

Resumos de Dissertações de Mestrado e Teses de Doutorado apresentadas na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP de outubro a dezembro de 2009

Biologia Celular e Molecular

IMUNODETECÇÃO DAS LIPINAS DE *Drosophila*

Murilo Carlos Bizam Vianna

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luisa Paçó-Larson

Dissertação de Mestrado apresentada em 01/10/2009

As lipinas fazem parte de uma nova família de proteínas conservadas evolutivamente, que apresentam atividade de fosfatase de ácido fosfatídico dependente de Mg^{2+} . De acordo com esta atividade, estudos de falta e ganho de função mostram envolvimento dessas proteínas na biossíntese de lipídeos de estocagem em camundongos, e na biossíntese de membranas, no nematóide *C.elegans* e em fungos. A lipina 1 de mamíferos também está envolvida na diferenciação de adipócitos e tem sido caracterizada como co-ativador transcricional regulando a expressão de genes associados com oxidação de ácidos graxos, síntese e secreção de lipídios. Enquanto em fungos e invertebrados existe somente um gene de lipina, em mamíferos as lipinas são codificadas por 3 genes (*Lpin1*, *Lpin2* e *Lpin3*), com padrão tecidual de expressão distintos. De modo interessante, resultados de nosso laboratório mostram que o ortólogo de *Lpin* em *Drosophila* (denominado de *DmLpin*), expressa três transcritos de modo regulado nos tecidos e no desenvolvimento. Neste trabalho iniciamos a caracterização das proteínas codificadas por *DmLpin* através do uso de anticorpos gerados para dois fragmentos distintos, mas comuns as três isoformas. Em imunoblots de extratos protéicos de células S2 e S2R⁺, e de tecidos de *Drosophila*, os dois anticorpos detectam uma banda principal que migra entre 130 kDa - 140 kDa. Dentre os tecidos analisados, a lipina mostrou-se presente em maiores quantidades no corpo gorduroso de larvas em L3, estágio em que também são detectados os maiores níveis de lipina durante o desenvolvimento. As diferenças dos níveis de lipina entre tecidos e no desenvolvimento diferem do observado para os mRNA, indicando envolvimento de controle pós-transcricional na expressão destas proteínas. A imunomarcagem de células S2R⁺, que expressam a lipina B, mas não as isoformas A ou C, revela um padrão disperso de localização. Nota de resumo (continuação) pequena porcentagem de células (~5%) apresentando marcação concentrada aparentemente na periferia de vesícula, com um diâmetro máximo de 3 μ m. Experimentos bioquímicos mostram que nessas células a lipina é majoritariamente solúvel, com uma quantidade pequena co-sedimentando com membranas pesadas, o que pode ser decorrente de sua possível associação com as estruturas vesiculares. As vesículas positivas para lipina são destituídas de lipídeos neutros (triglicérides). Essa observação e o fato de apenas uma pequena porcentagem de células apresentarem a lipina concentrada em vesículas levantam a hipótese de que as vesículas lipina-positivas vistas em células S2R⁺ reflitam um processo celular dinâmico, potencialmente direcionados para a biogênese de membranas necessárias para o crescimento que antecede o divisão celular.

BASES MOLECULARES DA MUTAÇÃO KG00562 E SUA ASSOCIAÇÃO COM LETALIDADE

Gustavo Borges Pereira

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luisa Paçó-Larson

Dissertação de Mestrado apresentada em 23/10/2009

O sítio de inserção do transposon na linhagem KG00562 foi mapeado entre os loci CG8709 e *kermit*. Esses genes são conservados evolutivamente, e estudos em outros organismos têm mostrado um papel importante no metabolismo de lipídios (CG8709) e no desenvolvimento (*kermit*). Assim, o mutante KG00562 poderia contribuir de modo importante na

caracterização funcional desses novos genes em *D. melanogaster*. O CG8709, denominado aqui de *DmLpin*, expressa diferentes isoformas. Uma dessas isoformas, a *DmLpinB*, é expressa majoritariamente no tecido nervoso. Na linhagem KG00562, o mRNA de *DmLpinB* não é observado, sendo detectado um mRNA de menor tamanho que carrega sequência do primeiro exon não traduzido de *DmLpinB*, compartilhado com *kermit*. Outra característica dessa linhagem mutante é o alto nível de letalidade. A inserção KG00562 em *background* selvagem apresenta um aumento no fenótipo de letalidade, o que é indicativo de um ganho de função. Através de RACE 3' clonamos o mRNA que contém o primeiro exon de *DmLpinB/kermit*. A análise da sequência, em conjunto com informações do perfil de expressão deste mRNA, mostrou que ele é resultado de um *splicing* aberrante entre o primeiro exon de *DmLpinB* e o segundo exon do gene *mini-White*, presente na construção KG e utilizado como marcador da inserção. A maior fase de leitura do mRNA quimérico codifica a proteína *White* com a porção amino-terminal truncada em 74 aminoácidos. Testes de letalidade mostraram que a inserção KG00562 sobre *background* selvagem (CantonS) ou deficiente em *White* (W1118) resulta em altos níveis de letalidade, indicando que a mortalidade em KG00562 não está relacionada com interferência na função de *White*. Além disso, a redução nos índices de mortalidade foi observada em animais KG00562 sobre Def7860, que também expressam *White* truncada em sua prole, reforçando a interpretação de que a mortalidade em KG00562 não está relacionada com a expressão de *White* truncada, mas com alterações na expressão de genes flanqueadores da inserção. De acordo com esta hipótese, estudos de RT-PCR em tempo real em diferentes tecidos confirmaram a ausência de *DmLpinB* e mostraram a superexpressão de *kermit* no intestino (283%) e em túbulos de Malpighi (325%) na linhagem KG00562. A falta de *DmLpinB* parece não contribuir para a letalidade da linhagem KG00562 uma vez que a mortalidade é resgatada aos níveis normais em animais carregando essa inserção sobre a região de inserção (Def7860). Por outro lado, *kermit* está contribuindo para os altos índices de mortalidade de KG00562. Níveis significativamente aumentados desse transcrito são mantidos nos túbulos de Malpighi de animais KG00562 sobre *background* selvagem, onde a mortalidade é alta, enquanto são reduzidos a níveis semelhantes aos do selvagem, em animais KG00562 sobre Def7860, onde a mortalidade é resgatada a níveis normais.

O GENE *BhSGAMP-1*, QUE CODIFICA UM PEPTÍDIO ANTIMICROBIANO, É REGULADO NO DESENVOLVIMENTO NA GLÂNDULA SALIVAR DE *Bradysia hygida* (Diptera, Sciaridae), PELA AÇÃO DIRETA DA 20-OH ECDISONA

Gabriela Morilha Zanarotti

Orientador: Prof. Dr. Jorge Cury de Almeida

Dissertação de Mestrado apresentada em 06/11/2009

Demonstramos, recentemente, que o *BhSGAMP-1* é um gene reiterado, regulado no desenvolvimento, codifica um peptídeo antimicrobiano e é expresso exclusivamente nas glândulas salivares, no final do estágio larval.

Neste trabalho, relatamos, pela primeira vez, que um gene que codifica peptídeo antimicrobiano é diretamente ativado pela 20-OH ecdisona. Este controle provavelmente envolve a participação de repressor(es) de vida curta. Também demonstramos que o promotor do *BhSGAMP-1* não está equipado com elementos de resposta à infecção. Ele não responde, na glândula salivar e no corpo gorduroso, à infecção provocada pela injeção de microorganismos. Foram produzidos anticorpos policlonais contra o peptídeo sintético e foi demonstrado que o peptídeo *BhSGAMP-1* é secretado na saliva. O gene *BhSGAMP-1* também é ativado durante a terceira muda larval. Estes fatos confirmam nossa hipótese de que este sistema preventivo de defesa foi selecionado para proporcionar um ambiente livre de microorganismos perigosos na vizinhança imediata do inseto, durante as mudas.

MIOSINA V EM COMPARTIMENTOS NUCLEARES E CENTROSSOMOS

Claudia Tavares dos Santos

Orientador: Roy Edward Larson

Dissertação de Mestrado apresentada em 27/11/2009

Miosina-Va (MVa) é um motor molecular ativo que gera força e movimento sobre os filamentos de actina e está envolvida no transporte intracelular de organelas e RNA. O anticorpo monoclonal 9E6 (mAb9E6) foi gerado contra um fosfo-peptídeo correspondente ao domínio da cauda globular da MVa que contém serina 1650. Nosso objetivo neste trabalho foi determinar a localização subcelular da MVa em sua forma fosforilada (fosfo-MVa) usando o mAb9E6. Estudos de imunofluorescência evidenciaram a localização de fosfo-MVa no núcleo das células HeLa e B16. A colocalização em células HeLa da fosfo-MVa e o fator de *splicing* SC35, demonstraram a presença da MVa em compartimentos denominados

como *speckles nucleares*, responsáveis pelo processamento de pré-mRNA. Após a inibição da transcrição, fosfo-MVA realocaliza-se para locais perto ou dentro dos nucléolos. Em nucléolos purificados, fosfo-MVA está presente difusamente no nucléolo e colocaliza com nucleofosmina, mas é ausente em Corpos de Cajal. Também foi investigada a distribuição de MvC por *western blots* de extratos de células B16 e S91-6. Nos melanócitos S91-6 há um aumento evidente da cadeia pesada da MvC em comparação com células B16, provavelmente em compensação pela ausência de MVA nessas células. Os estudos de imunofluorescência demonstraram que 9E6 também reconheceu a MvC fosforilada e que MvC colocaliza com α -tubulina em centrosomos e nos polos mitótico. Estes resultados sugerem um envolvimento dos membros da miosina V em compartimentos subcelulares específicos.

CARACTERIZAÇÃO DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A ANTIMONIAIS EM DIFERENTES ESPÉCIES DE *LEISHMANIA*

Wilton Carlos Zanetti Lopes

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Orsini Tosi
Tese de Doutorado apresentada em 30/11/2009

As leishmanioses são responsáveis por significativa morbidade e mortalidade em todo o mundo. Apesar da ampla utilização dos antimoniais no tratamento da leishmaniose, o seu modo de ação ainda é desconhecido. A resistência ao antimonial pentavalente (SbV) é um grande problema em países como Índia e já foi descrita para estes parasitas no Novo Mundo. Apesar da droga de primeira escolha no tratamento da doença ser o (SbV), a forma ativa do metal é a reduzida trivalente (SbIII). Neste estudo foram selecionados mutantes resistentes de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania major* as duas formas do antimonial (SbIII e SbV). Para caracterização dos mecanismos envolvidos, foram investigados neste trabalho eventos como a acumulação intracelular de SbIII, a concentração intracelular de tóxis totais, os níveis do padrão de expressão de diferentes genes e a identificação de proteínas diferencialmente expressas. As linhagens de *L. braziliensis* resistentes ao SbIII apresentaram uma diminuição na captação de SbIII devido possivelmente a expressão diminuída de *AQP1* e a um eficiente mecanismo de extrusão da droga direcionado pela expressão aumentada dos genes *GCS* e *MRPA*. Para as linhagens de *L. braziliensis* resistentes ao SbV pode estar ocorrendo a ativação de SbV devido a expressão aumentada de *ACR2* e um mecanismo ativo de extrusão da droga (expressão aumentada de *MRPA*). Cepas de *L. major* resistentes ao SbIII assim como em *L. braziliensis* apresentaram diminuição da expressão do gene *AQP1*, e expressão aumentada do gene *MRPA* levando a uma conseqüente diminuição no acúmulo de SbIII. Nossas linhagens de *L. major* resistentes ao SbV apresentaram fenótipo de resistência semelhante ao encontrado em linhagens de *L. donovani* naturalmente resistentes isoladas de pacientes caracterizado por uma possível inativação de SbV.

ESTUDO DO PAPEL DO CONTEXTO GENÔMICO NA INTEGRAÇÃO SÍTIO-DIRIGIDA EM SEQUÊNCIAS INTERGÊNICAS DE *LEISHMANIA*

Anderson Mioranza

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Orsini Tosi
Dissertação de Mestrado apresentada em 20/12/2009

Em um trabalho realizado em nosso laboratório, o gene da RPC2 de *L. major* foi alvo de tentativas de ruptura. Os resultados obtidos sugerem que este gene, que codifica a maior subunidade da RNA polimerase III, é essencial para o parasito. A tentativa de ruptura deste gene, que está presente próximo a extremidade telomérica do cromossomo 20 (LmjF20.0010), não elicitaram os eventos comumente descritos de translocação e amplificação. Considerando que as extremidades teloméricas são importantes pontos de regulação da expressão de genes em alguns tripanossomatídeos, investigamos o efeito da integração sítio-dirigida em diferentes extremidades cromossômicas.

Neste trabalho a inserção da marca de seleção SAT, que confere resistência à nourseotricina, foi tentada em protocolos de integração em duas sequências intergênicas, nas extremidades subteloméricas dos cromossomos 20 e 06. Apesar das tentativas, as integrações em loci subteloméricos não foram selecionadas. Nossos resultados de tentativas de ruptura de sequências intergênicas sugerem que a integridade destes loci possa ser mais importante para a homeostase celular do que inicialmente previsto. Ainda que os reagentes pretendidos não tenham sido gerados, o desenvolvimento deste trabalho nos levou a um melhor entendimento da organização genômica em extremidades de cromossomos.

Bioquímica

IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS À UBIQUITINA LIGASE FBXO25

Sami Yokoo

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Damário Gomes
Tese de Doutorado apresentada em 26/10/2009

A proteína FBXO25 é uma das 68 proteínas humanas do tipo F-box que servem como fatores de especificidade para uma família de ubiquitinas ligases compostas por Skp1, Rbx1, Cul1, e uma proteína F-box (SCF1). Proteínas do tipo FBXO possuem um domínio F-box de interação com Skp1 e outro domínio responsável pelo reconhecimento dos seus substratos alvo. Nós demonstramos recentemente que a proteína FBXO25 é capaz de formar um complexo SCF1 ativo o qual se acumula no núcleo celular na forma *dot-like*. A essa nova estrutura nuclear dinâmica nós denominamos FANDs (FBXO25-Associated Nuclear Domains). O objetivo deste estudo foi isolar e caracterizar substratos e cofatores da proteína FBXO25 através do sistema Duplo Híbrido em levedura. Realizamos uma triagem a partir de uma biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano. Um grande número de interações com β -actina foi identificada e confirmada por ensaios de coImunoprecipitação e co-purificação sequencial. Um mapeamento nas proteínas FBXO25 e β -actina revelou que os domínios C e N-terminal, respectivamente, são importantes para que essa interação ocorra. Através de dupla marcação, usando anticorpo anti- β -actina (C4) que reconhece contra uma forma nuclear desta proteína, foi possível observar sobreposição com os FANDs no núcleo de células HeLa. A β -actina nuclear está associada com vários processos celulares, regulando a transcrição, o remodelamento da cromatina e o controle da dinâmica de alguns corpos nucleares. Embora a β -actina pareça modular a dinâmica dos FANDs, os níveis dessa proteína não são alterados pela superexpressão do complexo SCF_{FBXO25}, sugerindo que actina não é um substrato desta E3-ligase, mas sim um modulador de sua atividade.

ANÁLISE DA PARTICIPAÇÃO DOS SISTEMAS RENINA-ANGIOTENSINA E CALICREÍNAS - CININAS NA ATROFIA MUSCULAR: POSSÍVEL PAPEL DO RECEPTOR B1 DE CININAS

Lucas Tabajara Parreiras e Silva

Orientador: Prof.Dr. Cláudio Miguel da Costa Neto
Tese de Doutorado apresentada em 17/11/2009

Os músculos esqueléticos representam cerca de 50% da massa corporal seca e exercem funções vitais como locomoção, respiração, sustentação, além de servirem como fonte de aminoácidos para a gliconeogênese em algumas situações. A massa muscular é controlada por diferentes vias de sinalização, que são reguladas por estímulos hormonais, neurais e nutricionais. Estes, por sua vez, são alterados durante diversas patologias como doença pulmonar obstrutiva crônica, diabetes, AIDS e câncer (caquexia), ou decorrentes, tais como imobilização e envelhecimento (sarcopenia). Como consequência, a proteólise no músculo é aumentada levando à atrofia muscular. O sistema renina-angiotensina (SRA) e o sistema calicreínas-cinina (SCC) são classicamente responsáveis pelo controle da pressão arterial sanguínea e no balanço hidroeletrólítico do sangue, mas também estão envolvidos em outros processos, como na resposta inflamatória e proliferação celular por meio da indução da expressão de citocinas e ativação de vias intracelulares mitogênicas, processos que já foram descritos participar da regulação da proteólise muscular. Nos últimos 5 anos, já foi descrito o envolvimento da angiotensina II na atrofia muscular, mas até o momento a participação do SCC neste processo ainda não foi relatada. Utilizando diferentes estratégias tais como três modelos de atrofia muscular *in vivo*, uso de animais *knockout* para os receptores B1 e B2 de cininas, tratamento de animais com antagonistas dos receptores do SRA e SCC e do tratamento de miotubos de células C2C12 com o agonista do receptor B1, obtivemos evidências de que o SCC pode participar na regulação da proteólise no músculo esquelético.

Clínica Cirúrgica

ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE DOIS MÉTODOS DE DESMAME DA VENTILAÇÃO MECÂNICA INVASIVA EM PACIENTES SUBMETIDOS À CIRURGIA CARDÍACA

Isabela Scali Lourenço

Orientador: Prof.Dr. Alfredo José Rodrigues

Dissertação de Mestrado apresentada em 09/10/2009

Introdução: Desmame é o processo de transição da Ventilação Mecânica Invasiva (VMI) para a ventilação espontânea. Uma vez que se toma a decisão de iniciar o desmame da VMI, outra questão deve ser levada em consideração, é a que indaga acerca da melhor forma de se fazer a transição da VMI para a ventilação espontânea. O objetivo do estudo foi comparar o desmame através da pressão de suporte ventilatório (PSV) e do tubo "T". **Métodos:** Vinte e oito pacientes submetidos à revascularização do miocárdio e cirurgia cardíaca valvar foram aleatoriamente alocados em dois grupos. O primeiro grupo (GPSV), em que os pacientes foram submetidos ao desmame com PSV por 30 minutos e extubados posteriormente; o segundo (GTT), os pacientes foram submetidos a 30 minutos de ventilação espontânea com nebulização com soro fisiológico em oxigênio a 10 litros/minutos e extubados posteriormente. A extubação foi realizada de modo idêntico em ambos os grupos. Todos os pacientes foram avaliados quanto: capacidade vital (CV), permeabilidade das vias aéreas (PF), pressões respiratórias máximas (PE_{máx} e Pl_{máx}), saturação de oxigênio (AsO₂), frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), volume minuto (VM), volume corrente (VC), pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD) e gasometria arterial. As avaliações foram realizadas durante a internação no período pré-operatório, antes do início do desmame, antes da extubação, na 1ª hora e 12ª hora após extubação. Enquanto o paciente estava entubado foram medidos apenas os valores da ventilometria, gasometria arterial, FC, FR, PAS e PAD. **Resultados:** Nenhum paciente foi a óbito e não ocorreu nenhuma complicação infecciosa, cardiovascular ou respiratória. Apenas um paciente do GTT apresentou disfunção renal. No pós operatório, tanto no GPSV como no GTT, os pacientes apresentaram em 43%, algum grau de atelectasia (p=0,979). As Pl_{máx} e PE_{máx} foram estatisticamente significantes quando comparadas entre os grupos. Todos os outros parâmetros de ventilometria, gasometria e hemodinâmicos foram semelhantes entre os grupos. **Conclusão:** Nossos resultados não evidenciaram diferença significativa entre as técnicas de desmame da ventilação mecânica invasiva utilizando do tubo "T" e pressão de suporte ventilatório em pacientes submetidos à revascularização do miocárdio e/ou operações valvares cardíacas.

A INFLUÊNCIA DE TRÊS MODALIDADES DE DERIVAÇÃO BILIODIGESTIVA NA EXCREÇÃO HEPATOBILIAR E NO REPARO DAS LESÕES HEPÁTICAS DE RATOS COM FIBROSE BILIAR SECUNDÁRIA

Rafael Kemp

Orientador: Prof. Dr. José Sebastião dos Santos

Tese de Doutorado apresentada em 23/10/2009

A obstrução biliar extra-hepática crônica pode ser revertida mediante derivação bilioduodenal (DD) ou biliojejunal (DJ). A descompressão da alça exclusiva do Y de Roux através de anastomose duodenojejunal laterolateral (DJD) é uma alternativa proposta para prevenir o refluxo enterobiliar e a estase. O objetivo desse estudo é comparar a influência dessas 3 modalidades de derivação bilioentérica na reparação das lesões hepáticas de ratos com obstrução biliar. Foram utilizados 33 ratos com 15 dias de obstrução biliar divididos em 4 subgrupos: IC (Ictérico), DDpre, DJpre, DJDpre, onde os 3 últimos foram submetidos, respectivamente, à DD, DJ e DJD e avaliados após 2 meses. No grupo controle (CO), 8 animais foram submetidos à operação simulada. Foram mensuradas, no soro, de todos os grupos, as bilirrubinas totais e frações, a fosfatase alcalina (FA) e as aminotransferases (ALT e AST). Verificou-se o peso úmido do fígado e do baço e calculou-se, mediante análise morfométrica do fígado, a massa estimada de hepatócitos, ductos biliares e fibrose. Procedeu-se, por estudo imunohistoquímico do fígado, a contagem das células estreladas. A excreção hepatobiliar foi avaliada mediante estudo cintilográfico com ANT^{99mTcDisida}. Após as 3 modalidades de derivação biliar houve redução significativa das bilirrubinas totais e frações, da AST e da FA. Houve recuperação completa da massa estimada dos componentes histológicos após DJ e DJD, mas no grupo DD a massa estimada de hepatócitos não se restabeleceu em comparação ao grupo CO. Houve aumento significativo das células estreladas hepáticas no grupo IC em relação ao grupo CO. Após DD,

DJ e DJD houve redução significativa do número destas células, sem distinção entre os grupos operados e o CO. No estudo cintilográfico, o T_{max} e T_{1/2} de eliminação do radiofármaco foram atingidos rapidamente nos grupos DD, DJ e DJD, sem diferença significativa entre eles e o grupo CO. D, sem diferença significativa entre eles e o grupo CO. A atividade residual hepática (R_{20/Max}) foi equivalente entre os grupos DD, DJ e DJD e significativamente menor na comparação com o grupo IC. Todavia, no grupo DJD, a R_{20/Max} foi significativamente maior em relação ao CO. A interposição da alça jejunal entre a via biliar e o trânsito intestinal pode retardar o fluxo hepatobiliar, mas não afeta a resolução da colestase e é mais efetiva na reparação das lesões hepáticas.

TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA POR EMISSÃO DE FÓTON ÚNICO EM CRIANÇAS COM EPILEPSIA ASSOCIADA A NEOPLASIA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: IMPLICAÇÕES CLÍNICO-CIRÚRGICAS

Valesio Becker Júnior

Orientador: Prof.Dr. Hélio Rubens Machado

Dissertação de Mestrado apresentada em 23/10/2009

Tumores primários do Sistema Nervoso Central em crianças representam a segunda causa mais frequente de epilepsia refratária. A ressecção do tumor isoladamente é suficiente para o controle da epilepsia somente em metade dos casos. A ressecção adicional da zona epileptogênica pode otimizar o controle da síndrome epiléptica no seguimento pós-cirúrgico. Utilizando o SPECT cerebral crítico, evidenciou-se que a zona epileptogênica pode estar localizada intrinsecamente ou na periferia da neoplasia, dependendo do tipo histopatológico da mesma. Idealmente a área a ser ressecada cirurgicamente deve ser suficiente para controle da doença neoplásica e da síndrome epiléptica e não ocasionar dano neurológico inaceitável, por este motivo é realizada avaliação pré-operatória minuciosa com utilização de imagens do Sistema Nervoso Central como as do SPECT crítico, de Ressonância Magnética e Tomografia Computadorizada. A estas informações pré-operatórias e operatórias, somam-se os resultados histopatológicos e de seguimento pós-operatório que conjuntamente são uma fonte de informações valiosa, podendo auxiliar em melhor delineamento da área a ser ressecada e na predição do prognóstico do paciente. **Objetivos:** Avaliar retrospectivamente a contribuição do SPECT na localização da zona epileptogênica em crianças com epilepsia associada a tumor do Sistema Nervoso Central e investigar fatores preditores de bom e mau prognóstico com relação ao seguimento pós-operatório. **Casuística e métodos:** Estudo retrospectivo de pacientes até 18 anos com diagnóstico de epilepsia e tumor do Sistema Nervoso Central, no período de 1993 a 2006, observando dados clínico-cirúrgicos, dados epidemiológicos, investigação pré-operatória, características de imagens funcionais e anatômicas e características histopatológicas, correlacionando-os com o seguimento pós-operatório utilizando a Classificação de Engel. **Resultados e Discussão:** Entre os pacientes que realizaram o SPECT crítico, observamos que o exame foi capaz de localizar a zona epileptogênica em 91,6% dos casos e foi concordante com a localização neurorradiológica do tumor acima de 90% dos casos. Nossos achados foram concordantes com a literatura: a principal localização de lesão foi em lobo temporal, seguido pelo lobo frontal. Nesta série, todos os casos com evolução desfavorável foram extratemporais. Observou-se evolução favorável (classificação de Engel I e II) após a realização da cirurgia em 75% dos casos. Nesta casuística observamos evolução favorável em 91,6% dos casos submetidos à cirurgia de epilepsia e somente em 58,3% dos casos submetidos à lesionectomia. **Conclusões:** 1) SPECT crítico é uma ferramenta útil na avaliação pré-operatória de crianças com diagnóstico epilepsia associado a tumor do Sistema Nervoso Central, com capacidade de localização da zona epileptogênica acima de 90%. 2) Os fatores preditores de mau prognóstico para epilepsia no pós-operatório foram: insulto prévio ao Sistema Nervoso Central, lesão extratemporal ou extensa e padrão não localizatório e não lateralizatório à Videoeleetroencefalografia pré-operatória. 3) O fator preditor de bom prognóstico para epilepsia no pós-operatório foi a localização da lesão tumoral no lobo temporal.

EFEITO DO CILOSTAZOL E DA PENTOXIFILINA NO DESEMPENHO DA MARCHA DE MEMBROS PÉLVICOS ISQUÊMICOS DE RATOS

Matheus Bredarioli

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eli Piccinato

Dissertação de Mestrado apresentada em 30/10/2009

Contexto: A principal manifestação clínica da doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) é a claudicação intermitente (CI). A dor na CI é causada pela insuficiência de fluxo arterial para manter a demanda metabólica durante o exercício

muscular e melhora com o repouso. A terapia farmacológica permanece como um instrumento importante no tratamento clínico da CI não limitante, pois amplia a distância útil e melhora a qualidade de vida. **Objetivo:** O objetivo deste estudo é avaliar a terapêutica com cilostazol (via oral) e pentoxifilina (via oral) no desempenho da marcha em modelo experimental de isquemia de membros pélvicos de ratos submetidos a teste em esteira computadorizada. **Material e Método:** Foram utilizados 30 ratos que foram divididos em cinco grupos de seis animais cada. Gc, grupo controle (n=6), não submetidos a procedimento cirúrgico; Gi, grupo isquemia (n=6), submetidos à ligadura da artéria ilíaca comum esquerda (AICE); Gpen, grupo pentoxifilina, submetidos à ligadura de AICE (n=6) e tratados com pentoxifilina (3 mg/Kg, v.o); Gcil, grupo cilostazol, submetidos à ligadura de AICE (n=6) e tratados com cilostazol (30 mg/Kg, v.o) e Gs, grupo sham (n=6), submetidos a procedimento cirúrgico simulado (sem ligadura de AICE). Seis semanas após a indução da isquemia foi quantificado para os membros direitos (MD) e esquerdos (ME), em teste na esteira rolante computadorizada, o número de contatos (NC) e a duração total dos contatos (DTC) em 300 segundos. Foi calculado, ainda, o índice de incapacitação do membro esquerdo (IIME) que mensurou o desempenho da marcha para cada animal. **Resultados:** A análise da marcha dos animais demonstra que o NC do ME foi menor que o do MD nos grupos isquêmicos ($p < 0,01$). Não houve diferença no NC entre os membros do mesmo animal nos grupos não isquêmicos. A DTC do ME em relação ao MD não foi diferente estatisticamente nos grupos não isquêmicos. Nos grupos isquêmicos a DTC foi menor no ME do que no MD. Na comparação intergrupos, não há diferença significativa quanto ao NC do ME entre Gcil e Gi ($p = 0,15$); e entre Gi e Gpen ($p = 0,13$). O NC apresentou valores maiores no Gcil em relação ao Gpen ($p < 0,01$). A variável DTC, na comparação intergrupos, não apresentou diferença no ME entre: Gcil e Gc ($p = 0,16$), Gcil e Gs ($p = 0,16$), Gi e Gpen ($p = 0,50$). A DTC foi maior no Gcil que no Gi ($p < 0,01$). O IIME apresentou valores semelhantes entre Gi e Gpen ($p = 0,99$). O valor do IIME foi maior no: Gcil do que no Gi ($p < 0,01$), no Gcil do que no Gpen ($p < 0,01$), no Gc do que no Gi ($p < 0,01$) e no Gc do que no Gpen ($p < 0,01$). O IIME foi menor no: Gcil do que no Gc ($p < 0,01$), no Gcil do que no Gs ($p < 0,01$), no Gi do que no Gs ($p < 0,01$) e no Gpen do que no Gs ($p < 0,01$). **Conclusão:** Conclui-se que, no modelo proposto, o cilostazol promoveu melhora da marcha de ratos submetidos à isquemia crônica do membro pélvico isquêmico em relação à pentoxifilina.

AVALIAÇÃO PELO ECO-DOPPLER DA ESTENOSE CAROTÍDEA TRATADA COM STENT *versus* ENDARTERECTOMIA CONVENCIONAL

Márcia Maria Morales

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eli Piccinato

Tese de Doutorado apresentada em 26/11/2009

Introdução: Na década de 90, vários estudos multicêntricos e randomizados consagraram a endarterectomia de carótida como o padrão-ouro para tratamento de estenoses hemodinamicamente significativas, em pacientes sintomáticos e assintomáticos. Simultaneamente, a angioplastia com stent surgiu como uma opção menos invasiva à endarterectomia e, desde então, diferentes aspectos relacionados às duas modalidades terapêuticas estão sendo estudados. **Objetivos:** Investigar os parâmetros morfológicos e hemodinâmicos de estenoses carotídeas tratadas com stent *versus* endarterectomia, por meio de *eco-Doppler*. **Casuística e Métodos:** 94 casos, com estenoses assintomáticas ($\geq 70\%$) ou sintomáticas ($\geq 50\%$), localizadas na bifurcação carotídea, preencheram os critérios de inclusão neste protocolo; 65 estenoses foram tratadas com endarterectomia e 29 receberam stent. Todas as artérias carótidas foram examinadas com *eco-Doppler* na véspera dos procedimentos e nos pós-operatórios imediato (24h) e tardio (doze meses). O exame incluiu insonação da artéria carótida extracraniana, nos seguintes seguimentos: artéria carótida comum (AGG), artéria carótida interna (AGI) proximal e AGI distal. Tanto parâmetros morfológicos (diâmetro luminal, mm) como hemodinâmicos (velocidade de pico sistólico [VPS, cm/s] e velocidade diastólica final [VDF, cm/s]) foram avaliados. Estenoses residuais e restenoses $\geq 50\%$ foram identificadas em modo B e com Doppler (por uma VPS ≥ 125 cm/s e uma VDF ≥ 40 cm/s). As complicações clínicas, incluindo ataque isquêmico transitório (AIT) e acidente vascular encefálico (AVE), foram registradas no pós-operatório. **Resultados:** No pós-operatório imediato, os dois grupos deste estudo apresentaram aumento significativo ($P < 0,05$) no diâmetro luminal médio da AGI proximal quando comparados ao pré-operatório. Em doze meses de seguimento, o lúmen da AGI proximal aumentou significativamente no grupo stent ($P < 0,05$); porém, no grupo cirúrgico, o diâmetro luminal médio reduziu ($P < 0,05$), dentro da normalidade. Durante todo o período de abrangência deste estudo, a dinâmica das velocidades medidas na AGI proximal mostrou-se similar entre os grupos stent e cirurgia, indicando normalização do fluxo após ambos os tratamentos (VPS média < 125 cm/s e VDF média < 40 cm/s). Nenhuma diferença significativa nas taxas de estenose residual $\geq 50\%$ foi observada entre os grupos stent (10,34%) e endarterectomia (1,53%, $P = 0,08$). Também não foi observada diferença estatística entre as taxas de restenose $\geq 50\%$ obtidas para as duas modalidades de tratamento (6,88% para o stent 3,07% para a endarterectomia; $P = 0,58$). Nesta série, a ocorrência de novos AIT e de AVE foi significativamente maior

no grupo stent, quando comparada ao grupo endarterectomia ($P < 0,05$). **Conclusão:** 1) O stent e a endarterectomia restauraram as velocidades Doppler para valores normais no pós-operatório imediato e em um ano de seguimento, 2) a endarterectomia proporcionou um ganho imediato de diâmetro na AGI proximal, maior, enquanto, o stent atingiu o mesmo diâmetro com doze meses; 3) não houve diferença entre os grupos na incidência de estenose residual e restenose; 4) o grupo stent apresentou maior incidência de eventos neurológicos quando comparado à endarterectomia.

EFEITO DA ALCALINIZAÇÃO SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO

Andrea Carla Celotto

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Barbosa Evora
Tese de Doutorado apresentada em 01/12/2009

O equilíbrio ácido-básico mantém o pH sanguíneo dentro de uma faixa ideal para o funcionamento celular. Entretanto, quando ocorrem distúrbios nesse equilíbrio, como em algumas condições fisiopatológicas, uma série de alterações no funcionamento do organismo acontece, dentre elas a alteração do tônus vascular. Alguns autores mostraram que alcalose pode induzir tanto vasoconstrição quanto vasodilatação. Baseado nessas informações, o objetivo do presente estudo foi investigar o efeito da alcalinização sobre a reatividade da aorta de ratos e os mecanismos envolvidos nessa resposta. Nos estudos de reatividade vascular foram realizadas curvas pH-resposta (7,4 a 8,5) em anéis de aorta com e sem endotélio, pré-contraídos com KCl 45mM ou Phe (10^{-7} M), na presença dos inibidores de: NOS (L-NAME), ciclooxigenase (indometacina), trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ (DMB), da via Ca^{+2} /calmodulina (W-7) e um desarranjador de cavéolas (metil- β -ciclodextrina). Medidas de NO e pH intracelular foram realizadas em célula endotelial isolada e cortes à fresco de aorta estimuladas com NaOH (1M). A partir dos resultados foi verificado que: 1) a alcalinização promoveu relaxamento dependente do pH; 2) esse relaxamento foi totalmente dependente do endotélio; 3) o relaxamento induzido pela alcalinização foi mediado pela ativação da NOS e produção de NO; 4) a ativação da NOS foi mediada pela via de sinalização envolvendo a via Ca^{+2} /calmodulina; 5) o desarranjo das cavéolas reduziu a ativação da NOS e consequentemente produção de NO estimulado pelo aumento do pH; 6) a ativação da NOS e produção de NO depende do influxo de Ca^{+2} mediado pelo trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$; 7) a alcalinização extracelular induzida por NaOH promoveu também alcalinização do meio intracelular quando o pH foi elevado para 8,5.

EFEITOS CAUSADOS POR BREVE E CRESCENTES GRAUS DE PRESSÃO DE DISTENSÃO EM VEIAS SAFENAS HUMANAS UTILIZADAS PARA REVASCULARIZAÇÃO DO MIOCÁRDIO. UM ESTUDO COM ENFOQUE NA MORFOLOGIA E NA REATIVIDADE VASCULAR

Fernanda Viaro Borges

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Barbosa Evora
Tese de Doutorado apresentada em 17/12/2009

Sabe-se que a patência da veia safena humana (VSH) é muito inferior à patência dos enxertos arteriais, utilizados na revascularização do miocárdio. Isto se deve, em parte, ao fato que a parede da veia safena normal tem diferentes características estruturais e funcionais que podem ser afetadas por altas pressões de distensão, tanto na fase de preparação da veia, quanto pela sua inserção no sistema arterial. Nenhum estudo, até o momento, foi realizado em VSH, correlacionando parâmetros funcionais e estruturais com pressões crescentes de distensão, com tempo de distensão, repetição dos estímulos pressóricos (como ocorre na fase de preparação da veia). Essa foi a motivação desse projeto, que teve como objetivo verificar se a pressurização crescente de veias safenas humanas, por breve período, promove alterações bioquímicas, morfológicas, imunohistológicas e da reatividade vascular. Segmentos de VSH foram obtidos de 20 pacientes submetidos a revascularização do miocárdio. A porção distal da VSH foi dividida em 4 segmentos, cada um alocado a um diferente grupo. No grupo I (grupo controle), o segmento de VSH não foi exposto a pressão de distensão. Nos grupos II, III e IV, os segmentos foram expostos a 100, 200 e 300 mmHg de pressão de distensão, respectivamente. A pressão de distensão foi aplicada e mantida com solução de Krebs por 15 segundos. A metodologia investigativa foi composta por: 1) Microscopia de luz de alta resolução; 2) Imunohistoquímica das isoformas da óxido nítrico sintase, CD34 e nitrotirosina; 3) Dosagem tecidual de nitrito/nitrato (NO_x) na VSH, determinada por quimioluminescência; 4) Avaliação da peroxidação lipídica pela determinação do malondialdeído tecidual, como expressão do estresse oxidativo e 5) Estudo *in vitro* da reatividade vascular da VSH, em câmaras de órgãos. Os principais achados experimentais da presente investigação foram: 1) A microscopia de luz de alta resolução revelou grande área de endotélio desnudo, redução das pregas íntimas e tendência

a aumento do perímetro e diâmetro interno das veias do grupo pressurizado com 300 mmHg; 2) A imunohistoquímica, mostrou que a partir da pressurização com 200 mmHg, já se observa uma tendência à diminuição da marcação do CD34, tornando-se estatisticamente significativa para a pressurização com 300 mmHg. A marcação da eNOS na camada endotelial da VSH foi significativamente menor no grupo pressurizado com 300 mmHg. A marcação da eNOS na musculatura lisa foi equivalente à marcação endotelial, mas não sofreu o efeito da pressurização. Houve marcação significativa da nNOS, tanto no endotélio, quanto na musculatura lisa, não afetada pela pressão de distensão. Não houve marcação significativa da iNOS no endotélio, porém a musculatura lisa apresentou marcação dessa enzima, não afetada pela pressão de distensão. A marcação da nitrotirosina não foi relevante, aparecendo fracamente no endotélio de 7 pacientes, sendo completamente ausente nos outros 13 pacientes; 3) Níveis teciduais normais de nitrito/nitrato (NOx) nas veias de todos os grupos estudados; 4) O MDA tecidual não apresentou alterações em relação ao grupo controle; 5) Não houve comprometimento da contratilidade e dos relaxamentos estudados *in vitro* com auxílio de organ chamber. Portanto, concluiu-se que são necessários cuidados ao manusear a VSH, uma vez que apenas alguns segundos de pressão de distensão acima da pressão sistêmica normal, podem ser suficientes para lesar, estruturalmente, o endotélio e comprometer a qualidade do enxerto.

Clínica Médica

CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE UM PROGRAMA DE EDUCAÇÃO NUTRICIONAL PARA MULHERES HIPERTENSAS

Giseli Cristina Galati

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosa Wanda Diez-Garcia

Dissertação de Mestrado apresentada em 08/10/2009

A Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) é uma doença crônica de alto de risco cardiovascular responsável por grande número de morbidade e mortalidade. Em particular no Brasil, as mulheres são mais atingidas do que os homens, o que torna necessárias ações específicas voltadas a esse grupo. Sabe-se que estratégias de controle e prevenção, como mudanças do estilo de vida e de práticas alimentares, são o foco primário e coadjuvante no tratamento e prevenção. Nesse contexto a utilização de estratégias que promovam mudanças para promoção da saúde e adoção de práticas alimentares mais saudáveis torna-se necessárias para que os fatores de riscos associados à HAS possam ser reduzidos. A seleção de técnicas de trabalhos educativos em grupo pode auxiliar nesse processo, tornando-se necessário o desenvolvimento e avaliação de intervenções educativas que fujam de orientações tradicionais pautadas em prescrições. O presente trabalho objetivou construir e avaliar o impacto de um programa de educação nutricional, tratado aqui pelo nome Groen - Grupo Operativo em Educação Nutricional. Foi constituído de dois grupos: um controle (GC) e um intervenção (GI) e sua construção foi baseada na Técnica de Grupo Operativo. Seu impacto foi monitorado em um período de três meses em dois tempos T1 e T2 sobre parâmetros pressóricos, bioquímicos, antropométricos, composição corporal e no consumo alimentar, e os resultados foram comparados entre os grupos em relação ao T2 e nas diferenças encontradas. O GROEN iniciou com vinte e seis mulheres (n=26) e finalizou com quinze (n=15) ou 57,6%. Todos os encontros aconteceram em nove sessões com duração de uma hora e trinta minutos em que eram revistos valores e práticas referentes à alimentação e cuidados com a saúde, e dificuldades relacionadas a mudanças nas práticas por meio de atividades, dinâmicas, instrumentos e tarefas que buscavam exercitar alimentação e saúde no presente. O planejamento e desenvolvimento do GROEN foram etapas fundamentais para a descoberta de estratégias que possam ser utilizadas em atividades de grupo e que promovam a reflexão acerca dos problemas levantados sendo que, a sua construção buscou a todo o momento atender às necessidades do grupo de participantes focalizando em seus temas a resolução coletiva de problemas voltada para mudanças de atitudes referentes às práticas alimentares e estilo de vida. A comparação das diferenças das variáveis e indicadores entre os GC e GI apresentou significância estatística ($p < 0,05$) para circunferência do quadril, gordura corporal, HDL e consumo de vegetais. Pode-se concluir que o GROEN promoveu impacto positivo na redução de risco cardiovascular associado à HAS observado na perda peso, melhora nos níveis pressóricos de PAS, redução de circunferências, redução de gordura corporal e melhora no consumo alimentar, sendo que esse foi melhor quando comparamos com os resultados obtidos no GC. Portanto atividades de educação nutricional em grupo quando bem planejadas embasadas em referenciais apropriados, que auxiliam na resolução de problemas coletivos podem ser uma alternativa no tratamento nutricional de doenças crônicas.

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO, CLONAGEM E EXPRESSÃO DE GENES DE FATORES DE CRESCIMENTO CELULAR A PARTIR DE UM BANCO DE cDNA DE FÍGADO FETAL HUMANO

Maria Fernanda de Castro Amarante

Orientador: Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas

Tese de Doutorado apresentada em 08/10/2009

As células-tronco hematopoéticas (CTHs) habitam diferentes nichos durante o desenvolvimento do organismo. O fígado fetal é considerado o principal sítio da hematopoese entre a sexta e a 24ª semana de gestação, período caracterizado pela alta expansão das CTHs (Yu et al, 2009). A possibilidade de expandir as CTHs na presença de citocinas recombinantes surgiu com a necessidade de acelerar a enxertia pós-transplante em pacientes com câncer. Sabe-se que *in vivo* as CTHs podem se dividir sem perder as capacidades de renovação e diferenciação, mantendo seu potencial por toda a vida do indivíduo (Till et al, 1964). No entanto, ainda não se conhece todos os fatores necessários para que isso ocorra, nem se seria possível reproduzir os estímulos do microambiente do nicho *in vitro*. Este trabalho tem como objetivo identificar, clonar e expressar proteínas do fígado fetal importantes para o desenvolvimento das CTHs *in vitro*. O RNA mensageiro foi extraído de fígado fetal de 24 semanas de gestação. A partir deste material, foi construído um banco de cDNA e os genes foram avaliados com o auxílio da ferramenta *Generic Est Annotation Pipeline* (GEAP). A ontologia dos genes foi analisada utilizando as ferramentas disponíveis no site ([Http://babelomics.bioinfo.cipf.es/](http://babelomics.bioinfo.cipf.es/)). Os genes da hemangiopoetina (HAPO) e da vitronectina (VN) foram amplificados a partir do RNA do fígado fetal e clonados no sistema TOPO®. Em seguida, foram ligados ao vetor de expressão pEGFP-N1 e expressos em sistema eucarioto (SK-HEP-1) utilizando a técnica de transfecção por lipofectamina. As análises para a detecção dos transcritos e da proteína recombinante foram realizadas por meio das técnicas de PCR convencional (primers específicos para os genes da VN e da HAPO), PCR quantitativo (qPCR) utilizando o reagente *Power SYBR PCR Master Mix*, espectrometria de massa (MALDI TOF/TOF) e microscopia confocal (anticorpos secundários marcados Alexa-fluor® 488 para detecção da VN e com isotiocianato de fluoresceína-FITC para detecção da HAPO), 48 h após a transfecção e por citometria de fluxo após a seleção com geneticina (G418). Alguns genes isolados deste banco estão relacionados a processos importantes para a manutenção das CTHs *in vitro*, tais como proliferação, resposta a estímulos externos e endógenos, adesão e comunicação celular. Estes genes são componentes da matriz extracelular (MEC), como por exemplo, a vitronectina (VN), o nidogeno 1 (NID1) e a fibronectina 1 (FN1), componentes intracelulares como a fosfatase de especificidade dupla (DUSP6), a macroglobulina α -2 (A2M) e o hemogeno (EDAG) ou componentes da membrana celular como a estomatina (STOM) e o receptor de adiponectina 1 (ADIPOR 1). Além disso, os transcritos descritos acima estão relacionados com a atividade dos fatores de transcrição NF- κ B, Myc e Smad-3, os quais têm participação no desenvolvimento das CTHs. A análise das sequências dos genes isolados neste estudo comprovou que o gene da VN (267 pb) tem 99% de identidade com o gene da vitronectina humana (NM_000638). A análise demonstrou também a presença da sequência referente ao peptídeo sinal e que o provável peso molecular da VN recombinante (VN_{np}) é de 10,5 KDa. O outro gene isolado (HAPO) possui os exons 1,2 e parte do exon 3 da variante C do gene da proteoglicana 4 (PRG4) (NM_001127710). O gene da HAPO recombinante (HAPO_{np}) não apresenta o peptídeo sinal e tem um peso molecular de 35 KDa. Ambos os genes possuem as sequências que codificam os domínios somatomedina B e hemopexina. A presença dos transcritos da VN e da HAPO foi diretamente detectada por PCR e por qPCR, que detectou uma alta concentração dos transcritos em fusão com o gene da GFP proveniente do vetor plasmidial. A presença das proteínas VN_{np} e HAPO_{np} foi indiretamente citometria de fluxo. A GFP foi detectada em 42,76% e 21,09% das células SK-HEP-1 transfectadas com as construções [pEGFP-N1 + VN] e [pEGFP-N1 + HAPO], respectivamente. Além disso, a análise da banda de 35 KDa recortada do gel SDS-PAGE em espectrômetro de massa demonstrou a presença do íon equivalente a GFP a partir do sobrenadante do cultivo das células SK-HEP-1 transfectadas com a construção [pEGFP-N1 + VN]. As análises em microscópio confocal demonstraram a presença de fluorescência emitida pelas células transfectadas com as construções [pEGFP-N1 + VN] e [pEGFP-N1 + HAPO]. Entretanto, a fluorescência observada nas células marcadas com os anticorpos primário e secundário não confirma a presença das proteínas VN_{np} e HAPO_{np}, uma vez que a fluorescência emitida pela GFP e pelos fluoróforos Alexa-fluor® 488 e FITC estavam sobrepostas. Este estudo demonstrou que o fígado fetal humano é um ambiente rico em genes que atuam direta ou indiretamente no comportamento de células hematopoéticas maduras e primitivas. Este trabalho mostrou também que as células SK-HEP-1 produzem eficientemente o RNA mensageiro dos genes alvo em fusão com o gene da GFP e sugere, pela identificação da GFP, que as proteínas VN_{np} e HAPO_{np} foram expressas pelas células SK-HEP-1 transfectadas com as construções [pEGFP-N1 + VN] e [pEGFP-N1 + HAPO] por Lipossomos.

DIFERENÇAS NEURO-HISTOQUÍMICAS DA PELE COM E SEM ALTERAÇÕES DE SENSIBILIDADE NA HANSENÍASE

Sâmara Cassimiro Soares

Orientador: Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade

Dissertação de Mestrado apresentada em 23/10/2009

A hanseníase ainda é considerada um problema de saúde pública nos países em desenvolvimento. O M leprae tem predileção para viver nos macrófagos e células de Schwann o que leva ao dano neural. O estudo dos processos imunológicos e sua relação com as alterações de sensibilidade torna-se fundamental para o entendimento dos mecanismos envolvidos na apresentação e no desenvolvimento da doença. O objetivo do estudo foi avaliar as diferenças neuro-imunohistopatológicas da pele com e sem alteração de sensibilidade desencadeada pela hanseníase. Foram selecionados aleatoriamente 6 pacientes paucibacilares (PB) e 6 multibacilares (MB), os quais foram submetidos à biópsia de pele de áreas com alterações de sensibilidade [Lesada (L)] e sem alterações de sensibilidade [Não Lesada (NL)], que foram coradas por H&E, Fite-Faraco e à imuno-histoquímica para os anticorpos anti-S100, NGF (*Neural Growth Factor*), IL-12, TGF β -1, IFN γ , IL-10, IL-4, além do anticorpo específico anti-PGL-1. As lâminas imuno-histoquímicas foram fotografadas padronizadamente para captura de 3 imagens por anticorpo testado, tiradas das regiões de infiltrado inflamatório (aumento de 400x, tamanho 192x968 pixels) que foram submetidas à análise de imagem pelo *software Imagem* utilizando-se os *plugins averaging filter*, *colour deconvolution* para hematoxilina-DAB e *threshold* para cálculo do percentual de marcação em DAB. A partir desses resultados foram calculadas as médias percentuais para cada anticorpo das respectivas lâminas dos pacientes. A amostra populacional apresentou média de idade de 52,5 anos, sendo a média de 58 anos para PB e 48,6 anos MB, sendo 10 do sexo masculino e 2 feminino. Entre os pacientes do grupo PB (3T, 3DT) e nos MB (1V, 1DD e 4 DV). A dosagem sérica de anti-PGL1 apresentou média de 2,9 mg/dL entre os PB e 4,5 mg/dL nos MB. Em relação à proteína S100, sua expressão foi maior nas amostras de pele n (L) dos pacientes PB ($p=0,008$). O fator de crescimento neural (NGF) apresentou-se fortemente expresso nas áreas de lesão dos PB, diferente estatisticamente das áreas não lesadas ($p<0,01$) e das áreas L dos MB ($p<0,01$). Quanto à citocina IFN γ , houve maior expressão nas áreas lesadas de PB diferente significativamente das áreas lesadas dos MB ($p=0,03$). Em conclusão, observou-se que a pele SEM ALTERAÇÃO DE SENSIBILIDADE dos pacientes com hanseníase paucibacilares apresentou aspecto imuno-histopatológico semelhante à normal, enquanto, a dos multibacilares apresentou alterações histopatológicas e imunológicas significativas quanto à maior expressão do TGF- β 1 e IL-12, associada à baixa expressão de IFN γ . Por outro lado, a pele COM ALTERAÇÕES DE SENSIBILIDADE dos paucibacilares expressaram menos proteína S-100 acompanhada de um desarranjo morfológico nos trajetos neurais, enquanto na pele dos multibacilares houve maior expressão, porém dispersa e intra-histiocitária morfológicamente. O NGF pareceu estar diretamente relacionado à resposta celular *in situ* gerada pela agressão neural, sendo máxima na pele com alterações de sensibilidade dos paucibacilares e mínima dos multibacilares, destacando o NGF como importante marcador *in situ* entre os pacientes paucibacilares com suspeita clínica de hanseníase.

SILENCIAMENTO DA EXPRESSÃO DE GENES ESTRUTURAIS DO HTLV-1 UTILIZANDO A TÉCNICA DE RNA DE INTERFERÊNCIA

Rodrigo Haddad

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Zago

Tese de Doutorado apresentada em 27/10/2009

O vírus linfotrófico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) é um retrovírus oncogênico que está etiológicamente associado à duas manifestações clínicas principais: uma doença hematológica aguda denominada leucemia de células T do adulto (ATLL) e uma doença neurodegenerativa denominada mielopatia associada ao HTLV-1/ paraparesia espástica tropical (HAM/TSP). Estima-se que entre 15 e 20 milhões de pessoas estejam infectadas pelo vírus em todo o mundo e o tratamento das doenças associadas ao HTLV-1 é restrito ao tratamento dos sintomas. Análogos de nucleosídeos, interferons, quimioterapia, transplante alogênico de células-tronco entre outros são utilizados como estratégias de tratamento, mas com benefícios em curto prazo e em alguns casos a média de sobrevivência continua baixa. Após a descoberta da tecnologia do RNA de interferência (RNAi), vários estudos foram conduzidos utilizando esta nova técnica, especialmente no campo da oncologia e da virologia. Esta técnica permite a inibição da expressão de genes através da degradação dos RNAs mensageiros específicos pelos siRNAs logo após o processo de transcrição. Assim, o objetivo deste trabalho foi utilizar

a tecnologia do RNAi para inibir a expressão de genes que codificam as proteínas estruturais Gag e Env do HTLV-1. Após a construção de vetores capazes de expressar as proteínas estruturais em fusão com uma proteína repórter (EGFP), estes foram co-transfectados em células da linhagem HEK 293 juntamente com os siRNAs. Vetores que expressam shRNAs também foram co-transfectados com os vetores de expressão repórteres na mesma linhagem. Células MT-2 foram transduzidas com retrovírus capazes de expressar shRNAs contra os genes gag e env. Foi observada a inibição da expressão dos genes gag e env em diferentes níveis quando foi utilizado siRNAs nas células HEK 293. Observou-se o mesmo efeito quando foram utilizados os vetores que expressam shRNAs na mesma linhagem celular. As células MT-2 mostraram uma pequena diminuição da expressão dos genes alvo quando transduzidas com retrovírus que expressam shRNAs. A utilização do RNAi como ferramenta para diminuir a expressão dos genes que codificam as proteínas estruturais Gag e Env do HTLV-1 foi efetiva, e pode ajudar no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos assim como no estudo da função biológica dessas proteínas.

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NO TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA ALOGÊNICO EXPERIMENTAL

Jorge Luiz Curado Siufi

Orientador: Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas

Tese de Doutorado apresentada em 28/10/2009

A doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) é uma complicação mediada por células T que ocorre nos transplantes de medula óssea (TMO) devido à incompatibilidade no MHC (*Major Histocompatibility Complex*) entre doador-receptor. A presença da DECH diminui a eficácia dos transplantes e as técnicas atuais de profilaxia e tratamento da doença não são eficientes, principalmente nos casos graves da doença. Uma possibilidade para a profilaxia e tratamento da DECH é a utilização de células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas da medula óssea e expandidas *in vitro*. As CTMs são células que possuem capacidade de auto-renovação e diferenciação em tipos celulares específicos como osteócitos, adipócitos e miócitos, entre outros. As CTMs possuem importante potencial regulador dos tipos celulares envolvidos na resposta imunológica e aparentemente não são aloreativas, pois não expressam moléculas de MHC classe-II e moléculas co-estimulatórias da resposta imune. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial profilático e terapêutico das CTMs no TMO alogênico experimental. Para isto, camundongos da linhagem C57BL/6 foram utilizados como doadores de medula óssea, esplenócitos e CTMs, e camundongos das linhagens Balb/c e FVB GFP+ foram utilizados como receptores dos transplantes. As análises de sobrevivência mostraram que todos os camundongos Balb/c e FVB GFP+ dos grupos Controle Irradiado, TMOa e TMOa+Espl morreram dentro do período de 30 dias depois de realizados os procedimentos de irradiação e/ou transplantes. Enquanto isto, todos os camundongos dos grupos TMO singênicos sobreviveram por longo período após os transplantes. O grupo de camundongos induzidos à DECH de intensidade grave que recebeu prevenção com CTMs (TMOa+Espl+CTMs) apresentou certa redução na incidência e no acometimento da DECH. Apesar de todos os camundongos Balb/c morrerem precocemente devido à ausência de reconstituição medular ou devido à incidência da doença, 38,5% dos camundongos FVB do grupo TMOa+Espl+CTMs viveram por longo período de tempo. Os camundongos induzidos à DECH de intensidade leve que receberam CTMs (TMOa+CTMs) foram os que apresentaram os melhores resultados quanto à prevenção da doença. Desta vez, 28,6% dos camundongos Balb/c e todos os camundongos FVB GFP+ (100%) sobreviveram por longo período de tempo após os transplantes alogênicos. As análises histológicas dos órgãos dos camundongos mostraram que os grupos que receberam CTMs (TMOa+CTMs e TMOa+Espl+CTMs) apresentaram achados histopatológicos menos conspícuos do que os camundongos dos grupos que não receberam CTMs (TMOa e TMOa+Espl). Conseqüentemente, as alterações físicas observadas nos camundongos também mostraram maior comprometimento dos indivíduos dos grupos que não receberam prevenção com CTMs. A análise *in vivo* dos fatores solúveis presentes no soro dos camundongos mostrou a desregulação do perfil das citocinas no microambiente da DECH, observado nos camundongos dos grupos TMOa e TMOa+Espl. Todavia, este perfil das citocinas foi encontrado menos desregulado, sendo que as citocinas pró-inflamatórias e de subtipo TH1/TH2 estudadas foram encontradas em menores concentrações nos grupos que receberam CTMs (TMOa+CTMs e TMOa+Espl+CTMs). Por fim, os camundongos FVB dos grupos TMOa+CTMs e TMOa+Espl+CTMs que sobreviveram por longo período de tempo, voltaram a apresentar sintomas clínicos tardios da doença, atingindo o óbito dias depois. As análises histológicas mostraram que os camundongos apresentavam hiperplasia linfocitária no baço e intestino delgado, e acometimento grave do fígado indicando presença da doença em fase crônica. As CTMs são importantes componentes celulares que além de beneficiar a reconstituição medular pós-transplante, pode ser candidatas ao tratamento e prevenção da DECH aguda.

EXERCÍCIO AERÓBICO AGUDO EM IDOSOS COMUNITÁRIOS DE UMA ÁREA URBANA DE RIBEIRÃO PRETO

Leandra Gonçalves Lima

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nereida Kilza da Costa Lima
Dissertação de Mestrado apresentada em 30/10/2009

Estudos demonstraram que uma única sessão de exercício realizado em cicloergômetros e esteiras ergométricas causam redução da pressão arterial (PA) pós-exercício. Contudo, não existem estudos semelhantes com exercícios tipo caminhada em pista. Como a principal modalidade de exercício disponível para os idosos no Brasil é a caminhada, investigaram-se os efeitos imediatos (primeira hora pós-exercício) e tardios (24 horas pós-exercício) na PA de idosos comunitários independentes que representam uma região da cidade de Ribeirão Preto. O estudo alocou uma amostra da população constituída por indivíduos nascidos entre 1929 e 1944, cadastrados nos Núcleos de Saúde da Família da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto -USP, e aleatorizados para a obtenção final de 100 indivíduos. Dentre estes, 23 foram incluídos e concluíram o estudo. Os voluntários foram aleatorizados para iniciar com a sessão de exercício (SE) ou de repouso (controle) (SR), realizando a outra sessão após uma semana. O actígrafo foi instalado 48 horas antes, permanecendo por cinco dias. A SE foi executada em pista, com intensidade moderada e duração de 40 minutos. Durante 20 minutos antes e 60 minutos após cada sessão, a pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) foram medidas a cada cinco minutos pelos métodos auscultatório e oscilométrico. A monitorização ambulatorial da pressão arterial de 24 horas foi iniciada 75 minutos após o término das sessões. A análise estatística foi realizada utilizando-se o modelo linear de efeitos mistos, o teste de McNemar, o coeficiente de concordância St. Laurent e o coeficiente de correlação de Pearson. A idade média foi de $67,7 \pm 3,5$ anos, com 11 idosos hipertensos tratados (HT) e 12 idosos normotensos (NT). Os resultados evidenciaram queda imediata e tardia nas PAS e PAD pelos métodos auscultatório e oscilométrico, após a SE, na amostra total (AT) e nos grupos juntamente com a PAD vigília, foram significativamente reduzidas na AT ($p < 0,01$) e nos grupos HT e NT ($p < 0,01$), após a SE, enquanto que a PAD não exibiu queda apenas para o grupo NT. A FC aumentou após a SE e reduziu após a SR na AT e nos grupos HT e NT ($p < 0,01$). As PAS na vigília e sono e PAD na vigília apresentaram valores menores após SE do que após SR ($p < 0,01$), quando avaliadas pelo padrão horário variável, obtido com o uso do actígrafo, em relação ao padrão horário fixo, o qual presume que o provável período de sono seria entre 23 e 7 horas. Na comparação dos dois dias precedentes à realização da SE com o período de dois dias subsequentes, não houve reduções nas médias de atividades espontâneas ($p > 0,05$). Concluímos que uma única sessão de exercício aeróbio, tipo caminhada, mostrou-se eficaz na redução imediata e tardia da PAS e da PAD em idosos. A utilização do actígrafo para determinar o real período de sono mostrou-se mais eficaz em detectar a queda pressórica do que o método de horários fixos. Não houve interferência da SE na atividade espontânea habitual dos indivíduos.

ESTUDO DO POTENCIAL ANTIGÊNICO RELATIVO DOS ANTÍGENOS DE GRUPOS SANGUÍNEOS MENORES EM PACIENTES SOB ESQUEMA DE TRANSFUÇÃO

Ana Paula Costa Nunes da Cunha Cozac

Orientador: Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas
Tese de Doutorado apresentada em 03/11/2009

Apesar de as transfusões de sangue salvarem vidas, riscos inerentes ao procedimento existem como o da aloimunização eritrocitária sendo este decorrente da disparidade antigênica entre doador e receptor. Ela pode ocorrer em consequência da transfusão de concentrado de hemácias, de plaquetas e, menos frequentemente, da transfusão de plasma. Tais anticorpos podem causar importantes reações transfusionais hemolíticas, evento este considerado a segunda causa de morte relacionada à transfusão de acordo com o relatado ao Food and Drug Administration (FDA) (FDA, 2008). O cálculo do potencial antigênico relativo dos antígenos de grupos sanguíneos menores, possibilita em última análise o estabelecimento de protocolos transfusionais que visem reduzir a taxa de aloimunização anti-eritrocitária. Segundo Giblett, para se calcular o potencial antigênico relativo de um determinado antígeno são necessárias informações quanto às frequências dos anticorpos específicos e dos fenótipos em uma dada população, comparando este potencial àquele do antígeno "K". Dado ao parco conhecimento sobre a aloimunização eritrocitária de grupos sanguíneos menores, estudos devem ser realizados para o maior entendimento do tema possibilitando, conseqüentemente, o estabelecimento de protocolos transfusionais adequados uma vez que é crescente o número de indicações transfusionais, assim como, o

período transfusional dos pacientes hematológicos e oncológicos devido a uma maior sobrevivência destes em decorrência da evolução das terapias de suporte. Os objetivos principais do presente estudo foram o de determinar o potencial antigênico relativo dos antígenos de grupos sanguíneos menores além de avaliar fatores relacionados à aloimunização eritrocitária. Para tal, foram levantados os perfis fenotípicos de 10.493 doadores de sangue e de 722 pacientes portadores de doenças variadas, sob esquema de transfusão, alguns destes genotipados quando a realização da fenotipagem era inviabilizada. Em paralelo foi levantada a aloimunização dos referidos pacientes. O índice total de aloimunização foi de 24,37%. Associação de anticorpos ocorreu em 65,34% dos casos. O anticorpo mais prevalente foi o anti-E (20,53%). O grupo de maior prevalência da aloimunização foi o de talassêmicos com 61,33% de pacientes aloimunizados. O segundo em índice de aloimunização foi o grupo de portadores de síndrome mielodisplásica (43,40%) seguido pelos portadores de doença falciforme (40,74%). Houve uma relação direta entre número de transfusões de concentrado de hemácias e tempo de transfusão em dias e índice de aloimunização ($p < 0,0001$). Pacientes com início transfusional mais precoce apresentaram menor índice de aloimunização ($p < 0,05$). A escala de imunogenicidade encontrado diferiu da descrita na literatura ($K > Kp^A > C^W > Di^a > E > C > c > Fy^a > S > e > Jk^a > Jk^b > S > Fy^b$). Diante dos resultados encontrados podemos concluir que os altos índices de aloimunização relacionam-se a determinadas doenças de base e os novos dados relativos ao potencial antigênico relativo de antígenos de grupos sanguíneos menores possibilitaram o estabelecimento de novos protocolos transfusionais para pacientes sob esquema transfusional.

INFLUÊNCIA DA ALIMENTAÇÃO E DA SUPLENÇÃO CONTENDO FERRO E ZINCO NA COMPOSIÇÃO DO LEITE MATERNO

Rutinéia de Fátima Micheletto

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Dutra de Oliveira
Dissertação de Mestrado apresentada em 12/11/2009

O leite materno exclusivo é o alimento ideal para a nutrição da criança até os seis meses de idade e é aconselhado manter a amamentação até os dois anos. Vários fatores podem influenciar a composição do leite materno, dentre eles, a ingestão de alimentos e a suplementação da lactante. Estudos demonstram que os nutrientes ferro e zinco no leite materno sofrem modificações, em outros concluíram que existem mecanismos que controla a transferência desses nutrientes na glândula mamária. O objetivo do presente estudo foi verificar a influência da alimentação e de um suplemento contendo ferro e zinco na composição do leite materno. Foram selecionadas lactantes adultas do 15º ao 60º dia de lactação. Um grupo de 20 lactantes recebeu suplemento polivitamínico e polimineral contendo 60mg de ferro e 25mg de zinco; e também foi analisada a alimentação por registro alimentar de 24h. Em outro grupo, com 17 lactantes, foi quantificada somente a alimentação. Foram coletadas amostras de sangue e de leite materno antes e após cinco dias de estudo, sendo que as amostras de leite foram coletadas antes e após cinco minutos de amamentação. As amostras foram analisadas por espectrofotometria de absorção atômica e a ingestão alimentar de ferro e zinco pelo *software DietProfessional*®. Para análise estatística dos resultados foi utilizado o modelo de regressão linear com efeitos mistos e auxílio do *software SAS*® 9.0. A quantidade de ferro e zinco ingerida somente pela alimentação não influenciou a concentração destes no leite materno. Os níveis sanguíneos também não tiveram relação com a quantidade de ferro e zinco no leite materno nos grupos não suplementados e nos suplementados. O leite materno apresentou maior concentração de ferro e zinco antes da amamentação, quando comparado ao coletado após cinco minutos de amamentação. Foi verificada uma correlação positiva, $p=0,16$, na razão entre a concentração final e inicial de ferro no grupo suplementado; já no grupo não suplementado foi encontrada uma correlação negativa, $p=-0,35$, em relação ao período da lactação. A suplementação garantiu menor decréscimo do ferro e do zinco ao longo do tempo, $p=-0,02$. A relação entre ferro e zinco foi inversamente proporcional no grupo suplementado. Já no grupo não suplementado, essa relação foi diretamente proporcional, porém a maioria das razões estavam abaixo de um.

CORRELAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO GENE $\beta 2GPI$ COM ANTICORPOS ANTI- $\beta 2GPI$ E CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DA $B2GPI$ NA HANSENÍASE

Maria José Franco Brochado

Orientadora: Profª. Drª. Ana Maria Ferreira Roselino
Tese de Doutorado apresentada em 13/11/2009

A hanseníase, causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae*, afeta principalmente a pele e os nervos periféricos. Durante a evolução da doença podem ocorrer estados reacionais, denominados: reação tipo 1 e reação tipo 2 (eritema

nodoso hansênico - ENH). Fenômenos tromboembólicos (FTE) têm sido associados ao uso da talidomida e ou corticóides prescritos para o ENH. Na hanseníase, especialmente na classificação operacional multibacilar (MB), anticorpos antifosfolípidos (AAF), tais como anticorpos anti- β 2glicoproteína I (β 2GPI), podem estar presentes, configurando a síndrome do anticorpo antifosfolípide (SAF) quando associados a FTE. Neste estudo caso-controle os polimorfismos Ser88Asn, Ile122Thr, Arg135His, Ala141Asp, Leu247Val, Cis306Gli e Trp316Ser do gene β 2GPI foram determinados, assim como os títulos de anticorpos anti- β 2GPI e a concentração plasmática da β 2GPI em amostras de pacientes MB (incluídos sete pacientes com a associação hanseníase e SAF, e dois pacientes com fenômeno de Lúcio) e de pacientes paucibacilares (PB). 42% do grupo MB e 17% do grupo PB apresentaram anticorpos anti- β 2GPI IgM. Houve correlação positiva dos títulos de anticorpos anti- β 2GPI IgM com anticorpos anti-PGL1. No grupo de pacientes que apresentaram ENH no decurso da doença, observou-se títulos menores de anticorpos anti- β 2GPI IgM entre pacientes em reação e em uso de talidomida, comparados àqueles que não estavam em reação no momento da coleta da amostra de sangue. Pacientes MB apresentaram níveis plasmáticos de β 2GPI diminuídos, comparados aos PB. Frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos Ser88Asn, Ala141Asp, Cis306Gli e Trp316Ser foram similares nos grupos hanseníase e controle. Para os polimorfismos Ile122Thr e Arg135His, observou-se diminuição da frequência alélica Thr e His no grupo hanseníase. Em relação à distribuição genotípica do polimorfismo Leu247Val houve aumento da frequência dos genótipos Leu/Leu e Val/Val no grupo hanseníase, e de Leu/Val no grupo controle. Pacientes com hanseníase e com anticorpos anti- β 2GPI IgM acima do cut off apresentaram frequência maior dos alelos Thr, His e Ser dos polimorfismos Ile122Thr e Arg135His e Trp316Ser, respectivamente. Com relação ao polimorfismo Leu247Val, pacientes MB com anticorpos anti- β 2GPI IgM acima do cut off apresentaram frequência aumentada dos genótipos Val/Val e Leu/Leu. Os sete polimorfismos estudados não influenciaram a concentração plasmática da β 2GPI nos grupos MB e PB. Foram construídos 9 haplótipos. O haplótipo 7 (88Ser-122Thr-135His-141Asp-247Val-306Cis-316Trp) esteve menos prevalente, enquanto que o haplótipo 4 (88Ser-122Ile-135Arg-141Asp-247Val-306Cis-316Trp) foi mais prevalente no grupo hanseníase. O grupo MB associado aos haplótipos 1 (88Ser-122Ile-135Arg-141Asp-247Leu-306Cis-316Trp) ou 4 apresentou maiores títulos de anticorpos anti- β 2GPI IgM se comparados aos do grupo PB. O haplótipo 4 diferenciou os grupos MB e PB com relação à concentração plasmática de β 2GPI. Os sete casos descritos de hanseníase MB e SAF apresentaram os genótipos Leu/Val ou Val/Val do polimorfismo Leu247Val do gene β 2GPI e o haplótipo 4. Nossos dados sugerem que os polimorfismos Leu247Val e Trp316Ser e o haplótipo 4 podem representar fatores de risco para a produção de anticorpos anti- β 2GPI, os quais se correlacionam à SAF em pacientes com hanseníase MB.

CARACTERIZAÇÃO CLÍNICO-LABORATORIAL E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE LINFÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO COMO MARCADORES PREDITIVOS DE GRAVIDADE E DA RESPOSTA TERAPÊUTICA EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATÓIDE

Renê Donizeti Ribeiro de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Paulo Louzada Jr.

Tese de Doutorado apresentada em 26/11/2009

Os eventos envolvidos na patogênese da artrite reumatóide (AR) ainda permanecem obscuros, mas certamente sua etiologia é multifatorial. O epitopo compartilhado (Shared epitope - SE) do HLA-DRB1 é o fator de risco genético mais importante. Fatores de risco ambientais são menos entendidos. O tabagismo é um candidato, associado ao surgimento de anticorpos contra peptídeos citrulinados (anti-CCP). Anti-CCP são altamente específicos para AR. Além disso, pacientes com doença agressiva têm pior prognóstico, e, frequentemente falham em responder às terapias padrão. Predizer quem será respondedor a determinada terapia torna-se essencial para prevenir a perda funcional. Neste estudo, investigamos se a associação entre a produção de anti-CCP e o tabagismo foi influenciada pelo estado de portador do SE e, após estratificar os indivíduos em grupos, avaliamos suas respostas aos bloqueadores do TNF α . A fim de identificar marcadores e mecanismos de resistência e resposta aos bloqueadores do TNF α , estudamos as células mononucleares do sangue periférico (*Peripheral Blood Mononuclear Cells* - PBMC) antes e após iniciar a terapia anti-TNF α . Cem pacientes de AR foram questionados sobre tabagismo. Para todos eles, foram obtidas amostras de sangue para tipagem HLA e quantificação de anti-CCP. Quarenta e dois indivíduos eram tabagistas e 58 não-tabagistas. a SE esteve presente em 61 pacientes e o anti-CCP foi positivo em 71. Encontramos que, entre os tabagistas, 25 eram SE positivo, 20 apresentavam anti-CCP positivo e 5 com anti-CCP negativo, e 17 eram SE negativo, 12 apresentavam anti-CCP positivo e 5 apresentavam anti-CCP negativo (OR 4,0, IC 95% 1,10 a 14,50). Esses resultados sugerem que fatores ambientais contribuem para o surgimento de anti-CCP em indivíduos com carga genética de susceptibilidade para AR, sendo o tabagismo um forte candidato. Dezesesseis pacientes necessitaram de terapia com bloqueadores do TNF α . Para eles, obtivemos PBMC em duas ocasiões, antes e depois de

20 semanas de tratamento anti-TNF α . RNA total foi extraído e copiado em cDNA. Sondas de cDNA marcadas com fluoresceína Cy3 foram hibridadas com microarray de cDNA. RNA irrelevante foi marcado com Cy5 e usado como referência. A expressão gênica diferencial foi analisada pelo método SAM (FDR \leq 5%). O *28-joint-count Disease Activity Score* (DAS28) foi usado para classificar os indivíduos em respondedores e não-respondedores, de acordo com os critérios de resposta do EULAR. Depois de 20 semanas, a evolução clínica classificou 8 pacientes como respondedores e 8 pacientes como não-respondedores. A análise de microarray revelou genes relacionados com resposta inflamatória, crescimento celular, proliferação celular, aderência e migração e, especialmente, apoptose. Encontramos alguns genes que podem ser marcadores de resposta, bem como estar envolvidos em mecanismos moleculares de resposta ao anti-TNF α em indivíduos com AR.

ANÁLISE PROTEÔMICA DAS SUBPOPULAÇÕES CD73+ DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ADULTAS E FETAIS E DOS PERICITOS HEPÁTICOS

Glauce Gaspar Gomes

Orientador: Prof. Dr. Lewis Joel Greene

Tese de Doutorado apresentada em 30/11/2009

As Células-Tronco Mesenquimais (CTMs) são células multipotentes que estão presentes em uma variedade de tecidos adultos e fetais, sendo sua associação com os vasos sanguíneos uma explicação para a sua ampla distribuição pelo organismo humano. Estas células possuem potenciais de diferenciação e uma complexa interação celular com células-tronco hematopoéticas (CTHs) e células endoteliais (CEs). Além disso, compartilham propriedades funcionais e perfil de expressão gênica com células que se encontram na parede dos microcapilares sanguíneos distribuídos por todo o organismo os chamados pericitos, que também conhecidos como células periendothelias e estão intimamente relacionados com as CTMs. Quando ativados durante a lesão, os pericitos adquirem várias características de CTMs. A identificação dos mecanismos moleculares compartilhados por essas células, bem como as diferenças podem ter um impacto significativo em terapias celulares. O objetivo do presente estudo foi identificar semelhanças e diferenças proteômicas nas subpopulações CD73+ de CTMs (adultas e fetais) e dos pericitos hepáticos através das metodologias 2D-DIGE e LC-MS/MS. As CTMs foram isoladas da medula óssea (MO) de indivíduos adultos através da aderência ao plástico da fração mononuclear; de fígados fetais (FF) com idade gestacional entre 18-32 semanas pelo tratamento com colagenase tipo 1 e os pericitos hepáticos (PH) (provenientes da linhagem celular LX2). As amostras de CTMs (adultas e fetais) e os pericitos hepáticos foram purificados de culturas em terceira passagem por seleção positiva (FACS) baseada na molécula CD73. As células purificadas foram expandidas, caracterizadas morfológicamente, imunofenotipicamente e quanto à capacidade de diferenciação celular. As proteínas das amostras foram extraídas em tampão de extração em 3 ciclos de sonicação, vortex e gelo. Os extratos proteicos foram quantificados pelo método de Bradford. Utilizamos a abordagem proteômica 2D-DIGE, marcando os extratos com CyDyes e as proteínas diferencialmente expressas foram analisadas por espectrometria de massas MALDI-TOF-TOF. Pela metodologia LC-MS/MS os extratos foram marcados com isótopos de acrilamida estáveis (leve e pesado). Quantidades iguais dos extratos de proteínas das CTMs-FF e PH e CTMs-MO e PHs foram misturados para a análise proteômica quantitativa. As amostras foram fracionadas por SDS-PAGE e cada slice do gel foi cortado em 9 frações, para posterior identificação e quantificação das proteínas por espectrometria de massa. Pela metodologia 2D-DIGE foram identificadas 23 proteínas diferencialmente expressas e por LC-MS/MS 2938 proteínas, sendo identificados 1832, 1770 e 2322 proteínas de CTMs-MO, MSC-FF e PHs, respectivamente. Destes, 1227 proteínas foram quantificados com base na marcação com isótopos de acrilamida. A grande maioria das proteínas (>80%) não apresentaram diferença na abundância superior a 2 vezes entre as CTMs e PHs. Cerca de 211 proteínas foram detectadas acima de 2 vezes ao comparar CTMs-FF vs PHs e CTMs-MO vs PHs. Dentre estas proteínas foi possível identificar as funções moleculares associados com os tipos de células específicas, tais como o metabolismo lipídico para os PHs e angiogênese e transição epitelial mesenquimal para as CTMs. A análise proteômica foi capaz de identificar um subconjunto de proteínas que podem ser usadas para distinguir as CTMs adultas e fetais dos PHs. Estas proteínas poderão ser utilizadas como marcadores para uma comparação mais detalhada dessas células, bem como contribuir para a elucidação dos mecanismos biológicos específicos que são relevantes para PHs e CTMs.

Farmacologia

EFEITO DE HAPLÓTIPOS DA SINTASE ENDOTELIAL DO ÓXIDO NÍTRICO (NO) SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE MARCADORES DE BIODISPONIBILIDADE DE NO EM NEGROS

Ingrid Ferreira Metzger

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

Tese de Doutorado apresentada em 13/10/2009

O óxido nítrico (NO) desempenha um importante papel no aparelho cardiovascular. Entretanto alguns estudos encontraram diferenças na biodisponibilidade de NO entre grupos étnicos. Existem diferenças nas frequências haplotípicas quando comparados indivíduos brancos e negros. O haplótipo "C 4b Glu" do gene da eNOS foi associado à baixas concentrações plasmáticas de NOx em voluntários brancos saudáveis, não sendo conhecido os efeitos sobre o nitrito assim como a influência da raça. Estudamos dois grupos homogêneos voluntários, 142 brancos e 198 negros, (homens, não fumantes, 18-60 anos de idade e que não estivessem tomando medicamentos). Comparamos o efeito dos haplótipos, envolvendo três polimorfismos relevantes da eNOS (T⁻⁷⁸⁶C, 4a4b Intron 4 e Glu298Asp) sobre os I níveis de nitrito em voluntários brancos e negros. O DNA genômico foi isolado para a realização das genotipagens. Os genótipos dos polimorfismos T⁻⁷⁸⁶C e Glu298Asp foram determinados por PCR-RFIP (voluntários brancos) ou através do método TaqMan (Taqman® Allele Oiscrimination assay) (voluntários negros). A determinação de nitrato e nitrito circulantes foi realizada por quimiluminescência (NO Analyser). As concentrações de GMPc e MDA (estresse oxidativo) foram determinadas por ELISA e ensaio fluorométrico, respectivamente. As frequências dos haplótipos foram estimadas com uso do programa PHASE 2.1 e "Estimating Haplotype" (EH). Não foram encontradas diferenças quanto idade, índice de massa corpóreo, pressão arterial sistólica e diastólica, frequência cardíaca ou nitrito entre os grupos de genótipos para os três polimorfismos estudados (todos p>0.05). Nos voluntários brancos encontramos uma correlação positiva entre nitrito e GMPc plasmático (p=0,017, rs=0,270). Interessante mente, assim como para o NOx em voluntários brancos saudáveis, o haplótipo "C 4b Glu" foi associado com baixas concentrações de nitrito nos voluntários brancos e negros. Não foram observadas diferenças significativas estatisticamente nos demais haplótipos. Esses dados sugerem que um haplótipo específico resultante da combinação de variantes do gene da eNOS modula a formação de NO independentemente da raça.

PAPEL DA HEMOPEXINA NA PATOGÊNESE DA SEPSE E DA ALFA-1 GLICOPROTEÍNA ÁCIDA NA SUSCEPTIBILIDADE DE CAMUNDONGOS DIABÉTICOS A SEPSE

Fernando Spiller

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha

Tese de Doutorado apresentada em 25/11/2009

A falência da migração de neutrófilos para o foco infeccioso está associada com um mau prognóstico na sepse. De maneira similar, defeitos nas interações entre neutrófilos e células endoteliais contribuem para o aumento da susceptibilidade a infecções em outras doenças como a diabetes mellitus. As proteínas de fase aguda alfa-1-glicoproteína ácida (AGP) e hemopexina (Hx) podem mediar esses processos. O objetivo deste estudo foi determinar o papel da Hx na patogênese da sepse. Além disso, investigar o envolvimento da AGP na susceptibilidade de camundongos diabéticos a infecção polimicrobiana. Nossos resultados mostraram que Hx inibiu a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal e aumentou a taxa de mortalidade nos camundongos submetidos à sepse não grave por ligação e perfuração do ceco (CLP). Em contraste aos camundongos selvagens, camundongos deficientes para Hx submetidos à sepse grave tiveram uma eficiente migração de neutrófilos para o foco infeccioso. Como consequência, esses animais tiveram baixos níveis de bacteremia e alta taxa de sobrevivência. *In vitro*, Hx incubada com neutrófilos inibiu a resposta quimiotática induzida por C5a ou MIP-2 e induziu uma redução na expressão de CXCR2 e CD62L assim como aumento na expressão de CD11b. Em outra etapa deste trabalho, nós mostramos que camundongos diabéticos foram altamente susceptíveis a sepse devido à redução da migração de neutrófilos para o foco infeccioso, o que resultou em inibição da depuração bacteriana no local da infecção, bacteremia e elevada resposta inflamatória sistêmica. Ademais, em contraste aos camundongos não diabéticos, animais diabéticos submetidos à sepse não grave tiveram redução do rolamento, adesão e quimiotaxia dos neutrófilos, a qual foi acompanhada de redução na expressão de CD62L e CXCR2, e aumento na expressão de CD11b e GRK2. Camundongos diabéticos submetidos à sepse não grave também tiveram aumento nos níveis hepáticos do RNAm para AGP assim como

aumento nos níveis séricos dessa proteína. O tratamento com insulina nos camundongos diabéticos diminuiu a taxa de mortalidade por prevenir a falência da migração de neutrófilos. Além disso, esse tratamento preveniu a diminuição da expressão do CXCR2 mediada pela GRK2 bem como inibiu a geração da AGP. Por fim, a administração de AGP aboliu os efeitos da insulina nos animais diabéticos. Os resultados apresentados demonstram um papel crucial da Hx na progressão da sepse experimental e sugere que a inibição terapêutica da Hx nas primeiras horas da sepse pode aumentar a migração de neutrófilos para o foco infeccioso, e como consequência, aumentar a taxa de sobrevivência. Na segunda parte do trabalho, nossos resultados sugerem que a AGP pode ser um fator chave na falência da migração de neutrófilos em camundongos diabéticos, fenômeno estreitamente relacionado à susceptibilidade dos camundongos a infecções.

EFETOS DA ESPIRONOLACTONA E DA HIDROCLOROTIAZIDA SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E SOBRE A METALOPROTEINASE-2 DA MATRIZ EXTRACELULAR NA HIPERTENSÃO RENOVASCULAR

Carla Speroni Ceron

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos
Dissertação de Mestrado apresentada em 04/12/2009

O aumento do estresse oxidativo e da atividade das metaloproteinases contribui para as alterações vasculares estruturais e funcionais presentes na hipertensão renovascular. O objetivo desse trabalho foi verificar se o tratamento com espironolactona, hidroclorotiazida, ou ambas as drogas modificam as alterações presentes no modelo dois-rins, um-clipe de hipertensão renovascular na pressão arterial, incluindo-se remodelamento da aorta, alterações de reatividade vascular, estresse oxidativo e níveis e atividade da metaloproteinase-2 da matriz extracelular (MMP-2). Animais controles operados ou ratos submetidos à estenose da artéria renal foram tratados com o veículo, espironolactona (25 mg.kg⁻¹.dia⁻¹), hidroclorotiazida (20 mg.kg⁻¹.dia⁻¹), ou a combinação dos dois medicamentos para oito semanas. A pressão arterial sistólica foi monitorada semanalmente por pleitismografia de cauda. Anéis de aorta foram isolados para avaliar o relaxamento vascular dependente e independente do endotélio. A análise morfológica da parede da aorta foi realizada em coloração de hematoxilina/eosina. Foram avaliados a produção do ânion superóxido na aorta pela β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase vascular, a peroxidação lipídica plasmática, medida como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, os níveis e atividade de MMP-2 determinados por zimografia em gel e fluorimetria em extrato de aorta, imuno-histoquímica e zimografia situ. O tratamento com espironolactona, hidroclorotiazida, ou a combinação das drogas atenuou a hipertensão arterial, reverteu a disfunção endotelial, atenuou o remodelamento vascular da aorta, assim como o aumento no estresse oxidativo, e reduziu os níveis e a atividade da MMP-2 induzidos pela hipertensão. Estes resultados sugerem que a espironolactona e hidroclorotiazida, isoladamente ou em combinação, produzem efeitos antioxidantes e diminuem o aumento da atividade da MMP-2, melhorando assim a disfunção vascular e remodelamento encontrados nesse modelo de hipertensão renovascular.

EFETOS DE ANTIDEPRESSIVOS SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL DO HIPOCAMPO DE RATOS SUBMETIDOS AO MODELO DO NADO FORÇADO: POSSÍVEL ENVOLVIMENTO DO ESTRESSE OXIDATIVO

Frederico Rogério Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães
Tese de Doutorado apresentada em 07/12/2009

Aproximadamente 30% dos pacientes que sofrem de transtorno depressivo maior (MDD) não respondem aos atuais tratamentos farmacológicos. Além disso, 40% a 60% dos pacientes responsivos apresentam recorrência de sintomas com 4 a 6 meses após o término do tratamento medicamentoso. Assim, a investigação dos mecanismos moleculares responsáveis pelo MDD e o desenvolvimento de novas terapias ainda são necessários. A administração sistêmica ou intra-hipocampal de inibidor da sintase neuronal de óxido nítrico (NO) reduz a imobilidade em roedores submetidos ao modelo do nado forçado (FST), um modelo animal preditivo para atividade antidepressiva. **Objetivos:** O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos do tratamento crônico com 7-nitroindazole (7NI), um inibidor da sintase neuronal de NO, ou imipramina, um prototípico antidepressivo, sobre a expressão gênica e proteica no hipocampo de ratos *Wistar* submetidos ao FST. Um experimento adicional foi realizado com o objetivo de investigar a hipótese de que os efeitos terapêuticos dos antidepressivos estão relacionados a mecanismos antioxidantes. N-acetil-L-cisteína (NAC), a cisteína pró-droga com potente efeito antioxidante, foi testada no modelo do FST.

Métodos: Os animais receberam diariamente injeções i.p. de 7NI (60 mg/kg), imipramina (15mg/kg) ou veículo (DMSO:salina 1:1) por 14 dias. O FST foi realizado 1h após a última injeção. Dois grupos controles adicionais receberam veículo ou 7NI, mas não foram submetidos ao FST. Duas horas depois do FST foram obtidos extratos totais de RNAm/proteína do hipocampo para análise seriada de genes expressos (SAGE) e Análise proteômica. Em experimento adicional ratos *Wistar* (n=4-7/grupo) foram submetidos a 15 min de nado forçado, e receberam injeções i.p. de NAC (5, 15, 50, 150 e 250 mg/kg) ou salina, imediatamente após, 5 h depois, e 1 h antes da sessão teste. Durante os 5 min de teste a imobilidade foi registrada. Grupos independentes de animais (n=5-7/grupo) receberam o mesmo tratamento e sua atividade exploratória no campo aberto foi avaliada por 5 min. **Resultados:** A partir do sequenciamento de 60.471, 61.390 e 60.450 etiquetas de genes entre os grupos tratados com veículo, 7NI ou imipramina e submetidos ao FST, respectivamente, e 61.272 e 62.031 etiquetas de genes para os animais tratados com veículo ou 7NI sem o estresse do FST, foi possível identificar e quantificar a expressão de 26.406, 26.256, 19.270, 19.072 e 24.936 genes no hipocampo dos animais destes grupos, respectivamente. A análise de agrupamento hierárquico, o qual agrupou os animais em estressados e não estressados, sugeriu um efeito predominante do estresse sobre o padrão de expressão gênica hipocampal. A análise de enriquecimento funcional para as bibliotecas proteicas e genômicas mostrou que houve uma modulação significativa de genes associadas à fosforilação oxidativa (29 genes, $P = 2,68-11$), apoptose e/ou proliferação sinalizada por receptores 5-HT1A (20 genes, $P = 2,6-8$) e remodelagem de citoesqueleto por sinalização Rho-GTPase e de neurofilamentos (11 genes, $P = 3,45-7$; 11 genes, $P = 7,9-7$), quando comparados o grupo veículo não estressado com o grupo veículo-FST. Importantes genes nestas vias foram modulados como o NADH desidrogenase (NADH), succinato desidrogenase (SBH), citocrome c oxidase (COX), ATP sintase (ATP), e genes envolvidos com as vias G(i)PKB-N-κB-PARP-1, G(i)JAK2-STAT3 e, G(i)AC-PP2A-Bcl2/BAX, assim como as vias RhoA-LIMK2-Actin, com provável efeito sobre processos ligados a neuroplasticidade e controle apoptótico. A análise de enriquecimento de funções celulares para os genes diferentemente expressos entre o grupo veículo, estressado e os grupos tratados com 7NI ou imipramina e submetidos ao FST indicou que o tratamento farmacológico reverteu parte dos efeitos do estresse comportamental sobre a expressão de genes ligados aos processos de fosforilação oxidativa e remodelagem sináptica, sendo que os efeitos positivos do 7NI sobre processos ligados à neuroplasticidade e reorganização sináptica são governados pela facilitação de vias sinalizadas por calmodulina-CREB (9 genes, $P = 1.247-05$), com a modulação dos genes Calmodulina, PP2A e cAnál de cálcio tipo II, enquanto a imipramina atua preferencialmente sobre genes ligados ao controle de transcrição gênica por heterocromatina (11 genes, $P = 5,25-6$), modulando a expressão de genes como histona deacetilase classe II e histonas H. No teste comportamental o NAC (nas doses de 15, 50, e 150 mg/kg) e imipramina reduziram significativamente [$F(6,35)=6,86$; $P<0,001$; Duncan post-hoc test $P<0,05$] o tempo de imobilidade sem interferir na atividade exploratória medida no campo aberto. **Conclusão:** O efeito tipo antidepressivo das drogas 7NI e imipramina pode estar associado à modulação de grupos importantes de genes hipocampais que atuam na redução dos efeitos do estresse comportamental, incluindo genes relacionados a estresse oxidativo e/ou metabólico bem como aqueles envolvidos em mecanismos neuroplásticos e neuroestruturais nessa estrutura. O efeito do tipo antidepressivo do NAC corrobora esta hipótese.

MECANISMOS ENVOLVIDOS NO DESENVOLVIMENTO DA ARTRITE: PARTICIPAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO NOD2/RIPK2/Caspase-1

Silvio Manfredo Vieira

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha
Tese de Doutorado apresentada em 10/12/2009

NOD2 (domínio de oligomerização vinculado ao nucleotídeo, membro 2) é uma proteína, também conhecida como família de domínio de recrutamento de caspase, membro 15 (CARD15), que desempenha um papel importante no sistema imunológico. O NOD2 pode contribuir para a iniciação, amplificação e progressão da resposta inflamatória em doenças reumáticas através do reconhecimento de agentes patogênicos, produtos de células danificadas ou metabólitos endógenos encontrados nas articulações artríticas. Neste estudo nós demonstramos que o NOD2, o RIPK2 e a caspase-1, mas não NOD1, estão envolvidos na patogênese da artrite auto-imune e colaboram na regulação da produção de citocinas pró-inflamatórias. Nós investigamos a participação do NOD1, NOD2, RIPK2 e caspase-1 na progressão da artrite induzida em camundongos. O desenvolvimento da artrite nos camundongos foi dependente da ativação do NOD2, RIPK2 e caspase-1 pelo antígeno, pois os camundongos deficientes para estas moléculas não desenvolveram a artrite. A avaliação clínica e histopatológica dos camundongos NOD2^{-/-}, RIPK2^{-/-} e caspase-1^{-/-} mostrou que estes animais eram resistentes ao desenvolvimento da artrite, caracterizada por uma redução no recrutamento de neutrófilos, na hipernocicepção e na perda de cartilagem. Nossos resultados mostram que a expressão do mRNA de NOD2, RIPK2 e IL-1β e a ativação de caspase-1 estão

elevados em células mononucleares de pacientes com artrite reumatóide (AR) em comparação a pacientes com osteoartrite (OA). Estes resultados sugerem fortemente que a sinalização via NOD2, mas não NOD1, desempenha um papel fundamental na patogênese da AR. Além disso, RIPK2/caspase-1 parece ser a jusante de sinalização de NOD2 na inflamação das articulações e pode favorecer uma resposta imune T_H 17. Os resultados levam a propor a sinalização do NOD2 como um novo alvo para o desenvolvimento de novos medicamentos para controlar a AR.

EFEITOS DA INJEÇÃO INTRACEREBRAL DE ANTAGONISTAS DE RECEPTORES MUSCARÍNICOS, SEROTONINÉRGICOS E OPIÓIDES NO NÚCLEO PRETECTAL ANTERIOR SOBRE A ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DOS CÓRTICES OCCIPITAL E RETROESPLÊNIO EM MODELO DE NOCICEPÇÃO PERSISTENTE

Ana Carolina Rossaneis

Orientador: Prof. Dr. Wiliam Alves do Prado

Dissertação Mestrado apresentada em 11/12/2009

Neste estudo investigamos os neurotransmissores envolvidos na conexão entre o córtex occipital ou retroesplênio e o núcleo prepectal anterior (NPA) na modulação da nocicepção persistente em ratos. Avaliamos o efeito da microinjeção de antagonistas (colinérgico muscarínico, serotoninérgico e opióide) no NPA sobre o efeito anti-hiperalgésico da estimulação elétrica cortical. Utilizamos ratos com implante crônico de eletrodo unipolar no córtex occipital ou retroesplênio e de cânula-guia no NPA. Sete dias mais tarde os animais foram submetidos à incisão na pata traseira direita e o limiar de retirada de para foi medido com auxílio de algesímetro mecânico. Atropina, metisergida ou naloxona no NPA diminuiu significativamente o limiar de retirada da pata ipsilateral (IL). O efeito antinociceptivo da estimulação elétrica do córtex occipital não foi alterado por nenhum dos antagonistas. O efeito antinociceptivo da estimulação elétrica do córtex retroesplênio também não foi alterado pela administração prévia de atropina no NPA. Entretanto, metisergida ou naloxona no NPA diminuiu significativamente a intensidade e a duração do efeito antinociceptivo da estimulação elétrica do córtex retroesplênio. Os resultados apresentados sugerem o envolvimento de receptores serotoninérgicos e opióides do NPA na modulação da nocicepção persistente exercida pelo córtex retroesplênio. Entretanto, esses receptores do NPA parecem não estarem envolvidos na via antinociceptiva ativada a partir do córtex occipital.

EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS DA SALIVA DE *Lutzomyia longipalpis* E DE SUA PROTEÍNA LJM 111 EM MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE

Renata Grespan

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha

Tese de Doutorado apresentada em 14/12/2009

No presente estudo, nós investigamos a atividade anti-inflamatória da saliva de *Lutzomyia longipalpis*, flebotômíneo do Novo Mundo, em modelo experimental de artrite. Além disso, avaliamos os mecanismos e identificamos os constituintes salivares envolvidos nessa atividade. O extrato de glândula salivar (EGS) de *L. longipalpis* inibiu a migração de neutrófilos, a hipernocicepção inflamatória e a lesão articular em animais com artrite. Ainda, o EGS reduziu a expressão de MHC-II e da molécula coestimulatória CD-86 em células dendríticas e inibiu a produção de mediadores inflamatórios em cultura de linfócitos. Ademais, nós demonstramos que o EGS também foi capaz de interferir com a locomoção dos neutrófilos, sugerindo ser por aumentar a expressão de GRK-2 e internalizar o receptor CXCR2.

Devido ao fato de a saliva de *L. longipalpis* ter diversos componentes, é essencial conhecer quais os componentes presentes no EGS são os responsáveis pelo seu efeito anti-inflamatório. Deste modo, em colaboração com os laboratórios do prof. Dr. Jesus G. Valenzuela e Dr. José Marcos Ribeiro (National Institute of Health - NIH) que clonaram os genes responsáveis pela síntese das proteínas presentes na saliva (Valenzuela et al., 2004), nosso próximo passo foi investigar quais os componentes presentes na saliva poderiam ser os responsáveis pela atividade anti-inflamatória observada. Nós identificamos a proteína LJM 111, presente no EGS, como responsável em inibir a migração de neutrófilos, a hipernocicepção inflamatória, a expressão de MHC-II e da molécula coestimulatória CD-86 em células dendríticas e inibir a produção de mediadores inflamatórios em cultura de linfócitos. Entretanto, observamos que a proteína LJM 111 não atua diretamente no neutrófilo, por não interferir com os níveis de CXCR2 e GRK-2. Deste modo, sugerindo que outro componente presente na saliva possa contribuir com estes efeitos. Por fim, os resultados obtidos sugerem que a proteína LJM 111 possa ser um protótipo para o desenvolvimento de uma futura abordagem terapêutica em doenças inflamatórias, como a artrite reumatóide.

ENVOLVIMENTO DA NEUROTRANSMISSÃO NORADRENÉRGICA DO NÚCLEO LEITO DA ESTRIA TERMINAL NA MODULAÇÃO DO SISTEMA CARDIOVASCULAR EM RATOS

Carlos Cesar Crestani

Orientador: Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Corrêa
Tese de Doutorado apresentada em 16/12/2009

O núcleo leito da estria terminal (NLET) é uma estrutura telencefálica envolvida no controle do sistema cardiovascular. Em um estudo prévio, nós demonstramos pela primeira vez que a microinjeção de noradrenalina (NA) no NLET desencadeia aumento na pressão arterial (PA), no qual é mediado pela liberação sistêmica de vasopressina. No presente estudo, nós observamos que o pré-tratamento do NLET com crescentes doses do WB4101, antagonista seletivo de adrenoceptores α_1 , ou do RX821002, antagonista seletivo de adrenoceptores α_2 , parcialmente reduziram as respostas cardiovasculares observadas após a microinjeção de NA no NLET. A resposta da NA foi completamente bloqueada somente após o pré-tratamento do NLET com a combinação do WB4101+RX821002. A administração desta combinação também deslocou a curva dose-efeito para a esquerda, claramente mostrando uma potencialização do efeito do tratamento combinado com os antagonistas de adrenoceptores α_1 e α_2 . Estes dados evidenciam uma interação entre a ativação de adrenoceptores α_1 e α_2 no NLET na mediação das respostas da NA. Nós também observamos que o pré-tratamento do NLET com propranolol, antagonista não-seletivo de adrenoceptores β , ou CGP20712, antagonista seletivo de adrenoceptores β_1 , aumentou em 60% as respostas cardiovasculares observadas após microinjeção de NA no NLET, sugerindo que a ativação de adrenoceptores β_1 no NLET podem modular de maneira inibitória as respostas cardiovasculares desencadeadas pela ativação dos adrenoceptores α_1 e α_2 . Nós também investigamos o envolvimento dos núcleos hipotalâmicos paraventricular (NPV) e supraóptico (NSO) nas respostas cardiovasculares à microinjeção de NA no NLET. Nós observamos que o pré-tratamento do NSO com CoCl_2 , inibidor não-seletivo de sinapses, não afetou as respostas cardiovasculares da NA. Entretanto, tratamento do NPV com CoCl_2 bloqueou a resposta pressora desencadeada pela microinjeção de NA no NLET, sugerindo que a liberação de vasopressina em resposta à NA no NLET é mediada pela ativação de neurônios magnocelulares no NPV. Ainda, o pré-tratamento do NPV com NBQX, antagonista seletivo de receptores glutamatérgicos não-NMDA, também bloqueou as respostas cardiovasculares causadas pela administração NA no NLET, sugerindo que a ativação desses receptores no NPV está envolvida nas respostas cardiovasculares da NA no NLET. Foi estudado o envolvimento da neurotransmissão noradrenérgica do NLET na modulação da resposta bradicárdica do barorreflexo. Microinjeção bilateral no NLET do WB4101 causou um aumento no ganho da resposta bradicárdica reflexa decorrente de aumentos da pressão arterial induzida pela infusão intravenosa de fenilefrina, sugerindo que a ativação de adrenoceptores α_1 no NLET tem uma influência inibitória sobre a resposta bradicárdica do barorreflexo. Microinjeção bilateral no NLET do RX821002 ou de propranolol não afetou a atividade do barorreflexo. Além disso, administração do WB4101 em animais tratados intravenosamente com metilbrometo de homatropina, antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos, não afetou a resposta bradicárdica reflexa, sugerindo que adrenoceptores α_1 no NLET controla a atividade do barorreflexo através de uma modulação do componente parassimpático do baroreflexo. Por fim, investigamos o envolvimento do NLET nas respostas cardiovasculares observadas durante exercício físico dinâmico em uma esteira para roedores. Foi observado que a administração bilateral de CoCl_2 no NLET reduziu a resposta pressora e taquicárdica desencadeada pelo exercício físico dinâmico. Estes dados sugerem uma influência facilitatória do NLET sobre as respostas cardiovasculares observadas durante o exercício físico dinâmico.

PAPEL DA NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA E NITRÉRGICA DO NÚCLEO PARA VENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO NA MODULAÇÃO CARDIOVASCULAR EM RATOS

Cristiane Busnardo

Orientador: Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Corrêa.
Tese de Doutorado apresentada em 16/12/2009

O núcleo paraventricular do hipotálamo (NPV) é um importante centro integrador de respostas autonômicas e neuroendócrinas. O NPV é um complexo núcleo composto por neurônios magnocelulares que secretam vasopressina, um potente agente vasoconstritor, e por neurônios parvocelulares pré-autonômicos que se conectam com núcleos autonômicos do tronco cerebral e da medula espinhal, os quais são responsáveis pelo controle neural do tônus cardiovascular. Vários trabalhos sugerem a existência de um balanço entre mecanismos glutamatérgicos e nitrérgicos na regulação cardiovascular. No presente estudo nós relatamos os efeitos cardiovasculares à microinjeção de glutamato (L-glu) no NPV bem

como os mecanismos envolvidos na sua mediação. Doses crescentes de L-glu no NPV causaram respostas pressoras e taquicárdicas de maneira dose-dependente em ratos não anestesiados, apresentando uma DE50 de aproximadamente 10nmol/100nL. Estas respostas foram bloqueadas pelo pré-tratamento intravenoso (i.v.) com o bloqueador ganglionar, pentolínio (PE, 5 mg/Kg), sugerindo a mediação simpática destas respostas. As respostas ao L-glu não foram afetados pela microinjeção local de antagonista seletivo dos receptores não-NMDA, o 1, 2, 3,4-tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxo-benzo(f)quinoxaline-7-sulfonamide (NBQX, 2 nmol/100nL) ou pela microinjeção local de antagonista seletivo do receptor NMDA, o LY235959 (LY, 2 nmol/100nL). Contudo, a resposta de taquicardia foi invertida para resposta de bradicardia após o tratamento com LY, sugerindo que os receptores NMDA estão envolvidos na resposta taquicárdica causada pela microinjeção de L-glu no NPV. O pré-tratamento local com LY associado com pré-tratamento sistêmico com PE ou dTir (CH2) 5 (Me) AVP (dTir, 5 µg/kg) respectivamente, potencializou ou bloqueou a resposta ao L-glu, sugerindo que as respostas ao L-glu observadas após LY são mediados pela liberação sistêmica de vasopressina. As respostas pressora e bradicárdica observadas após LY+PE foram bloqueados pelo subsequente tratamento i.v. com o dTir, antagonista dos receptores V1 de vasopressina, sugerindo mediação vasopressinérgica. As respostas pressora e bradicárdica à microinjeção de L-glu no NPV observadas em animais pré-tratados com LY + PE foram progressivamente inibidas e até mesmo bloqueados pelo pré-tratamento adicional com doses crescentes de NBQX (2, 10 e 20 nmol/100nL) microinjetados no NPV, sugerindo sua mediação por ativação dos receptores não-NMDA. Adicionalmente, a microinjeção de L-glu no NPV após o bloqueio dos receptores NMDA com LY aumentou os níveis plasmáticos de vasopressina. Em conclusão, os resultados sugerem a existência de duas vias pressoras glutamatérgicas no NPV: uma via simpática que é mediada por ativação dos receptores NMDA e uma via vasopressinérgica que é mediada por ativação dos receptores não-NMDA. Além disso, no presente estudo, nós avaliamos uma possível interação local entre óxido nítrico (NO) e guanilato ciclase na mediação dos efeitos cardiovasculares causados pela microinjeção de L-glu no NPV de ratos não anestesiados. As respostas cardiovasculares evocadas pela microinjeção de L-glu no NPV foram abolidas pelo pré-tratamento local com um inibidor da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), N-Propil-L-arginina (N-Propil, 0.04 nmol or 4nmol/100nL) em ratos não anestesiados e anestesiados. O pré-tratamento do NPV com um sequestrador de NO, carboxi-PTIO (C-PTIO, 1nmol/100nL) ou com um inibidor da guanilato ciclase, o 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalina-1-um (ODQ, 1nmol/100nL) também reduziu as respostas cardiovasculares causadas pelo L-glu no NPV. Em um experimento final, diferentes doses de nitroprussiato de sódio (NPS, 9, 27 e 45 nmol/100nL) microinjetadas no NPV causou respostas pressoras e taquicárdicas em animais não anestesiados, reforçando a idéia do papel do NO na mediação das respostas cardiovasculares ao L-glu. Porém, nos animais anestesiados, o NPS evocou respostas depressoras e bradicárdicas, sugerindo que a anestesia poderia interferir nas respostas cardiovasculares mediadas pelo sistema nervoso central (SNC). Em conclusão, os resultados sugerem que a interação NO-guanilato ciclase seria o mecanismo de transdução de sinal responsável pelas respostas cardiovasculares causadas pela microinjeção de L-glu no NPV.

Fisiologia

AÇÃO DA VIA DA HEME-OXIGENASE NA LIBERAÇÃO DE VASOPRESSINA DURANTE O CHOQUE ENDOTOXÊMICO

Viviana Moreto

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Evelin Capellari Carnio
Tese de Doutorado apresentada em 08/10/2009

O choque endotoxêmico é um quadro clínico caracterizado por queda acentuada na pressão arterial, a qual não responde a agentes vasopressores. O choque endotoxêmico é geralmente induzido pela administração de endotoxinas como o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas. A indução de choque endotoxêmico em animais, pela administração sistêmica de LPS, leva a uma resposta bifásica na liberação de vasopressina (AVP), um hormônio peptídico, com ação vasoconstrictora. Observa-se um aumento transitório na concentração plasmática deste hormônio durante as duas primeiras horas, seguido por um retorno à concentração basal durante a quarta e sexta hora após a administração de LPS. A enzima heme-oxigenase (HO), cataliza a degradação da molécula de heme em 3 sub-produtos, CO, Ferro e BV. Muitos trabalhos tem demonstrado que a HO tem ações protetoras durante o choque endotoxêmico. Sendo assim o presente estudo teve como objetivo avaliar a participação dos subprodutos da via HO sobre a liberação de AVP durante o choque endotoxêmico. O choque endotoxêmico foi induzido em ratos machos *Wistar* pela da administração intravenosa de

LPS, que provocou um aumento da concentração plasmática de AVP, queda da temperatura corpórea, queda da pressão arterial média (PAM) e aumento da frequência cardíaca (FC). Após duas horas da administração de LPS houve um retorno aos valores basais da concentração plasmática de AVP, aumento da temperatura corpórea, e um aumento do volume urinário, porém a PAM continuou em queda e a FC continuou aumentada. Ao administrarmos centralmente os subprodutos da via HO juntamente com o LPS observamos que a BV promoveu um aumento da concentração plasmática de AVP, a queda da PAM foi amenizada e o aumento da FC foi acentuado. O CO apenas promoveu uma queda inicial da PAM. O Ferro apenas acentuou o aumento da FC induzida por LPS. Sendo assim, nossos resultados sugerem a que a BV pode agir positivamente no controle da liberação de AVP durante a endotoxemia experimental, com consequente recuperação dos valores de pressão arterial.

EFEITOS DA HIPOXIA INTERMITENTE CRÔNICA NO METABOLISMO DE PROTEÍNAS E CARBOHIDRATOS EM RATOS

Thiago de Lorena Fábio

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos C. Navegantes

Dissertação de Mestrado apresentada em 14/10/2009

O objetivo principal do presente estudo foi investigar os efeitos da hipóxia crônica intermitente (HIC) no metabolismo de proteínas em músculos esquelético de ratos jovens. Considerando que a hipóxia é uma situação que afeta todo o metabolismo celular, avaliou-se também as possíveis alterações do metabolismo de carboidratos e lipídios na musculatura esquelética. Para isso, ratos de aproximadamente 3 semanas foram expostos a 9 dias de HIC (6% O₂ durante 40s em intervalos de 9 min; 8 h por dia). No décimo dia, o grupo HIC desenvolveu hipertrofia cardíaca e aumentou o conteúdo de dopamina na glândula adrenal sugerindo hiperatividade simpática. A massa corporal dos animais hipóxicos foi menor que a dos animais controles e este efeito foi associado à redução da massa muscular esquelética, à atrofia das fibras tipo IIa/I e IIa nos músculos *soleus* e à menor velocidade de síntese proteica tanto no músculo *soleus* quanto no EDL. O grupo de animais hipóxicos apresentou menores valores da proteólise total, diminuição na atividade da proteólise Ca²⁺-dependente e aumento no conteúdo proteico da forma autolisada (ativa) da μ -calpaína e da calpastatina, o inibidor endógeno das calpaínas. Além disso, o presente estudo mostra que a HIC resultou em aumento do conteúdo de glicogênio hepático e muscular (*soleus*) e redução da oxidação de glicose em músculos *soleus* e EDL. Paralelamente, a HIC aumentou a oxidação de ácidos graxos pelos músculos esqueléticos incubados na presença de insulina e a atividade enzimática de dois componentes da cadeia respiratória mitocondrial (complexos III e IV). Esses dados sugerem que a atividade simpática aumentada dos ratos jovens submetidos à HIC inibiu a proteólise Ca²⁺-dependente nos músculos *soleus* devido ao aumento dos níveis de calpastatina. Esse efeito antiproteolítico parece ser um importante mecanismo de atenuação da perda de massa muscular esquelética oxidativa e da perda adicional da massa corporal, em um período crítico do desenvolvimento do animal. Nossos dados também indicam que a HIC induz adaptações metabólicas que possibilitam maior aproveitamento dos ácidos graxos como fonte de energia, ao mesmo tempo que a glicose é desviada para a síntese de glicogênio.

Genética

DESENVOLVIMENTO DE UMA PLATAFORMA INTEGRATIVA PARA DEPURAÇÃO E ANÁLISE DE DADOS DE EXPRESSÃO GÊNICA

Daniel Guariz Pinheiro

Orientador: Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior

Tese de Doutorado apresentada em 05/10/2009

Métodos de análise de expressão gênica em larga escala como microarrays, *Serial Analysis of Gene Expression* (SAGE), *Massively Parallel Signature Sequencing* (MPSS) e outros baseados na nova geração de Sequenciadores [*e.g. Sequencing-By-Synthesis* (SBS)] têm sido amplamente utilizados para traçar perfis de expressão gênica. Estas abordagens têm permitido a identificação de biomarcadores de tipos celulares específicos em uma extensa variedade de condições biológicas. Análises de expressão gênica diferencial usando dados produzidos a partir dessas tecnologias fornecem recursos que auxiliam sobremaneira a identificação e avaliação de alvos terapêuticos. A fim de oferecer suporte para essas

análises, desenvolvemos uma plataforma integrativa que utiliza bancos de dados públicos e próprios e reúne uma coleção de ferramentas web. Essa plataforma compreende dois sistemas integrados: o primeiro é chamado de *Hyper- and Hypo-expressed Genes* (H2G) e o segundo de *Score System for Sequence Tags* (S3T). O H2G oferece suporte às análises comparativas de expressão gênica diferencial e o S3T foi concebido para indexar os dados de expressão gênica por meio de uma série de avaliações baseadas em um conjunto de regras definido, o qual permite a identificação/seleção de dados considerados mais confiáveis para posterior análise com H2G ou quaisquer outros aplicativos. O H2G possui ferramentas computacionais para a análise e detecção de genes diferencialmente expressos e engloba um banco de dados de expressão gênica que contém atualmente 1.174 bibliotecas obtidas a partir das tecnologias SAGE, MPSS e SBS. O H2G inclui o S3T como um recurso para realizar a depuração nesses dados. Análises com o S3T foram realizadas em conjuntos de bibliotecas de SAGE humanas, organizadas por tipo celular. Agrupamentos hierárquicos foram obtidos a partir dos dados brutos e também a partir dos dados após a filtragem do S3T, para cada conjunto de bibliotecas. Os resultados das avaliações desses agrupamentos revelam que os agrupamentos gerados a partir dos dados após a filtragem são mais coerentes, sugerindo que o processo de depuração do S3T é capaz de reduzir a presença de ruídos. Este trabalho oferece uma contribuição significativa para os estudos da dinâmica da expressão gênica. Essa plataforma de análise pode auxiliar outros pesquisadores na realização de suas investigações biológicas. Os recursos de análise estão livremente disponíveis nas seguintes URLs: <Http://gdm.fmrp.usp.br/h2g/> e <Http://gdm.fmrp.usp.br/s3t/>, respectivamente para o H2G e o S3T.

UMA PLATAFORMA COMPUTACIONAL PARA ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL MÚLTIPLA

Israel Tojal da Silva

Orientador: Prof.Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior

Tese de Doutorado apresentada em 07/10/2009

A era pós-genômica trouxe novos desafios no que se refere à compreensão da organização e funcionamento do genoma humano. Muitos destes desafios estão centrados sobre o significado da regulação gênica diferencial em distintas condições biológicas, e podem ser enfrentados mediante a análise de Expressão Diferencial Múltipla (EDM) de genes relacionados a processos biológicos. Atualmente, a análise EDM está limitada aos métodos usuais de expressão diferencial inicialmente projetado para análise pareada. O aperfeiçoamento desta análise torna-se necessário para entender as desordens moleculares associadas com a fisiopatologia do fenótipo estudado. Esta tese tem como objetivos o desenvolvimento de uma plataforma computacional web (ProbFAST) para análise EDM em larga escala integrada às informações funcionais disponíveis. Apresenta-se, ainda, um estudo para avaliar a performance da abordagem implementada na ferramenta com outros procedimentos usuais ao analisar um conjunto de dados simulados. Quando aplicada aos dados de expressão públicos e privados, demonstramos a sua flexibilidade para extrair informações gênicas biologicamente relevantes. ProbFAST pode ser acessado pelo site <Http://gdm.fmrp.usp.br/probfast>.

Ginecologia e Obstetrícia

EFEITOS DO SISTEMA INTRA-UTERINO DE LEVONORGESTREL SOBRE MARCADORES DE RISCO CARDIOVASCULAR DE PACIENTES COM ENDOMETRIOSE: ESTUDO COMPARATIVO COM O ANÁLOGO DO GNRH

Rodrigo Alves Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Rui Alberto Ferriani

Tese de Doutorado apresentada em 14/10/2009

Introdução: Aventa-se a hipótese de que pacientes com endometriose poderiam apresentar risco elevado para doenças cardiovasculares. Existe, porém, controvérsia quanto ao perfil lipídico observado nessas pacientes.

Objetivos: avaliar os marcadores de risco cardiovascular associados à endometriose, comparando-se o efeito sobre eles de dois diferentes tratamentos para esta doença: Sistema Intra-uterino liberador de levonorgestrel (SIU-LNG) e o análogo do GnRH na forma de depósito (aGnRH). Marcadores inflamatórios, parâmetros clínicos e avaliação lipídica foram utilizados como marcadores de risco cardiovascular.

Material e Métodos: Quarenta pacientes entre 18 e 40 anos, com diagnóstico laparoscópico de endometriose, foram randomizadas para receber tratamento com SIU-LNG (n=22) e com o aGnRH (n=18), durante 6 meses. Foram avaliados o

índice de massa corporal, a frequência cardíaca, as pressões arteriais sistólica e diastólica, além dos seguintes parâmetros laboratoriais: lipidograma (colesterol total (CT), HDL-colesterol (HDL-C), LDL-colesterol (LDL-C), triglicérides (TGL)), interleucina-6 (IL-6), proteína C reativa (PCR), homocisteína, molécula de adesão de célula vascular (VCAM), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e contagem de leucócitos (LCT), sendo realizados no início e após seis meses de tratamento.

Resultados: no grupo do SIU-LNG, houve redução dos níveis do VCAM ($92,8 \pm 4,2$ ng/mL para $91,2 \pm 2,7$ ng/mL, $p=0,04$), PCR ($0,38 \pm 0,30$ mg/dL para $0,28 \pm 0,21$ mg/dL, $p=0,03$), CT ($247,0 \pm 85,0$ mg/dL para $180,0 \pm 31,0$ mg/dL, $p=0,0002$), TGL ($118,0 \pm 76,0$ mg/dL para $86,5 \pm 41,5$ mg/dL, $p=0,003$), LDL-C ($160,5 \pm 66,0$ mg/dL para $114,5 \pm 25,5$ mg/dL, $p=0,0005$) e HDL-C ($63,0 \pm 20,5$ mg/dL para $48,5 \pm 10,5$ mg/dL, $p=0,002$). No grupo do aGnRH, houve aumento da homocisteína ($11,5 \pm 2,9$ μ mol/L para $13,0 \pm 2,7$ μ mol/L, $p=0,04$) e diminuição dos níveis de IL-6 ($4,3 \pm 3,9$ pg/mL para $2,3 \pm 0,8$ pg/mL, $p=0,005$), VCAM ($94,0 \pm 3,8$ ng/mL para $92,0 \pm 1,6$ ng/mL, $p=0,03$) e LCT (7330 ± 2554 para 6350 ± 1778 , $p=0,01$). Esse estudo mostra que alguns marcadores de risco cardiovascular são influenciados por ambos aGnRH e SIU-LNG, mas esse último reduz mais os níveis lipídicos e pode ter efeitos mais favoráveis em longo prazo.

EFEITOS DO TREINAMENTO DOS MÚSCULOS DO ASSOALHO PÉLVICO REALIZADOS DURANTE A GESTAÇÃO NA SUA FUNÇÃO E NO RELATO DE PERDA URINÁRIA

Daniella Leiros Cunha Cavalcanti

Silvana Maria Quintana

Dissertação de Mestrado apresentada em 23/11/2009

Apesar do treinamento dos músculos do assoalho pélvico ser considerado tratamento de primeira linha nos casos de IU de esforço em mulheres, a literatura ainda é escassa e controversa em relação a sua efetividade no período gestacional. Este estudo avaliou os efeitos de um programa de treinamento dos músculos do assoalho pélvico na melhora de sua função e na diminuição de relatos de perda urinária. Quarenta e duas primigestas de baixo risco foram randomicamente distribuídas para fazerem parte de um grupo controle ou de um grupo de treinamento dos MAP. O grupo de intervenção realizou 16 sessões de treinamento intensivo, individual e supervisionado. Todas as gestantes foram avaliadas com 20 semanas, 24 semanas, 36 semanas de gestação e com 6 semanas após o parto quanto a função dos MAP utilizando-se a escala de Oxford modificada e o perineômetro Peritron®. Foram consideradas incontinentes as mulheres que relataram um ou mais episódios de perda urinária no último mês. O pico e média da perineometria na avaliação com 20 semanas gestacionais para o grupo controle foram $51,89$ cm H₂O e $33,71$ cm H₂O, respectivamente e para o grupo treinamento $43,01$ cm H₂O e $28,21$ cm H₂O. No grupo controle, 52% relataram perder urina e 33% do grupo de treinamento na primeira avaliação. Não houve diferença significativa entre os grupos em relação a média ($p=0,18$) e o pico ($p=0,47$) da perineometria e relato de perda urinária ($P=0,34$) na primeira avaliação. Na avaliação com 36 semanas o pico e a média da perineometria para o grupo controle foram respectivamente $50,81$ cm H₂O e $33,06$ cm H₂O e para o grupo de treinamento $42,49$ cm H₂O e $28,21$ cm H₂O. Não houve diferença significativa entre os grupos para a perineometria, mas houve diferença entre as avaliações para a média da perineometria para o grupo de treinamento ($p=0,03$ de 20 sem para 36 sem de gestação e $<0,01$ de 20 sem de gestação para 6 semanas após o parto). O número de mulheres que não perdiam urina aumentou de 48% para 52% no grupo controle, e de 67% para 87% no grupo exercício ($p=0,04$). O treinamento dos MAP proporcionou aumento da perineometria (média) após o treinamento, manteve a função dos MAP após o parto e foi eficaz na diminuição dos relatos de perda urinária.

DILATAÇÃO MEDIADA POR FLUXO DA ARTÉRIA BRAQUIAL EM GESTANTES TABAGISTAS

Luis Guilherme Carvalho Nicolau

Francisco Mauad Filho

Dissertação de Mestrado apresentada em 30/11/2009

Introdução: O hábito de fumar causa inúmeros prejuízos à saúde, entre os quais aumenta o risco de disfunção endotelial. Atualmente, o método mais utilizado para a avaliação não invasiva da função vascular, é a dilatação mediada por fluxo da artéria braquial: através da ultrassonografia. **Objetivos:** Avaliar em que tempo ocorre à máxima dilatação, e se existe diferença na avaliação da função endotelial avaliada pela ultrassonografia ao comparar quatro grupos de mulheres (gestantes ou não e fumantes ou não). **Métodos:** Estudo transversal no qual foi realizada a mensuração do diâmetro da artéria braquial em repouso e em quatro tempos após estímulo (30, 60, 90 e 120 segundos) em quatro grupos de mulheres entre 20 e 30 anos de idade, incluindo gestantes entre 24 e 28 semanas de idade gestacional: gestantes não fumantes (N=47), gestantes fumantes (N=33), mulheres não fumantes (N=34) e mulheres fumantes (N=19), resultando em 133 avaliações.

Resultados: Dados antropométricos, idade, paridade e idade gestacional não houve diferença significativa nos grupos estudados, bem como, os níveis de pressão arterial diastólica (PAD) (mmHg) e índice de massa corporal. Uma diferença significativa foi observada entre o número de cigarros consumidos por semana entre gestantes e não gestantes ($p=0,04$). A DMF foi maior entre as gestantes não fumantes em comparação às fumantes ($11,50 \pm 5,77$ vs. $8,74 \pm 4,83$; $p=0,03$) como também no grupo de não gestantes não fumantes em comparação as fumantes ($10,52 \pm 4,76$ vs. $7,21 \pm 5,57$; $p=0,03$). Ambas com diferença significativa em relação ao grupo controle. Em relação à avaliação da dilatação nos diferentes tempos, esta foi máxima para todos os grupos no tempo 60 segundos após a desinsuflação. Uma diferença significativa foi observada em todos os tempos e entre todos os grupos. **Conclusões:** A máxima dilatação mediada por fluxo foi observada 60 segundos, após o estímulo em todos os grupos. O hábito de fumar parece levar a disfunção endotelial, tanto em mulheres gestantes quanto em não gestantes, o que foi demonstrado por uma menor dilatação mediada por fluxo nas fumantes.

Imunologia Básica e Aplicada

PRODUÇÃO DE UMA VACINA DE DNA PARA AS PROTEÍNAS PRM E E DO VÍRUS DENGUE-1 UTILIZANDO PV AX® COMO VETOR DE EXPRESSÃO

Maira Gabriela Martins Pereira

Orientador: Prof. Dr. Benedito Antonio Lopes da Fonseca
Dissertação de Mestrado apresentada em 13/10/2009

Os vírus da dengue (DENV) correspondem a mais importante doença viral veiculada por artrópodes de significância para a saúde pública e consistem de quatro tipos antigênicos diferentes (DENV-1 ao -4) que apresentam grande diversidade genética. Estes vírus usualmente causam desde dengue clássica (DC) até febre hemorrágica (FHD) e síndrome de choque por dengue (SCD). O vírus é transmitido ao homem através da picada dos mosquitos *Aedes ssp.* fêmea, principalmente *Aedes aegypti*. O dengue é um vírus de RNA de fita simples de polaridade positiva que pertence à família Flaviviridae e ao gênero Flavivirus. O RNA é envolto por um envelope lipídico no qual a proteína de membrana (M) e a glicoproteína do envelope (E) estão fixadas. A proteína E é o principal alvo de anticorpos neutralizantes desempenhando um papel importante na ligação ao receptor e na fusão de membrana, conseqüentemente, esta tem sido a proteína estrutural mais importante no emprego de candidatas a vacinas. Até o momento, não existe tratamento específico para dengue nem vacina comercial disponível, de forma que o controle do vetor tem sido a única alternativa para o controle da doença. O sucesso na construção de uma vacina para dengue consiste na elaboração de uma vacina tetravalente que seja capaz de induzir produção de anticorpos neutralizantes contra todos os quatro sorotipos, diminuindo a possibilidade de desenvolvimento das formas mais graves da doença. O uso de vacinas de DNA é uma nova e promissora Nota de resumo técnica de imunização e nosso grupo tem desenvolvido vacinas de DNA para os quatro sorotipos. As vacinas produzidas por engenharia genética são potencialmente mais seguras, menos termolábeis e mais facilmente administráveis. Além disso, a produção em massa destas vacinas resultará em redução no custo, tratando-se de uma grande vantagem econômica, considerando que a grande proporção da população afetada pelo dengue, e que se beneficiaria com o uso destas (contínua) (continuação) vacinas, reside em países em desenvolvimento. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi a produção de uma vacina de DNA para as proteínas prM e E do vírus dengue-1 utilizando pVAX como vetor de expressão. O vetor pVAX foi escolhido para a construção da vacina por ser o único plasmídeo aceito para uso em humanos pela FDA. No nosso trabalho foram desenvolvidos clones recombinantes para o vírus dengue-1 que foram capazes de expressar as proteínas virais em células Hek. A detecção das proteínas virais foi feita por imunofluorescência indireta e imunoprecipitação seguida de eletroforese em gel (SDS-PAGE) de células tranfectadas com os clones. O clone que melhor expressou as proteínas prM e E (pVAX-D1c104) do vírus dengue-1 foi selecionado para avaliação da sua imunogenicidade e consequente proteção em camundongos Balb/c. A detecção de anticorpos específicos no soro dos animais imunizados foi realizada pela técnica de imunofluorescência indireta e a proteção da vacina foi avaliada pelo ensaio de Nota de resumo sobrevivência após desafio i.c. com o DENV-1. Como resultado, a vacina pVAX-D1c104 foi capaz de induzir produção de anticorpos específicos contra o vírus porém não conferiu proteção após desafio. Acreditamos, dessa forma, que esta vacina necessita de melhorias, para então servir de possível candidata à vacina tetravalente para o vírus dengue. No Brasil, o gerenciamento inadequado do plano de erradicação do *Aedes aegypti* em algumas localidades resultou no desenvolvimento de surtos epidêmicos, e o desenvolvimento de uma vacina para os vírus da dengue seria de imensa valia, pois é a forma mais barata e mais eficaz de todas as intervenções médicas modernas.

AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE CÉLULAS T REGULADORAS APÓS IMUNIZAÇÃO COM VACINAS CONTRA TUBERCULOSE E CORRELAÇÃO COM A PROTEÇÃO APÓS DESAFIO COM *Mycobacterium tuberculosis*

Paola Fernanda Fedatto

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vânia Luiza Deperon Bonato

Dissertação de Mestrado apresentada em 21/10/2009

Diante da ampla capacidade das células T reguladoras em suprimir respostas imunes tanto em órgãos-linfóides quanto na periferia, é evidente o fato de que essas células podem interferir na magnitude e duração da resposta imune induzida pelas vacinas, como tem sido mostrado por diferentes protocolos de vacinação. Nesse estudo, nós selecionamos preparações vacinais diferentes (DNA-HSP65, BCG, BCG/DNA-HSP65 e BCG/PFC-CpG) quanto à eficácia protetora em modelo de tuberculose com a finalidade de avaliar se a expansão de células T reguladoras poderia estar associada com a capacidade protetora distinta conferida por cada formulação vacinal. Desse modo, os objetivos deste trabalho foram (I) avaliar a indução, através da frequência e do número absoluto, das células T reguladoras por diferentes estratégias vacinais testadas contra tuberculose experimental; (II) avaliar o fenótipo das células T reguladoras após as imunizações; (III) avaliar a população de células T reguladoras no pulmão dos animais imunizados após desafio com *Mycobacterium tuberculosis* e (IV) verificar a capacidade supressora de células T reguladoras de animais imunizados ou infectados por *M. tuberculosis*. Nossos dados mostraram que a vacina DNA-HSP65 foi a principal formulação que aumentou significativamente o número e a frequência de células T reguladoras CD4⁺Foxp3⁺ no baço e linfonodos, respectivamente, e apresentou tendência em aumentar a expressão de Foxp3 nas células CD4⁺CD25^{High} no baço e linfonodos em relação ao grupo não imunizado. As imunizações com BCG/DNA-HSP65 e BCG/PFC-CpG não alteraram o número de células T reguladoras CD4⁺Foxp3⁺ no baço, mas diminuíram sua frequência nos linfonodos. Além disso, apresentaram tendência em diminuir a expressão de Foxp3 em células CD4⁺CD25^{High} no linfonodo em relação aos animais não-imunizados. Já os animais imunizados com BCG apresentaram tendência em diminuir o número de células T reguladoras quando avaliada a população celular CD25^{High} (CD4⁺CD25^{High}Foxp3⁺) no baço em relação aos animais não-imunizados. Ao avaliarmos a migração de células T reguladoras para o pulmão após desafio com *M. tuberculosis*, verificamos que nenhuma das formulações vacinais foi capaz de aumentar significativamente o número de células CD4⁺Foxp3⁺. Porém, dentre as formulações estudadas, a vacina DNA-HSP65 foi a que mostrou menor diminuição na carga micobacteriana: o que pode estar relacionado com o elevado número de células T reguladoras induzidas após a vacinação. Para avaliarmos a habilidade funcional das células T reguladoras, utilizamos modelo de hipersensibilidade tardia (HT), no qual animais previamente infectados com os bacilos receberam, no coxim plantar, células T reguladoras (CD4⁺CD25⁺) junto com antígenos de *M. tuberculosis*. Nossos dados mostraram que as células T reguladoras de animais imunizados com DNA-HSP65 ou de animais infectados tiveram tendência à maior capacidade supressora quando comparadas às células T reguladoras de animais não infectados. Todos estes dados sugerem que as células T reguladoras são induzidas pelo processo de vacinação, podem influenciar a capacidade protetora de uma formulação vacinal e que as células T reguladoras induzidas pela imunização com DNA-HSP65 ou pela infecção com *M. tuberculosis* são mais supressoras que as células T reguladoras de animais não infectados.

EFEITO DO ESTRESSE CRÔNICO PELO FRIO SOBRE AS FUNÇÕES DO MACRÓFAGO

Renata Sesti Costa

Orientador: Prof. Dr. Bernardo Mantovani

Tese de Doutorado apresentada em 22/10/2009

A susceptibilidade a infecções, reações alérgicas, progressão tumoral e desordens auto-imunes são fortemente influenciadas pela atividade do sistema nervoso e endócrino em resposta a um estímulo estressante. As consequências da resposta fisiológica ao estresse são geralmente adaptativas em um curto prazo, mas podem ser danosas quando o estresse é crônico e de longa duração. Neste estudo, investigamos a influência do estresse crônico pela exposição ao frio sobre as funções de macrófagos residentes da cavidade peritoneal e ativados pela injeção com LPS. Nós observamos que, o estresse crônico parece afetar diferentemente macrófagos de camundongos injetados com LPS e de camundongos controles. Os macrófagos residentes possuem uma redução generalizada da fagocitose por todos os estímulos fagocíticos testados (imunocomplexo, zimosan, zimosan opsonizado com complemento e timócito apoptótico). Esta redução na fagocitose está correlacionada com diminuição na polimerização de actina e com a inibição dos receptores de fosfatidilserina, dectina-1 e FcγRII/III induzidas pelo estresse. Estes macrófagos produzem menos TNF-α e IL-6 e maiores quantidades de

IL-10, enquanto sua produção de ânion superóxido não foi alterada. Como consequência destes efeitos, os macrófagos possuem redução na expressão de MHC de classe II e os linfócitos estimulados por estes macrófagos residentes produzem menos IFN- γ , embora, surpreendentemente, proliferam mais. Todos estes efeitos do estresse crônico sobre os macrófagos em repouso estão correlacionados com um aumento de 4 vezes na expressão da enzima conversora de glicocorticóide inativo em ativo, 11 β -HSD, embora haja também uma redução na expressão do receptor de glicocorticóides (GR) por estes macrófagos. Já os macrófagos ativados, ao contrário, parecem ser menos sensíveis aos efeitos do estresse crônico. Eles apresentam uma inibição da fagocitose de zimosan e de tímócitos apoptóticos, no entanto, a fagocitose mediada pelo receptor de complemento e pelo Fc γ R não é alterada pelo estresse. Os mecanismos que levam a esta inibição específica da fagocitose ainda não são esclarecidos, mas certamente não são mediados pela polimerização de actina nem pela expressão dos receptores fagocíticos na superfície da célula. Os macrófagos ativados também apresentam produção de superóxido inalterada, reduzida produção de TNF- α e IL-6 e aumentada liberação de IL-10, que por consequência, culmina em uma menor expressão de MHC de classe II e de B7.1, no entanto, isto não modifica a capacidade dos macrófagos em estimular a proliferação e a produção de citocinas pelos linfócitos. A influência do estresse sobre estes macrófagos ativados está correlacionada com redução na expressão de GR e aumento na expressão do receptor β 2 adrenérgico. Muitos estudos mostram que o estresse crônico pode ser imunossupressor, e por consequência, prejudicial para a saúde. Os resultados deste estudo mostram o papel do macrófago na imunossupressão induzida pelo estresse e sugerem que o estresse crônico expõe o organismo a um maior risco de infecções e de proliferação de células tumorais, já que seus macrófagos regulatórios possuem uma capacidade fagocítica limitada e produzem citocinas antiinflamatórias que inibem as funções do próprio macrófago bem como as da imunidade adaptativa.

BAIXAS DOSES DE DNA PLASMIDEAL CONTROLAM RESPOSTA IMUNE CELULAR NO MÚSCULO GASTROCNÊMIO EM MODELO EXPERIMENTAL DE DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

Ricardo Luís Louzada da Silva

Orientador: Arlete Ap Martins Coelho-Castelo

Dissertação de Mestrado apresentada em 24/11/2009

A Distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma doença genética grave, ligada ao cromossomo X, que pode ser fatal por volta dos 20 anos de idade. Essa doença causa um enfraquecimento muscular devido a mutações presentes na distrofina, proteína que mantém o complexo da fibra muscular ligada à matriz extracelular. A ausência dessa proteína gera uma instabilidade culminando com lesões recorrentes e, por fim, necrose das fibras musculares ocasionando inflamação crônica. Até o momento, o tratamento existente é paliativo, antiinflamatório, com o intuito de combater o componente autoimune dessa doença, o qual é caracterizado principalmente pela atividade de linfócitos T citotóxicos e auxiliares. Ademais, são características dessa doença as citocinas IFN- γ , TNF- α , TGF- β , IL-12 e IL-6. Dentro desse contexto, nosso laboratório vem trabalhando com uma nova abordagem, empregando baixas doses de DNA plasmideal como antiinflamatório. Para tanto, inicialmente realizamos experimentos avaliando a atividade antiinflamatória *in vitro* de nossa construção gênica ao dosarmos as citocinas TNF- α e IL-6 no sobrenadante de cultura de macrófagos, e a citocina IL-6 em cultura de mioblastos, ambos submetidos a estímulo com LPS e tratados juntamente com DNA. Verificamos a redução da secreção dessas citocinas quando a dose utilizada foi 10 μ de DNA/mL. Em seguida, realizamos experimentos que contaram com 3 doses de 20 μ de DNA plasmideal inoculados diretamente no músculo gastrocnêmio de camundongos da linhagem *mdx*, durante 5 semanas, nas quais os animais dos diferentes grupos experimentais foram exercitados em esteira mecânica. Verificamos que a abordagem terapêutica utilizada foi capaz de controlar e reduzir, no músculo gastrocnêmio, a resposta imune típica do padrão Th17, ao reduzir a expressão dos genes que codificam as citocinas IL-17, IL-23, IL-6 e TGF- β , além de também observarmos redução da expressão da citocina pró-inflamatória TNF- α . Entretanto, não observamos alteração na expressão dos genes IFN- γ e IL-12. Além disso, analisamos a citocina antiinflamatória IL-10 e observamos aumento de sua expressão. Contudo, a expressão do gene *foxp-3* não foi alterada em relação aos animais controles. Além disso, também foi obtida redução da quantidade de linfócitos T nas lesões dos músculos gastrocnêmio dos animais tratados. Quanto a parâmetros de análise inerentes à patologia da DMD, quantificamos a atividade das enzimas séricas CK e LDH, além da quantificação da expressão gênica do gene que codifica a proteína PAX7 e quantificação do incremento de força dos animais após o tratamento. Obtivemos resultados interessantes quanto a análise das enzimas séricas, pois ambas apresentaram diminuição de sua atividade no soro dos animais tratados com DNA e os mesmos animais apresentaram aumento da expressão do gene PAX7, revelando melhora no quadro clínico desses animais. Entretanto, a análise de incremento de força não mostrou diferença entre os grupos tratados e controle. Portanto, o tratamento anti-inflamatório foi eficiente no modelo de DMD, especialmente no que tange o padrão T *helper* 17 de resposta imune.

AVALIAÇÃO DO USO DE BAIXAS DOSES DE DNA PLASMIDEAL NO CONTROLE D E PROCESSOS INFLAMATÓRIOS

Thiago Malardo

Arlete Aparecida Martins Coelho-Castelo

Dissertação de Mestrado apresentada em 27/11/2009

Trombone e col. (2007) mostraram que a captura de baixas doses de DNA plasmideal, pode impedir a apresentação antigênica e apresentar um perfil antiinflamatório. Esses resultados geraram um paradigma desde que DNA plasmideal é usado em vacinas gênicas. Assim, parece que em altas doses (vacina) o DNA plasmideal funciona como inflamatório e indutor de Th1, enquanto em baixas doses atuam como antiinflamatório. Essa ação antiinflamatória abriu vários campos de pesquisa. Para comprovar o efeito antiinflamatório *in vivo*, usamos nesse trabalho dois modelos; a) choque endotoxêmico induzido por LPS e b) Diabetes Mellitus induzida por STZ.

Usando o modelo da diabetes induzi da por STZ, avaliamos o tratamento com duas doses de 5' mug e 10' mug, após o estabelecimento da doença. A dosagem de glicemia acima de 200dl/mL serviu como índice para determinar o estabelecimento de diabetes nos animais. Em nenhum dos tratamentos realizados o nível de glicose diminuiu. Isso foi observado com 5 e 10µg de DNA. No tratamento com DNA plasmideal, não houve redução de células TCD8⁺ e TCD4⁺ específicas para insulina nos linfonodos pancreáticos e baço dos animais.

O choque endotoxêmico foi induzido em ratos machos *Wistar*, por injeção intravenosa de 1,5mg/kg de lipopolissacarídeo (LPS). A administração de LPS induz uma significativa diminuição da pressão arterial média (PAM) com um concomitante aumento da frequência cardíaca. Um aumento na concentração plasmática de AVP Nota de resumo ocorre duas horas após a administração de LPS, assim como, ocorre um aumento na produção de NO na quarta hora de experimento.

Quando o LPS foi combinado com a administração intravenosa de baixas doses de DNA plasmideal (5, 10 e 20µg), foi observada uma atenuação na queda da PAM. Uma diminuição na concentração de nitrato plasmático (produto da degradação do NO) foi observada apenas no grupo tratado com 5µg. A produção de AVP foi potencializada na segunda hora de experimento mediante a todas as doses do tratamento. Além disso, as doses de 5 e 10mg de DNA, reduziu a produção de citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-6. Estes dados sugerem que a administração de DNA plasmideal reduz a queda da pressão arterial, potencializa a produção de AVP e reduz a produção de citocinas inflamatórias.

VIA NOTCH EM *Schistosoma mansoni*: ASPECTOS MOLECULARES E FUNCIONAIS

Lizandra Guidi Magalhães

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Rodrigues

Tese de Doutorado apresentada em 11/12/2009

O desenvolvimento e a manutenção fisiológica dos organismos multicelulares são desencadeados por um conjunto de vias de sinalização que interpretam e transmitem sinais que culminará na ativação da transcrição de vários genes.. Dentre os mecanismos de sinalização, destaca-se a via *Notch* por ser crítico na diferenciação celular em muitos organismos. Neste trabalho, estudamos os aspectos moleculares e funcionais da via *Notch* no parasita *schistosoma mansoni*. Utilizando o banco de dados GeneDB de *S. mansoni* o qual reúne sequências provenientes dos projetos transcriptoma e genoma do parasita, a maioria dos componentens envolvidos com a via em estudo foram identificados no parasita; além disso, a sequência da proteína predita Smp_105360 identificada, possui uma arquitetura modular típica dos receptores *Notch* de outros organismos. A análise por PCR quantitativo dos transcritos *SmNotch*, *SmSU(H)*, *SmHES* e para o complexo gama-secretase (*SmPresenilina*, *SmPEN-2*, *SmNicastrina* e *SmAPH1*) nas diversas fases evolutivas do parasita, monstrou que os componentes da via *Notch* foram expressos em todos os estágios Analisados, no entanto, diferenças de expressão entre os estágios foram observadas. Utilizando um anticorpo policlonal direcionado contra a região *Notch/LIN-12* e uma região sem domínio do receptor *Notch* identificado na análise predita, foi possível detectar nos extratos protéicos dos estágios de vermes adultos, ovos, cercárias e esquistossômulos uma marcação de aproximadamente 110kDa, que sugere ser a proteína *SmNotch* sem sofrer as clivagens proteolíticas, e uma marcação de 55kDa nos estágios de vermes adultos e ovos, que pode ser a região extracelular do receptor após ter sido liberado pela clivagem proteolítica. A influência de curcumina e do inibidor de gama-secretase DAPT foi avaliada sobre os casais de vermes adultos e no desenvolvimento dos ovos mantidos *in vitro*. Os resultados demonstraram que curcumina causou várias mudanças no parasita, levando a morte dos mesmos nas maiores concentrações, e DAPT causou somente a separação dos casais de vermes adultos nas maiores concentrações. Nesta abordagem, também foi observado que ambos compostos, quando utilizados nas menores concentrações, causou uma diminuição no número de ovos e na porcentagem de ovos desenvolvidos quando comparados com os grupos controles. A análise comparativa do perfil de expressão dos transcritos para *SmNotch* e *SmHES* em vermes adultos e ovos demonstra-

ram uma diminuição da expressão de *SmNotch* e SmHES em vermes adultos e ovos após a incubação com curcumina, e uma diminuição de SmHES quando incubados com DAPT, sugerindo o envolvimento da via *Notch* na formação e desenvolvimento dos ovos. Por fim, avaliamos a proteína recombinante *SmNotch* como um possível alvo de vacina contra a esquistossomose experimental, os resultados demonstraram que o esquema de imunização com a proteína *SmNotch* recombinante induziu uma proteção parcial contra à infecção experimental por *S. mansoni*. Em conclusão, as análises dos transcritos dos componentes da via *Notch* aliada aos estudos de inibição e imunológicos contribuíram significativamente para uma avaliação molecular e funcional preliminar desta via no parasita *S. mansoni*. Desta forma, as análises subsequentes poderão ser empregadas para a elucidação dos mecanismos pelos quais a via *Notch* coopera para garantir o desenvolvimento deste parasita.

ScFv's PRODUZIDOS POR PHAGE DISPLAY, ESPECÍFICOS PARA A PEÇONHA DE *Bothrops jararacussu*, INIBEM AÇÕES TÓXICAS DAS PEÇONHAS DE *Bothrops jararaca*, *Bothrops pauloensis* E *Bothrops moojeni*

Eduardo Crosara Roncolato

Orientador: Prof. Dr. José Elpidio Barbosa

Dissertação de Mestrado apresentada em 18/12/2009

O uso de antivenenos permanece como o principal tratamento dos acidentes ofídicos desde o final do século 19. A terapia clássica se baseia na administração de soros obtidos a partir do sangue coletado de equinos imunizados, contudo, gera o risco do desenvolvimento de doenças relacionadas à hipersensibilidade, além do elevado custo de produção e manutenção dos biotérios. Diante disso, buscam-se alternativas para a produção de antivenenos. Uma delas é a tecnologia de *Phage Display*, que oferece a possibilidade da obtenção de fragmentos de anticorpos humanos recombinantes, específicos para as toxinas desejadas. Sua utilização, a princípio, eliminaria a necessidade de imunização animal e, por consequência, os inconvenientes do uso de soros heterólogos, reduzindo custos de produção e se adequando às normas do bem-estar animal.

Partindo dessa técnica, Tamarozzi (Tamarozzi, Soares et al. 2006) selecionou, a partir da biblioteca de fagos-anticorpos Griffin.1 (MRC, Cambridge, UK), quatro clones produtores de scFv's capazes de inibir as atividades fosfolipásica e miotóxica da peçonha de *Bothrops jararacussu*. Sabendo da existência de similaridades estruturais entre as enzimas de ação tóxica das serpentes do Gênero *Bothrops* sp. (Gutierrez and Lomonte 1995), buscou-se avaliar a ação desses anticorpos citados, na inibição de atividades das peçonhas das *Bothrops jararaca*, *Bothrops pauloensis* e *Bothrops moojeni*. Os clones referidos, expandidos como fagos-anticorpos que apresentam o fragmento do anticorpo em sua superfície, se mostraram capazes de reconhecer as peçonhas botrópicas em ensaio de ELISA. Os fragmentos de anticorpos solúveis, derivados dos fagos-anticorpos mencionados, foram utilizados em experimentos *in vitro* que avaliaram a inibição da atividade fosfolipásica das peçonhas botrópicas. Os sobrenadantes contendo os fragmentos solúveis foram capazes de inibir parte desta atividade, quando comparados à ação do sobrenadante de uma cultura controle.

Alguns métodos foram testados buscando purificar os fragmentos de anticorpos recombinantes. Através das técnicas de gel filtração ou afinidade dos ScFv's à proteína L, não foram obtidos resultados satisfatórios. A purificação foi realizada, com sucesso, a partir da interação da cauda de hexa-histidina dos scFv's ao íon níquel, ligado à uma resina de agarose.

Os ensaios *in vitro*, desta vez utilizando os fragmentos purificados, comprovaram sua função na inibição da atividade fosfolipásica das peçonhas botrópicas avaliadas. A partir destes ensaios, o clone que revelou maior eficiência nesta inibição foi selecionado dentre os quatro em questão. Os ensaios *in vivo* seguintes evidenciaram a capacidade deste clone em inibir também a miotoxicidade, além de retardar e em alguns casos, até mesmo evitar a letalidade decorrente da ação das peçonhas das *Bothrops jararacussu*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops pauloensis* e *Bothrops moojeni*.

ANÁLISE DA PATOGÊNESE DA LESÃO PULMONAR AGUDA RELACIONADA À TRANSFUSÃO (TRALI) EM MODELOS *in vivo*

Mirela de Barros Tamarozzi

Orientador: Eduardo Magalhães Rego

Tese de Doutorado apresentada em 21/12/2009

A lesão pulmonar aguda relacionada à transfusão (TRALI - do inglês "transfusion-related acute lung injury") é uma complicação da transfusão de sangue alogênica, tipicamente manifestada por um edema pulmonar bilateral, dispnéia, hipoxemia, febre e hipotensão na presença de função cardíaca normal, ocorrendo dentro de um período de até seis horas após o início da transfusão. TRALI representa uma das mais frequentes reações transfusionais agudas, sendo considera-

da a principal causa de morte relacionada à transfusão em diversos países. O desenvolvimento de TRALI foi associado à transfusão de todos os tipos de componentes do sangue - sangue total, plasma, concentrados de hemácias, plaquetas e granulócitos. Anticorpos contra HLA (tanto de classe I quanto de classe II) e/ou granulócitos, presentes no sangue do doador, foram frequentemente implicados como causa desta síndrome. A presença de lipídeos que se acumulam durante a rotina de estocagem dos componentes celulares do sangue também foi associada à ocorrência de TRALI. Independentemente do hemocomponente envolvido, os neutrófilos desempenham um papel central nesta síndrome. Existem dois mecanismos propostos para explicar a fisiopatogenia de TRALI: a hipótese do anticorpo, ou de um evento e a hipótese de dois eventos. Ambos os mecanismos propostos levam a uma via final comum de aumento da permeabilidade vascular, resultando em edema pulmonar. No entanto, estudos experimentais objetivando elucidar os mecanismos de TRALI são pouco frequentes na literatura. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver modelos *in vivo* para o estudo do papel dos anticorpos anti-granulócitos e de lipídeos bioativos no desenvolvimento da TRALI. O primeiro modelo é baseado na hipótese de um evento, com a inoculação de neutrófilos humanos incubados previamente com anticorpos anti-HNA-2a em animais NOD/SCID e o segundo modelo é baseado na hipótese de dois eventos, com a inoculação de lipídeos em animais BALB/c pré-tratados com LPS. Os modelos desenvolvidos foram validados pelo aumento no infiltrado de células para o pulmão dos animais, bem como pelo extravasamento de proteínas no fluido da lavagem broncoalveolar e pela congestão e edema nos alvéolos pulmonares observadas por análise histopatológica. Em ambos os modelos detectou-se um aumento nos níveis de IL-1 β , KC e MIP-2. No modelo de um evento, ensaios *in vitro* demonstraram que a interação entre anticorpos anti-HNA-2a e neutrófilos humanos levaram a uma produção de IL-8 e ao aumento da expressão de CD54 e CD11b. No modelo de dois eventos, embora tenha havido uma diferença significativa na expressão de CD54 em relação ao grupo controle, este efeito foi induzido principalmente pelo LPS. Por outro lado, mudanças drásticas na expressão de CD11b/CD18 (Mac-1) foram detectadas apenas no tratamento com LPS seguido de PAF. Também foi observado um aumento nos níveis de TNF- α somente para este modelo. No entanto, o tratamento prévio dos animais com dexametasona resultou na inibição desta citocina, sem acarretar na diminuição do influxo de neutrófilos, sugerindo um papel irrelevante para o TNF- β na indução da TRALI. Em conclusão, os resultados aqui obtidos demonstram que há um mecanismo comum envolvendo a participação de KC, MIP-2, IL-1 β , CD54 e CD11b na indução de TRALI mediada por anticorpos ou pela associação de um insulto inflamatório e lipídeos presentes nas bolsas de sangue estocadas. A modulação de moléculas compartilhadas por ambos os modelos pode ser uma alternativa terapêutica futura no tratamento da TRALI.

Neurologia

PERFIS DE DESEMPENHO NEUROPSICOLÓGICO EM PACIENTES COM EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL MESIAL ASSOCIADA À ESCLEROSE HIPOCAMPAL: CORRELAÇÕES CLÍNICAS E RELEVÂNCIA PROGNÓSTICA

Ana Carolina Gargaro Silva

Orientador: Prof. Dr. Américo Ceiki Sakamoto

Dissertação de Mestrado apresentada em 20/10/09

Na epilepsia de lobo temporal mesial (ELTM) associada à esclerose hipocampal (EH), o exame neuropsicológico é um instrumento importante na avaliação dos pacientes candidatos à cirurgia. É usada para avaliar prejuízos cognitivos antes da cirurgia, auxiliar na lateralização/localização da zona epileptogênica, sugerir o prognóstico do desenvolvimento cognitivo após a cirurgia e é útil para o controle da qualidade e dos resultados do tratamento. Na prática clínica, é possível observar alguns perfis de desempenho neuropsicológico nos pacientes com ELTM associada à EH, entre eles: Ipsilateral - n=64 (déficits cognitivos compatíveis com o lado da EH); Contralateral - n=19 (déficits cognitivos contralaterais ao lado da EH); Bitemporal - n=19 (déficits cognitivos compatíveis com prejuízos em lobos temporais bilaterais, independente do lado da EH unilateral); e Normal - n=15 (perfil cognitivo dentro da normalidade, sem déficits funcionais apesar da EH unilateral). Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar correlações clínicas e a relevância prognóstica destes perfis. Para isso, foi realizada uma análise retrospectiva em pacientes adultos, destros, portadores de epilepsia refratária, avaliados no Centro de Cirurgia de Epilepsia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. Todos os pacientes apresentavam EH unilateral na imagem de ressonância magnética (RM) pré-operatória. Foram analisados parâmetros clínicos, demográficos e cognitivos (testes neuropsicológicos) dos grupos e suas relações com o efeito da cirurgia. Em relação ao resultado de controle de crises após a cirurgia, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. O mesmo ocorreu para os

aspectos clínicos e demográficos Analisados. Através da MANOVA foi constatada a diferença de desempenho cognitivo entre os grupos para cada lado da EH (esquerda e direita), quando Analisados e comparados os resultados dos testes neuropsicológicos de cada grupo. No que tange a comparação no desempenho cognitivo antes e depois da cirurgia, foi observado que os pacientes que passaram por lobectomia temporal esquerda mostraram maior declínio de memória episódica verbal. Isto foi observado Analisando os resultados dos testes Memória Lógica I e II e na evocação tardia da lista de palavras RAVLT. Os grupos com maior declínio foram o Contralateral e Normal. Os grupos que passaram por lobectomia temporal direita não mostraram diferença estatisticamente significativa no desempenho em nenhum dos testes neuropsicológicos após a cirurgia. Em relação ao prognóstico cognitivo, os pacientes que passaram por lobectomia temporal esquerda mostram declínio cognitivo maior do que os pacientes que passaram por lobectomia temporal direita. Também foi demonstrado neste estudo que os diferentes perfis cognitivos não mostraram relação com o controle de crises, ou seja, os resultados neuropsicológicos antes da cirurgia não são preditores adequados de controle de crises após a cirurgia. Estes diferentes perfis cognitivos encontrados antes da cirurgia podem estar associados ao processo de reorganização funcional do cérebro, secundário a epilepsia.

SÍNDROME DAS PERNAS INQUIETAS NA ATAXIA ESPINOCEREBELAR TIPO 3: PREVALÊNCIA E FATORES DETERMINANTES

Lívia Leite Goes Gitai

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Regina Maria França Fernandes
Tese de Doutorado apresentada em 23/10/2009

A síndrome das pernas inquietas (SPI) é uma desordem prevalente cuja fisiopatologia ainda não está bem esclarecida. A ataxia espinocerebelar tipo 3 (AEC 3) é uma doença neurodegenerativa que compromete várias áreas do sistema nervoso central (SNC) e periférico potencialmente envolvidas na fisiopatologia da SPI. Há evidências de maior prevalência de SPI na AEC 3, mas ainda não são conhecidos os fatores determinantes dessa associação. Nossa pesquisa objetivou determinar a prevalência de SPI em pacientes com AEC 3; verificar se os seguintes parâmetros exercem influência nessa prevalência: características dos pacientes, número de repetições CAG, características clínicas relacionadas à AEC 3, ferritina sérica, e alterações encefálicas detectadas por relaxometria ou *Voxel-based Morphometry* (VBM); estabelecer as características da macroestrutura do sono e dos movimentos periódicos de membros em pacientes com AEC 3 e estabelecer as características do teste de imobilização sugerida (TIS) em pacientes com AEC 3. Para isso foram submetidos à entrevista clínica, no período de fevereiro a agosto de 2006, 40 pacientes com AEC 3, diagnosticados e acompanhados no ambulatório de Neurogenética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP (HCFMRP) e 40 controles. Entre esses, 27 pacientes com AEC 3 e 16 controles foram submetidos, no período de fevereiro de 2006 a abril de 2009, a avaliação clínica detalhada, eletroneuromiografia, exames sanguíneos, polissonografia, TIS e ressonância magnética. A SPI está presente em 27,5% dos pacientes com AEC 3 e 2,5% dos controles normais ($p=0,003$). Os fatores significativamente relacionados à SPI em pacientes com AEC 3 foram sexo feminino, idade de início das manifestações da ataxia acima de 30 anos, presença de neuropatia periférica e presença de deficiência de ferro. Em relação aos controles, os pacientes com AEC 3 apresentam menor densidade de substância cinzenta em tronco cerebral e cerebelo, prolongamento do tempo de relaxometria em substância cinzenta e bulbo, tendência a encurtamento desse tempo em núcleos caudados ($p=0,08$), menor tempo total de sono, menor eficiência de sono, maior tempo de vigília, maior índice de microdespertar, maiores índices de movimentos periódicos de membros (iMPM) e maior iMPM no TIS. No grupo de pacientes com AEC 3, os pacientes com SPI apresentaram nível mais alto de escore máximo de desconforto no TIS em relação aos pacientes sem SPI. A associação entre SPI e AEC 3, portanto, existe e parece derivar de uma combinação de fatores cuja identificação pode melhorar a qualidade de assistência prestada a esses pacientes e contribuir para a compreensão sobre a fisiopatologia da SPI e mesmo da AEC 3.

CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E INVESTIGAÇÃO ETIOLÓGICA DE 29 PACIENTES BRASILEIROS COM FENÓTIPO DOENÇA DE HUNTINGTON-SÍMILE

Guilherme Gustavo Riccioppo Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. Vitor Tumas
Dissertação de Mestrado apresentada em 25/11/2009

A DH (Doença de Huntington) é uma doença neurodegenerativa caracterizada por movimentos involuntários, principalmente coreicos, associados a alterações cognitivas e comportamentais, herdada de forma autossômica dominante. É causada por expansões patológicas na sequência de tripletos (CAG)_n do gene *Htt*. Pacientes com quadro clínico compatível

com a DH porém sem a expansão CAG esperada são classificados como portadores de FDHS (Fenótipo Doença de Huntington-símile). O objetivo deste trabalho é realizar uma avaliação clínica e genética em uma população de pacientes com FDHS atendida no Ambulatório de doenças extrapiramidais do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. **Metodologia:** Todos os pacientes cujo DNA foi analisado para expansões no gene *Htt*, entre 1998 e 2006, tiveram seus prontuários revisados. Os pacientes foram então classificados em 3 grupos: 1) pacientes com DH; 2) pacientes com FDHS; 3) pacientes sem fenótipo sugestivo de DH. Os pacientes com FDHS foram reavaliados clínica e/ou laboratorialmente pesquisando-se mutações nos genes *ATNI* (DRPLA), *Htt* (expansões muito longas), *JPH3* (HDL2), *TBP* (SCA 17). Alguns pacientes também foram avaliados quando a presença de acantócitos no sangue periférico e níveis de ceruloplasmina. Os casos suspeitos para CAC (Coreoacantocitose) tiveram seus níveis de coreína dosados por *Western-blotting*. **Resultados:** Cento e oito pacientes foram submetidos ao teste de DNA no período de 1998 a 2006. Sete foram excluídos por dados insuficientes. Ao todo, 37 (36,6%) pacientes foram diagnosticados como DH e 29 (28,7%) como FDHS. Dos pacientes com FDHS, 3 (10,3%) apresentaram mutação no gene *JPH3* e 3 (10,3%) foram diagnosticados como CAC através da detecção de ausência da coreína. Nenhum caso de DRPLA ou SCA 17 foi diagnosticado. **Conclusão:** Em relação a estudos em outras populações, encontrou-se uma alta proporção de pacientes brasileiros com FDHS. Dentre as etiologias implicadas, a HDL2 aparenta ser a principal causa deste fenótipo no Brasil, devendo ser suspeitada em todo paciente afrodescendente com FDHS. A CAC também foi uma causa importante de FDHS, devendo ser suspeitada no paciente com FDHS associada à presença de acantócitos, elevação dos níveis de CPK, epilepsia e/ou sinais de doença neuromuscular. Ao contrário do observado em estudos prévios, que consideram a SCA17 a principal causa de FDHS, esta condição não foi causa de FDHS nos pacientes estudados.

AÇÃO ANTINOCICEPTIVA DO USO CRÔNICO DE MONOAMINAS EM MODELO EXPERIMENTAL DE NEUROPATIA PERIFÉRICA: UMA ANÁLISE DA PLASTICIDADE NEURAL ASSOCIADA À ATIVIDADE DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO CREB

Karina Previdelli

Orientador: Prof. Dr. Guilherme de Araújo Lucas

Dissertação de Mestrado apresentada em 27/11/2009

Neste trabalho investigamos o efeito do uso crônico de imipramina na fosforilação do fator de transcrição CREB (*cyclic AMP-responsive element-binding protein*) na coluna dorsal da me de camundongos submetidos à dor crônica de origem neuropática pela lesão de nervo periférico. O modelo de neuropatia periférica consistiu de ligação unilateral e parcial do nervo isquiático (modelo de Seltzer). Neste modelo, as alterações de sensibilidade aparecem de 24-48 horas após a cirurgia e os animais apresentaram hipersensibilidade ao estímulo mecânico (alodínia mecânica) e hipernocicepção ao estímulo térmico. Essas alterações de sensibilidade perduraram por, pelo menos, 3 meses. A partir do 7º dia após a lesão, os animais foram tratados com inibidor da recaptção de serotonina e noradrenalina, imipramina, em diferentes doses (5, 10 ou 30 mg/kg/dia; i.p.) ou salina (10 µl/gr; i.p.) durante 21 dias. O desenvolvimento da alodínia mecânica e da hiperalgesia térmica foi monitorado uma vez por semana, antes da injeção de imipramina e 24 horas após a administração da última dose do fármaco. O estado de fosforilação de CREB foi investigado por western blot e imunohistoquímica em extrato ou fatias da coluna dorsal da me lombar (L₄-L₆). A atividade de CREB foi monitorada 7 e 28 dias após a lesão e após o tratamento agudo e crônico com imipramina. Nos resultados mostram que a alodínia mecânica e a hipernocicepção térmica estavam presentes do 7º ao 28º dia após a ligação do nervo periférico ($p < 0,05$, teste não-paramétrico de Mann-Whitney). Entretanto, a administração de imipramina, reduziu, progressivamente, a hipersensibilidade ao estímulo mecânico e térmico a partir da primeira semana de tratamento. Após 21 dias de terapia as alterações de sensibilidade decorrentes da lesão do nervo periférico estavam completamente revertidas ($p < 0,05$, teste não-paramétrico de Mann-Whitney). Por outro lado, não observamos efeito antinociceptivo após a administração aguda de imipramina. Encontramos, ainda, que a fosforilação de CREB na coluna dorsal da me, ipsilateral à lesão, aumentou significativamente, no 7º e 28º dia após a lesão ($p < 0,05$, teste-*t de Student*). O tratamento crônico com imipramina, também, inibiu o aumento da atividade de CREB após lesão do nervo periférico ($p < 0,05$, teste-*t de Student*). Os resultados imunohistoquímicos sugerem que o efeito da lesão e do tratamento com imipramina ocorre em neurônios das camadas mais superficiais da me, onde a informação nociceptiva é inicialmente processada pelo sistema nervoso central. Observamos, ainda, que mesmo após a interrupção do tratamento crônico com imipramina, os animais apresentaram uma resposta comportamental ao estímulo mecânico semelhante aos padrões anteriores à lesão. Esses resultados sugerem que a administração crônica de imipramina produz mudanças no sistema sensorial cujo aparecimento é dependente do tempo de administração do fármaco. Esse fenômeno pode explicar, pelo menos parcialmente, por que o efeito clínico, antinociceptivo, apresenta uma latência de 2-3 semanas para aparecer. Nossos resultados evidenciam que o tratamento crônico com IRSN produz antinocicepção em condições de dor neuropática pela redução da transcrição de novas proteínas mediada por CREB.

ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DO NERVO RENAL EM RATOS DIABÉTICOS, TRATADOS OU NÃO COM INSULINA

Karina Laurenti Sato

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Valeria Paula Sassoli Fazan
Tese de Doutorado apresentada em 11/12/09

A inervação intrínseca dos rins de mamíferos tem sido extensivamente descrita na literatura, particularmente em ratos. Em contraposição, poucos estudos têm fornecido uma descrição detalhada da morfologia do nervo renal extrínseco dos rins. Os nervos renais extrínsecos são de interesse porque são sítios de registro da atividade simpática e estimulação elétrica em estudos funcionais. A indução do diabetes com streptozotocina (STZ) causa, em ratos, uma redução na velocidade de condução e do calibre dos axônios, sendo um dos modelos experimentais de diabetes mais largamente estudado. O objetivo do presente estudo foi descrever os parâmetros morfológicos e morfométricos do nervo renal extrínseco em ratos e determinar se estes parâmetros são afetados pelo diabetes experimental agudo e crônico e corrigidos pelo tratamento com insulina em ambas as fases. Foram utilizados os nervos renais esquerdos de ratos, após 15 dias (N=10) e 12 semanas (N=10) de indução do diabetes, com a injeção de STZ. Animais tratados com insulina 15 dias (N=10) ou 12 semanas (N=7), receberam uma dose de (10 u/kg) sub-cutânea de insulina ao dia. Animais controle receberam injeção de tampão 15 dias (N=10) ou 12 semanas (N=10), antes do experimento. A pressão arterial, juntamente com a atividade dos nervos renais, foi registrada, para certificar que os nervos estudados foram o nervo renal extrínseco. A seguir, os animais foram mortos e os nervos renais dissecados e preparado para a microscopia de luz e eletrônica, por técnicas convencionais de inclusão em resina epóxi. Interessantemente os parâmetros morfométricos das fibras mielínicas (área e diâmetro) foram significativamente maior nos animais diabéticos agudos tratados com insulina. Nas fibras amielínicas a densidade das fibras foi maior no grupo agudo controle e no grupo tratado com insulina crônico. Concluímos que nossos resultados não sugerem alterações nos nervos renais, diabéticos agudos. Diferente do que observamos nos nervos renais diabéticos crônicos nos quais há perda de fibras mielínicas finas. O tratamento com insulina não previne essa perda.

SÍNDROME DAS PERNAS INQUIETAS EM CRIANÇAS: PREVALÊNCIA, CARACTERÍSTICAS, IMPACTO NO SONO E NA QUALIDADE DE VIDA NO MUNICÍPIO DE CÁSSIA DOS COQUEIROS, SÃO PAULO, BRASIL

Heidi Hauelsen Sander

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Regina Maria França Fernandes
Tese de Doutorado apresentada em 17/12/2009

Introdução: Estudos epidemiológicos da Síndrome das Pernas Inquietas (SPI) em crianças são escassos, especialmente os que utilizaram os critérios do Grupo Internacional de Estudo de SPI (GIESPI). Recentemente nosso grupo determinou a prevalência de 7,7% de SPI em uma população adulta brasileira. O estudo PEDS-REST encontrou a prevalência de 2% em crianças. Nosso objetivo foi determinar a prevalência de SPI, qualidade de vida, qualidade de sono e caracterizar a apresentação da síndrome em crianças.

População e Métodos: O estudo foi conduzido no município de Cássia dos Coqueiros, uma cidade no interior do estado de São Paulo, Brasil. O estudo constou de duas fases: transversal e caso-controle. A população total, urbana e rural, era de 2706 habitantes, havendo 478 estudantes matriculados no ensino fundamental, com idade entre 5 e 17 anos no ano de 2007. As crianças regularmente matriculadas no ensino fundamental foram incluídas no estudo. As entrevistas foram realizadas por neurologista com experiência em medicina do sono entre janeiro e junho de 2008. O estudo epidemiológico consistiu de aplicação de questionário semi-estruturado, *face-to-face* incluindo dados demográficos. A SPI foi diagnosticada quando os critérios clínicos essenciais para SPI definitiva para crianças do GIESPI foram preenchidos. A prevalência de SPI foi calculada pela presença dos sintomas, a avaliação de sonolência excessiva diurna foi avaliada através da escala de *Epworth* modificada para crianças (SDE); a qualidade do sono através da aplicação do Questionário de Comportamento no Sono (QCS); a qualidade de vida através do Questionário sobre Qualidade de Vida em saúde - *Pediatric Quality of Life Inventory™* (PedsQL™). A intensidade dos sintomas foi avaliada pela aplicação do Questionário de Dor para Crianças - (*PedsQL™ pain questionnaire*), avaliação da presença de dor do crescimento (DC) pelo inquérito dos critérios de Peterson. Foi realizado exame clínico e neurológico, dosagem sérica de ferritina e exames bioquímicos. Um grupo controle de estudantes, pareado por idade e sexo, selecionado por sorteio aleatório, foi submetido ao mesmo protocolo de investigação, exceto a realização de exames bioquímicos e dosagem de ferritina.

Resultados: Foram entrevistados 383 indivíduos (taxa de participação de 80,12%), 50,1% meninas, 50% brancos,

idade entre 5 e 16 anos. A prevalência de SPI encontrada foi de 6,3 % (24 crianças); sexo feminino foi mais afetado (67%), (RP=1,99). As crianças com SPI tinham média de idade superior à da população geral (11,5+2,32 vs 9,98+2,52, $p<0,005$). O diagnóstico de dor do crescimento (DC) no grupo de SPI foi semelhante ao da população geral ($p<0,52$). Quando comparados os grupos SPI e controle, as crianças com SPI apresentaram maiores escores na SDE (6,86+2,90 vs 4,82+4,55, $p<0,089$), QCS (53,91+9,38 vs 47,6+10,88, $p<0,047$), com maior dificuldade em reconciliar o sono após despertar a noite por mais de 30 minutos ($p<0,037$), mais movimentação excessiva durante o sono ($p<0,0001$) e maior dificuldade em permanecer acordado conversando com alguém pela manhã ($p<0,063$) e menores escores no PedsQLTM (69,76+14,80 vs 81,91+10,44, $p<0,003$). A avaliação da intensidade dos sintomas de SPI pelo PedsQLTMPQ mostrou que 63% das crianças apresentavam-se assintomáticas no momento da entrevista. Os valores de ferritina sérica foram abaixo de 75 ng/dl em 19/21 casos das crianças com SPI. Houve uma correlação negativa entre os valores de ferritina e os escores na escala de Epworth ($r=-0,59$, $p<0,01$). A história familiar para SPI foi positiva em 92% dos pacientes.

Conclusão: O presente estudo permitiu concluir que em uma cidade brasileira, com população mista (rural de 30% e urbana de 60%), entre crianças de 5 a 16 anos de idade, a prevalência da SPI foi de 6,3%, sendo que as meninas foram duas vezes mais afetadas do que os meninos. Também observou-se uma pior qualidade de sono, pior qualidade de vida, a associação entre hereditariedade e baixos níveis de ferritina nas crianças portadoras de SPI. Estudos populacionais maiores são necessários para melhor caracterização de SPI na população pediátrica.

Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço

ESTUDO EXPERIMENTAL SOBRE A CONTAMINAÇÃO POR VÍRUS NO INSTRUMENTAL CIRÚRGICO DA FACOEMULSIFICAÇÃO

Tatiana Vannucci Garcia

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pinto Coelho

Dissertação de Mestrado apresentada em 14/10/2009

Objetivos: Verificar a ocorrência de contaminação pelo vírus *Piry* no instrumental cirúrgico da facoemulsificação através das técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase precedida por Transcrição Reversa (RT-PCR) e de Reação em Cadeia da Polimerase com iniciadores internos precedida por Transcrição Reversa (RT-Nested-PCR).

Materiais e Métodos: Foi realizado um modelo experimental utilizando-se quatro olhos de porcos contaminados através de parectese de câmara anterior pelo vírus *Piry* e quatro olhos de porcos não contaminados. Após a contaminação dos olhos de porcos, foram realizadas cirurgias de catarata utilizando-se a técnica de facoemulsificação, alternando-se entre um olho contaminado e outro não contaminado. Entre as cirurgias eram trocados os campos operatórios, as luvas, o bisturi de 2,75mm, as pinças, as agulhas, as seringas, as ponteiras da caneta e o saco coletor do facoemulsificador, mantendo-se a caneta e as vias de irrigação e aspiração.

Resultados: As reações de RT-PCR não apresentaram resultados satisfatórios e não foram analisados. Nas reações de RT-Nested-PCR, todos os olhos contaminados apresentaram resultados positivos (4/4) e todos os não contaminados apresentaram resultados negativos (4/4). No saco coletor, três amostras dos olhos contaminados (3/4) foram positivas e em duas amostras (2/4) de olhos não contaminados também foram positivas; na ponteira, em uma amostra de olhos contaminados (1/4) e em duas amostras de olhos não contaminados (2/4), os resultados foram positivos; na via de irrigação foi positiva uma amostra de olhos não contaminados (1/4) e em nenhuma dos olhos não contaminados (0/4); na via de aspiração foram positivas duas amostras de olhos não contaminados (2/4) e duas de olhos contaminados (2/4); nas amostras das luvas, duas amostras de olhos não contaminados (2/4) e duas de olhos contaminados (2/4) foram positivas; nas amostras dos bisturis, três amostras de olhos contaminados (3/4) foram positivas e em nenhuma dos olhos não contaminados (0/4); duas amostras da câmara anterior dos olhos não contaminados colhidas após a cirurgia também foram positivas (2/4).

Conclusões: A metodologia de RT-PCR não se mostrou adequada para a identificação de material genético do *Vesiculovirus Piry* neste modelo experimental e, portanto, esses resultados não foram analisados. Ao contrário, a metodologia de RT-Nested-PCR mostrou-se adequada. Foi possível detectar a presença de material genético viral por meio da técnica de RT-Nested-PCR em todos os níveis pesquisados, demonstrando assim, que todos os componentes do facoemulsificador ficaram contaminados após a cirurgia de catarata de um olho contaminado com o vírus *Piry*. Além disso, em dois olhos não contaminados pode-se detectar a presença de material genético viral após a cirurgia de catarata através da facoemulsificação, demonstrando que em algum momento da cirurgia houve a transmissão de material genético do vírus *Piry* para esses olhos não contaminados.

ANÁLISE DOS EFEITOS DA DIREÇÃO DO BISEL DA CANETA DE FACOEMULSIFICAÇÃO NO ENDOTÉLIO CORNEAL

Eduardo Raskin

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pinto Coelho

Dissertação de Mestrado apresentada em 19/10/2009

O estudo compara a extensão da perda das células endoteliais corneais em dois grupos de olhos submetidos à cirurgia de facoemulsificação. O primeiro grupo de olhos (G 1) foi submetido à técnica cirúrgica tradicional, em que se direciona a abertura do bisel da ponteira de facoemulsificação para o endotélio corneal. No segundo grupo (G 2) foi utilizada a técnica oposta no olho contralateral, em que a reversão da posição de abertura permite o direcionamento da energia de emulsificação para o núcleo.

Este estudo prospectivo foi realizado em 25 pacientes com catarata bilateral, que foram submetidos à cirurgia para remoção de catarata por meio da técnica de facoemulsificação. As cataratas foram classificadas clinicamente pelo seu grau de dureza. Foram estudados os seus efeitos sobre a córnea e as possíveis complicações. O trabalho foi dividido em quatro tempos: pré-operatório, 1, 3 e 6 meses de pós-operatório. Após as cirurgias foram estudados: perda endotelial, tempo total de cirurgia, tempo efetivo de faco e paquimetria central.

Os resultados mostraram dois grupos homogêneos, com tempo médio de cirurgia: G 1 = 10 minutos (DP=2,46) e G 2 = 9,86 (DP=2,17) ($p=0,6267$ - teste t-pareado), tempo efetivo médio de facoemulsificação: G 1 = 8,1 segundos (DP=6,8) e G 2 = 7,0 (DP=5,8) ($p=0,1792$ - teste t-pareado). Após seis meses de acompanhamento, a perda média de células endoteliais foi de 11,1% e 8,55%, respectivamente, revelando significância estatística. As complicações foram semelhantes nos dois grupos. O estudo concluiu que a variação da manobra apresentada é segura e pode minimizar as perdas no endotélio corneal, podendo ser uma opção na cirurgia da catarata, de acordo com as preferências pessoais do cirurgião.

ESTUDO COMPARATIVO DO RINGER LACTATO *versus* BSS PLUS PARA CIRURGIA DE CATARATA POR FACOEMULSIFICAÇÃO

David da Rocha Lucena

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Jorge

Dissertação de Mestrado apresentada em 22/10/2009

Objetivo: Duas soluções de irrigação intra-ocular (BSS *Plus versus* Ringer Lactato) foram comparadas neste estudo prospectivo, randomizado e mascarado para avaliar as diferenças na preservação da integridade da córnea após a cirurgia de catarata por facoemulsificação.

Métodos: Cento e dezenove pacientes submetidos à facoemulsificação foram randomizados para a cirurgia com a Solução Salina Balanceada (BSS *Plus*) ($n = 59$) ou Ringer Lactato como solução de irrigação ($n=60$). Os pacientes se submeteram a avaliações oftalmológicas no pré-operatório e no 1°, 8°, 15°, 30° e 60° dias de pós-operatório. A avaliação incluiu a melhor acuidade visual corrigida pela tabela de Snellen, microscopia especular e paquimetria corneana. As principais medidas de seguimento incluíram a densidade de células endoteliais (DCE) e a espessura central da córnea (ECC).

Resultados: Cem pacientes completaram todas as visitas do estudo. Os grupos de tratamento foram semelhantes em relação à densidade do cristalino, acuidade visual pré-operatória, ao tempo de facoemulsificação e volume da solução de irrigação empregado durante a cirurgia. A média da DCE (\pm DP) pré-operatória foi 2836 ± 355 céls/mm² e 2728 ± 501 céls/mm² nos Grupos BSS *Plus* e Ringer Lactato, respectivamente, ($p=0,1092$). A média da DCE estava significativamente reduzida ($p<0,05$) em ambos os grupos no 1°, 8°, 15°, 30° e 60° dias de pós-operatório. Não houve diferença significativa entre os grupos na média da DCE em todas as visitas do estudo ($P>0,05$). A média da ECC (\pm DP) pré-operatória foi $516 \pm 4\mu\text{m}$ e $513 \pm 4\mu\text{m}$ nos Grupos BSS *Plus* e Ringer Lactato, respectivamente, ($p=0,3364$). A média da ECC estava significativamente aumentada em ambos os grupos no 1°, 8°, 15° e 30° dias de pós-operatório ($p<0,05$), retornando aos valores basais aos 60 dias. Não houve diferença significativa entre os grupos na média de ECC em todas as visitas do estudo ($P>0,05$). Não houve nenhum caso de endoftalmite durante o estudo.

Conclusões: As alterações na córnea depois da cirurgia de catarata por facoemulsificação foram semelhantes, independentemente, se BSS *Plus* ou Ringer Lactato foram usados como solução de irrigação.

INFLUÊNCIA DO SABOR NA DEGLUTIÇÃO DE PACIENTES COM SEQUELA DE ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO

Leda Maria Tavares Alves

Orientador: Prof.Dr. Roberto Oliveira Dantas

Dissertação de Mestrado apresentada em 19/11/2009

Aproximadamente 25% a 50% dos acidentes vasculares encefálicos resultam em disfagia orofaríngea. Nosso objetivo foi avaliar a deglutição com bolos de diferentes sabores em pacientes com alterações neurológicas provocadas por acidente vascular encefálico. Nossa hipótese é de que o sabor do bolo deglutido possa influenciar na deglutição desses pacientes. Estudamos 36 pacientes, 21 homens e 15 mulheres, com idades entre 44 e 82 anos (média 63 anos) com antecedentes da ocorrência de AVE, de 1 mês a 7 anos, (mediana: 5,5 meses), e de 30 sujeitos no grupo controle, sendo 13 homens e 17 mulheres, com idades entre 33 e 85 anos (média 59 anos), sem sintomas. Foi realizada entrevista com questões direcionadas ao paciente e/ou cuidador. Posteriormente, foram realizadas duas etapas da avaliação clínica: estrutural e funcional. Após a avaliação clínica, os indivíduos foram submetidos à avaliação cintilográfica da deglutição. Foram oferecidos volumes de 5 mL de líquido com 4 sabores diferentes (Doce, Amargo, Azedo e Neutro), em sequência previamente sorteada. As avaliações fonoaudiológicas demonstraram que um número elevado de pacientes com AVE usavam próteses dentárias, em um estado de conservação ruim e com má higienização oral, dificuldade na sensibilidade extra oral, na abertura da boca, na deglutição de saliva, além de uma diminuição da força e mobilidade de língua, postura inadequada durante a deglutição, vedamento labial alterado e ruídos cervicais alterados. Em relação à avaliação cintilográfica da deglutição observamos que os tempos de trânsito, resíduo e depuração oral e faríngea foram maiores nos pacientes com AVE do que nos controles. Nos pacientes com AVE houve mais erros na percepção dos sabores amargo e azedo. Os pacientes com AVE apresentaram mais frequentemente disfagia do que os controles, durante o exame cintilográfico. Nos controles, o trânsito e a depuração no esôfago proximal foi mais rápido com o sabor azedo do que os outros sabores. No esôfago distal, o trânsito e a depuração foram mais longos com o sabor azedo. No esôfago médio o resíduo foi maior com o sabor azedo do que com o sabor neutro, e no esôfago distal o sabor azedo provocou maior quantidade de resíduo. No grupo com AVE os sabores não influenciaram o tempo de entrada no esôfago proximal, o trânsito e a depuração em esôfago proximal, o trânsito em esôfago médio e a quantidade de resíduo em todo o esôfago. No esôfago médio e no esôfago distal, a depuração foi mais longa com sabor azedo, sendo que no esôfago distal o trânsito foi mais longo com o sabor azedo do que com os outros sabores. Concluímos que há diferença nas fases oral e faríngea da deglutição de pacientes com AVE comparado a controles. Os pacientes com AVE acumulam mais resíduos do material deglutido em esôfago distal do que controles. Os sabores não demonstraram influenciar a deglutição da população estudada nesta pesquisa.

ADMINISTRAÇÃO ORAL DO MIDAZOLAM OU DIAZEPAM ASSOCIADOS OU NÃO À CLONIDINA EM CIRURGIA PALPEBRAL COM ANESTESIA LOCAL: EFEITO NO POSICIONAMENTO E EXCURSÃO DA PÁLPEBRA SUPERIOR E EM ALGUNS PARÂMETROS CARDIORRESPIRATÓRIOS

Victor Marques de Alencar

Orientador: Prof. Dr. Antonio Augusto Velasco e Cruz

Tese de Doutorado apresentada em 23/11/2009

Objetivo: Avaliar o efeito de quatro regimes diferentes de sedação oral em pacientes submetidos à cirurgia de pálpebra inferior sob anestesia local, com respeito ao posicionamento da pálpebra superior, nível de sedação, à pressão arterial sistólica e diastólica, frequência cardíaca e saturação de oxigênio. **Casuística e Método:** Oitenta e dois pacientes com risco cirúrgico, classificados em ASA I e ASA II, submetidos à cirurgia de pálpebra inferior sob anestesia local foram divididos em cinco grupos de acordo com a medicação oral administrada antes da cirurgia: Grupo 1 (G1) 10mg de diazepam (17 pacientes: 5 homens e 12 mulheres, com idade média de $62,3 \pm 14,3$ SE anos); Grupo 2 (G2) 10mg de diazepam + 0,15mg de clonidina (18 pacientes: 7 homens e 11 mulheres, com idade média de $58,8 \pm 17,5$ SE anos), Grupo 3 (G3) midazolam 15mg (16 pacientes: 4 homens e 12 mulheres, com idade média de $55,6 \pm 7$ SE anos), Grupo 4 (G4) midazolam 15mg + clonidina 0,15mg, (17 pacientes: 6 homens e 11 mulheres, com idade média de $59,9 \pm 8,5$ SE anos e o Grupo 5 (G5), o grupo controle, que não recebeu medicamento. Antes da cirurgia e uma hora após a administração das drogas sedativas e ao final da cirurgia foram medidas em todos os pacientes: a) pressão sistólica e diastólica, b) frequência cardíaca, c) saturação de oxigênio, d) distância da margem palpebral superior ao reflexo pupilar (DCPM). Para todos os pacientes, o nível de sedação foi avaliado no início da cirurgia e mensurado através da Escala de Sedação da Universidade de Michigan. Dependendo da

natureza da variável, comparações múltiplas foram realizadas com ANOVA paramétrica associada ao teste de Tukey-Kramer ou não paramétrica (Kruska-Wallis) associada ao teste de Dunn. Para comparações de dois grupos, foi utilizado o teste-t ou o teste de Wilcoxon. **Resultados:** O nível de sedação foi significativamente mais pronunciado com o midazolam (mediAna de escore = 2) do que com diazepam (mediAna de escore = 1). A clonidina aumentou ligeiramente o nível de sedação de ambos. A queda de pressão arterial com midazolam associado ou não à clonidina foi significativamente maior do que com diazepam. O valor médio da variação da distância da margem palpebral superior (-1,87mm) foi maior quando a clonidina foi associada ao midazolam. As mudanças observadas em todos os parâmetros sistêmicos não foram diferentes entre os grupos. Baixa de saturação de O₂ (<85%) foi observada em três pacientes (1 no G3 e outros 2 no G4) e foi controlada somente com a administração de O₂. Não foi necessária intervenção anestesiológica em nenhuma das cirurgias. **Conclusão:** O midazolam (15mg) foi a droga sedativa que induziu o maior nível de sedação e quando associado à clonidina provocou a maior diminuição na DCPM (média de 1,87mm). A associação da clonidina aos agentes benzodiazepínicos diminui a resposta hipertensiva sistólica. Não houve dessaturação de oxigênio com nenhuma das drogas estudadas.

TRANSPLANTE DE TRAQUÉIA COM RETALHO MICROCIRÚRGICO NEOVASCULARIZADO

Alexan Icibaci

Orientador: Prof. Dr. Francisco Veríssimo de Mello-Filho
Tese de Doutorado apresentada em 27/11/2009

Objetivo: Testar a viabilidade de um autotransplante traqueal com uma técnica original usando um retalho pré-fabricado de um segmento traqueal completo neovascularizado (STCNV) com o músculo esternoióideo (ME) Anastomosado por técnica microcirúrgica. **Material e Métodos:** Foi realizado estudo experimental utilizando cães como modelo animal. Dez cães com peso de 23 a 40Kg foram divididos em dois grupos: Grupo 1 (controle), cinco cães submetidos ao autotransplante do STCNV sem Anastomose vascular microcirúrgica, e Grupo 2, cinco cães submetidos ao autotransplante do STCNV com Anastomose vascular microcirúrgica do pedículo do músculo esternoióideo. **Resultados:** Todos os cães do Grupo 1 evoluíram com insuficiência respiratória devido à necrose e estenose do STCNV, sendo sacrificados, e um animal faleceu, enquanto todos os cães do Grupo 2 completaram um período mínimo de 90 dias de observação, sem apresentar alterações clínicas. A análise macro e microscópica dos animais do Grupo 2 revelaram as estruturas traqueais intactas. **Conclusão:** Os presentes achados morfológicos e clínicos demonstram que o autotransplante do STCNV é viável quando a Anastomose vascular microcirúrgica é realizada.

ELETROCOCLEOGRAFIA EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE DIABETES MELLITUS TIPO 2

Ariane Solci Bonucci

Orientador: Prof. Dr. Miguel Angelo Hyppolito
Dissertação de Mestrado apresentada em 09/12/2009

A Diabetes Mellitus (DM) e a perda auditiva são problemas de saúde que acometem grande parte da população, assim sendo, é de fundamental importância investigar a correlação entre elas. O objetivo do presente estudo foi verificar as alterações na função auditiva causada pela DM2, refletidas na eletrococleografia (EcoG) e comparar os resultados com o grupo controle. Foram avaliados 26 indivíduos diabéticos tipo 2 e 23 indivíduos do grupo controle, com idade entre 20 a 50 anos. As avaliações realizadas foram: audiometria tonal limiar, imitanciométrica e EcoG. Observou-se pelo questionário aplicado e análise dos prontuários que a maioria dos indivíduos não apresentou as complicações diabéticas retinopatia, nefropatia, neuropatia e doenças cardiovasculares. Porém, encontrou-se estatística significativa para a variável nefropatia e a razão PS/PA na EcoG. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os medicamentos (insulina e/ou orais) utilizados pelos pacientes e os exames de sangue de glicemia e hemoglobina glicada quando comparados com os resultados da EcoG. Na avaliação audiométrica, constatou-se que apenas 8% dos pacientes diabéticos tinham perda auditiva plAna de grau leve do tipo sensorineural bilateral. Todos os indivíduos do grupo controle apresentavam audição dentro da normalidade. Na EcoG, foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre as variáveis ms PS/PA, μV PS/PA, ms PS e ms PA. O grupo experimental apresentou a razão PS/PA mais elevada quando comparada ao grupo controle. Foi observado um aumento anormal da razão PS/PA em oito pacientes diabéticos. Diante de tais resultados, são fundamentais os acompanhamentos otorrinolaringológico e fonoaudiológico periódicos desses pacientes, visando uma detecção precoce da perda auditiva, bem como, as orientações necessárias quanto à sua prevenção.

FORÇA DE MORDIDA E DE LÍNGUA NAS DEFORMIDADES DENTOFACIAIS

Janaina Bueno da Silva

Orientadora: Profa. Dra. Luciana v. Voi Trawitzki

Mestrado 09/12/2009

As deformidades dentofaciais são consideradas problemas graves de maloclusões e quando comparadas a indivíduos normais apresentam valores menores de força de mordida. O objetivo do presente estudo foi verificar se a deformidade dentofacial influencia na força de mordida isométrica máxima (FMIM) e na força de língua isométrica máxima (FLIM), comparativamente a um grupo-controle em relação ao gênero, ao lado de mordida para FMIM e regiões de língua (porção anterior e dorso) para a FLIM, ao padrão classe II e classe III e ao Índice de Massa Corpóreo (IMC). Participaram do estudo, voluntariamente, 125 pacientes, adultos, atendidos em um hospital terciário, 44 deles com o diagnóstico confirmado de classe II, 13 homens e 31 mulheres, média de idade de 27 anos, nomeados GII e 81 pacientes classe III, 35 homens e 46 mulheres, média de idade de 25 anos, nomeados GIII, todos com indicação de cirurgia ortognática. Também participaram do trabalho 50 voluntários adultos, 17 homens e 33 mulheres, média de idade de 22 anos, sem alterações na oclusão dentária e sem sinais clínicos de disfunção da ATM, formando o grupo controle (GC). As medidas de FMIM foram feitas por meio de um dinamômetro eletrônico, posicionado na região dos dentes molares dos indivíduos, nos dois lados da arcada dentária, alternadamente, e os indivíduos foram instruídos a mordê-lo o mais forte possível, sendo o valor registrado em kgf. O mesmo equipamento foi utilizado para investigação da FLIM, posicionado na região retroincisiva para avaliar a força da porção anterior e posicionado na região do palato duro, para mensuração da força de dorso da língua. Ao voluntário foi solicitada a aplicação da força máxima. Foram selecionados indivíduos com boa compreensão da linguagem oral, sem déficits cognitivos e neuromusculares. Na análise estatística foi utilizado o Modelo de Efeitos Mistos e o Teste de Correlação de Pearson. O gênero influenciou na FMIM, tanto em indivíduos-controles quanto naqueles com deformidades dentofaciais. Os homens apresentaram os valores maiores de FMIM. Em relação à FLIM, os homens sem a deformidade dentofacial apresentaram valores maiores de força comparados às mulheres, em ambas as regiões. Entretanto, nos indivíduos com deformidade dentofacial, notou-se diferença significativa ($p < 0,05$) em apenas uma das regiões. Para a FLIM, houve diferença entre os gêneros no grupo GII, região de dorso, GIII região anterior e GC em ambas as regiões de língua ($p < 0,05$). Houve diferença entre os lados para a FMIM ($p < 0,05$), sendo observados valores maiores de força no lado esquerdo para o GII em ambos os gêneros e para os grupos GIII e GC no gênero feminino. A região da língua influenciou na FLIM visto que na região do dorso foram observados valores maiores comparados à região anterior da língua para todos os grupos estudados. Não houve diferença ($p > 0,05$) nos valores de FMIM e de FLIM entre as diferentes deformidades dentofaciais (classe II e classe III), entretanto, seus valores foram menores do que os valores dos indivíduos-controles, o que indica que a deformidade (independente do seu padrão) influenciou nessas forças. Não houve influência do IMC na FMIM, nem na FLIM, em nenhum dos grupos estudados.

Ortopedia, Traumatologia e Reabilitação

USO DE LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE NA VIABILIDADE DO RETALHO CUTÂNEO EM RATOS SUBMETIDOS À AÇÃO DELETÉRIA DA NICOTINA

Lais Mara Siqueira das Neves

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Thomazini

Dissertação de Mestrado apresentada em 21/10/2009

Na área da Cirurgia Plástica estética e reparadora, utilizam-se frequentemente retalhos cutâneos, onde a necrose é a principal complicação que pode levar ao insucesso no tratamento. Diversos autores pesquisaram o efeito deletério da fumaça do cigarro ou da nicotina isoladamente sobre os retalhos de pele, com comprovado aumento da área de necrose no retalho. Assim, o objetivo deste estudo foi o de investigar o efeito do laser diodo 830nm (36 J/cm^2) como bloqueador dos efeitos da nicotina na viabilidade do retalho cutâneo randômico experimental. Foram utilizados 24 ratos albinos - *Wistar*, distribuídos aleatoriamente em 3 grupos de 8 animais: Grupo 1 - (controle) submetido à técnica cirúrgica para obtenção dos retalhos cutâneos randômicos de base cranial, os quais sofreram simulação da irradiação laser de diodo para verificar se há interferência física do transdutor, e injeção subcutânea de solução salina cloreto de sódio; Grupo 2 - similar ao grupo 1,

com injeção subcutânea de nicotina em uma dose de 2mg/Kg/dia, uma semana antes e uma semana após o procedimento cirúrgico; Grupo 3 - similar ao grupo 2, cujos retalhos cutâneos randômicos de base cranial foram submetidos à irradiação do laser de diodo 830nm. A aplicação do laser ocorreu imediatamente após a cirurgia e nos 4 dias subsequentes. Após a eutanásia, as áreas de necrose e de tecido viável foram examinadas e avaliadas através de duas técnicas de morfometria, uma manual (gabarito de papel) e outra semi-automática (Mini-Mop®). Também foram contados os vasos sanguíneos prévios em uma área pré-definida do retalho. Os resultados foram analisados através do teste ANOVA e pós-teste Método de Contraste Ortogonais. Os valores de porcentagem de área de necrose média no método Gabarito de Papel do Grupo 1 (controle) foi 47,41%, no Grupo 2 (nicotina) foi 52,69% e no Grupo 3 (nicotina + laser 830nm) foi 43,24%. Em relação ao método Mini-Mop®, os valores de porcentagem de área de necrose média do Grupo 1 (controle) foi 43,69%, no Grupo 2 (nicotina) foi 51,08% e no Grupo 3 (nicotina + laser 830nm) foi 39,56%. A média da contagem de vasos sanguíneos do grupo 1 (controle) foi de 31 vasos, no grupo 2 (nicotina) foi de 17,1 vasos e no grupo 3 (nicotina + laser 830nm) foi de 29,7 vasos. Estes resultados, mostraram que o uso do laser foi eficaz, promovendo uma diminuição da área de necrose dos ratos submetidos a nicotina, tornando-os semelhantes ao grupo controle. E, quanto menor a área de tecido necrótico, maior foi o número na contagem de vasos sanguíneos do retalho.

ESTUDO DO ÂNGULO DE TORÇÃO DO RÁDIO POR MEIO DA TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA

Luiz Fernando Pinheiro de Freitas

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Henrique Barbieri

Dissertação de Mestrado apresentada em 30/10/2009

Objetivo: descrever um novo método para medir o ângulo de torção do rádio, que seja reproduzível e aplicável à correção de deformidades rotacionais do antebraço. **Método:** O estudo foi conduzido com 12 pares de raios descarnados e 116 antebraços de 58 voluntários (32 homens, 26 mulheres, idade média: 34,18 anos), todos submetidos à tomografia computadorizada para estudo do ângulo de torção do rádio, pela superposição de cortes tomográficos obtidos das suas extremidades proximal e distal, nos quais foram determinadas duas linhas de referência, uma passando numa projeção diametral pela tuberosidade radial e a outra tangente à superfície volar do rádio, tão próximo quanto possível do osso subcondral da superfície articular. Os ângulos foram medidos por três observadores, em duas ocasiões diferentes e comparados entre si. **Resultados:** Nos ossos descarnados, o ângulo médio de torção do rádio esquerdo foi de 1,62° (variação: -6° -8°) e do rádio direito, de 1,48° (variação: -6° -9°); a diferença média foi de 1,61° (variação: 0° -8°), sem significância estatística. Nos voluntários, o ângulo médio de torção foi de 3° (variação: -17° - 17°) à direita e 2,91° (variação: -16° -15°) à esquerda; a diferença média entre os lados foi de 1,58° (variação: 0° -7°), sem significância estatística. Houve forte correlação entre as medidas obtidas pelos três observadores. **Conclusão:** O método descrito, estudado tanto em ossos de cadáver como em voluntários, é de fácil execução e reproduzível, baseado que está em parâmetros anatômicos de mais fácil detecção, mesmo quando a tuberosidade radial não está perfeitamente visível.

USO DO MÉTODO DE ELEMENTOS FINITOS NA ANÁLISE BIOMECÂNICA DE PARAFUSOS DO SISTEMA DE FIXAÇÃO VERTEBRAL

Ana Paula Macedo

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Shimano

Dissertação de Mestrado apresentada em 09/11/2009

O parafuso como elemento de ancoragem de sistemas de fixação vertebral já é há muito utilizado. Porém a forma de distribuição da tensão gerada por ele na região de ancoragem não está ainda bem clara. O método de elementos finitos (MEF) é um método matemático desenvolvido no século passado e permite, quando em um estudo estático, avaliar reações internas de estruturas ao se aplicar uma força. Este estudo teve por objetivo analisar as tensões e deformações internas geradas por parafusos do sistema de fixação vertebral por meio do MEF. Os parafusos USS1 de 5, 6 e 7 mm de diâmetro e 45 mm de comprimento (Grupo 1 - G1, Grupo 2 - G2 e Grupo 3 - G3) e os parafusos USS2 anterior, USS2 posterior de 6,2mm de diâmetro e USS1 de 6 mm de diâmetro e 30 mm de comprimento (Grupo 4 - G4, Grupo 5 - G5 e Grupo 6 - G6) foram utilizados neste estudo. Para validação dos modelos foram utilizados: ensaio mecânico de arrancamento do parafuso em corpos de

prova de poliuretana com densidade de 0,16 g/cm³ e resultados de ensaios de arrancamento encontrados na literatura. Foi confeccionado um modelo tridimensional para cada conjunto parafuso e poliuretana estudado no programa SolidWorks®2006. Foram confeccionados 30 corpos de prova em poliuretana para validação de G1, G2 e G3, sendo 10 corpos de prova para cada grupo. O orifício piloto foi realizado por broca de 3,8 mm para G1 e 4,8 mm para G2 e G3. Os modelos dos grupos G4, G5 e G6 foram validados por resultados encontrados na literatura de ensaios em poliuretana de mesma densidade e orifício piloto realizados por sonda de 3,8 mm para G4 e G5 e 4,8mm para G6. A análise pelo método de elementos finitos, foi realizada no programa ANSYS®Workbench 10.0. A validação foi obtida pela comparação da rigidez relativa obtida no ensaio mecânico e o resultado da simulação pelo MEF. Foram encontradas divergências de 8,3% para G1, 3,1% para G2, 0,5% para G3, 14,4% para G4, 9,5% para G5 e 10,3% para G6, sendo todas consideradas aceitáveis. Validados os modelos, os grupos G4 e G6, utilizados na fixação anterior, foram submetidos à força de compressão, tração e dobramento lateral. Os grupos G5 e G6, empregados na fixação posterior, foram submetidos à força de compressão, tração, flexão e extensão. Na fixação anterior as menores tensões foram encontradas para G4 e as maiores para G6 para todas as forças aplicadas. Na fixação posterior as menores tensões foram encontradas para G5 e as maiores para G6 para todas as forças aplicadas. As maiores tensões foram geradas ao se realizar o dobramento lateral na fixação anterior e a extensão na fixação posterior.

DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE ACOPLAMENTO PARA PARAFUSOS DE INTERFERÊNCIA NA CIRURGIA LIGAMENTAR DO JOELHO: ENSAIOS BIOMECÂNICOS E APLICAÇÃO CLÍNICA

Aloísio Fernandes Bonavides Júnior

Orientador: Prof. Dr. Maurício Kfuri Júnior

Tese de Doutorado apresentada em 19/11/2009

Este trabalho teve como objetivo apresentar o desenvolvimento de um sistema de acoplamento solidário entre parafuso de interferência e chave de inserção para cirurgias ligamentares do joelho. Foi buscada a validação deste desenvolvimento em um estudo biomecânico e clínico. O novo sistema, denominado FMRP, é constituído por três componentes sendo eles: uma chave em T, um elemento de interfixação e um parafuso modificado de tal forma que sua cabeça tem o formato de um hexágono externo, com rosca interna à esquerda, para permitir a conexão solidária da chave. Ensaios biomecânicos de arrancamento realizados em madeira e em osso bovino compararam o sistema FMRP a um sistema bastante utilizado na prática clínica (Acufex®). Ensaios biomecânicos de torção avaliaram a inserção dos parafusos em osso bovino e a força máxima de torção à qual resistiram os parafusos. Testes estatísticos de *Mann-Whitney* foram aplicados aos resultados obtidos e a análise dos dados procedida pelo *software SPSS versão 15.0*. Estudo clínico foi planejado para avaliar se as vantagens teóricas atribuídas ao novo sistema se confirmariam na prática. Neste estudo, 101 pacientes foram submetidos à reconstrução do ligamento cruzado anterior por artroscopia, operados exclusivamente pelo autor desta tese, em caráter prospectivo, seguindo critérios pré-determinados de inclusão e exclusão. 84 pacientes se tornaram aptos a participar deste estudo, por preencherem todos os critérios de seleção. Todos eles foram acompanhados por um período mínimo de dois anos de pós-operatório e avaliados pelo autor da tese, utilizando os protocolos de avaliação funcional IKDC e Lysholm. Nos resultados dos ensaios de arrancamento na madeira, considerando $p \leq 0,05$, não houve diferença significativa entre os parafusos do estudo e os parafusos controle no tocante à força máxima de arrancamento, rigidez e energia. Nos ensaios de arrancamento em bovinos, considerando $p \leq 0,05$, houve diferença significativa, com valores superiores para o parafuso controle em relação ao parafuso do estudo nos seguintes parâmetros: força máxima de arrancamento ($p=0,04$), deformação máxima ($p=0,001$) e energia ($p=0,008$). Não houve diferença significativa quanto à rigidez ($p=0,11$). Não houve diferença significativa nos valores médios do torque máximo de inserção entre os dois tipos de parafusos ($p=0,12$). O torque de inserção apresentou correlação alta com a força máxima de arrancamento nos parafusos do estudo ensaiados ($r=0,86$ e $p=0,001$). Nos ensaios de torção avaliamos 2 grupos: os do estudo e os parafusos controle. Considerando $p \leq 0,05$, o grupo de parafuso do estudo não diferiu significativamente dos grupos de parafuso controle, tanto para deformidade angular quanto para torque máximo. O comportamento mecânico do parafuso de interferência do estudo foi similar ao parafuso de interferência controle nos ensaios de arrancamento na madeira e nos ensaios de torção, mas variou nos ensaios de arrancamento nos bovinos. Não houve diferença significativa entre valores do torque máximo de inserção entre as duas marcas de parafuso avaliadas. Na avaliação clínica com os parafusos do estudo obtivemos, no seguimento de dois anos ou mais, os seguintes resultados: valor médio de Lysholm igual a 96,64, e 95,2% dos pacientes operados apresentaram resultados normais e subnormais no IKDC. Em quatro pacientes houve quebra por fadiga no sistema, sendo uma na chave e três no elemento de interfixação no momento da fixação do enxerto no fêmur. Concluiu-se que os valores altos encontrados na avaliação biomecânica para os parafusos do

estudo ofereceram confiabilidade para aplicação na prática cirúrgica. Não houve influência da quebra do material ou outras complicações nos escores do IKDC e Lysholm. O parafuso concebido permitiu fixação segura. O instrumental foi adequado para evitar a perda de parafuso na articulação em todos os pacientes da série.

EFEITOS MORFOLÓGICOS DA REABILITAÇÃO PELO ALONGAMENTO DO MÚSCULO SÓLEO PÓS-IMOBILIZAÇÃO EM FLEXÃO PLANTAR DE RATAS ADULTAS

Juliana Cristina Polizello

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Shimano

Dissertação de Mestrado apresentada em 19/11/2009

A imobilização é uma técnica amplamente utilizada no tratamento de lesões do sistema osteomioligamentar, porém, conhecidamente, provoca transformações na arquitetura e histoquímica nas fibras musculares esqueléticas. Em grande parte, essas alterações mostram-se reversíveis frente a atividades de remobilização. Dentre essas atividades, o alongamento muscular tem sido usado com frequência na prática clínica reabilitadora a fim de melhorar a amplitude do seguimento e a viscoelasticidade do músculo acometido. O objetivo desse estudo, portanto, foi avaliar as alterações sofridas pelo músculo sóleo frente à aplicação de um protocolo de alongamento muscular passivo manual realizado uma e duas vezes ao dia, após a imobilização em encurtamento do tríceps sural dos animais, além de verificar as respostas teciduais do músculo EDL, imobilizado em alongamento. Foram utilizadas 30 ratas wistar (peso médio, 200 g \pm 30), divididas em 5 grupos (n=6): Controle, Imobilizado, Imobilizado e liberado, Imobilizado e alongado uma vez ao dia, Imobilizado e alongando duas vezes ao dia. O músculo sóleo foi coletado dos grupos descritos, enquanto o músculo EDL foi coletado apenas nos grupos Controle, Imobilizado e Imobilizado e liberado. Os fragmentos de cada músculo foram processados sob diferentes métodos histoquímicos como HE, mATPase e imunohistoquímica para colágenos I e III. No sóleo, a imobilização por 14 dias consecutivos determinou alterações de caráter degenerativo/necrótico, aumento na quantidade de colágeno I e redução no diâmetro das fibras. Os protocolos de remobilização após a imobilização provocaram reversão de algumas dessas alterações, de forma que a liberação provocou aumento na quantidade de fibras em segmentação e na quantidade de colágeno I, aumento no diâmetro das fibras, porém sem atingir valores do controle, além de aumento na porcentagem de fibras de contração lenta e redução de fibras de contração rápida. De modo geral, os protocolos de alongamento aplicados uma e duas vezes ao dia provocaram aumento do número de fibras com núcleos centralizados e redução no número de fibras em processo degenerativo/necrótico, além de redução na proporção de fibras de contração rápida. Porém, quando aplicado uma vez, o alongamento provocou aumento da quantidade de colágeno I e da proporção de fibras intermediárias e quando aplicado duas vezes ao dia, provocou redução na quantidade de colágeno I e aumento na quantidade de fibras de contração lenta. Para o EDL, a imobilização em alongamento provocou redução no diâmetro das fibras e na quantidade de fibras de contração rápida, aumento discreto da quantidade de fibras em degeneração/necrose e de colágeno I. A liberação causou aumento no diâmetro das fibras e no número de centralização nuclear e retorno na quantidade de colágeno I aos valores controle. Os achados indicam que a imobilização em encurtamento do músculo sóleo provocou alterações histomorfométricas reversíveis pelos protocolos de remobilização aplicados, porém, alongamento 1 vez ao dia provocou melhor resposta adaptativa no animais que a liberação ou o protocolo de alongamento aplicado duas vezes ao dia. A imobilização em alongamento do EDL gerou atrofia e aumento no índice de necrose das fibras musculares e a atividade espontânea permitiu a recuperação dos valores de diâmetro e regeneração das fibras lesadas.

OSTEOTOMIAS TIBIAIS COM CUNHA DE EDIÇÃO: RELEVÂNCIA DOS MÉTODOS DE FIXAÇÃO

Rafael Lara de Freitas

Orientador: Prof. Dr. Maurício Kfuri Junior

Tese de Doutorado apresentada em 19/11/2009

Avaliamos as propriedades mecânicas de diferentes métodos de fixação na osteotomia alta da tibia (OAT) com cunha de abertura, tomando como parâmetro duas variáveis: estabilidade do implante e integridade da cortical lateral. Os modelos experimentais artificiais em poliuretana simulando o segmento proximal da tibia foram fixados com placa DCP®, T-LCP® e Tomofix® para grandes fragmentos com parafusos convencionais e de ângulo fixo. Cunhas de abertura foram

confeccionadas para simular a distração da osteotomia alta da tibia. Os ensaios foram realizados em modelos com a cortical lateral íntegra e com cortical rompida (GAP) para simular fraturas e também fixadas com diferentes tipos de parafusos para verificar a estabilidade do sistema. Ensaios de torção e compressão axial foram avaliados na fase elástica simulando uma marcha leve. A compressão foi medida em um ponto situado a 62% da margem medial para simular a hipercorreção do eixo mecânico. De acordo com as montagens, 10 diferentes grupos foram constituídos. Os ensaios mecânicos registraram a rigidez relativa e a deformação percentual. As medidas de torção evidenciaram superioridade mecânica com a placa Tomofix® nas corticais íntegra e rompida. Os parafusos de estabilização lateral de compressão ou de posição demonstraram rigidez equivalente à cortical íntegra ($p < 0,001$) nos ensaios de torção. As medidas de compressão obtidas no grupo com cortical íntegra foram equivalentes entre os modelos com fixação convencional e ângulo fixo ($p > 0,05$). Os parafusos de estabilização lateral de compressão ou de posição com cortical rompida foram estatisticamente inferiores quando comparado com o grupo de implantes com cortical íntegra ($p < 0,001$). Em modelo experimental, utilizando-se diferentes métodos de fixação na OAT com cunha de adição, os implantes DCP®, T-LCP® e Tomofix® mostraram-se uma opção estável para forças mecânicas que simulam uma marcha leve. A cortical lateral é relevante na estabilidade do sistema na OAT com cunha de abertura medial. A placa Tomofix® evidenciou superioridade mecânica em torção com cortical íntegra e rompida. Nos ensaios de compressão axial, os implantes apresentaram comportamento mecânico equivalentes nos grupos com cortical íntegra e rompida.

INFLUÊNCIA NA RESISTÊNCIA MECÂNICA DO LIGAMENTO PATELAR REMANESCENTE, APÓS A RETIRADA DO TERÇO MÉDIO, ATRAVÉS DE DUAS MINI-INCISÕES TRANSVERSAIS E DE INCISÃO LONGITUDINAL

Leandro Calil De Lazari

Orientador: Prof. Dr. Cleber Antônio Jansen Paccola
Tese de Doutorado apresentada em 04/12/2009

A reconstrução do ligamento cruzado anterior é uma das cirurgias mais realizadas pelos cirurgiões do joelho. A utilização do enxerto do ligamento patelar é amplamente utilizada e aceita mundialmente. Porém, existem algumas complicações na área doadora do enxerto patelar, como dor na região anterior do joelho, distúrbios neurológicos, abaixamento da patela, ruptura do ligamento patelar, cicatriz hipertrófica e pouca estética, entre outras. No entanto, a dificuldade de visualização pela técnica de duas mini-incisões, levanta a preocupação da possibilidade de remoção excessiva do enxerto, levando à possível fraqueza do ligamento patelar remanescente. Para analisar este aspecto, 10 ovelhas foram submetidas à remoção do terço médio do ligamento patelar, sendo que no joelho direito, ela foi feita através de uma incisão longitudinal (tradicional) e, no joelho esquerdo, ela foi feita através de duas mini-incisões transversas. Os animais ficaram em observação por 6 meses. A análise foi feita com testes biomecânicos de resistência do ligamento patelar e análise histológica da regeneração ligamentar. Os resultados sugerem que não há nenhuma diferença entre as duas técnicas propostas com relação à regeneração e resistência do ligamento patelar. Foi observado que a técnica de duas incisões transversas é muito mais estética e que pode prevenir diversas complicações na área doadora. Nos dois grupos houve abaixamento da patela. Concluímos que a técnica de retirada do enxerto do ligamento patelar através de duas incisões, não alterou a resistência mecânica do ligamento patelar. Histologicamente também não houve diferença na regeneração do ligamento, entre as duas técnicas analisadas.

ANÁLISE DAS RESPOSTAS MUSCULARES ADAPTATIVAS FRENTE A PROTOCOLOS DE ALONGAMENTO E EXERCÍCIO EXCÊNTRICO, APLICADOS APÓS DESUSO DO MEMBRO POSTERIOR DE RATAS EM DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL

Priscila Cação Benedini de Oliveira Elias

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Claudia Mattiello Sverzut
Dissertação de Mestrado apresentada em 08/12/2009

O presente estudo analisou as mudanças e adaptações geradas pelos protocolos de alongamento e exercício excêntrico nos músculos sóleo e plantar, após 10 dias de imobilização do membro posterior de ratas em desenvolvimento pós-natal. Para isso, 45 ratas da raça *Wistar*, com 21 dias de idade, foram divididas em 10 grupos: grupo imobilizado (GI);

grupo imobilizado e treinado excêntrica por 10 dias (GITE(10)) ou 21 dias (GITE(21)); grupo imobilizado e alongado por 10 dias (GIAL(10)) ou 21 dias (GIAL(21)); grupo anestesiado (GA); grupo controle de 21 dias de idade (GC(Zero)); grupo controle do imobilizado de 31 dias de idade (GC(Imob)); grupo controle de 10 dias com 41 dias de idade (GC(10)); grupo controle de 21 dias com 52 dias de idade (GC(21)). A imobilização foi aplicada por 10 dias no membro posterior direito dos animais, a fim de manter a posição de encurtamento dos músculos sóleo e plantar. Posteriormente, as ratas do GITE(10) e GITE(21) passaram pelo período de treino excêntrico em esteira declinada, por 40 minutos. Enquanto os animais do GIAL(10) e GIAL(21) foram submetidos ao alongamento mantido por 40 minutos, através da fixação da dorsiflexão máxima permitida pelo tornozelo. Após os protocolos, os fragmentos dos músculos sóleo e plantar foram retirados e submetidos às reações histoquímica, imunoistoquímica e bioquímica. Análise qualitativa e quantitativa (isoformas de MHC, proporção de fibras, diâmetro menor e relação capilar/fibra) foram realizadas. Para análise estatística foi usado o Modelo Linear de Efeitos Mistos com nível de significância de 5% e Intervalo de Confiança de 95%. A partir da análise temporal do desenvolvimento muscular dos animais, foram observadas características de imaturidade dos músculos sóleo e plantar (fibras arredondadas, núcleos volumosos, reatividade do tecido), principalmente em animais com 21 e 31 dias de idade. Aumento progressivo do diâmetro das fibras e da relação capilar/fibra, em ambos os músculos, foram observados. O predomínio de FT1 e maior expressão da MHCI já estavam evidentes no músculo sóleo, mesmo de animais com 21 dias de idade. O músculo plantar apresentou predomínio de FT2D na análise da mATPase, e a avaliação das isoformas indicou predomínio da MHCIId e MHCIIb. O procedimento de imobilização desencadeou alta reatividade do tecido, redução do diâmetro de todos os tipos de fibras, mudança na proporção das fibras (redução de FT1 no sóleo e aumento de FT2D no plantar) e na expressão das isoformas de MHC, e queda do número de capilares transversais. A aplicação do alongamento e exercício excêntrico provocou adaptações importantes como o aumento do diâmetro das fibras, modificação da proporção das fibras e aumento da relação capilar/fibra, em ambos os músculos. Da análise morfológica, o músculo sóleo apresentou maior reatividade, quando comparado ao músculo plantar, com grande quantidade de núcleos centralizados e halo basofílico. O treino excêntrico foi capaz de intensificar as respostas hipertrófica e angiogênica, principalmente no período de 21 dias de reabilitação. Portanto, o desenvolvimento muscular normal foi acompanhado por adaptações importantes que correspondem ao avançar da idade juntamente com o aumento da demanda funcional nessa fase. O dispositivo de imobilização foi eficaz para promover o desuso e encurtamento dos músculos avaliados. Diferenças nítidas entre a resposta adaptativa dos músculos sóleo e plantar são observadas em ambos os protocolos de reabilitação no animal bebê.

O EXERCÍCIO FÍSICO MELHORA A MODULAÇÃO AUTÔNOMICA CARDÍACA EM PACIENTES HIPERTENSOS INDEPENDENTEMENTE DO TRATAMENTO COM INIBIDOR DA ENZIMA CONVERSORA DA ANGIOTENSINA

Izabela Campos Cozza

Orientador: Prof. Dr. Hugo Celso Dutra de Souza

Dissertação de Mestrado apresentada em 15/12/2009

Os inibidores da enzima conversora da angiotensina destacam-se como importante classe de medicamentos utilizada no tratamento da hipertensão arterial sistêmica, entretanto não se sabe ao certo o seu efeito nas adaptações cardiovasculares, principalmente sobre a modulação autonômica da variabilidade da frequência cardíaca (VFC), quando prescrita em associação ao exercício físico. Nesse sentido, o presente estudo teve por objetivo investigar em indivíduos hipertensos, não tratados e tratados com um inibidor da enzima conversora da angiotensina (iECA), a influência do exercício físico sobre a pressão arterial média (PAM) basal e modulação autonômica da VFC. Foram estudados 33 voluntários sedentários de ambos os gêneros com idade média de 44 ± 2.1 anos, os quais foram divididos em três grupos: normotensos controle (grupo NT; N=11), hipertensos que não faziam uso de qualquer medicamento (grupo HT; N=11) e hipertensos que faziam uso de iECA (grupo iECA; N=11). Todos foram submetidos a um protocolo de treinamento físico aeróbico supervisionado em esteira motorizada, 3 vezes por semana, durante 12 semanas, com duração de 45 minutos e intensidade correspondente à 95% do limiar anaeróbico respiratório, obtido no teste ergoespiométrico. A VFC foi avaliada em repouso e no tilt test por meio da análise espectral, utilizando o registro eletrocardiográfico (ECG). Os grupos estudados apresentavam, antes do treinamento, diferenças significativas nos valores de PAM (NT: 94 ± 2.5 mmHg; HT: 112 ± 2.9 mmHg; e iECA: 104 ± 2.2 mmHg). O treinamento promoveu a redução significativa da PAM nos grupos HT (6.3%) e iECA (5.8%). Deste modo, ao final do treinamento de 12 semanas, o grupo HT (105 ± 1.5 mmHg) apresentava valores da PAM semelhantes ao grupo somente tratado com iECA (104 ± 2.2 mmHg). Por sua vez, após o treinamento, os grupos iECA (98 ± 2.9 mmHg) e NT (93 ± 2.5 mmHg) apresentavam a PAM semelhantes. Em relação à análise espectral, foi observado que o grupo HT apresentava aumento nas oscilações de LF e redução nas oscilações de HF em unidades normalizadas em relação aos

grupos NT e iECA, entretanto, após o treinamento essas diferenças deixaram de existir. Em relação ao tilt test, o grupo HT também apresentava as menores respostas em relação aos demais grupos. Por sua vez, após o treinamento todos os grupos tiveram aumento nas respostas ao tilt test em unidades normalizadas e não houve diferenças entre os grupos estudados. O tratamento com inibidores da enzima conversora da angiotensina restabeleceu a modulação autonômica basal nos indivíduos sedentários hipertensos, uma vez que apresentavam valores semelhantes aos indivíduos normotensos sedentários. Por sua vez, o treinamento físico restabeleceu a modulação autonômica cardíaca dos indivíduos hipertensos sem tratamento e melhorou as respostas autonômicas modulatórias ao tilt test em todos os grupos estudados, independentemente do tratamento com inibidor da enzima conversora da angiotensina II.

ESTUDO COMPARATIVO DAS ADAPTAÇÕES NA MODULAÇÃO AUTONÔMICA CARDÍACA INDUZIDAS PELO TREINAMENTO FÍSICO EM MULHERES COM DIFERENTES PORCENTAGENS DE GORDURA.

Thaísa Helena Roselli Di Sacco

Orientador: Prof. Dr. Hugo Celso Dutra de Souza

Dissertação de Mestrado apresentada em 16/12/2009

Nosso estudo avaliou em mulheres sedentárias, com diferentes índices de massa corpórea (IMC; peso/altura²), o efeito do treinamento físico aeróbio sobre a variabilidade da frequência cardíaca (VFC). Quarenta e oito voluntárias foram divididas de acordo com o IMC e submetidas a um protocolo de treinamento físico aeróbio durante 12 semanas; peso normal (NW), 18.0-24.9; sobrepeso (OW), 25.0-29.9; e obeso (OB), 30.0-39.9. A VFC foi avaliada em repouso e durante o tilt test por meio da análise espectral. Antes do treinamento físico aeróbio os grupos OW e OB apresentavam redução nas oscilações de baixa (LF, 0.04-0.15Hz) e alta frequência (HF, 0.15-0.5Hz). Após o treinamento físico aeróbio, as oscilações de HF nos grupos NW, OW e OB eram semelhantes, e somente o grupo OB apresentou aumento nas oscilações de LF em relação aos valores basais. Os percentuais das respostas da VFC ao tilt test, obtidos antes e após o treinamento físico aeróbio, mostrou que o grupo NW não apresentava diferenças nas oscilações de LF (34 ± 6 vs. $36 \pm 8\%$) e HF (-65 ± 6 vs. $-60 \pm 7\%$). Entretanto, o grupo OW apresentou aumento nas oscilações de LF (46 ± 6 vs. $86 \pm 14\%$) e HF (-44 ± 7 vs. $-61 \pm 8\%$), enquanto que o grupo OB apresentou redução nas oscilações de LF (288 ± 25 vs. $159 \pm 16\%$) e HF (-83 ± 5 vs. $-70 \pm 4\%$). Em conclusão, nossos resultados sugerem que a atividade física regular tem efeito benéfico na função do sistema nervoso autonômico, um preditor relevante de morbidade e mortalidade cardiovascular, e que o exercício pode atenuar o efeito negativo da obesidade.

GANHOS DE EQUILÍBRIO E MARCHA EM PACIENTES HEMIPARÉTICOS CRÔNICOS ATRAVÉS DE TERAPIA MODIFICADA DE CONSTRIÇÃO COM INDUÇÃO DE MOVIMENTO

Carlos Tostes Guerreiro

Orientador: Prof. Dr. João Eduardo de Araújo

Dissertação de Mestrado apresentada em 17/12/2009

Como o Acidente Vascular Encefálico (AVE) produz alterações no centro de equilíbrio e na marcha nós propusemos uma modificação na técnica de Constraint Induced Movement Therapy (mCIMT) para reabilitar a marcha de pacientes pós AVE. Participaram desse estudo 19 sujeitos alocados em um único grupo. A imobilização do membro superior (MS) não parético foi feita através de uma malha tubular junto ao tronco. As avaliações aconteceram semanalmente e a cada trinta dias após a interrupção do protocolo, durante três meses. Utilizamos na admissão e ao final do protocolo a National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) e a Stroke Impact Scale (SIS). Para avaliar a funcionalidade dos membros inferiores a Berg Balance Scale (BBS), Barthel Index (BI) e Fugl-Meyer Assessment of Motor Recovery (FMA). Para a marcha o teste de caminhada de 10 metros (T10m) e o Timed Up & Go Test (TUGT). Para a análise estatística utilizamos ANOVA seguida de Holm-Sidak, com nível de significância de $p < 0,005$. As comparações entre semanas e meses evidenciaram melhora significativa em relação à avaliação inicial e manutenção dos resultados nos 3 meses de seguimento, NIHSS ($F_4, 78: 21,80$), SIS $F_4, 78: 25,96$), índice de Barthel ($F_7, 132: 15,17$). Já para a FMA ($F_7, 108: 37,10$) e BBS ($F_7, 132: 43,90$) encontramos significância adicional de todas as semanas e meses a partir da segunda e para T10m ($F_{7, 132}: 7,55$) e TUGT ($F_{7, 130}: 12,77$) a partir da quarta semana em relação à primeira. Até o momento não foram encontrados trabalhos que avaliassem as funções dos MMII após a aplicação de uma mCIMT, pois o nosso protocolo modificado foi efetivo para reabilitar a função e a velocidade da marcha em sujeitos hemiparéticos pós AVE que participaram desse estudo.

INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO DOS MÚSCULOS DO ASSOALHO PÉLVICO SOBRE OS RESULTADOS DO PARTO E PERINATAIS EM GESTANTES DE BAIXO RISCO

Letícia Alves Rios Dias

Orientadora: Profa. Dra. Cristine Homsy Jorge Ferreira
Dissertação de Mestrado apresentada em 21/12/2009

A ausência de estudos nacionais e limitações metodológicas relacionadas às pesquisas que já avaliaram a repercussão do treinamento dos músculos do assoalho pélvico (TMAP) sobre o trabalho de parto, parto e resultados perinatais constituíram a fundamentação científica para o desenvolvimento desta pesquisa cujo objetivo foi verificar a influência de um programa de TMAP realizado durante a gravidez sobre variáveis inerentes ao parto e aos resultados perinatais. Trata-se de ensaio clínico prospectivo randomizado e controlado que incluiu 42 gestantes nulíparas de baixo risco. As voluntárias fizeram parte de um grupo controle (GC) que não treinou os músculos do assoalho pélvico (MAP) ou de um grupo de treinamento (GT) que realizou um treino intensivo e supervisionado dos MAP por 16 semanas. Uma pesquisadora cega em relação distribuição dos grupos fez a análise dos prontuários das participantes da pesquisa. Foram coletados: idade gestacional (IG) na ocasião do parto; tipo de parto; duração do período expulsivo; tempo total de trabalho de parto; ocorrência de laceração e o seu grau; apresentação do recém-nascido; peso; tamanho; sexo e escores de Apgar dos recém-nascidos (RN). A análise estatística utilizou-se de procedimentos PROC FREQ e PROC MEANS do software SAS 9.0, modelos ANOVA, contrastes ortogonais baseados na distribuição t, modelos lineares de efeitos mistos, teste exato de Fisher, modelo de regressão quantílica e coeficiente de correlação de Pearson. No GC, 9,53% tiveram parto normal, 23,81% parto normal com episiotomia médio lateral (EML), 19,04% parto fórceps e 47,62% parto cesárea. No GT, 23,81% das mulheres tiveram parto normal, 38,1% parto normal com EML, 14,28% parto fórceps e 23,81% foram submetidas a cesárea. Não houve diferença estatística entre os grupos em relação a IG no momento do parto ($p=0,72$); tipo de parto ($p=0,23$); duração do período expulsivo ($p=0,28$), tempo total de trabalho de parto ($p=0,91$), ocorrência de laceração perineal ($p=0,66$); peso ($p=0,43$), tamanho ($p=0,61$) e escores de Apgar dos RN ($p=1,00$). Não houve relação entre o tipo de parto com uma melhor média de pico de perineometria na 36ª semana de IG entre os grupos ($p=0,15$). Também não se observou diferença estatística entre as avaliações (20 e 36 semanas) em relação ao tipo de parto entre os grupos ($p=0,61$). Concluiu-se que não houve influência do programa de TMAP realizado durante a gravidez nas variáveis maternas e perinatais avaliadas neste estudo.

Patologia

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE BUBR1 EM CARCINOMAS ORAIS DE CÉLULAS ESCAMOSAS E LESÕES ORAIS BENIGNAS ASSOCIADAS À INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

Régia Caroline Peixoto Lira

Orientador: Prof. Dr. Edson Garcia Soares
Dissertação de Mestrado apresentada em 08/10/2009

O carcinoma oral de células escamosas (OSCC - *Oral Squamous Cell Carcinoma*) é o câncer de cabeça e pescoço mais comum. Somente no Brasil, foram estimados 14.160 novos diagnósticos para o ano de 2009. O HPV está associado com o aumento no risco do câncer oral, mas seu papel na carcinogênese ainda é controverso. A BubR1, uma proteína importante para o checkpoint de fuso mitótico (SAC - *Spindle Assembly Checkpoint*), tem sido associada com algumas proteínas codificadas por espécies virais e com o câncer. O objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão de BubR1 em lesões orais benignas e amostras de OSCC com e sem metástase associadas com infecção pelo HPV. Nós realizamos imunistoquímica para BubR1 em 16 biópsias de lesão oral benigna e em 70 biópsias de OSCC divididas em três grupos (tumores *in situ*, tumores invasivos sem metástase e tumores invasivos com metástase), com os respectivos linfonodos das amostras com metástase. A técnica de Nested PCR foi realizada com finalidade de detectar DNA do HPV. Nas lesões malignas, foi observada uma significativa superexpressão de BubR1 associada com menor sobrevida ($p=0,0479$). Houve também correlação significativa ($r=1,000$) de BubR1 entre as lesões com metástase e seus respectivos linfonodos. Noventa por cento dos OSCC e 100% das lesões benignas foram HPV positivos. HPV 16 e HPV 18 foram detectados em, respectivamente, 13% e

24% das amostras com OSCC HPV-positivas. O HPV teve maior prevalência (76%) nas amostras com alta expressão de BubR1 e a ausência de DNA viral não influenciou no padrão de expressão de BubR1. Esses resultados sugerem uma provável associação do HPV com a superexpressão de BubR1 em OSCC, o que não se aplica para lesões orais benignas.

AVALIAÇÃO DAS DELEÇÕES 1P E 19Q EM ASTROCITOMAS, OLIGODENDROGLIOMAS E OLIGOASTROCITOMAS POR HIBRIDAÇÃO *in situ* FLUORESCENTE (FISH) E HIBRIDAÇÃO *in situ* CROMOGÊNICA (CISH)

Viviane de Cássia Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Luciano Neder Serafini

Dissertação de Mestrado apresentada em 04/11/2009

Diversos estudos estão sendo realizados no intuito de esclarecer melhor o papel das alterações genéticas no prognóstico e definição da conduta clínica para os pacientes com tumores gliais. As deleções nas regiões cromossômicas 1p e 19q estão associadas a uma melhor resposta a alguns regimes quimioterápicos em tumores oligodendrogliais e a detecção destas deleções tem se tomado rotina em neuropatologia. O objetivo deste estudo foi analisar a deleção dos loci cromossômicos 1p36 e 19q13 por hibridação *in situ* fluorescente (FISH) e hibridação *in situ* cromogênica (CISH) em uma série de gliomas e determinar o impacto destas alterações no prognóstico dos pacientes. Para análise dos loci cromossômicos 1p36 e 19q13 empregamos a FISH e a CISH em 61 amostras tumorais, e a presença ou ausência das regiões de interesse foi observada em diferentes áreas de astrocitomas (n=19), oligodendrogliomas (n=19) e oligoastrocitomas (n=23) [área astrocítica vs área oligodendrogliol]. Os valores de corte foram obtidos através da análise de 4 amostras de tecido cerebral não tumoral. A idade média dos 61 pacientes foi 40 anos, com predomínio do sexo masculino (39 Masc./22 Fem.). As deleções em 1p e 19q foram observadas com maior frequência nos tumores oligodendrogliais [14/19 casos (73,7%), sendo deleção combinada de 1p/19q em 52,63%, deleção isolada de 1p em 15,8% e deleção isolada de 19q em 5,27%]. Nos oligoastrocitomas as perdas cromossômicas foram vistas em mais da metade dos casos [12/23 casos (52,17%), sendo deleção combinada de 1p/19q em 21,74%, deleção isolada de 1p em 26,08% e deleção isolada de 19q em 4,35%]. O padrão das deleções foi semelhante em ambos os componentes nestes tumores. Os tumores astrocíticos, apresentaram o menor índice de perdas [9/19 casos (47,36%), sendo deleção combinada de 1p/19q em 10,52%, deleção isolada de 1p em 15,79% e deleção isolada 19q em 21,05%]. Em relação aos fatores prognósticos, os pacientes que tiveram maior tempo de sobrevida foram os com tumores com baixo grau de malignidade (p=0,03), idade < 45 anos (p=0,009) e com grau de ressecção tumoral completa (p=0,04). Os pacientes com oligodendrogliomas com deleção isolada de 1p apresentaram uma sobrevida superior aos demais (p=0,05). Da mesma forma, a deleção isolada de 19q foi considerada um fator preditivo de sobrevida em pacientes com astrocitomas (p=0,02). Com relação às reações de FISH e CISH foi encontrada concordância no resultado das duas metodologias em 95,08% dos casos (58 casos) (p < 0,001). Os 3 casos que apresentaram discordância se referem àqueles com deleções não balanceadas. Este trabalho foi pioneiro na padronização e emprego da metodologia de CISH na detecção das deleções 1p/19q em gliomas, sendo em 95,08% dos casos concordante com a reação de FISH. Casos isolados de deleções não balanceadas devem ser analisados por FISH complementar. As perdas isoladas em 1p e 19q são indicativas de melhor prognóstico em oligodendrogliomas e astrocitomas, respectivamente.

EXPRESSÃO DA GALECTINA-3 E AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E DA DENSIDADE MICROVASCULAR EM EPENDIMOMAS

Elder Francisco Latorraca

Orientador: Prof. Dr. Luciano Neder Serafini

Dissertação de Mestrado apresentada em 14/12/2009

Ependimomas são tumores originados das células que revestem os ventrículos e o canal central da medula espinhal do Sistema Nervoso Central. Em geral, são tumores de crescimento lento e suscetíveis à completa ressecção cirúrgica, dependendo da sua localização no neuroeixo. No entanto alguns ependimomas apresentam transformação anaplásica e prognóstico reservado. Os tumores da fossa posterior podem, ainda, exibir áreas de necrose ou mesmo mitoses em alguns casos, sem que isso signifique prognóstico adverso. A importância de estudar estes tumores é devido à maior prevalência em crianças e adultos jovens com alta morbiletalidade. Galectinas são proteínas ligantes a carboidratos de mamíferos,

composta de quatorze membros que desempenham papéis importantes em condições fisiológicas, como proliferação, apoptose, regulação da transcrição, sinalização intracelular, adesão e migração celular. As galectinas estão presentes em condições patológicas do organismo, como no surgimento neoplásico, progressão, disseminação e sobrevivência do câncer. A galectina-3 (Gal-3) tem sido extensivamente estudada devido a sua relação com várias neoplasias e prognóstico adverso. O presente projeto pretende avaliar a expressão da galectina-3 numa série de ependimomas de diferentes graus de malignidade e avaliar as possíveis correlações da expressão desta lectina com o Índice de Proliferação Celular avaliado pelo Ki-67 (IPC-Ki-67) e a Densidade Microvascular, avaliada pela imunomarcagem para CD31. Foram levantados os casos de ependimomas de pacientes operados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) e no Hospital São Paulo da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP/EPM) num período de 18 anos (1990 a 2008). Após revisão diagnóstica e graduação dos tumores, foi realizado o levantamento dos blocos disponíveis em 40 casos. A casuística foi composta de 22 do sexo masculino e 18 do sexo feminino, e a idade média dos pacientes foi de 19,1 anos \pm 16,7, (variação de 6 meses a 55 anos). Todos os ependimomas foram reativos para Gal-3, mas a expressão não correlacionou-se com a evolução ou com o grau histológico, bem como com as demais variáveis clínicas. O IPC-Ki-67 $>$ 3% foi observado em casos que resultaram em óbito, com forte tendência a significância estatística. Casos com IPC-Ki-67 $<$ 3% e a idade dos pacientes ($>$ 5 anos) foram os melhores preditivos para alta sobrevivência dos pacientes. Localização tumoral, grau histológico e DMV não exibiram qualquer relação com a sobrevida dos paciente. Gal-3 é ubiqüamente expressada em ependimomas de todos os graus de malignidade. Entre os marcadores avaliados, o IPC-Ki-67 de 3% (cutt-o.ff) foi o valor que melhor discriminou a evolução dos pacientes.

Saúde da Criança e do Adolescente

ESTUDO DE TUMORES ADRENOCORTICAIS DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES ATRAVÉS DA TÉCNICA HIBRIDAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA CGH)

Elvis Cristian Cueva Mateo

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone

Tese de Doutorado apresentada em 01/10/2009

Os tumores adrenocorticais (TAC) são neoplasias raras das glândulas adrenais. São frequentemente fatais e sua incidência em crianças é extremamente baixa correspondendo a 0,2% de todos os cânceres pediátricos. No entanto, a incidência dos TAC em crianças da região sul do Brasil é 10-15 vezes maior do que a incidência em nível mundial. Os TAC são geralmente classificados em tumores benignos (adenomas) e malignos (carcinomas). Os aspectos moleculares envolvidos na tumorigênese adrenocortical têm sido amplamente investigados porém, poucos marcadores moleculares mostraram-se úteis para o diagnóstico da malignidade. A presença de desequilíbrios genômicos foi encontrada em um grande número de tumores em outros tecidos e estudos com hibridação genômica comparativa (CGH) demonstraram alto grau de instabilidade cromossômica presente nos TAC, sobretudo nos carcinomas. **Objetivo:** Analisar a presença de alterações no número de cópias de DNA (CNAs) através da técnica de CGH em tumores adrenocorticais de crianças e adolescentes. **Métodos:** Foram avaliados 16 TAC, sendo 8 adenomas e 8 carcinomas, de pacientes acompanhados no HCFMRP-USP e mais duas amostras normais, uma de tecido adrenal e outra de tecido placentário. A análise da presença de alterações no número de cópias de DNA (CNAs) foi realizada através da técnica de CGH. A validação de um dos achados foi realizada mediante a análise da expressão do gene IGFII mensurada por PCR em Tempo Real. **Resultados:** Todos os TAC apresentaram CNAs, o número de alterações foi proporcional ao tamanho do tumor. Os adenomas apresentaram 158 alterações com média de 19,7 alterações por amostra sendo que o número total de ganhos foi 113 (71,5%) e as perdas foram de 45 (28,5%). Os carcinomas apresentaram 284 alterações com média de 35,5 alterações por caso sendo que, o número total de ganhos foi 200 (70,4%) e o número total de perdas foi 84 (29,6%). Nos frequentes foram: ganho de 4p15.1-p15.3 (87,5%) e perda de 20p11.2-p13.2 (100%). Nos carcinomas as alterações mais frequentes foram: ganho de 2q14.1-q24.3 (100%) e perdas de 3q21-q26.2, 20q12-qter e 22q11.2-q13.3 (100%). As alterações mais frequentes nos adenomas e carcinomas foram: ganhos de 1p21-p31.2, 2p12-p21 (75%) e perda de 20p11.2-p12 (93,7%). A expressão do gene IGFII, localizado na região 11p15.5, foi maior nas amostras que apresentaram ganho desta região ($p = 0,022$). **Conclusões:** Existe uma grande instabilidade genômica nos TAC, que é proporcional ao tamanho do tumor uma vez que, as regiões de ganho e perda possuem genes candidatos à oncogenes ou supressores tumorais, respectivamente.

ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO CORPORAL EM PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA

Andréa Aparecida Contini Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. José Simon Camelo Junior

Tese de Doutorado apresentada em 26/10/2009

A avaliação do estado nutricional em pacientes com Fibrose Cística (FC) é clinicamente relevante, pois a subnutrição é um fator importante que afeta de modo adverso a sobrevivência destes pacientes. Desta forma, o presente estudo teve como objetivos a análise da composição corporal dos pacientes com Fibrose Cística, utilizando um modelo de três compartimentos (3C), realizando validação cruzada entre os métodos utilizados e métodos antropométricos e medidas de pregas cutâneas; comparação dos achados de composição corporal em dois grupos de pacientes, a depender da presença ou não de colonização pulmonar crônica por *Pseudomonas aeruginosa*; avaliação do estado nutricional de pacientes com Fibrose Cística por meio de análise vetorial de impedância bioelétrica e ângulo de fase. **Casuística e métodos:** Foram estudados 27 pacientes com Fibrose Cística, com idade entre 6 e 18 anos, insuficientes pancreáticos. Foram avaliados parâmetros antropométricos e pregas cutâneas; a impedância bioelétrica (IBE) por análise vetorial e cálculo do ângulo de fase e a absorciometria com emissão de raios X de dupla energia (DXA). Resultados: os dados antropométricos revelaram: escore Z P/I: $-1,08 \pm 0,91$ (grupo 1=colonizado crônico), $-0,70 \pm 0,66$ (grupo 2=não colonizado); ZE/I: $-0,89 \pm 0,86$ (grupo 1), $-0,61 \pm 0,61$ (grupo 2); Z IMC: $-0,64 \pm 0,63$ (grupo 1), $-0,49 \pm 0,71$ (grupo 2); circunferência muscular do braço (CMB), prega cutânea tricípital (PCT) e prega cutânea subscapular (PCS) dentro da faixa de normalidade (escore Z=-2), sem diferença estatística para os todos os parâmetros antropométricos avaliados; boa correlação entre CMB e AMB (área muscular do braço) com massa magra DXA; PCT, PCS e AGB (área gordurosa do braço) com massa gorda DXA; concordância entre DXA e BIA apenas para os valores absolutos; análise vetorial demonstrou 55% de eutrofia no grupo 1 e 54% de eutrofia no grupo 2; ângulo de fase menor que a população referência no grupo 1. **Conclusões:** este estudo observou um bom estado nutricional em relação às variáveis utilizadas (antropometria); as medidas antropométricas e pregas cutâneas se mostraram adequadas na avaliação das reservas de gordura e proteína; a composição corporal obtida por meio da BIA necessita ser mais bem avaliada e a BIVA e ângulo de fase permitem uma avaliação qualitativa da composição corporal sem o conhecimento do peso e sem erro de predição das fórmulas.

Saúde Mental

ESTRATÉGIAS DE DEFESA EM PACIENTES COM TRANSTORNO DE ANSIEDADE SOCIAL AVALIADAS PELO QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DEFENSIVO EM SERES HUMANOS (QCD)

Stella Cristina Vasconcellos Mesquita

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cristina Marta Del-Ben

Dissertação de Mestrado apresentada em 07/10/2009

Introdução: Seres humanos guardam semelhanças com animais não-humanos nas estratégias defensivas adotadas mediante estímulo de ameaça. A reação adequada a uma situação é condição que influencia na sobrevivência do animal. As emoções representam padrões de respostas moldadas pela seleção natural para oferecer vantagens adaptativas. Logo, a ansiedade social pode ser apropriada e o Transtorno de Ansiedade Social (TAS) seria resultante de sua disfunção. Hipotetizou-se que o portador de TAS mostraria diferenças na adoção de estratégias defensivas aos cenários do Questionário do Comportamento Defensivo em Seres Humanos (QCD), comparando-se a indivíduos saudáveis. **Objetivos:** Pretendeu-se verificar a frequência de respostas defensivas aos 12 cenários de ameaça coespecífica, em indivíduos com TAS, em comparação a saudáveis, controlando-se o sexo, e se características clínicas como gravidade dos sintomas e subtipo do TAS interferem em tais respostas. **Sujeitos e Métodos:** Gravidade clínica foi avaliada pelo Inventário de Ansiedade de Beck (BAI), Inventário de Fobia Social (SPIN) e Escala Breve de Fobia Social (BSPS). O diagnóstico foi confirmado através da Entrevista Clínica Estruturada para o DSM-IV (SCID). Dos 198 voluntários, 110 eram casos de TAS

e 88, controles saudáveis. Respostas ao QCD e a caracterização clínico-demográfica foram comparadas pelo Teste Exato de Fischer; aplicou-se ANOVA de uma via, para idades e escores médios de escalas de avaliação de gravidade. **Resultados:** Não houve diferença significativa com relação ao sexo, estado civil, cor da pele e idade média, entre grupos caso e controle. A maioria dos voluntários é solteira, de pele branca, distribuindo-se em 18 cursos universitários. Entre os casos de TAS, independente do sexo, a idade média de início da doença foi de 11,38 anos; o tempo médio de evolução, de 10,55 anos. Não foram observadas diferenças significativas, entre os sexos, quanto ao subtipo, gravidade pelo DSM-IV, temores de falar em público, comer e escrever sob a visão de um terceiro, escores médios da BSPS, SPIN e de suas subescalas. Escores médios do BAI mostraram diferença significativa entre os sexos. Diferenças na adoção de estratégias defensivas em sete dos doze cenários: "Árvore", "Elevador", "Semáforo", "Traseira", "Praça", "Agarrão", "Barulho", indicando diferença à direita. Tais cenários caracterizam-se por ameaça proximal, com rota de fuga ("Árvore", "Semáforo", "Elevador"); características semelhantes, porém, proteção em ambiente seguro, no cenário "Traseira". Situação de captura, "Agarrão" mostrou diferenças mais marcantes quanto ao sexo. "Praça" representa ameaça clara, de alta intensidade, com possibilidade de fuga intermediária. O único cenário descritivo de ameaça distal, dentre os supracitados, foi "Barulho". Condutas diferentes, nem sempre mais urgentes, foram escolhidas por casos de TAS. Não houve diferenças significativas nas respostas defensivas de acordo com o subtipo e a gravidade do TAS, independente de sexo. **Conclusão:** As respostas estão de acordo com as hipóteses da literatura animal não-humana e mostram que houve confirmação da hipótese do estudo de que portadores de TAS apresentam diferenças na adoção de estratégias defensivas, em comparação aos saudáveis. A gravidade da doença não interferiu nas escolhas de estratégias defensivas, mas houve diferenças significativas entre os sexos.

SAÚDE NA COMUNIDADE

ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO E SAÚDE DOS TRABALHADORES: ESTUDO COM BANCÁRIOS DO MUNICÍPIO DE UBERABA-MG

Juliana Lemos Silva

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lúcia Navarro

Dissertação de Mestrado apresentada em 02/10/2009

O setor bancário brasileiro passou por intenso processo de transformação nas últimas décadas e ocupou posição de liderança na incorporação de novas tecnologias e inovações organizacionais. A reestruturação produtiva observada no setor objetivou ajustá-lo às novas formas de acumulação capitalista: a intensa informatização do trabalho bancário e outras mudanças estruturais do setor afetaram não apenas a natureza dos produtos, mas também o próprio comportamento dos mercados, o que resultou em mudanças significativas nas condições de trabalho e, conseqüentemente, na saúde dos trabalhadores. Este estudo teve por objetivo investigar as condições de trabalho dos bancários de uma instituição privada em Uberaba, MG, Brasil, na tentativa de identificar em que medida as mudanças na organização do trabalho interferiram em sua saúde. A coleta de dados se deu através de entrevistas gravadas com onze bancários pertencentes a diferentes níveis hierárquicos, de ambos os sexos, e os critérios de inclusão adotados foram: a. que o entrevistado tivesse vínculo empregatício com a instituição quando da realização da pesquisa e, b. que metade dos entrevistados tivesse, no mínimo, dez anos de carreira na instituição. Os contatos com os trabalhadores foram mediados pelo sindicato da categoria. A reconstituição do processo de trabalho, na perspectiva dos bancários, denuncia que além de adoecimentos de ordem física, como as doenças ocupacionais diretamente relacionadas à intensificação do ritmo de trabalho, ocorreram também o aumento da incidência do sofrimento mental e a perda da identidade e da valorização profissional, em decorrência das novas exigências da profissão. A maioria dos entrevistados, independente de seu tempo de contratação, afirmou que o trabalho bancário perdeu seu status. Predominaram nos depoimentos sentimentos de frustração e insegurança em relação à carreira. Os dados revelaram também preocupação com a pressão psicológica sofrida, principalmente no que se refere ao cumprimento de metas. Expressões como desgaste mental, estresse, depressão, pressão psicológica, medo, incerteza e insegurança estiveram presentes na maioria dos depoimentos.

FATORES DE RISCO PARA INFECÇÃO DO SÍTIO CIRÚRGICO EM CIRURGIA ONCOLÓGICA DO APARELHO DIGESTÓRIO DO HOSPITAL DE CÂNCER DE BARRETOS

Paulo de Tarso Oliveira e Castro

Orientador: Prof. Dr. Afonso Dinis da Costa Passos

Dissertação de Mestrado apresentada em 06/10/2009

Infecção do sítio cirúrgico (ISC) é a infecção hospitalar (IH) de maior prevalência em pacientes cirúrgicos, determinando aumento do tempo de hospitalização, dos custos e da morbidade e letalidade. É importante conhecer os principais fatores de risco desta infecção para estabelecer medidas de prevenção através dos fatores que podem ser modificáveis. O objetivo do presente estudo foi descrever a ocorrência de ISC e estudar os seus fatores de risco em cirurgias oncológicas do aparelho digestório no Hospital de Câncer de Barretos. Indivíduos submetidos à cirurgia oncológica do aparelho digestório, no período de 01/08/2007 a 10/08/2008, foram acompanhados prospectivamente por 30 dias para diagnóstico de ISC. Simultaneamente, foram estudados possíveis fatores de risco, ligados ao paciente e ao procedimento cirúrgico. Foram avaliadas 210 cirurgias, com uma incidência global de ISC de 23,8%. As seguintes variáveis apresentaram associação independente de risco: tempo de cirurgia, tipo de cirurgia, radioterapia antes da cirurgia e tempo de experiência do cirurgião. Os fatores de risco encontrados neste estudo descrevem um grupo de indivíduos com maior risco de ISC, nos quais novos protocolos de prevenção devem ser considerados.

AValiação DISCENTE DA DISCIPLINA ATENÇÃO À SAÚDE DA COMUNIDADE I

Tatiana Jisselle Jango Ribeiro da Silva

Orientador: Profa. Dra. Aldaísa Cassanho Forster

Dissertação de Mestrado apresentada em 19/11/2009

Em 1948, a cidade de Ribeirão Preto foi contemplada com uma faculdade de medicina, a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), cujas primeiras aulas foram ministradas em maio de 1952. Desde sempre, essa faculdade se dedicou à pesquisa e à formação pós-graduada, no entanto, a formação oferecida durante o ensino médico de graduação nunca deixou de ser uma preocupação constante. Mesmo tendo sofrido uma extensa reforma curricular, aprovada em 1992, implantada em 1993 e completada em 1998, o curso de ciências médicas da FMRP sofreu, após a aprovação das novas diretrizes curriculares nacionais para cursos de medicina, em 2001, uma revisão curricular, aprovada, em 2007, e implementada, em 2008, que determinou o desenvolvimento de atividades de forma articulada ao longo dos anos pela introdução de eixos longitudinais de formação. A Atenção à Saúde da Comunidade I ou, simplesmente, ASCI, foi a primeira disciplina do eixo Atenção à Saúde da Família e da Comunidade. Este estudo teve por objetivo realizar uma avaliação discente da disciplina ASCI, em seu primeiro ano de inclusão na grade curricular, identificando o que deveria permanecer, o que requereria aperfeiçoamento e o que deveria ser abandonado, obtendo, ainda, sugestões que permitissem introduzir, nos próximos anos, mudanças que aumentassem a efetividade do processo ensino-aprendizagem dos estudantes. Considerando a complexidade do objeto a ser estudado, uma abordagem metodológica quantitativa-qualitativa que permitisse tanto a identificação de indicadores e tendências quantificáveis quanto de percepções e sugestões, foi adotada. A população de estudo escolhida foi: todos os estudantes do curso de ciências médicas da FMRP matriculados na disciplina ASCI, no ano de 2008, totalizando 103 indivíduos. Optou-se pela construção de um instrumento de coleta de dados específico para essa pesquisa composto por: um questionário estruturado auto-aplicável capaz de caracterizar a população e quantificar as percepções discentes sobre cada variável estudada, uma questão não estruturada, destinada a captar evidências sobre a construção de um novo conhecimento a respeito da promoção da saúde e prevenção de doenças em uma comunidade, e um espaço para comentários e sugestões sobre a disciplina. Para a etapa quantitativa do estudo, foram escolhidas como variáveis as características da disciplina: objetivo, metodologia de ensino-aprendizagem, conteúdos, diversificação de cenários, aprendizagem por meio de vivências, interação com a comunidade, tutoria, divisão em pequenos grupos, discussões em grupo, comunicação mediada por computador, metodologias de avaliação e carga horária. A coleta de dados ocorreu entre os dias 24 de novembro e 02 de dezembro de 2008. Os resultados quantitativos obtidos apontaram altos índices de aprovação discente à disciplina e os qualitativos, a construção de uma percepção discente adequada aos objetivos educacionais da disciplina incluindo a modificação do conceito sobre saúde e a aproximação entre discentes e seu futuro objeto de trabalho. Além disso, a população estudada demonstrou grande preocupação em contribuir para que a disciplina se tornasse, durante os próximos anos, ainda mais efetiva no cumprimento de seu objetivo educacional.

MÉTODOS BAYESIANOS EM METANÁLISE: ESPECIFICAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO A *PRIORI* PARA A VARIÂNCIA ENTRE OS ESTUDOS

Suleimy Cristina Mazin

Orientador: Prof. Dr. Edson Zangiacomi Martinez

Dissertação de Mestrado apresentada em 27/11/2009

Profissionais da saúde, pesquisadores e outros responsáveis por políticas de saúde são frequentemente inundados com quantidades de informações nem sempre manejáveis, o que torna a revisão sistemática uma maneira eficiente de integrar o conhecimento existente gerando dados que auxiliem a tomada de decisão. Em uma revisão sistemática os dados dos diferentes estudos podem ser quantitativamente combinados por métodos estatísticos chamados metanálise. A metanálise é uma ferramenta estatística utilizada para combinar ou integrar os resultados dos diversos estudos independentes, sobre o mesmo tema. Entre os estudos que compõem a metanálise pode existir uma variabilidade que não é devida ao acaso, chamada heterogeneidade. A heterogeneidade é geralmente testada pelo teste Q ou quantificada pela estatística I². A investigação da heterogeneidade na metanálise é de grande importância pois a ausência ou a presença indica o modelo estatístico mais adequado. Assim, na ausência desta variabilidade utilizamos um modelo estatístico de efeito fixo e na presença utilizamos um modelo de efeitos aleatórios que incorpora a variabilidade entre os estudos na metanálise. Muitas metanálises são compostas por poucos estudos, e quando isso acontece, temos dificuldades de estimar as medidas de efeito metanalíticas através da teoria clássica, pois está é dependente de pressupostos assintóticos. Na abordagem bayesiana não temos esse problema, mas devemos ter muito cuidado com a especificação da distribuição a priori. Uma vantagem da inferência bayesiana é a possibilidade de predizer um resultado para um estudo futuro. Neste trabalho, conduzimos um estudo sobre a especificação da distribuição a priori para o parâmetro que expressa a variância entre os estudos e constatamos que não existe uma única escolha que caracterize uma distribuição a priori que possa ser considerada "não informativa" em todas as situações. A escolha de uma distribuição a priori "não informativa" depende da heterogeneidade entre os estudos na metanálise. Assim a distribuição a priori deve ser escolhida com muito cuidado e seguida de uma análise de sensibilidade, especialmente quando o número de estudos é pequeno.