivos:** Verificar o impacto da suplementação materna com vitamina A sobre a concentração de retinol do leite materno e do soro no binômio mãe-filho, além de estimar a prevalência da DVA neste grupo, verificar a associação entre mãe e filho e a influência de alguns fatores envolvidos na gênese da DVA.

**Casuística e métodos:** 33 puérperas receberam cápsulas com 200.000 UI de vitamina A entre o 20º e o 30º dias pós-parto (grupo suplementado) e 33 receberam cápsulas idênticas com óleo de soja (grupo placebo). Amostras de sangue e leite maternos foram colhidas antes (T0) e após (T1) a intervenção (três meses pós-parto). Sangue dos lactentes foi colhido aos três meses. O retinol foi analisado pelo método de HPLC. Concentrações inferiores a 0,70 µmol/l no soro e 1,05 µmol/l no leite foram indicativas de DVA. Peso e altura foram aferidos e dados sociodemográficos e clínicos foram obtidos através de entrevista.

**Resultados:** Concluíram a pesquisa 61 pares mãe-filho. Nas mães suplementadas, a concentração sérica de retinol aumentou de 1,05 ± 0,31 µmol/l no T0 para 1,17 ± 0,34 µmol/l no T1 (p=0,026), mostrando diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo placebo, cuja média foi 1,02 ± 0,28 µmol/l (p=0,032). No leite materno, houve redução significativa da concentração de retinol somente

no grupo que não recebeu a vitamina (1,98 ± 0,78 µmol/l no T0 e 1,34 ± 0,89 µmol/l no T1, p=0,003). Nos lactentes, não houve diferença estatística nas médias de retinol entre os grupos (0,64 ± 0,30 µmol/l e 0,69 ± 0,26 µmol/l). Quanto à DVA materna sérica, encontrou-se 6,7% (T0) e 16,7% (T1) no grupo placebo e 6,5% (T0) e 3,2% (T1) no suplementado. DVA no leite materno foi observada em 7,4% (T0) e 55,6% (T1) das amostras do grupo placebo e 22,6% (T0) e 16,1% (T1) do suplementado. A DVA esteve presente em 66% dos lactentes (69% no grupo placebo e 63,3% no suplementado). Apenas uma puérpera apresentou subnutrição e um lactente apresentou risco nutricional. DVA materna associou-se à DVA no leite (p=0,015) e houve correlação positiva significativa entre retinol sérico materno e do leite (r = 0,28; p=0,032). Não houve influência das variáveis paridade, escolaridade, renda, uso de polivitamínico, febre e diarreia no retinol de puérperas e lactentes. O retinol sérico materno não se alterou com o IMC, mas a idade das puérperas se correlacionou positivamente com o retinol (r = 0,29; p=0,024).

**Conclusões:** A suplementação materna com 200.000 UI de vitamina A mostrou impacto positivo na concentração de retinol da mãe e do leite materno, porém não atingindo o lactente. Apesar de a população estudada ter sido considerada eutrófica em praticamente sua totalidade, elevada prevalência de DVA foi encontrada, principalmente nos lactentes de três meses de idade, questionando-se o ponto de corte empregado para esta faixa etária.

## SAÚDE MENTAL

### TRANSTORNO DE ANSIEDADE SOCIAL : VALIDAÇÃO DE INSTRUMENTOS DE AVALIAÇÃO

**Flávia de Lima Osório**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sonia Regina Loureiro  
Tese de Doutorado apresentada em 07/11/2008

O Transtorno de Ansiedade Social (TAS) é um distúrbio de início precoce, com prevalência e comorbidades significativas, favorecendo prejuízos importantes no funcionamento laboral, familiar, social e acadêmico, especialmente em pessoas jovens. Dada tais características, faz-se necessária a identificação precoce e o diagnóstico preciso do TAS, o que requer instrumentos validados. Objetivou-se a avaliação sistemática do TAS, por meio de um conjunto de instrumentos validados quanto às suas qualidades psicométricas de fidedignidade e validade, em uma população de adultos jovens brasileiros, estudantes universitários, sob a perspectiva da auto e hetero-avaliação. Para tal,

realizou-se a validação transcultural dos instrumentos auto-avaliativos: *Social Phobia Inventory* (SPIN) e *Self Statements During Public Speaking Scale* (SSPS -versão traço e estado) e do instrumento hetero-avaliativo *Brief Social Phobia Scale* (BSPS), com aprovação prévia dos autores das versões originais. O delineamento metodológico envolveu três etapas. Na primeira, a amostra utilizada para avaliação dos instrumentos SPIN e SSPS foi composta por 2314 estudantes universitários da população geral. Na segunda etapa, para a validação dos instrumentos SPIN, SSPS e BSPS, utilizou-se de uma amostra de 178 estudantes universitários identificados como casos (N = 88) e não-casos (N = 90) de TAS, através da Entrevista Clínica Estruturada para o DSM-IV (SCID-IV). Na terceira etapa, 45 estudantes universitários também classificados como casos (N = 24) e não-casos (N = 21) de TAS compuseram a amostra para

validação da SSPS-estado no contexto de um modelo experimental de falar em público. O SPIN apresentou boa consistência interna ( $\alpha=0,63-0,90$ ), validade concorrente com o Inventário de Ansiedade de Beck (BAI) ( $r=0,10-0,63$ ) e SSPS-traço ( $r=0,22-0,65$ ), validade discriminativa (sensibilidade = 0,84, especificidade = 0,87) e validade de construto. A análise fatorial indicou a presença de um número variável de fatores em função da amostra estudada. Destaca-se a versão reduzida deste instrumento, o Mini-SPIN, que também apresentou ótimos indicadores psicométricos (sensibilidade = 0,77, especificidade = 0,67). A SSPS-traço mostrou-se bastante adequada quanto à consistência interna ( $\alpha=0,64-0,94$ ), validade concorrente com o BAI ( $r=0,18-0,53$ ) e SPIN ( $r=0,22-0,65$ ) e validade discriminativa entre casos e não-casos de TAS. A análise fatorial evidenciou a presença de dois fatores: auto-avaliação positiva e negativa. A BSPTS aplicada com o suporte de um roteiro de perguntas-guia, apresentou excelentes confiabilidade inter-

avaliadores (0,86-1,00) e validade discriminativa (sensibilidade = 0,84, especificidade = 0,83); adequadas consistência interna ( $\alpha=0,48-0,88$ ), validade concorrente com o BAI ( $r=0,21-0,62$ ), SPIN ( $r=0,24-0,82$ ) e SSPS-traço ( $r=0,23-0,31$ ) e validade de construto. A análise fatorial apontou a presença de seis fatores que explicam 71,8% da variância dos dados. A SSPS-estado mostrou-se apropriada para avaliação dos aspectos cognitivos associados ao falar em público no contexto de um modelo experimental de simulação de falar em público, apresentando excelente validade discriminativa entre casos e não-casos de TAS, além de sensibilidade para discriminar os diferentes níveis de ansiedade nas fases do procedimento. Todos os instrumentos mostraram boas qualidades psicométricas, o que recomenda o uso na população de universitários brasileiros, podendo ser aplicados tanto em contextos experimentais como clínicos, favorecendo a detecção mais precisa do TAS, especialmente nos contextos de atenção primária à saúde.

## SAÚDE NA COMUNIDADE

### TRABALHO EM EQUIPE E COMPETÊNCIA PROFISSIONAL NA ESTRATÉGIA SAÚDE DA FAMÍLIA: A PERCEPÇÃO DO CIRURGIÃO DENTISTA

**Carolina Menez de Carvalho Pinto**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Aldaísa Cassanho Forster  
Dissertação de Mestrado apresentada em 31/10/2008

A Saúde Bucal deve ser entendida como parte integrante e inseparável da saúde geral do indivíduo e que está relacionada com as condições de saneamento; alimentação; moradia; trabalho; educação; renda; transporte; lazer; liberdade; e acesso à terra, aos serviços de saúde e à informação (Brasil, 1993). Um ator nesta história se torna primordial, o cirurgião dentista, responsável por proporcionar padrões adequados de saúde bucal para o conjunto da população de um país, de uma região, ou de uma localidade; procurando formular estratégias e linhas de ação que permitam a construção de uma saúde de base coletiva. Esta investigação tem por objetivo analisar a percepção do cirurgião dentista da equipe de saúde Bucal (ESB) sobre a Estratégia Saúde da Família (ESF) e a Saúde Bucal; com enfoques no trabalho em equipe e nas suas competências na ESF.

Constitui-se em um estudo descritivo exploratório com abordagem qualitativa dos dados.

Para a coleta dos dados foi utilizada a entrevista

semi-estruturada com os 10 cirurgiões dentistas que trabalham na equipe de saúde bucal da ESF do município de Ribeirão Preto.

As entrevistas gravadas e transcritas na íntegra. Para interpretação dos dados nos baseamos na análise de conteúdo preconizada por Bardin (1977). Com relação aos resultados da caracterização do sujeito, constatamos que todos os CDs entrevistados egressaram da graduação há mais de 14 anos, com média de 24,4 anos de formação acadêmica. Com relação à idade, os profissionais, possuem média de 46,2 anos, a maioria é do sexo masculino e também casado. Eles possuem uma média de tempo de trabalho na ESF de 29,9 meses, todos os profissionais possuem especialização e somente um entrevistado não possui formação voltada para a área de Saúde Pública. Da análise das entrevistas realizadas com os cirurgiões dentistas da Estratégia Saúde da Família emergiram dois temas principais: o trabalho em equipe e as competências profissionais para o trabalho na ESF.

Estes dois temas são de grande importância para o cirurgião dentista, para que este possa proporcionar uma elevação dos níveis de saúde da população, principalmente da saúde bucal.

## PROGRAMA DE SAÚDE VOCAL PARA PROFESSORES: ESTUDO EM UMA ESCOLA PARTICULAR DE RIBEIRÃO PRETO

**Silvia Tiekio Kasama**

Orientador: Prof. Dr. Edson Zangiacomi Martinez  
Dissertação de Mestrado apresentada em 07/11/2008

**Introdução:** os professores são profissionais com alto risco para disfonia. A intensa demanda vocal e a falta de conhecimento a respeito de cuidados com a própria voz são aspectos comuns entre os professores. Experiências anteriores para orientar este profissional, com relação a sua própria voz, demonstram sucesso e a opinião dos professores, assim como a prática de novos hábitos são de grande importância. As Escolas Waldorf têm uma pedagogia baseada na Antroposofia, sendo frequente o uso da voz falada e cantada em suas atividades.

**Objetivo:** Propor uma ação de promoção de saúde vocal para professores, capaz de fornecer uma percepção mais ampla, além da conscientização dos fatores que determinam ou interferem no processo saúde-doença da disfonia.

**Método:** 13 professores (2 do sexo masculino) de uma Escola Waldorf de Ribeirão Preto, com média de idade de 43 anos (mín=24, máx=56), participaram das 3 etapas da pesquisa, que compreendia uma avaliação inicial individual (etapa 1), o Programa de Saúde Vocal com duração de 12 encontros semanais (etapa 2) e uma reavaliação individual após o

término dos encontros (etapa 3). Houve a participação de 5 professores do ensino infantil, 6 do fundamental e 2 do médio. O programa abordou anatomia e fisiologia da fonação, higiene vocal e exercícios de aquecimento e desaquecimento vocal. Logo após o término dos encontros, os professores preencheram um questionário de avaliação do programa.

**Resultados:** a comparação dos dados coletados nas avaliações individuais pré e pós-intervenção não revelaram mudanças significativas, porém tiveram a função de monitoramento do aspecto vocal dos professores. De acordo com os professores, o aspecto negativo do processo foi a falta de tempo para comparecer aos encontros e para realizar os exercícios diariamente. As mudanças citadas como mais importantes foram aspectos gerais de higiene vocal (destacando-se a hidratação), respiração, efeitos benéficos dos exercícios, atenção para a própria voz e dos alunos e o reconhecimento da importância da voz.

**Conclusão:** a ação de promoção de saúde proposta obteve grandes êxitos em ampliar a percepção e conscientizar os professores a respeito dos fatores que atuam de maneira favorável ou prejudicial à voz. O resultado foi muito favorecido pelo espaço criado para reflexão, troca de experiências e vivências de situações proporcionadas pelo Programa de Saúde Vocal.

## GEOEPIDEMIOLOGIA DA CO-MORBIDADE AIDS/ TUBERCULOSE NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL - DE 1996 A 2005

**Ana Teresa Mancini Pimenta**

Orientador: Prof. Dr. Antonio Luiz Rodrigues-Júnior  
Dissertação de Mestrado apresentada em 14/11/2008

Foi desenvolvido um estudo ecológico com o objetivo de descrever a incidência da co-morbidade aids/ tuberculose no Estado de São Paulo, no período de 1996 a 2005, segundo sua distribuição espacial. A base territorial utilizada foram os 645 municípios do Estado, agrupados em 63 microrregiões de acordo com a divisão do IBGE; os coeficientes de incidência de aids e da co-morbidade aids/ tuberculose foram empregados como medidas das doenças. O IDH e seus componentes IDH-L, IDH-E e IDH-R foram calculados para cada microrregião como indicadores de desenvolvimento humano das populações. No período estudado, foram notificados 81.841 casos de aids; 16.759 casos de co-morbidade aids/ tuberculose com uma taxa de ataque de 21,60% e 733 casos suspeitos de tuberculose. Observou-se que 65,49% dos casos de aids notificados eram do sexo masculino; a faixa etária em que ocorreu a maior proporção (61,46%) do número de notificações foi entre 25 e

39; houve maior proporção de transmissão heterossexual (52,81%); quanto à escolaridade, a maioria dos casos (53,42%) apresentou entre 1 e 7 anos; as microrregiões com os maiores coeficientes de incidência (casos por 100.000 habitantes acima de 14 anos) foram Ribeirão Preto (490,41), Barretos (489,42), São José do Rio Preto (464,08), Santos (459,22) e Caraguatatuba (402,84). Dos casos notificados com a co-morbidade, 73,92% eram do sexo masculino; pessoas com idade entre 25 e 44 anos foram as mais acometidas (77,09%); 57,10% apresentavam escolaridade entre 1 e 7 anos; as microrregiões com os maiores coeficientes de incidência (casos por 100.000 habitantes acima de 14 anos) foram Santos (136,35) Caraguatatuba (88,67) São Paulo (87,45), São José dos Campos (72,64) e Ribeirão Preto (70,97). A microrregião de São Paulo (0,835) apresentou o maior valor de IDH; Nhandeara (0,843) o maior IDH-L; São José dos Campos (0,897) o maior IDH-E; São Paulo (0,835) o maior IDH-R; as microrregiões ao sul/ sudoeste do Estado apresentaram os menores valores do IDH e de seus componentes. O padrão de distribuição espacial da aids e da co-morbidade aids/ tuberculose foram diferentes do padrão do IDH e seus componentes.



## ALTERAÇÃO DO EQUILÍBRIO E MARCHA EM IDOSOS E OCORRÊNCIA DE QUEDAS

**Thaise Lucena Silva**

Orientador: a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Amábile Rodrigues Xavier Manço  
Dissertação de Mestrado apresentada em 27/11/2008

O envelhecimento populacional presente na maioria dos países na atualidade inclusive no Brasil, tem sido associado ao aumento das quedas que estão se tornando cada vez mais frequentes e sendo consideradas como um importante problema de saúde pública. O presente estudo realizado na Associação dos Aposentados de Catanduva e Região tiveram como objetivo estudar as alterações de equilíbrio e marcha em idosos e as associações com quedas. Foram pesquisados 200 idosos de ambos os sexos, com idade igual e superior a 60 anos. O método utilizado foi uma entrevista contendo perguntas abertas e fechadas, e para avaliação cognitiva foi aplicado o mini-exame do estado mental (MEEM) e a escala de avaliação de desempenho físico de membros inferiores (SPPB), com o intuito de ava-

liar o equilíbrio, marcha e a força destes membros. Para a análise dos dados foi utilizado o procedimento GENMOD do programa computacional SAS versão nove, sendo considerado um nível de significância de 5% ao testar hipóteses e um intervalo de confiança de 95%. Os resultados mostraram que 51% dos idosos sofreram quedas nos últimos 6 meses, os fatores de risco encontrados como significantes foram: idade de 70 a 74 anos ( $p=0,04$ ) e de 75 a 79 anos ( $p \leq 0,01$ ), residir sozinho ( $p \leq 0,01$ ), não possuir companheira ( $p=0,01$ ), uso de medicamentos ( $p=0,05$ ), número de medicamentos de 3 a 4 ( $p=0,04$ ) e 5 ou mais ( $p=0,01$ ), presença de fraqueza muscular ( $p \leq 0,01$ ), largura dos passos pequenos ( $p=0,08$ ), assimetria da marcha ( $p=0,09$ ), presença de problemas nos pés ( $p=0,07$ ), uso de aparelho de audição ( $p \leq 0,01$ ). Os resultados indicam a importância de uma equipe multidisciplinar, como medidas preventivas, visando diminuir as quedas possibilitando uma melhora das atividades básicas da vida diária (ABVDs), dessa forma tornando o idoso mais independente.

## A REPRESENTAÇÃO DE VELHICE ENTRE OS PROFISSIONAIS QUE ATUAM NOS NÚCLEOS DE SAÚDE DA FAMÍLIA

**Angélica Maria Jabur Bimbato**

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Duarte de Carvalho  
Dissertação de Mestrado apresentada em 28/11/2008

Diversas mudanças têm ocorrido no perfil demográfico do Brasil, passando o envelhecimento populacional a ser uma realidade e não mais uma expectativa. Muitos são os mitos, conceitos e concepções sobre idoso, velhice e envelhecimento existentes em nossa sociedade, assim como meios legais que regem sobre os direitos e deveres da pessoa idosa (Programa Nacional de Saúde do Idoso, Estatuto do Idoso e Pacto pela Vida 2006). Objetivando analisar as representações de velhice presentes entre os profissionais que atuam nos Núcleos de Saúde da Família I, III, IV e V do Centro de Saúde Escola da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (CSE - FMRP/USP) e as possíveis implicações para o serviço de saúde, realizamos este estudo, utilizando-se da abordagem qualitativa por meio de entrevistas semi-estruturadas, com dezoito profissionais que atuam nesses Núcleos (agentes comunitários de saúde, auxiliares de enfermagem, enfer-

meiras, médicos e dentistas). As concepções de velhice variaram em função da formação, idade e experiência de vida dos entrevistados, sendo apresentadas como: fase de sabedoria e experiência de vida; evolução natural do corpo humano; estado de espírito; fase que se assemelha ao mundo infantil; fase de decadência ou solidão; e melhor idade. Há a compreensão por parte dos profissionais entrevistados, de que a velhice é um conjunto bio-psico-social-espiritual, sendo manifestadas pelos mesmos as dificuldades encontradas em prestar uma assistência de qualidade neste cenário tão complexo. Demonstraram também, os seus sentimentos (medo e ansiedade) frente ao próprio processo de envelhecimento, como consequência da cultura e da sociedade em que vivem, onde ser idoso é visto de forma negativa. As concepções sobre idoso, velhice e envelhecimento, apresentadas pelos entrevistados, indicam a dimensão do quanto esses profissionais encontram-se despreparados para enfrentar o grande desafio de melhorar o atendimento oferecido pelo serviço de saúde, principalmente, em se levando em consideração o aumento acentuado do número de idosos neste país.

## FATORES PREDITORES DO ALCANCE DAS METAS DO PROGRAMA DE INTERVENÇÃO NO ESTILO DE VIDA EM NIPO-BRASILEIROS DE BAURU - SP

**Marília Alessi Guena de Camargo**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Saes Sartorelli

Dissertação de Mestrado apresentada em 08/12/2008

**Objetivos:** Identificar fatores associados ao alcance das metas de um programa de intervenção no estilo de vida em Nipo-Brasileiros de Bauru, SP.

**Metodologia:** Os fatores associados ao alcance das metas (perda de peso de 5%, prática de 150 minutos de atividades físicas semanal, consumo alimentar com teor de gordura saturada inferior a 10% das calorias totais, consumo diário de 400g de frutas, verduras e legumes), após 12 meses de intervenção foram investigados em modelos de regressão logística ajustados. As avaliações do estilo de vida e perfil de saúde foram conduzidas no início do estudo e após 12 meses de seguimento.

**Resultados:** No total, 458 nipo-brasileiros, 56% do sexo feminino, 84% de 2ª geração, idade média (DP) de 60 (11) anos foram analisados. Foram incluídos nos modelos múltiplos para cada desfecho investigado os indivíduos com excesso de peso (n=329), que reportaram não terem o hábito da prática de 150 minutos de atividades físicas semanal (n=278), consumo alimentar com teores de gordura saturada superior a 10% das calorias totais (n=107) e con-

sumo diário inferior a 400g de frutas, verduras e legumes (n=265). Após 12 meses, 11% dos indivíduos com excesso de peso alcançaram a meta de perda de peso, 24, 55 e 16% dos participantes alcançaram as metas de prática de atividades físicas, teor da dieta de gordura saturada e consumo de frutas, verduras e legumes, respectivamente. Após ajuste por variáveis de confusão, maior razão de chance [OR (95%)] para o alcance da meta de perda de peso foi verificada entre mulheres [2,4 (1,3; 4,5)], e menor razão de chance entre portadores de diabetes, hipertensão e dislipidemia [0,4 (0,1; 0,8)] e indivíduos classificados em estágio de mudança de pré-contemplação / contemplação para redução do consumo de carnes vermelhas [0,4 (0,2; 0,9)]. Os participantes de 2ª geração apresentam menor razão de chance para o alcance da meta do consumo de frutas, verduras e legumes [0,3 (0,1; 0,9)]. Nenhuma associação foi verificada para as metas da prática de atividades físicas e de gordura saturada.

**Conclusões:** Entre os Nipo-Brasileiros, as estratégias do programa de intervenção no estilo de vida foram mais eficientes no alcance das metas entre as mulheres, indivíduos de 1ª geração, não portadores de morbidades e participantes classificados nos estágios de mudança de ação/manutenção para a redução do consumo de carnes vermelhas.

## A INFLUÊNCIA DA FISIOTERAPIA NA PROMOÇÃO DA QUALIDADE DE VIDA EM PACIENTES COM DISFUNÇÃO TEMPOROMANDIBULAR

**Maíra de Oliveira Viana**

Orientador: Prof. Dr. Jair Lício Ferreira Santos

Dissertação de Mestrado apresentada em 15/12/2008

A disfunção temporomandibular (DTM) é responsável por uma sintomatologia de difícil diagnóstico e tratamento, estando cada vez mais presente em um número considerável de indivíduos, trazendo prejuízos nas atividades diárias, no sono e na alimentação, o que resulta em impacto negativo na qualidade de vida do paciente. A fisioterapia utiliza inúmeros recursos com a finalidade normalizar a função do sistema estomatognático e proporcionar uma melhora na qualidade de vida desses indivíduos. O objetivo geral da pesquisa foi avaliar a influência da fisioterapia na melhora dos sintomas e na qualidade de vida sob a perspectiva de pacientes portadores de DTM. O estudo foi realizado com 60 pacientes de ambos os sexos, com idade variando entre 18 a 70 anos com diagnóstico de DTM atendidos na clínica da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP). Os pacientes foram divididos em dois

grupos de 30 voluntários cada, sendo que um grupo recebeu tratamento fisioterápico e odontológico e o outro recebeu apenas o tratamento odontológico. A medida da qualidade de vida foi obtida pelo questionário genérico SF-36 *Medical Outcome Study-Mos Short From Health Survey*, em duas ocasiões: uma no início do tratamento e outra no final. Os resultados mostram que os pacientes que fizeram um tratamento interdisciplinar apresentaram escores mais elevados em todos os domínios do questionário: capacidade funcional, limitação por aspectos físicos, dor, estado geral de saúde, vitalidade, aspectos sociais, aspectos emocionais e saúde mental. No grupo que recebeu tratamento apenas odontológico, verificou-se melhora apenas no domínio relacionado a dor. O questionário SF-36 foi um instrumento adequado, de aplicação relativamente rápida e de fácil uso para avaliação da qualidade de vida em pacientes com DTM. Sendo assim os resultados apontam para a importância do trabalho multidisciplinar e as contribuições que a fisioterapia pode oferecer a fim de proporcionar uma melhor qualidade de vida em pacientes com DTM.