

RESUMOS DE DISSERTAÇÕES DE MESTRADO E TESES DE DOUTORADO APRESENTADAS NA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - USP DE JULHO/DEZEMBRO 2005

BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

CARACTERIZAÇÃO DE UM ELEMENTO REPETITIVO DE EXTREMIDADE CROMOSSÔMICA DE *LEISHMANIA MAJOR*

Andréa Martins Silva

Orientadora: Profa. Dra. Angela Kaysel Cruz
Dissertação de Mestrado apresentada em 01/07/2005

Este trabalho descreve a caracterização de um elemento repetitivo, nomeado LST-R533, presente em quatro regiões diferentes de uma extremidade do cromossomo 20 de *Leishmania*. As quatro seqüências são repetições polimórficas no tamanho, variando de 367 a 533 pares de base e contêm um elemento interno de 81 pares de bases que encontra-se disperso por todo o genoma do parasito. Estas seqüências não são encontradas em regiões codificadoras

de genes preditos no genoma de *L. (L.) major* Friedlin, mas são parte de regiões não traduzidas de alguns transcritos de *Leishmania*. A análise da seqüência de 81 nucleotídeos revelou graus significativos de identidade com retrotransposons descritos em plantas e animais. A presença do LST-R533 em outras espécies do gênero *Leishmania* foi determinada por hibridação e seqüenciamento de DNA genômico clonado após amplificação de fragmentos pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Esta análise revelou a conservação do elemento de 81 nucleotídeos em todas as espécies de *Leishmania* estudadas. Nenhuma seqüência similar à LST-R533 ou ao elemento 81nt foi encontrada em bancos de dados de *T. brucei* e de *T. cruzi*.

EXPRESSÃO E LOCALIZAÇÃO CELULAR DE NINJURINA 1 EM LINHAGENS DE MELANOMA

Karine Sá Ferreira

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina R. Costa
Dissertação de Mestrado apresentada em 12/08/2005

A ninjurina 1, do inglês *ninjurin 1* (*nerve injury induced protein 1*), é uma proteína recentemente descoberta cuja estrutura primária sugere dois segmentos transmembrana, um *loop* intracelular e os domínios N- e C-terminais extracelulares. Sua participação como molécula de adesão já foi descrita durante a regeneração axonal periférica e em processos neoplásicos, e sua localização por hibridização *in situ* em diversos tecidos indica também expressão durante a embriogênese. O objetivo deste trabalho consistiu em estudar a expressão de mRNA de ninjurina 1 em células normais e tumorais (incluindo melanoma) de humanos e camundongos e verificar sua localização celular em uma linhagem de melanoma metastático. Para tanto, foram realizados ensaios de expressão diferencial por RT-PCR, imunodeteção

por quimioluminescência com dois anticorpos anti-ninjurina 1, centrifugação diferencial, espectrometria de massa e imunocitoquímica, além de reações de *cross-linking* para a identificação de possíveis ligantes da ninjurina 1. Dentre as células humanas testadas, a linhagem de melanoma metastático LB373 foi a que apresentou maior expressão de ninjurina 1. Em camundongos, foi observada maior expressão de ninjurina 1 em melanomas metastáticos do que em não-metastáticos que, por sua vez, apresentaram maior expressão do que em melanócitos normais. Os ensaios com a proteína indicaram que a ninjurina 1 encontrava-se solúvel no citoplasma nesta linhagem, não estando associada a membranas. A localização citoplasmática foi confirmada por imunocitoquímica confocal, onde era possível visualizá-la em células permeabilizadas, mas não em células não-permeabilizadas. Portanto, nas células LB373, a ninjurina 1 está altamente expressa e se localiza de forma diferente da observada em outras células. Estes resultados contribuem para o conhecimento acerca da ninjurina 1.

MICROARRANJO DE cDNA ORESTES E BIBLIOTECAS SUBTRATIVAS APLICADOS A MODELO DE MELANOMA HUMANO INDICAM NOVOS GENES COM POTENCIAL IMPORTÂNCIA NA PROGRESSÃO TUMORAL

Josane de Freitas Sousa

Orientadora: Profa. Dra. Enilza Maria Espreafico
Tese de Doutorado apresentada em 01/09/2005

O melanoma é uma neoplasia muito agressiva e que apresenta grande resistência terapêutica. A progressão do tumor ocorre através de três principais estágios: a fase de crescimento radial (RGP), a fase de crescimento vertical (VGP) e a metástase. As células em fase de crescimento radial ficam confinadas à epiderme, em contraste com aquelas da fase de crescimento vertical que invadem a derme e já apresentam competência para a metástase. Embora haja um grande número de estudos sobre melanoma, as bases moleculares da sua progressão não estão claramente definidas. Linhagens celulares estabelecidas, de diferentes fases da progressão tumoral de melanomas humanos, servem como modelos experimentais com grande potencial para a identificação e caracterização de genes com papel na progressão tumoral. Nosso objetivo consistiu em utilizar uma coleção dessas linhagens para análise da expressão gênica diferencial, permitindo assim identificar e iniciar a caracterização de novos genes envolvidos na progressão tumoral. A primeira abordagem consistiu em selecionar, através de minuciosa análise *in silico*, fragmentos ORESTES (Open Reading Frame ESTs) gerados pelo Projeto Genoma Humano do Câncer, que alinham em regiões cromossômicas cujos rearranjos são freqüentemente associados com melanoma. Em um ensaio piloto, utilizando dot blots contendo 137 fragmentos ORESTES que mapeam nas regiões cromossômicas 1p36, 1p11-12 e 1q21, foram detectados, e posteriormente confirmados por Northern blot, 4 genes diferencialmente expressos entre uma linhagem de melanoma

obtida de um tumor em fase de crescimento vertical e uma linhagem da metástase derivada da primeira. Em uma etapa seguinte, a análise do perfil de expressão de linhagens representando as fases radial, vertical e metastática da progressão tumoral, com o uso de um microarranjo de clones ORESTES representando genes das regiões 1p36, 6q21-23 e 9p21, revelou um pequeno, porém significativo, número de genes diferencialmente expressos, entre eles dois genes sem função conhecida (C6ORF51) e C9ORF82) com potencial papel de supressor de tumor. Em uma outra abordagem, através da construção de bibliotecas subtrativas nós obtivemos, conforme validação por diferentes ensaios, duas grandes coleções de genes diferencialmente expressos entre os estágios de crescimento radial e metastático do melanoma. Dentre os genes detectados, existem genes já conhecido envolvidos na progressão tumoral, genes ainda não associados ao processo e um grande número de genes de função desconhecida. O uso dos clones das bibliotecas subtrativas em ensaios de microarranjos revelou que um maior número de eventos de repressão gênica parece estar associado a progressão do estágio de crescimento radial para os estágios mais avançados, enquanto na transição da fase vertical para a metástase houve um maior número de superexpressão de genes. Além disso, nós selecionamos para estudos funcionais um dos genes detectados no ensaio piloto (KIAA0090), para o qual nenhuma função é conhecida. Duas diferentes construções da proteína, em fusão com a EGFP, quando expressas em quatro linhagens de melanoma mostraram diferentes padrões de distribuição e colocalização da proteína com organelas celulares, além de afetarem a viabilidade celular, também em níveis diferentes.

CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS GENES DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* IDENTIFICADOS A PARTIR DE SEQUÊNCIAS ORESTES

Valeria Valente

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luisa Paçó-Larson
Tese de Doutorado apresentada em 02/09/2005

A partir da análise de um conjunto de ORESTES (*open reading expressed sequence tags*) produzidas em um projeto piloto de geração de seqüências expressas em *Drosophila melanogaster* identificamos 83 possíveis novas regiões de *splicing* em diferentes genes preditos. Quatro destes genes: CG3060 (*Apc2*), CG8709 (*lipina*), CG14616 (*unknown*) e CG7376 (*swi/snf*) foram selecionados para ca-

acterização estrutural com base no alto grau de conservação evolutiva e anotação. Para um deles (CG8709) estendemos a caracterização ao nível funcional. A proteína deduzida deste predito apresenta identidade significativa de seqüência com o gene *Lpin1* de camundongos, cujas mutações causam lipodistrofia em consequência de falha na diferenciação dos adipócitos e neuropatia periférica progressiva relacionada com mielinização anormal e degeneração axonal. Neste trabalho caracterizamos duas novas isoformas do homólogo de *Lpin1* em *Drosophila*, por nós denominado *DmLpin*. *DmLpinA* e *DmLpinB* apresentam padrão de

splicing diferente entre si e com uma terceira isoforma codificada por um cDNA (GH19076) seqüenciado pelo Projeto Genoma de *Drosophila* de Berkley, que chamamos de DmLpinC. DmLpinA, DmLpinB e DmLpinC apresentam diferenças nas proteínas codificadas pela maior fase aberta de leitura de cada transcrito. DmLpinA, DmLpinB e DmLpinC também diferem quanto ao padrão de expressão. DmLpinA e DmLpinC são detectados no intestino/tubúlos de Malpighi e DmLpinB é detectado no cérebro larval. Análises de linhagens mutagenizadas por inserção de elemento P no locus *DmLpin* indicam que esse locus é requerido para o desenvolvimento. Dentre as isoformas analisadas, DmLpinA e DmLpinB parecem ser essenciais. Duas das linhagens investigadas, que apresentam letalidade durante os estágios embrionário larval, mostraram alterações quantitativas ou qualitativa nas isoformas DmLpinA e B. Uma destas linhagens, a EP2431, apresenta ainda esterilidade no macho e alterações no comportamento de geotaxismo negativo. Análises da linhagem EY10844 mostram superexpressão de *DmLpin* na presença do driver *hsp70/GAL4*, o que disponibiliza uma ferramenta adicional para testes de ganho de função. Ensaios iniciais mostram que a super-expressão de

DmLpin ao longo do desenvolvimento causa letalidade. Com o objetivo de analisar o efeito do *knockdown* de *DmLpin* de modo regulado temporal e espacialmente foram geradas linhagens transgênicas transformadas com construção para indução de RNAi para esse locus. Inesperadamente, em vez de diminuição, observamos que, nos animais em que a expressão do dupla-fita é induzida, o transcrito endógeno é detectado em níveis bem mais elevados. As causas desse resultado inesperado são discutidas. Finalmente, células S2R⁺ de *Drosophila* transfectadas com construções para a expressão das proteínas LPINA e LPINB em fusão com GFP, ou com um pequeno epítipo viral, mostraram que tanto LPINA quanto LPINB ficaram restritas ao citoplasma, apesar da presença de possíveis sinais de localização nuclear em ambas as proteínas. Dados preliminares relativos ao padrão de crescimento de células transfectadas com LPINA-GFP ou LPINB-GFP mostraram que a super-expressão dessas proteínas, em células S2 ou S2R⁺, ocasiona uma redução significativa na taxa de crescimento celular, o que sugere que as proteínas lipina de *Drosophila* possam desempenhar algum papel no controle da proliferação celular.

CARACTERIZAÇÃO DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA À ANTIMONIAIS EM LINHAGENS SELECIONADAS DE *LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS*

Wilton Carlos Zanetti Lopes

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Orsini Tosi

Dissertação de Mestrado apresentada em 05/09/2005

Espécies do protozoário *Leishmania* são os agentes responsáveis por um amplo espectro de manifestações clínicas denominadas leishmanioses. O tratamento desta doença é baseado na administração de antimoniais pentavalentes que podem causar uma série de efeitos colaterais em doses elevadas. O estudo da habilidade do parasita para escapar da ação de drogas é importante para o desenvolvimento de tratamentos efetivos. A *Leishmania major* quando submetida a altas concentrações do antimônio ou outras drogas não relacionadas, amplifica um locus de 48 kb denominado região H. Os genes contidos neste locus, *PGPA*, *PTR1* e *HTBF* estão relacionados com a resistência à drogas. O gene *PGPA* confere resistência a antimoniais e está associado a vesículas da via endo-e exocíticas da célula do parasita. Em estudos anteriores demonstramos que, apesar da divergência de seqüência entre *L. major* e *L. (Viannia) braziliensis*, a sintênia gênica é mantida na região H destas duas espécies. O objetivo do estudo aqui apresentado foi investigar o papel do gene *PGPA* na resistência a metais pesados em *L. braziliensis*.

A participação do gene *LbPGPA* na resistência ao

antimônio foi investigada através da submissão desta espécie do subgênero *Viannia* a pressão por droga. Usando um protocolo de seleção isolamos a linhagem de *L. braziliensis* resistente a 10 mg/ml do antimônio pentavalente (SbV). Nossos resultados indicaram que a resistência ao antimônio nestas linhagens celulares não esta associada à alteração do influxo da droga ou da redução do SbV na forma tóxica trivalente (SbIII). Análises de *Southern blotting* revelaram que o *PGPA* não está amplificado nas linhagens resistentes a 10 mg/ml de SbV e análises de PFGE demonstraram que a linhagem resistente não carregava moléculas episomais amplificadas. Linhagens celulares de *L. major* submetidas ao mesmo protocolo de seleção demonstrou claramente a formação de amplicons e um alto número de cópias do gene *PGPA*. O gene *PGPA* de *L. major* foi capaz de conferir resistência em *L. braziliensis* quando transfectado nesta espécie do subgênero *Viannia*. Estes resultados indicaram que todos os outros componentes relacionados à resistência mediada pelo *PGPA* estão presentes em *L. braziliensis*. Experimentos de resistência cruzada revelaram que, apesar da não amplificação dos genes *PGPA* ou *HTBF* linhagens de *L. braziliensis* resistentes ao antimônio também são resistentes a terbinafina. Desta forma nossos resultados sugerem que em *L. braziliensis* o mecanismo de amplificação não é favorecido no desenvolvimento da resistência a droga.

ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS PROMOVIDAS PELA DEFICIÊNCIA DA PP125FAK EM MASTÓCITOS DA LINHAGEM RBL-2H3

Daniel Giuliano Cerri

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Maria Célia Jamur

Tese de Doutorado apresentada em 15/09/2005

Os mastócitos exercem um papel crítico em processos inflamatórios e alérgicos, através da liberação de mediadores presentes em seus grânulos. Neste estudo, foi investigado o papel da quinase de adesão focal (FAK) no processo de desgranulação de mastócitos da linhagem RBL-2H3. Células C5 deficientes em FAK, derivadas das RBL-2H3, e células 2C1 que foram reconstituídas com o gene da FAK foram analisadas em comparação com as células RBL-2H3. As células C5 expressaram apenas 15,5% de FAK, enquanto as células 2C1 expressaram 7 vezes mais FAK, quando comparadas com as células RBL-2H3. A linhagem C5 foi constituída, na sua maioria, de células arredondadas que, quando estimuladas via FcεRI, apresentaram uma redução de 71% na liberação da enzima β-hexosaminidase, em comparação com as células RBL-2H3. Nas células C5 não se observou a formação de placas de adesão, mesmo durante o estímulo via FcεRI. Nestas células, o citoesqueleto de actina

e os microtúbulos apresentaram-se desorganizados. Os grânulos secretores mantiveram-se agregados e apresentaram uma redução de 88% no conteúdo de condroitim sulfato da matriz granular. No entanto, não foram observadas alterações morfológicas nas organelas relacionadas com o processo de síntese e secreção celular como o retículo endoplasmático rugoso e o complexo de Golgi. A deficiência da FAK não impediu a fosforilação de resíduos de tirosina das proteínas destas células. As células 2C1, reconstituídas com o gene da FAK, são morfológicamente semelhantes às RBL-2H3 e mostraram um aumento de 55% na liberação de β-hexosaminidase, em relação às células selvagens. Também, foi verificado nestas células um aumento de 17% no conteúdo de condroitim sulfato dos grânulos, em comparação com as células RBL-2H3. Portanto, a deficiência em FAK afetou a manutenção da morfologia celular, alterou a função de citoesqueleto, a distribuição dos grânulos e o conteúdo de componentes da matriz granular, como a do glicosaminoglicano condroitim sulfato. Estas alterações morfofuncionais observadas em decorrência da deficiência em FAK interferem diretamente no processo de desgranulação de mastócitos.

PRODUÇÃO SISTEMÁTICA DE REAGENTES PARA MUTAGÊNESE SÍTIO-ESPECÍFICA EM *LEISHMANIA*. A RUPTURA DE GENES LOCALIZADOS NA EXTREMIDADE DE CROMOSSOMOS

Fabio Márcio Squina

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Orsini Tosi

Tese de Doutorado apresentada em 19/09/2005

O sequenciamento do genoma de diferentes espécies do protozoário parasita *Leishmania* vem requisitando o desenvolvimento de estratégias genômicas para o estudo da função gênica. Com este intuito, foi utilizado o sistema *mariner* MOS1 de transposição *in vitro* como fonte de reagentes para integração gênica. Bibliotecas genômicas de *L. major* e *L. braziliensis* foram construídas e utilizadas como alvo para inserção de transposons especializados.

As seqüências dos eventos de inserção foram compiladas no programa Artemis, permitindo disponibilizar graficamente os dados de sequenciamento. Os fragmentos de ruptura gênica delineados foram transfectados no parasita para ruptura direcionada de genes. A integração específica destes fragmentos no *locus* cromossômico foi validada pela ruptura de dois genes sub-teloméricos, um transportador da família ABC e uma RNA polimerase III. A inativação do segundo alelo da RNA polimerase requisitou a complementação epissomal do gene intacto. A habilidade de gerar estes reagentes é uma ferramenta poderosa para análises funcionais neste parasita.

GANGLIOSÍDEOS DERIVADOS DO GD_{1b} SÃO ESSENCIAIS NA TRANSDUÇÃO DE SINAL VIA FcεRI E NA MANUTENÇÃO DA ESTRUTURA CELULAR

Adriana Maria Mariano Silveira e Souza

Orientadora: Profa. Dra. Constance Oliver

Tese de Doutorado apresentada em 17/10/2005

Os gangliosídeos são glicoesfingolípídeos complexos localizados na monocamada externa da membrana plasmática e apresentam um ou mais resíduos de ácido siálico.

Embora os gangliosídeos atuem em múltiplas funções celulares, ainda são escassos os estudos detalhados sobre o papel biológico desses glicosíngolípídeos na fisiologia celular. Evidências recentes mostram que os eventos iniciais da transdução de sinal ocorrem em microdomínios da membrana plasmática denominados *lipid rafts*, que são formados por agrupamentos de esfingolípídeos, colesterol e onde se encontram confinadas certas proteínas da membrana. Os gangliosídeos derivados do GD_{1b}, específico de mastócitos de rato e camundongo, foram identificados como componentes estruturais dos *lipid rafts* da superfície das células RBL-2H3, uma linhagem de mastócitos rato. Esses gangliosídeos são reconhecidos pelo anticorpo monoclonal AA4 que, ao se ligar a estes gangliosídeos, inibe a liberação de β -hexosaminidase pelos mastócitos. Entretanto, o papel funcional desses gangliosídeos nos *lipid rafts* ainda não está esclarecido. Neste estudo foram analisadas alterações morfológicas, bioquímicas e funcionais nas linhagens mutantes, E5 (expressa aproximadamente 35% de gangliosídeos derivados do GD_{1b}) e D1 (expressa menos de 1% gangliosídeos derivados do GD_{1b}), em comparação com as células RBL-2H3, durante a transdução de sinal via receptor de alta afinidade para a porção Fc da imunoglobulina E (Fc ϵ RI). As três linhagens celulares em estudo expressam Fc ϵ RI, Lyn, Syk, LAT e Vav, que são importantes para a transdução de sinal. Entretanto, apenas na linhagem RBL-2H3, ocorreu a mobilização dos gangliosídeos derivados do GD_{1b}, do Fc ϵ RI, e das proteínas Lyn e LAT para os *lipid rafts* após o estímulo via Fc ϵ RI. As linhagens E5 e D1 tiveram redução na porcentagem de liberação de β -hexosaminidase após estímulo via Fc ϵ RI em comparação à linhagem RBL-2H3. No entanto, quando estimuladas com ionóforo de cálcio A23187, as células mutantes apresentaram resposta similar, a das células selvagens, o que demonstra que estas linhagens possuem

capacidade funcional para desgranular. A mobilização de cálcio nas linhagens mutantes, após estímulo via Fc ϵ RI, foi mais rápida do que a observada para as células RBL-2H3, porém menos duradoura. Este resultado associado à porcentagem menor de liberação de β -hexosaminidase encontrada nas linhagens mutantes, estimuladas via Fc ϵ RI, sugere que o defeito destas células precede a mobilização de cálcio.

Morfológicamente, as linhagens E5 e D1, independente de estarem estimuladas ou não, diferem entre si e são diferentes das células RBL-2H3. Os filamentos de actina nas células E5 e nas RBL-2H3 se localizam abaixo da membrana plasmática, seguindo a morfologia fusiforme destas células. Entretanto, nas células D1, a F-actina está concentrada nas grandes ondulações da membrana plasmática. Os microtúbulos nas células RBL-2H3 e E5 partem radialmente do centrosomo e estão organizados em feixes longos e retos devido à morfologia fusiforme destas células. Nas células D1, os microtúbulos também partem do centrosomo e se estendem radialmente em direção à periferia celular. Os feixes nas células D1 são mais espessos e estão organizados circunferencialmente sob a membrana plasmática, constituindo um arcabouço. O retículo endoplasmático e o complexo de Golgi também se mostraram alterados nas linhagens celulares mutantes. Nas células RBL-2H3 o retículo endoplasmático apresentou marcação filamentosa distribuída por todo o citoplasma. Entretanto, as células E5 e D1, apresentaram marcação com aspecto vesicular, bem evidente na região perinuclear. O complexo de Golgi, nas células D1, apresentou cisternas pequenas e muitas delas espalhadas pelo citoplasma, não exibindo a organização de “sacos achatados empilhados”, observada nas células RBL-2H3. Estes dados sugerem que os gangliosídeos derivados do GD_{1b} são essenciais para a ativação dos mastócitos via Fc ϵ RI e para a manutenção da estrutura celular.

ANÁLISE FUNCIONAL “IN VIVO” DA PORÇÃO INTRACELULAR DO PRODUTO PROTÉICO DO LOCUS ROUGHEST DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*, POR TRANSFORMAÇÃO MEDIADA POR ELEMENTO P

Lucilene de Almeida

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Guelerman Pinheiro Ramos
Tese de Doutorado apresentada em 25/10/2005

A família IRM (*Irre Recognition Module*) é um subgrupo filogeneticamente conservado de proteínas de adesão da superfamília das imunoglobulinas, a qual inclui os produtos dos loci *hibris* (*hbs*) *stick and Stones* (*sns*) e os parálogos *roughest* (*rst*) and *kin of irre* (*kirre*) em *Drosophila melanogaster* bem como as proteínas SYG de *C. elegans* e Nefrina e Neph de mamíferos. *rst* é um gene pleiotrópico que está envolvido em vários processos do desenvolvimento embrionário e pós embrionário de *Drosophila*, tais como desenvolvimento da musculatura

embrionária, direcionamento axonal, histólise das glândulas salivares e diferenciação das células pigmentares durante o processo final do desenvolvimento do olho. O locus *rst* codifica uma proteína transmembrana unipasso com cinco domínios semelhantes àqueles de imunoglobulina na sua porção extracelular e uma longa cauda citoplasmática rica em serina e treonina contendo vários sub domínios potencialmente importantes do ponto de vista funcional. A proteína Rst é dinamicamente expressa durante a embriogênese, nos estágios larvais tardios e pupais e parece atuar tanto como uma molécula de adesão quanto de sinalização. No olho composto, a distribuição precisa e regulada da proteína Rst, no espaço e tempo, é essencial para a correta diferenciação das células pigmentares secundárias e terciárias e

para a eliminação das células intermatidiais em excesso. Com a intenção de estudar *in vivo* a função de alguns destes domínios, diversas versões truncadas do cDNA *rst* contendo regiões progressivamente menores do domínio intracelular da proteína, previamente construídas em nosso laboratório foram microinjetadas em embriões de *Drosophila melanogaster*, através da técnica de transformação mediada por Elemento *P*. Estas construções foram integradas estavelmente na linhagem germinativa de *Drosophila melanogaster*. Uma das construções, pGMR18Z, a qual codifica uma proteína truncada, que elimina a seqüência consenso putativa reconhecida por proteínas com domínio PDZ (X-Ser/Thr-X-Val-COO⁻), apresentou um fenótipo de olho rugoso com desorganização das omatídias e num plano mais basal, compactação dos possíveis fotorreceptores, sugerindo que o complexo protéico necessário para o ancoramento ao citoesqueleto, para a montagem do com-

plexo juncional, não foi recrutado, formando dessa maneira uma adesão célula-célula ineficiente, porém suficiente para compactar estruturas celulares, já que esta possui o domínio transmembranar, numa região onde esta proteína não deveria estar presente naquele período do desenvolvimento. As demais construções, pCa18Z/ Δ 1, pCa18Z/ Δ 2, pCa18Z/ Δ 3, pGMR 1.2E e pGMR st, não apresentaram alterações fenotípicas de olho nos indivíduos analisados. No caso do fenótipo de olho rugoso apresentado pelo transgênico pGMR18Z pode-se especular que este seja devido à falta da seqüência consenso putativa reconhecida por proteínas com domínio PDZ, já que este foi o único domínio retirado da proteína *Rst*. Em conjunto, os resultados obtidos contribuíram para o entendimento do papel desempenhado pelos diversos domínios da proteína *Rst*, na formação da estrutura altamente organizada que caracteriza o olho composto de *Drosophila melanogaster*.

IMUNOGLOBULINAS GLICOSILADAS DO COLOSTRO BOVINO E DO EQÜINO: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E RESISTÊNCIA À DIGESTÃO PÉPTICA

Ana Carolina Rusca Corrêa Porto

Orientadora: Profa.Dra. Maria Cristina R. Antunes Barreira
Dissertação de Mestrado apresentada em 08/11/2005

A ingestão de colostro é o processo natural mais significativo para conferir proteção imunitária eficaz a bezerros e potros na fase inicial de vida. Isso se justifica pelo fato de que esses animais nascem agamaglobulinêmicos, em decorrência da total falta de passagem transplacentária de moléculas de imunoglobulinas, tornando a proteção de recém-nascidos contra patógenos dependente de anticorpos passivamente transferidos pelo colostro. Por muitas razões animais neonatos podem ser privados da ingestão do colostro, tais como a falta de produção de colostro pela mãe e a incapacidade do neonato de levantar para mamar. Na condição de privação do aleitamento, o neonato fica totalmente suscetível a infecções. Preparações alternativas ao colostro natural são alvo de investigações que, entretanto, não chegaram à meta de obtenção de formulação que seja absorvida adequadamente e cuja ingestão mimetize a natural.

Jacalina, lectina de *Artocarpus integrifolia*, foi descrita como ferramenta útil no isolamento de imunoglobulinas contidas no colostro humano. Essa propriedade é atribuível ao fato da lectina se ligar a glicanas associadas a tais moléculas de anticorpos, glicanas que incluem resíduos galactose e N-acetilgalactosamina (GalNac), interligados nas posições β 1-3. Esse dissacarídeo constitui o core de *O*-glicanas. À presença de *O*-glicanas na região de dobradiça de imunoglobulinas secretórias atribui-se o fato des-

ses anticorpos resistirem à hidrólise por enzimas do trato gastrointestinal. Supondo que *O*-glicanas possam estar presentes em imunoglobulinas do colostro de diversos mamíferos, decidimos investigar a aplicação de jacalina imobilizada em matriz de agarose no isolamento de imunoglobulinas dos colostros bovino e eqüino.

A classe de imunoglobulina isolada por cromatografia de afinidade em coluna de agarose-jacalina a partir do colostro das duas espécies estudadas não foi IgA, como no colostro humano, e sim IgG. Essa é a classe de imunoglobulinas bovinas e eqüinas que mais se assemelha à IgA1 humana, por conter *O*-glicanas apenas na cadeia pesada. Os resultados demonstram que o colostro bovino apresenta uma concentração muito maior de imunoglobulinas *O*-glicosiladas do que o colostro eqüino.

As moléculas de IgG contidas em ambas frações cromatográficas foram analisadas por SDS-PAGE, immunoblot e espectrometria de massa (MS), após a digestão por pepsina. As primeiras abordagens permitiram demonstrar que as moléculas de IgG *O*-glicosilada do colostro bovino, que se ligaram à jacalina imobilizada e foram eluídas com solução de D-galactose, mostraram-se mais resistentes à digestão por pepsina do que as moléculas de IgG que não contém tais glicanas e que, portanto, não se ligaram à resina. A última abordagem (MS) demonstrou que a IgG *O*-glicosilada contida na fração ligante de jacalina se mantém resistente à hidrólise péptica, mesmo quando submetida a processo de 24 horas de incubação com a enzima. Por fim, a análise dos peptídeos trópticos evidenciou que as cadeias polipeptídicas da IgG *O*-glicosilada e da IgG que não con-

tém *O*-glicanas, são similares, indicando que a diferença de suscetibilidade à ação da enzima relacione-se à presença de *O*-glicanas nessas cadeias.

Em contraposição à IgG bovina, a IgG eqüina ligante de jacalina não apresentou resistência à ação enzimática. Na verdade, a IgG contida na fração não retida na coluna foi claramente mais resistente à digestão péptica. A diferença de suscetibilidades entre as frações ligantes, ou não, de jacalina não é atribuível a distinções entre suas cadeias polipeptídicas, já que elas proporcionaram mapa tríptico similar, na análise por MS. Por outro lado a *N*-deglicosilação enzimática da IgG eqüina não absorvida à coluna de jacalina tornou a molécula suscetível à digestão péptica mostrando

que, no caso da IgG eqüina, a resistência à digestão relacione-se à presença de oligossacarídeos *N*-ligados ao esqueleto protéico da IgG. Uma vez que essa IgG é amplamente majoritária no colostro eqüino, não há interesse em obter preparações enriquecidas de tais glicoformas de anticorpos.

O presente trabalho permite concluir que a IgG ligante de jacalina proveniente do soro lácteo bovino possa ser utilizada na imunoterapia de bezerros neonatos privados da ingestão de colostro. Já a imunoterapia de potros não aleitados não requer a utilização de preparações especialmente enriquecidas de glicoformas particulares de imunoglobulinas.

BIOQUÍMICA

CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES CODIFICADORES DAS ENZIMAS CONJUGADORAS DE UBIQUITINA ENVOLVIDAS NOS MECANISMOS DE TOLERÂNCIA A LESÕES NO DNA EM *SCHISTOSOMA MANSONI*

Sergio Henrique da Silva

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Rodrigues

Dissertação de Mestrado apresentada em 06/07/2005

A modificação pós-traducional de proteínas pode desempenhar um papel essencial para a homeostase e para o desenvolvimento de *S. mansoni*. Entre os diversos mecanismos de modificação de proteínas, a ubiquitinação se destaca por ser crítico em diversos processos geralmente associados à proteólise intracelular. Outros eventos, no entanto, podem ser promovidos pela modificação por ubiquitina, sem que ocorra a proteólise pelo proteassoma 26S. Os mecanismos de tolerância a lesões no DNA mediados pela ubiquitinação do PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) são exemplos desses processos controlados por ubiquitina. A função de enzimas conjugadoras de ubiquitina como UBC13, MMS2 e RAD6 desempenha um papel essencial no controle dos mecanismos mutagênico e não-mutagênico de tolerância a lesões durante a replicação do

DNA. O presente trabalho analisou o perfil de expressão dos referidos genes durante o ciclo de vida de *S. mansoni*.

Através da técnica RT-PCR foi possível demonstrar que os três genes são constitutivamente expressos durante os diferentes estágios do ciclo de vida do parasita. A análise dos fragmentos amplificados a partir do DNA genômico mostrou a ausência de íntros na região codificadora dos três genes conforme observado na seqüência de genes relacionados de outros organismos. Através da análise das seqüências de nucleotídeos e aminoácidos se observou a alta conservação dos resíduos, em especial na região do domínio UBC, que caracteriza as enzimas dessa espécie.

O presente trabalho sugere a presença de uma via conservada de tolerância a lesões no DNA dependente de ubiquitina em *S. mansoni* que possivelmente está ativa durante todos os estágios do ciclo de vida e dessa forma mantém a integridade do genoma do parasita nos diferentes ambientes em que se localiza.

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS ENZIMAS DESUBIQUITINADORAS 7 E 12 DURANTE O CICLO DE VIDA DO PARASITA *SCHISTOSOMA MANSONI*

Andressa Barban do Patrocínio Andreolli

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Rodrigues

Dissertação de Mestrado apresentada em 11/10/2005

A via de modificação pós-traducional dependente de ubiquitina direciona a regulação de diversos processos biológicos tais como, controle do ciclo celular, ativação da

transcrição, transdução de sinal e proteólise intracelular dependente do proteossoma 26S.

A conjugação e a ativação da molécula de Ubiquitina (Ub) envolvem três enzimas distintas: a enzima ativadora (E1), dependente de ATP, conjugadora (E2) e a ligase (E3). Esse processo é reversível, sendo regulado pelas enzimas envolvidas na conjugação e também por enzimas chamadas desubiquitinadoras (DUBs). Essas últimas clivam a ligação isopeptídica entre as ubiquitinas que formam a cadeia poliubiquitinada, mantendo o pool livre de Ub intracelular; clivam a ligação entre a Ub e o substrato mono ou poliubiquitinado; e processam a pré - proteína, dando origem a forma madura de Ub.

As enzimas desubiquitinadoras são divididas em cinco famílias: as ubiquitinas C-terminal hidrolases (UCHs), proteases específicas para ubiquitina (USPs), otubaínas, proteases ataxina3/josephim e isopeptidases do tipo JAMM.

Dentro desse contexto, o nosso trabalho teve como objetivo determinar as diferentes DUBs presentes em *S. mansoni*, através de análises de bioinformática no banco de dados do Projeto Genoma do *Schistosoma*, as quais mostraram a existência de 32 clusters relacionados a essas enzimas; sequenciar, caracterizar e analisar a expressão dos genes que codificam para as enzimas DUB7 e DUB12 nesse parasita.

Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores gene-específicos, idealizados com base nos clusters SmAE 604756 e 602388, para amplificar um produto com 800 e 736 pb, através da técnica de RT-PCR, da fase de verme adulto.

Depois disso, foi extraído o RNA total das diversas

fases do parasita (esporocistos mãe e filho, ovos, esquistossômulos de 3 horas, e cercárias) e procedemos à técnica de RT-PCR. Para SmDUB7 obtivemos um padrão de expressão, mas para a SmDUB12 a técnica de RT-PCR não possibilitou amplificar os cDNAs para esquistossômulos e ovos devido aos baixos níveis de transcritos.

O tamanho da mensagem codificadora, bem como o perfil da população de mRNA em verme adulto foi verificado, utilizando a técnica de Northern Blot. Para SmDUB7 obtivemos uma banda de 5,46Kb e para a SmDUB12 uma banda de 1,7Kb.

Para determinar o perfil genômico desses dois genes em parasitas adultos, foram utilizadas as técnicas de PCR e Southern Blot. O resultado da seqüência genômica, para o fragmento do gene SmDUB7, mostrou não haver interrupções por regiões não codificadoras na região codificadora analisada. Por outro lado, a SmDUB12 mostrou que o fragmento gênico correspondente a região codificadora é interrompida por pequenas regiões não codificadoras o que é uma característica do genoma de *S. mansoni*, descrita anteriormente para outros genes do parasita. A técnica de Southern Blot mostrou que existe apenas uma cópia desse gene por genoma haplóide nesse parasita para a SmDUB12.

Esses dados juntamente com outros resultados obtidos pelo nosso grupo, apontam para a forte evidência de que ciclos de ubiquitinação/desubiquitinação podem estar envolvidos em processos celulares críticos durante um ciclo biológico completo do *S. mansoni*. No entanto, podemos ressaltar que esta caracterização inicial constitui uma abordagem pioneira no estudo destas enzimas em parasitos helmintos.

CLÍNICA CIRÚRGICA

ESTUDO DA INERVAÇÃO MOTORA E ENTÉRICA, DA MUSCULATURA DA PELVE E DAS ALTERAÇÕES SACRAIS EM FETOS DE RATOS COM ANOMALIA ANORRETAL INDUZIDA PELA ETILENOTIOURÉIA

Evandro Luis da Cunha Oliveira

Orientadora: Profa. Dra. Yvone Avalloni de M. V. A. Vicente
Tese de Doutorado apresentada em 02/08/2005

A anomalia anorretal (AAR), malformação congênita cuja característica é a imperfuração ou ectopia do orifício

anal, associada ou não a defeitos de posição do reto, ocorre dentro de um espectro de gravidade.

Neste trabalho foram estudadas as inervações motora e entérica, a musculatura da pelve e as alterações sacrais, em fetos de ratos com e sem anomalia anorretal, induzida pela etilenotiouréia.

Foram utilizadas 60 fêmeas gerando 243 fetos, dos

quais 43 eram controles, 118 eram portadores de anomalia anorretal (malformados) e 82 foram submetidos ao efeito da droga mas não apresentavam anomalia anorretal (afetados). As anomalias associadas mais freqüentes foram: 55 fetos com espinha bífida, 20 com encefalocele e 5 com alterações de membros inferiores. O sacro estava malformado em 45 % dos ratos afetados e em 53,2 % dos ratos malformados.

A inervação motora foi estudada por meio da relação número de placas motoras / área muscular e a inervação entérica considerando-se o número de pontos visuali-

zados por campo fotográfico, para cada corte. (Tabela I)

Concluiu-se que há redução da inervação motora, na musculatura pélvica de ratos com anomalia anorretal, induzida pela ETU e também nos fetos expostos ao efeito da droga, mas sem anomalia anorretal. A inervação entérica está alterada nos fetos com anomalia anorretal, mas não nos fetos expostos à droga e sem anomalia. A alteração sacral, quando presente, não interferiu nos resultados, quando comparados dentro do mesmo grupo (ratos afetados ou malformados).

Tabela I – Resultados finais do estudo imuno-histoquímico e histológico

	A			B			C			D		
	C	A	MF	C	A	MF	C	A	MF	C	A	MF
placas motoras / área muscular (x 10 ⁻⁶)	2567 / sd 1163	1007 / sd 874 **	530 / sd 1044 **	1594 / sd 623	1319 / sd 984	598 / sd 560 **	1438 / sd 534	845 / sd 228 **	563 / sd 384 **	1526 / sd 549	862 / sd 348 **	592 / sd 315 **
SNE / foto	-	-	-	7,1 / sd 7,4	6,9 / sd 8,2	0,06 / sd 0,3 **	14,3 / sd 5,9	18,4 / sd 7,5	6,5 / sd 8,9 **	19,8 / sd 5,6	22,6 / sd 10,0	14,9 / sd 8,3

** diferença estatística comparada ao controle, p ≤ 0,05

ESTUDO *IN VITRO* DA REATIVIDADE VASCULAR DE AORTAS DE COELHOS SOB A AÇÃO DO COMPOSTO 48/80

Fernanda Viaro Borges

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Barbosa Evora
Dissertação de Mestrado apresentada em 12/08/2005

O Composto 48/80 (C48180), um clássico liberador de histamina, é um produto de condensação sintético de N-metil-p metoxifenetilamina com formaldeído. A presente investigação experimental objetivou investigar o C48/80 como uma possível alternativa farmacológica para o estudo *in vitro* do relaxamento vascular através da ativação direta de G-proteínas.

Segmentos de aorta de coelho, com e sem endotélio, foram suspensos em câmaras de órgão (10 ml) preenchidas com solução de Krebs mantida a 37°C, borbulhada com 95% O₂/5% CO₂ (pH 7.4). Fenilefrina foi usada para contrair os segmentos antes do C48/80, que foi usado para induzir relaxamento vascular. Outras drogas do protocolo inclui-

ram: inibidores da síntese de prostanóides, óxido nítrico, receptores de histamina H₁ e H₂ e de canal para cálcio. Também foi estudado relaxamento vascular induzido por C48/80 em solução de Krebs livre de cálcio.

Os resultados principais obtidos com respeito à ação do C48180 foram: a) C48/80 causa relaxamento dependente do endotélio via produção de NO; b) C48/80 é dependente da expressão da isoforma eNOS; c) C48/80 é dependente da ativação de cGMP; d) C48/80 é independente da mobilização de cálcio extracelular e; e) C48/80 é independente de receptores da histamina H₁ e H₂.

Nossos dados sugerem, com grande margem de segurança, que C48/80 induz síntese de NO por ativação direta de G proteínas. Como tal, é possível que C48/80 possa ser uma valiosa ferramenta farmacológica para estudar *in vitro* a transdução de sinal, que é uma função altamente específica da família de G-proteínas.

REATIVIDADE VASCULAR DA ARTÉRIA FEMORAL CANINA: ESTUDO FARMACOLÓGICO DA FUNÇÃO ENDOTELIAL E ATIVIDADE ÓXIDO NÍTRICO SÍNTASE NA ISQUEMIA-REPERFUSÃO DE EXTREMIDADE

Edwaldo Edner Joviliano

Orientador: PROF.DR. Jesualdo Cherri

Tese de Doutorado apresentada em 11/8/2005

Os mecanismos da **lesão de isquemia e reperfusão** relacionam-se com disfunção endotelial, que entre outros processos biofarmacológicos, devem-se à diminuição da produção do óxido nítrico (NO) ou da sua biodisponibilidade, expondo os vasos sanguíneos ao risco de espasmo e trombose. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de bloqueadores da atividade do óxido nítrico (L-Name, aminoguanidina e azul de metileno) utilizado *in vivo* em animais, estudando as vias de produção do NO através da utilização de agonistas dependentes e independentes de receptores de membrana da célula endotelial *in vivo* e dosando a variação da concentração de nítros e nitratos nas diferentes condições. O modelo experimental escolhido foi isquemia parcial das extremidades inferiores (patas traseiras) de cães, submetidos à oclusão temporária da artéria aorta abdominal infra-renal, padronizando oito grupos experimentais (N=6): 1) Grupo controle (ctl), 2) Grupo isquemia (90 min.), reperfusão (60 min.), (I/R); 3) Grupo controle / azul de metileno, 4) Grupo isquemia (90 min.), reperfusão (60 min.) / azul de metileno, 5) Grupo controle / L-NAME; 6) Grupo isquemia (90 min.) – reperfusão (60 min.) / L-NAME 7) Grupo controle / aminoguanidina, 8) Grupo isquemia (90 min.)- reperfusão (60 min.) / aminoguanidina. A reatividade vascular da artéria femoral foi estudada *in vitro* em sistema de banhos orgânicos (*organ chambers*), onde segmentos de 4 a 5 mm, com e sem endotélio, foram suspensos e conectados a transdutores de força. Todos os passos da via de liberação do NO foram estudados: 1) Receptores

(acetilcolina e ADP): 2) Transdução de sinal pelas G-proteínas (fluoreto de sódio), 3) Processos intracelulares independentes de receptores (fosfolipase C e ionóforo do cálcio) e 4) Função da musculatura lisa (nitroprussiato de sódio/sistema GMPc e isoproterenol/sistema AMPc). Além da reatividade vascular foi realizada dosagem de nítros e nitratos no plasma de todos os animais, analisando a variação da concentração em diferentes momentos do experimento. O azul de metileno provocou diminuição no relaxamento vascular induzido pela ACH e ADP no grupo I/R e também no relaxamento induzido pelo isoproterenol no grupo ctl. A aminoguanidina causou diminuição no relaxamento vascular induzido pela PLc no grupo ctl. Também houve diminuição no relaxamento pela PLc e ADP e ADP no grupo I/R de animais submetidos a administração de aminoguanidina. A L-NAME provocou a diminuição do relaxamento induzido por todas as drogas agonistas do NO ainda no grupo ctl. Os animais submetidos à isquemia-reperfusão, nos quais foi administrado a L-NAME, não sobreviveram ao experimento. A variação na concentração sérica de nítros e nitratos foi pouco significativa exceto nos animais submetidos a administração de L-NAME, que tiveram a maior variação negativa. Analisando os resultados obtidos concluímos que: 1) O óxido nítrico derivado da iNOS participa de mecanismo compensatório protetor do endotélio no evento isquemia reperfusão de extremidades em cães; 2) A utilização *in vivo* do bloqueio inespecífico da NOS afeta de maneira acentuada a função endotelial, tornando proibitivo sua utilização em ensaios clínicos e 3) A utilização do azul de metileno na isquemia reperfusão de extremidade, provocou deterioração na reatividade vascular induzida pela ACH e ADP, indicando a necessidade de novos estudos para melhor definir a ação desta droga na referida condição.

EFEITO DO LASER NO TECIDO HEPÁTICO REMANESCENTE APÓS HEPATECTOMIA 90% EM RATOS

Alexandre Ferreira Oliveira

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

Tese de Doutorado apresentada em 15/09/2005

O efeito fotobioestimulador do laser de baixa potência é uma modalidade terapêutica que progressivamente vem crescendo. Presume-se que este conduza a alterações confor-

macionais na estrutura dos citocromos dos hepatócitos, expressando um aumento do metabolismo energético do fígado de ratos submetidos à hepatectomia. As perspectivas de aplicação do laser na insuficiência hepática aguda motivam pesquisas com intuito de aumentar as opções terapêuticas para essa doença. O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da irradiação a laser, nos ratos submetidos a hepatectomia a 90%. O laser foi aplicado em cinco pontos do

fígado remanescente, por 30 segundos em cada um deles, com comprimento de onda de 660 nm e intensidade 30 mW. Os animais foram sacrificados após 24, 48 e 72 horas para coleta de sangue sendo realizado as dosagens bioquímicas de bilirrubina total (BT) e frações; da alanina-aminotransferase (ALT); aspartato-aminotransferase (AST); fosfatase alcalina (FA) e desidrogenase láctica (DHL) e análise do fígado através de imunohistoquímica utilizando o PCNA (Antíge-

no Nuclear de Proliferação Celular). Nos grupos irradiados com laser os resultados mostraram diminuição nos níveis de bilirrubina direta (BD) nos grupos de 48 e 72 horas; acréscimo do nível sérico de ALT no grupo de 24 horas e decréscimo no grupo de 72 horas e o aumento do índice de células marcadas (ICM) no grupo de 72 horas. A análise dos resultados demonstrou que o laser não causou lesões hepáticas adicionais à ressecção e estimulou a atividade proliferativa.

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS DO NERVO ÓPTICO DE RATOS WISTAR NORMAIS E COM ANEMIA FERROPRIVA

Gabriel Ribeiro

Orientador: Prof. Dr. João José Lachat

Dissertação de Mestrado apresentada em 18/10/2005

Muitos investigadores têm demonstrado que a diminuição da ingestão de ferro leva a mudanças morfológicas e bioquímicas no sistema nervoso central. A deficiência de ferro é uma das mais comuns desordens nutricionais em pacientes pediátricos e adultos e atinge cerca de 2,5 a 5 bilhões de pessoas em todo mundo. A consequência mais explícita da deficiência de ferro é a anemia. A relação entre a integridade do sistema visual e a anemia ferropriva tem sido estudada em seres humanos através de potenciais visuais evocados. O ferro está relacionado ao desenvolvimento de fibras mielínicas e sua deficiência induz alterações na mielinização. Sendo grande parte das fibras do nervo óptico mielínicas, o objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos da anemia sobre parâmetros morfométricos do nervo óptico de ratos Wistar, no período de amamentação e desmame.

Os animais foram divididos em 2 grupos: Controle e Anêmico. O grupo anêmico recebeu uma dieta com 4 mg de ferro/Kg, e o grupo controle recebeu uma dieta com 35 mg de ferro/Kg. Avaliações do peso corpóreo, hemoglobina e hematócrito foram feitas para analisar os efeitos da deficiência de ferro. Os animais foram anestesiados e sacrificados

por perfusão cardíaca com PBS 0,05 M em pH 7,4, seguido da mistura fixadora paraformaldeído 2% mais glutaraldeído 1% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4). O nervo óptico foi dissecado e imerso em solução de tetróxido de ósmio a 1% por duas horas a 4 °C, desidratado em acetona e incluído em araldite. As amostras do nervo óptico foram orientadas para permitir secções transversais de suas fibras. Secções semi-finas (0,5µm) foram obtidas, montadas em lâminas histológicas, coradas com azul de toluidina 1%, utilizadas para documentação fotográfica e para análises morfológicas e morfométricas. Foram avaliadas as densidades de vasos sanguíneos, oligodendrócitos, astrócitos e fibras mielínicas lesadas. Os valores hematológicos e do peso corpóreo estavam diminuídos no grupo anêmico. A análise estrutural mostrou que os animais do grupo anêmico têm o espaço intersticial aumentado separando as fibras do nervo óptico, levando a um menor empacotamento destas. A análise morfométrica do grupo anêmico revelou uma significativa diminuição da densidade de vasos sanguíneos (18° e 32° dia) e oligodendrócitos (32° dia) e um aumento da densidade de fibras mielínicas lesadas (32° dia). Por outro lado a densidade de astrócitos aumentou no grupo anêmico (32° dia). Os resultados demonstraram que o modelo experimental induziu a anemia ferropriva efetivamente, causando lesões morfológicas e alterações morfométricas no nervo óptico de ratos Wistar.

ANALGESIA INTRA E PÓS-OPERATÓRIA COM A COMBINAÇÃO DE BAIXAS DOSES DE CLONIDINA E MORFINA POR INFUSÃO PERIDURAL CONTÍNUA EM CRIANÇAS SUBMETIDAS A CIRURGIAS ABDOMINAIS DE GRANDE PORTE

Magaly Santoni

Orientador: Prof. Dr. Jyrson Guilherme Klamt

Tese de Doutorado apresentada em 27/10/2005

Justificativa e objetivo: Estudos em adultos tem demonstrado uma potente interação na administração de clonidina e morfina peridural para o controle da dor após

cirurgia abdominal. Além disso, essa combinação ou clonidina administrada isoladamente, tem um efeito na redução do consumo de anestésico. Esse estudo foi empreendido para avaliar a eficácia e segurança analgésica no intra e pós-operatório da combinação de baixas doses de clonidina e morfina por infusão peridural contínua em crianças submetidas a cirurgias abdominais de grande porte.

Metodologia: Após aprovação do Comitê de Ética e obtido consentimento dos pais ou responsáveis, foram analisadas 30 crianças, entre 2 e 149 meses, submetidas a cirurgias abdominais de grande porte e, divididas em 2 grupos através de sorteio pré-definido. No grupo C, foi administrado um bolus de $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de cetoprofeno intravenoso, seguido de infusão contínua por 24 horas de $0,2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, sendo essa, uma das rotinas de tratamento de dor pós-operatória do serviço. No grupo C+M, foi administrado um bolus no cateter peridural de $0,7 \text{ mcg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de clonidina e $7 \text{ mcg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de morfina antes do início da cirurgia, seguido de infusão contínua por 24 horas de $0,12 \text{ mcg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ e $1,2 \text{ mcg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ de clonidina e morfina respectivamente. A concentração inspiratória de isoflurano requerida para manter, no intra-operatório, valores pressóricos dentro de 20% abaixo do valor pré-anestésico, foi mensurada a cada 10 minutos durante a cirurgia. Foi utilizado tramadol, na dose de $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, como analgésico de resgate, no pós-operatório. A recupera-

ção da anestesia geral também foi avaliada na sala de cirurgia e na sala de recuperação pós-anestésica.

Resultados: Foi observada uma redução significativa nas concentrações inspiratórias de isoflurano, nos tempos de 20, 60 e 90 minutos após o início da cirurgia e mantida durante a cirurgia no grupo C + M, comparado ao grupo C. O tempo de manutenção da anestesia somente com a mistura de $\text{N}_2\text{O} : \text{O}_2$ (50% : 50%) comparado com o final da cirurgia, também apresentou resultados significativos no grupo C + M. O tempo requerido entre o final da cirurgia e a primeira dose de analgesia de resgate (tramadol) foi significativamente maior no grupo C + M, apesar de não ter apresentado diferença significativa entre o número de doses utilizadas nas 24 horas após o término da cirurgia. O tempo transcorrido entre o final da cirurgia e a saída do paciente da sala cirúrgica, foi significativamente menor no grupo C + M. Não foi observado depressão respiratória ou aumento na incidência de vômitos. Dois casos de hipotensão moderada, um caso de retenção urinária e um caso de prurido foi observado no grupo C + M.

Conclusão: A combinação de baixas doses de clonidina e morfina por infusão peridural contínua, reduz o consumo de anestésico no intra-operatório além de proporcionar uma analgesia pós-operatória efetiva e segura em crianças submetidas a cirurgias abdominais de grande porte.

ESTUDO DO EFEITO PROTETOR DA CLORPROMAZINA NA ISQUEMIA RENAL NORMOTÉRMICA, COM CINTILOGRAFIA RENAL DINÂMICA COM $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG3}$ E ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Whemberton Martins de Araújo

Orientador: Prof. Dr. Silvio Tucci Jr.

Tese de Doutorado apresentada em 18/11/2005

A necrose tubular aguda (NTA) é uma complicação frequentemente observada no pós-operatório imediato do transplante renal. Apesar de importantes avanços, ainda persiste a necessidade de melhores métodos de preservação da viabilidade do rim doado. Soluções de perfusão e métodos farmacológicos de proteção são atualmente utilizados e/ou permanecem em avaliação. No presente trabalho, propomos avaliar o efeito protetor da clorpromazina (CPZ) em modelo experimental de isquemia renal normotérmica, utilizando cintilografia renal dinâmica (CRD) e análise histopatológica (AH). Foram analisados 25 ratos adultos machos, divididos em 3 grupos: grupo A (controle), grupo B (isquemia sem CPZ) e grupo C (isquemia com CPZ), todos previamente estudados CRD com $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG3}$ (estudo basal), e em seguida submetidos à cirurgia, com isolamento da artéria renal esquerda (ARE). Nos grupos B e C foi provocada isquemia do rim esquerdo (através de obstrução arterial com pinça metálica, durante 1 hora e, poste-

rior reperfusão), sendo que o grupo C recebeu dose prévia endovenosa de 3 mg/kg de CPZ, 15 minutos antes da isquemia. O grupo A teve a ARE apenas isolada, porém não obstruída. Todos os grupos tiveram o rim direito preservado, e submetidos à segunda CRD, após 24 horas. Do total de 25 animais, 15 foram mantidos sedados (após segunda CRD, todos os 5 animais do grupo A; 5 animais do grupo B, e 5 do grupo C), em seguida nefrectomizados e sacrificados. Os 10 animais restantes (grupos B e C) foram novamente estudados 8 dias pós-isquemia, com terceira CRD, sendo em seguida mantidos sedados, e na seqüência, nefrectomizados e sacrificados. Não houve óbito relacionado à isquemia. Todas as peças histológicas obtidas (rins esquerdo e direito) foram rapidamente imersas em formol tamponado (a 10%), imediatamente após a vivisseção. A análise cintilográfica constou de quantificação da função relativa no primeiro minuto da fase funcional. A avaliação histopatológica foi realizada por dois observadores, considerando a presença de: dilatação da luz tubular (DLT), vacuolização (VC) e necrose celular (NC), cilindros intratubulares (CIT) e fibrose intersticial (FI). Escore histomorfométrico utilizado: 0 – Normal; 0,5 – Pequenas

áreas focais; 1 – Menor que 10%; 2 – 10 a 25%; 3 – 25 a 75%; 4 – Superior a 75%. No grupo B, observou-se importante redução da função renal esquerda (NTA) nas imagens cintilográficas 24 horas pós-isquemia, comparativamente ao estudo basal do mesmo grupo ($p < 0.001$) e do grupo controle (grupo A, com $p < 0.001$). No grupo C (isquemia + clorpromazina) observou-se déficit funcional do rim esquerdo pós-isquemia, comparativamente ao estudo basal do mesmo grupo ($p < 0.01$), porém com déficit significativamente menor quando comparado ao grupo isquemia (grupo B, com $p < 0.001$). O seguimento com 8 dias demonstrou melhor recuperação funcional do rim esquerdo no grupo C, comparativamente ao grupo B ($p = 0.01$). Padrões funcional

e histológico preservados nos rins controles (rim direito) de todos os grupos, assim como nos rins esquerdos nos animais do grupo A. Quanto à AH, observou-se significativa preservação tecidual (embora parcial) nos rins (esquerdos) coletados 24 horas pós-isquemia do grupo C, comparativamente ao grupo B, principalmente nos quesitos DLT e CI ($p < 0.05$), assim como melhor recuperação tecidual observada 8 dias pós-isquemia, principalmente referente aos quesitos VC e NC ($p < 0.01$). Somente algumas áreas de FI foram observadas nas amostras 8 dias pós-isquemia (não significativas). Os achados cintilográficos e histopatológicos são consistentes com significativo efeito protetor da CPZ frente à isquemia renal normotérmica.

EFEITO DA TALIDOMIDA NA CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSES COLÔNICAS. ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS

Samuel Gama e Veneziano

Orientador: Prof. Dr. Omar Féres

Dissertação de Mestrado apresentada em 18/11/2005

A cicatrização desperta muito interesse para o cirurgião e é um processo complexo e depende de múltiplos fatores para sua realização, seja intrínsecos ou extrínsecos. Sabe-se que agentes farmacológicos podem influir neste processo. Dos agentes farmacológicos, a talidomida, devido suas propriedades anti-inflamatórias, tem ressurgido como uma opção no tratamento da doença de Cröhn refratária à terapêutica convencional. Neste trabalho, estudamos o efeito da talidomida na cicatrização de anastomoses colônicas no rato. Foram utilizados 60 animais *Rattus norvegicus*, sexo masculino, entre 60 a 80 dias de vida, com peso médio de 300g. Organizou-se 3 grupos de 20 animais, sendo um grupo controle (AC) com administração de solução salina por 7 dias, um grupo (BD), com administração de talidomida 0,5 mg/kg por 7 dias e um grupo (AD) com administração de talidomida 1,0 mg/kg por 7 dias. Todos foram operados após a administração prévia das soluções com colotomia de colon

esquerdo e anastomose término-terminal contínua de prolene 6-0. O sacrifício foi no 7º. dia pós operatório e as anastomoses foram analisadas quanto a aspecto macroscópico, dosagem de hidroxiprolina, histologia em hematoxilina-eosina e imunohistoquímica para metaloproteinase 1, inibidor de metaloproteinase 1 e VEGF. Feito a análise estatística dos resultados, não houve diferença estatisticamente significativa para a observação macroscópica, sem diferença para dosagem de hidroxiprolina ($p = 0,5403$), com diferença para alguns padrões histológicos como crosta fibrino-leucocitária, necrose, edema, hemorragia, neoformação vascular e fibrose. Na análise imunohistoquímica, para VEGF houve $p = 0,5817$, para metaloproteinase 1, $p = 0,1854$ e para inibidor de metaloproteinase, $p = 0,0023$, considerado estatisticamente significativo. Concluímos que a talidomida influenciou na maturação do colágeno formando anastomoses com menor fibrose, necrose, crosta fibrino-leucocitária, mais remodelação, sem grande atuação na ação do VEGF e sem danos à vasculatura da anastomose. Notou-se maior ação das metaloproteínas, que pode significar uma tendência negativa para o processo cicatricial.

EXPRESSÃO DE RNA MENSAGEIRO DOS RECEPTORES DE SEROTONINA, 5HT1A E 5HT2A, DE NORADRENALINA, ADRA1A E ADRA2A, E DE BDNF EM HIPOCAMPOS DE PACIENTES COM ESCLEROSE HIPOCAMPAL

Alexandre Magno de Nóbrega Marinho

Orientador: Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Jr.

Tese de Doutorado apresentada em 19/12/2005

A epilepsia é uma doença crônica de etiologia multifatorial. A elucidação dos mecanismos moleculares e celu-

lares na epileptogênese pode resultar no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos objetivando a prevenção e um melhor manejo da doença. Uma hipótese pouco explorada clinicamente, ou em experimentos, é a relação da epilepsia com o sistema serotoninérgico de neurotransmissão. Além da epilepsia, as deficiências nesse sistema têm

sido associadas a distúrbios como estresse, ansiedade e depressão, doenças nas quais alterações no sistema serotoninérgico são amplamente conhecidas. Uma forte sugestão de correlação epilepsia e sistema serotoninérgico é a relevante ocorrência de episódios depressivos na doença epiléptica. Quantificou-se a expressão gênica pelo método de PCR em tempo real de RNA mensageiro dos receptores de serotonina, 5HT1A e 5HT2A, receptores de noradrenalina, e BDNF em hipocampos com esclerose por epilepsia.

Agrupando o material estudado em pacientes epilépticos, sem depressão (n=28); epilépticos com depressão (n=9), e um grupo controle (n=4), sem epilepsia e sem depressão, onde motivo operatório foi tumor mesial temporal. Concluiu-se que não existe diferença significativa ($\alpha=5\%$) entre os epilépticos, depressivos ou não, em todos os genes estudados; apenas uma diferença estatisticamente significativa quanto a hipoexpressão relativa de 5HT1A quando se comparou os controles com os epilépticos.

AValiação DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA PRION CELULAR EM HIPOCAMPOS HUMANOS

Marcelo Neves Linhares

Orientador: Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Junior
Tese de Doutorado apresentada em 21/12/2005

A proteína prion celular (PrPc) é expressa em altas concentrações no sistema nervoso central, sendo mais abundante no córtex cerebral, hipocampo e estriado, enquanto níveis moderados são detectados no bulbo olfatório, hipotálamo, mesencéfalo, cerebelo e tronco cerebral. Animais em que o gene da PrPc foi removido apresentam uma alta sensibilidade a crises epilépticas induzidas. Pacientes operados de epilepsia do lobo temporal (ELT) associado à esclerose do hipocampo que apresentam alelo variante no códon 171 têm uma pior resposta ao tratamento cirúrgico quando comparados aos que possuem o alelo normal. Em nosso trabalho, avaliamos a expressão de PrPc em hipocampos humanos através de imunohistoquímica para o prion em 4 grupos: pacientes portadores de epilepsia do

lobo temporal associado à esclerose do hipocampo (ELT-EH) portadores de alelo normal no códon 171 (N171N), pacientes portadores de ELT-EH que possuem o alelo variante no códon 171 (N171S), pacientes com ELT associada a lesões corticais e hipocampos retirados de autópsia de pacientes sem doença neurológica ou psiquiátrica. Em nossos dados encontramos um aumento significativo da espessura da região interna do estrato molecular do giro denteado nos grupos de ELT-E1-1 quando comparados aos grupos autópsia e lesão, que pode estar relacionado ao brotamento que ocorre nesta região em pacientes portadores de epilepsia. A expressão da PrPc nas regiões do hipocampo (CA1 a CA4) foi variável entre os grupos e entre pacientes de um mesmo grupo. No grupo lesão a expressão da PrPc foi menor nas regiões CA1, CA2 e CA3 quando comparada ao grupo autópsia, enquanto que o grupo autópsia apresentou forte imunoreatividade em todas as regiões.

CLÍNICA MÉDICA

EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO NA LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA/ LINFOMA LINFOCÍTICO E EM LINFOMAS NÃO-HODGKIN B EM FASE LEUCÊMICA

Daniel Mazza Matos

Orientador Prof. Dr. Roberto Passetto Falcão
Dissertação de Mestrado apresentada em 22/07/2005

As moléculas de adesão representam um conjunto de famílias de receptores e contra-receptores que atuam em diversos processos biológicos, entre os quais a migração celular. Desde que as células dos linfomas não-Hodgkin B (LNH-B) são as correspondentes malignas dos linfócitos B

que sofreram um ou mais eventos de transformação neoplásica em algum estágio do seu desenvolvimento, é possível que essas células utilizem os mesmos mecanismos de migração linfocitária como método de disseminação a partir do seu tecido de origem, qual seja, o gânglio linfático, nos casos dos LNH-B nodais. Neste estudo foi analisada a expressão de 10 moléculas de adesão (CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD49c, CD49d, CD29, CD44, CD54, CD62) no sangue periférico e, ou no gânglio linfático de 58 pacientes com o diag-

nóstico de leucemia linfocítica crônica/linfoma linfocítico e outros LNH-B em fase leucêmica (linfoma de células do manto, linfoma da zona marginal esplênica e nodal e linfoma folicular), com o objetivo de melhor compreender os mecanismos de disseminação empregados por essas neoplasias linfóides. Foi utilizada a intensidade de fluorescência média (I.F.M) aferida por técnica de citometria de fluxo nas amostras de sangue periférico e gânglio linfático com o intuito de quantificar a intensidade de expressão das moléculas de adesão. A expressão dessas moléculas foi comparada entre as células malignas do sangue periférico dos pacientes com leucemia linfocítica crônica/linfoma linfocítico e os outros subtipos de LNH-B em fase leucêmica. A expressão das moléculas de adesão foi também comparada entre as células malignas do sangue periférico e do gânglio linfático dos pacientes com leucemia linfocítica crônica/linfoma linfocítico, bem como entre as células do sangue periférico e do gânglio linfático dos pacientes com os outros subtipos de

LNH-B em fase leucêmica, constituindo, esses últimos, um grupo único. A leucemia linfocítica crônica/linfoma linfocítico apresentou a menor intensidade de expressão para as integrinas CD11a, CD11b, CD18 e CD49d, e a maior intensidade de expressão para o CD49c, nas células do sangue periférico, quando comparada com os outros subtipos de LNH-B. O linfoma da zona marginal mostrou a maior intensidade de expressão para o CD11c e o CD54. A comparação entre as amostras de sangue periférico e gânglio linfático evidenciou uma forte tendência para uma menor expressão de CD11a e CD49d nas células em circulação, nos casos de leucemia linfocítica crônica/linfoma linfocítico; e menor expressão do CD54 nas células em circulação nos casos de LNH-B em fase leucêmica. A leucemia linfocítica crônica/linfoma linfocítico apresenta um perfil de expressão de moléculas de adesão bem distinto de outros LNH-B, o que poderia responder pelo seu comportamento biológico caracterizado pela freqüente invasão da corrente sanguínea.

GERAÇÃO DE DUAS POPULAÇÕES CELULARES TRANSGÊNICAS SUPER-EXPRESSANDO OS GENES BCRABL PARCIAL E B7.1

Fabiola Singaretti de Oliveira

Orientadora: Profa. Dra. Aparecida Maria Fontes

Dissertação de Mestrado apresentada em 12/08/2005

A modificação gênica de células dendríticas em Leucemia Mielóide Crônica (LMC) com os genes BCRABL parcial e o gene B7.1 pode consistir uma estratégia de vacinação alternativa que permitirá a apresentação de múltiplos antígenos leucêmicos e de maneira eficiente com a super-expressão de uma das moléculas co-estimuladoras da resposta imune. Entre os diferentes protocolos de modificação gênica, o uso do sistema retroviral tem se mostrado favorável em estudos de terapia gênica envolvendo as células tronco hematopoéticas. Assim, esse trabalho visa o estabelecimento de duas populações celulares produtoras de retrovírus super-expressando esses genes. No que diz respeito a geração da população celular produtora do retrovírus portador do gene BCR-ABL parcial, inicialmente, um fragmento de DNA de 531 bp relativo a região de fusão do gene BCRABL foi isolado por PCR partindo do DNA plasmidial MIGR1 portador do cDNA BCRABL inteiro e sub-clonado no vetor retroviral plasmidial pBMN-I-GFP. Em seguida, foi realizada a co-transfecção do plasmídeo recombinante pBMN-BCRABL-I-GFP com o plasmídeo pCDNA3.1/Neo portador do gene que confere resistência a neomicina na linhagem celular ecotrópica Eco-PackTM-293. Análises por citometria de fluxo mostraram uma expressão transitória de 13% e após a seleção com geneticina foi diag-

nosticado um aumento de 6X no nível de expressão do gene GFP. Posteriormente, o sobrenadante retroviral produzido pela linhagem Eco-PackTM-293/BCRABL⁺ foi utilizado para transduzir a linhagem celular anfotrópica PG-13/LNc8 e após o rastreamento por citometria de fluxo foi possível o isolamento de um clone celular com níveis de expressão de GFP de 99% e título retroviral da ordem de $4,4 \times 10^6$ pfu/ml. No que diz respeito ao estabelecimento de uma linhagem celular produtora de retrovírus portador do cDNA relativo ao gene B7.1, inicialmente foi isolado o fragmento de DNA de 866 bp a partir do RNA total extraído de células dendríticas geradas *ex-vivo*, e em seguida, esse fragmento de DNA foi sub-clonado no vetor retroviral plasmidial pBMN-I-GFP. Posteriormente, foi realizada a co-transfecção do plasmídeo recombinante pBMN-BCRABL-I-GFP com o plasmídeo pCDNA3.1/Neo na linhagem Eco-PackTM-293 o que resultou em uma eficiência da transfecção de 16%. Após a seleção com o antibiótico, seguido do rastreamento por citometria de fluxo essa população celular passou a expressar níveis de GFP da ordem de 94%. Finalmente, o sobrenadante retroviral produzido pela linhagem Eco-PackTM-293/B7.1⁺ foi utilizado para transduzir a linhagem PG-13/LNc8 e após o rastreamento celular por citometria de fluxo foi isolado um clone celular com níveis de expressão de GFP de 71% e título retroviral da ordem de $4,4 \times 10^6$ pfu/ml. Em conjunto, esse trabalho mostra a geração de duas populações celulares produtoras de retrovírus portadoras de dois genes terapêuticos que poderão ser utilizados no desenvolvimento de protocolos de vacinação para LMC.

CONTRIBUIÇÃO DA TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (TC) NO DIAGNÓSTICO DE LESÕES TRAUMÁTICAS DO BAÇO E DO FÍGADO

Valéria Cristiane Nakano Junqueira

Orientador: Prof. Dr. Clóvis Simão Trad

Dissertação de Mestrado apresentada em 23/08/2005

O trauma constitui um dos principais problemas de saúde pública mundial. No Brasil é a segunda causa de morte em geral e a primeira causa de morte entre 11 e 40 anos de vida, o que tem provocado forte impacto na morbidade e mortalidade da população.

Na década de 80, houve importantes avanços no tratamento dos pacientes traumatizados com a criação e desenvolvimento do Sistema de Atendimento às Emergências Médicas e o uso disseminado da tomografia computadorizada. Esse exame tornou-se fundamental na avaliação dos pacientes vítimas de trauma, devido à sua alta sensibilidade (100%), especificidade (97,6%) e acurácia (96,8%) na detecção da presença e extensão das lesões. A utilização de tomografia computadorizada na avaliação do trauma abdominal tem diminuído o número de laparotomias desnecessárias e aumentado o tratamento conservador não operatório em lesões traumáticas de órgãos parenquimatosos.

Neste trabalho retrospectivo procurou-se avaliar os achados tomográficos em pacientes com trauma esplênico e/ou hepático e o impacto em relação ao tipo de tratamento, comparando os achados tomográficos do laudo original

com os achados após a revisão desses exames e com as descrições cirúrgicas dos pacientes que foram para laparotomia exploradora. Foram estudados 57 pacientes submetidos à avaliação por TC das lesões abdominais decorrentes do trauma no período de 13/12/1997 a 15/09/2003 e que apresentaram lesões esplênicas e/ou hepáticas nos exames de TC.

Observou-se que laceração foi o tipo de lesão mais freqüente em todos os pacientes e que grau 4 foi mais comum nas lesões esplênicas e 3 nas lesões hepáticas e o lobo direito foi o mais acometido. Não houve diferença do laudo original de TC, realizado em uma Unidade de Emergência, que comumente é um ambiente estressante, em relação à detecção de lesão hepática e/ou esplênica e hemoperitônio, quando comparado com a revisão destes exames tomográficos. Comparando-se os achados tomográficos com os cirúrgicos, todas as 13 lesões esplênicas descritas no laudo de TC foram encontradas na cirurgia e das seis lesões hepáticas, cinco foram encontradas na cirurgia, ocorrendo um caso de falso positivo. Embora a avaliação com TC tenha tido um importante papel na detecção e extensão das lesões, os achados tomográficos, isoladamente, não indicaram quais pacientes se beneficiaram com tratamento cirúrgico e quais poderiam apresentar complicações tardias com tratamento conservador.

DISPNEIA E TOSSE ASSOCIADAS À BRONCOCONSTRICÇÃO POR BRADICININA, METACOLINA E EXERCÍCIO NA ASMA

Thaís Regina Suguikawa

Orientador: Prof. Dr. Elcio Oliveira Vianna

Dissertação de Mestrado apresentada em 25/08/2005

Identificar a obstrução por meio da sensação da dispnéia é fundamental para o paciente asmático, mas nem sempre ocorre devido a peculiaridades do paciente ou do broncoespasmo. Portanto, a relação entre broncoconstricção e dispnéia é importante para a identificação da crise pelo paciente e por profissionais da saúde. O presente estudo comparou a intensidade da dispnéia e tosse induzidas por diferentes estímulos broncoconstritores. Vinte indivíduos asmáticos foram submetidos a testes de broncoprovocação com metacolina, bradicinina e exercício, em seqüência aleatória. A dispnéia foi medida por duas escalas: Borg modificada e visual analógica. A tosse foi contada durante

todos os testes de broncoprovocação. Com o objetivo de verificar se os testes de broncoprovocação (bradicinina, metacolina e exercício) influenciam a variável resposta (escala de Borg, visual analógica e número de tosses), foi utilizado o modelo de regressão linear com efeitos mistos (efeitos aleatórios e fixos). Em termos da dispnéia medida pela escala de Borg, não houve diferença entre os estímulos testados ($p > 0,05$). Quando a dispnéia foi medida pela escala visual analógica, a bradicinina induziu mais dispnéia do que os outros estímulos ($p = 0,02$). Segundo a avaliação de tosse, a bradicinina se mostrou mais potente indutor em comparação à metacolina e ao exercício ($p < 0,01$). Em conclusão, o teste de broncoprovocação com bradicinina associado à escala visual analógica parece ser o instrumento de escolha para avaliação da dispnéia, principalmente para pacientes hipoperceptores.

POLIMORFISMO DOS MICROSSATÉLITES DA REGIÃO DO FATOR DE NECROSE TUMORAL EM PACIENTES BRASILEIROS COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

Ceci Baldochi de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Antônio Donadi

Dissertação de Mestrado apresentada em 30/08/2005

Lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica, de causa desconhecida e de natureza auto-imune, caracterizada pela presença de diversos tipos de auto-anticorpos, comprometendo diferentes órgãos e sistemas. Fatores múltiplos, como mecanismos ambientais, imunológicos, genéticos e hormonais, contribuem na progressão e patogênese da doença. Níveis elevados do fator de necrose tumoral (TNF- α) no plasma e líquido cefalorraquidiano de pacientes com LES indicam fortemente a participação desta citocina na patogenia da doença. A região gênica que codifica o TNF é altamente polimórfica, sendo descritos seis microssatélites (TNFa-b-c-d-e-f), caracterizados por seqüências curtas de nucleotídeos, arranjados *in tandem*. Posto que alguns desses alelos estejam associados com a magnitude de produção de TNF, no presente estudo, avaliamos os polimorfismos dos microssatélites TNFa-e em 127 pacientes brasileiros com LES e 120 indivíduos saudáveis. As tipificações foram realizadas utilizando se-

qüências iniciadoras específicas para cada loco desses microssatélites. Os haplótipos foram reconstruídos através do consenso dos métodos computacionais EM X PHASE e as distribuições alélicas e haplotípicas foram comparadas entre os dois grupos estudados. As frequências dos alelos TNFa12, TNFb2 e TNFb6 estavam diminuídas nos pacientes com LES ($p=0,0014$, $p=0,0265$ e $p=0,0061$, respectivamente), quando comparadas ao grupo de indivíduos saudáveis. Já a frequência do alelo TNFd0 estava aumentada nos pacientes lúpicos quando comparada aos indivíduos saudáveis ($p=0,0112$). Os haplótipos TNFa2-b3-c1-d1-e3 e TNFa6-b5-c1-d3-e3 mostraram-se aumentados nos pacientes com LES, determinando susceptibilidade para o desenvolvimento da doença. Três haplótipos, TNFa12-b3-c1-d5-e3, TNFa2-b2-c1-d1-e3 e TNFa10-b3-c1-d3-e3 mostraram-se diminuídos nos pacientes, indicando proteção contra o desenvolvimento do LES. Considerando que a região do TNF está contida dentro do complexo principal de histocompatibilidade, cujos alelos estão fortemente associados com susceptibilidade/proteção ao LES, este estudo corrobora a participação dos alelos dos microssatélites da região do TNF na patogenia do LES.

ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA PESQUISA DE ANTICORPOS DAS CLASSES IgG, IgM E IgA, NO SORO E NA SALIVA DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

Maíra Peres Ferreira

Orientador: Prof Dr José Fernando de Castro Figueiredo

Dissertação de Mestrado apresentada em 09/09/2005

A ocorrência da LTA na região nordeste do estado de São Paulo e estados vizinhos tem aumentado nos últimos anos. As tentativas de padronização de ensaio imunoenzimático (ELISA) para o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) se justificam uma vez que, os métodos tradicionalmente utilizados para o diagnóstico desta doença apresentam sensibilidade e especificidade variáveis, dando margem a resultados falso-positivos e/ou falso negativos em proporção considerável de pacientes. Alternativamente, o emprego de fluidos orais na pesquisa de anticorpos específicos para diagnóstico de doenças infecciosas apresenta vantagens, por não ser um método de coleta invasivo; por ter maior viabilidade em indivíduos com dificuldade de acesso venoso e pelo menor risco de transmissão de infecções aos que manipulam as amostras. Tivemos por objetivos a padronização do ensaio imunoenzimático para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* das classes IgG, IgM e IgA no soro e na saliva de pacientes portadores de LTA, comparando os resultados do teste

ELISA com os obtidos por outros métodos tradicionais de diagnóstico desta doença; a avaliação da sua utilidade como método alternativo de diagnóstico da LTA; e avaliação das possíveis associações entre os resultados dos testes e variáveis clínicas dos pacientes em estudo. Foram incluídos no estudo 53 pacientes com quadro clínico compatível com LTA e que apresentavam positividade em pelo menos um dos seguintes exames: reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para LTA, intradermorreação de Montenegro (IRM), reação em cadeia da polimerase (PCR) em biópsia de pele ou mucosa e visualização de parasitas em biópsia de pele ou mucosa; 16 indivíduos normais, sem lesões de pele ou mucosas; 26 pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial confirmado de paracoccidiodomicose (Pb) e 18 pacientes com a forma cardíaca da doença de Chagas e que apresentavam reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) positiva para esta doença. Utilizamos antígeno preparado a partir da cepa 2762 de *Leishmania braziliensis*, que foi mantida em meio líquido "Schneider Suplementado" por meio de lise por ciclos de congelamento e aquecimento. O teste ELISA IgG no soro obteve o melhor desempenho, diferenciando o grupo LTA dos indivíduos saudáveis e do grupo Pb, embora tenha sido incapaz de diferenciar os pacien-

tes com LTA dos pacientes chagásicos. Sua sensibilidade foi de 85% e a especificidade de 61%, no conjunto dos casos. Observou-se correlação significativa e índice de concordância razoável entre os testes ELISA IgG no soro e RIFI para Leishmaniose. Nos doentes com LTA que apresentavam IRM negativa, o ELISA foi positivo em 75%; além disso, foi positivo em 84,8% dos casos de LTA com biópsias de pele ou mucosa negativas para a presença de parasitas e detectou 100% dos casos com PCR negativa realizada em biópsia de pele ou mucosa. O desempenho dos diferentes testes diagnósticos utilizados nesta mesma população de pacientes com LTA, quando analisados isoladamente, re-

velou: 85% de positividade para o ELISA IgG; 81% para a PCR, 64,4% para IRM, 58% para a RIFI e 34% para a presença de parasitas na biópsia. A pesquisa de IgG na saliva apresentou sensibilidade comparável à obtida na RIFI no soro (60% x 54%) O ELISA no soro pode ser considerado um método complementar de diagnóstico da LTA uma vez que foi capaz de identificar uma proporção considerável dos pacientes portadores de LTA e que apresentavam resultados negativos em outros testes diagnósticos. Os resultados encontrados nos testes ELISA para pesquisa de IgM e IgA na saliva, não recomendam a sua aplicação para o diagnóstico rotineiro da LTA.

EXCREÇÃO VIRAL MATERNA E GENOTIPOS gB NA INFECÇÃO CONGÊNITA PELO CITOMEGALOVÍRUS (CMV) NUMA POPULAÇÃO COM ELEVADA TAXA DE SOROPOSITIVIDADE

Virgínia Mara de Deus Wagatsuma

Orientadora: Profa. Dra. Aparecida Yulie Yamamoto
Dissertação de Mestrado apresentada em 20/09/2005

Embora o citomegalovírus (CMV) seja reconhecido como o agente mais comum de infecção congênita no homem, pouco é conhecido sobre os eventos virológicos e imunológicos da infecção materna pelo CMV que determinam a transmissão da infecção intra-útero, numa população com elevada taxa de soropositividade. Características maternas e a variabilidade genética viral podem contribuir na ocorrência da infecção ativa durante a gestação. Não existem dados sobre as taxas de excreção do CMV em mulheres brasileiras e o papel das diferentes cepas virais na transmissão vertical tem recebido atenção principalmente devido às estratégias futuras de vacinação. Os objetivos deste estudo incluíram a determinação das taxas de excreção do CMV em mães transmissoras e não transmissoras e a verificação da associação com a ocorrência de infecção congênita. Ainda, a caracterização dos genótipos gB das cepas identificadas em amostras maternas e a ocorrência da co-infecção materna com mais de uma cepa viral foram investigadas. Foram incluídas 48 mães de 50 recém-nascidos (RN) infectados congenitamente pelo CMV (transmissoras – T) e identificados em um programa de triagem neonatal de 4439 recém-nascidos, com uma incidência de 1,1%. O diagnóstico de infecção congênita foi baseado na detecção de frações nucleotídicas do CMV pela reação de amplificação gênica da polimerase (PCR) e confirmação pelo isolamento viral em cultura celular em duas amostras de urina e/ou saliva obtidas nas primeiras duas semanas de vida. Para cada caso-índice, 3 mães soropositivas para o CMV de RN não infectados foram incluídas (144 não transmissoras – NT). Das mães T e NT foram coletadas amostras de leite, urina, saliva e sangue na primeira semana após o parto (mediana de 3 dias) e submetidas à PCR para detecção

do DNA viral. A partir do produto amplificado, realizou-se a caracterização genotípica baseado na glicoproteína B (gB) do CMV pela análise do polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição. Soros maternos do início da gestação foram obtidos. Mães T e NT não diferiram em relação à idade e escolaridade; porém observou-se que mães que excretavam o CMV eram predominantemente primíparas jovens (< 20 anos). Considerando todos os sítios de excreção viral, o CMV foi detectado mais freqüentemente nas mães T do que NT (41/48; 85% vs. 39/144; 27%, $p < 0,0001$; *odds ratio* = 15,77). O leite materno foi o melhor sítio de detecção do CMV tanto em mães T e NT. A detecção do DNA do CMV no leite foi significativamente maior em T (38/44; 86%) do que em NT (39/143; 27%; $p < 0,0001$; *odds ratio* = 16,89), assim como na urina (9/48; 19% vs. 0/140, 0%); $p < 0,0001$). Taxas menores foram observadas na saliva em ambos os grupos (2/48; 4% em T vs. 1/142; 1% em NT, $p = 0,569$). Não se observou a detecção do DNA viral no sangue de nenhuma mãe. A excreção viral em mais de um sítio foi observada em 19,5% das T e em 2,6% das NT ($p < 0,0001$). Com exceção de três mães T e uma NT, todas presumivelmente albergavam uma única cepa viral. Todas as mães que tiveram amostras de soro disponíveis no início da gestação eram soropositivas ao CMV. A distribuição dos genótipos gB em mães T foi gB1 27% (10/37), gB2 46% (17/37) e gB3 27% (10/37); ($p = 0,137$) e entre as NT foi gB1 28,5% (8/28), gB2 28,5% (8/28) e gB3 43% (12/28); ($p = 0,424$). O genótipo gB4 não foi encontrado. A excreção do CMV é comum em mães que transmitiram a infecção aos seus filhos mostrando uma associação com a transmissão intra-útero deste vírus. A virolactia precoce pode ser considerada um indicador da infecção fetal. Não houve predomínio de nenhum genótipo gB bem como nenhuma associação com a transmissão vertical do CMV. Ao contrário de pacientes imunocomprometidos, um único genótipo viral foi observado na grande maioria das mães.

ESTUDO DAS CORRELAÇÕES ENTRE PARÂMETROS FUNCIONAIS RESPIRATÓRIOS E AS ESCALAS EK E BARTHEL EM INDIVÍDUOS COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

Marisa Afonso Andrade Brunherotti

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Baddini Martinez
Dissertação de Mestrado apresentada em 21/09/2005

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma doença que se caracteriza pela perda progressiva da força muscular. Incapacidade para caminhar estabelece-se geralmente entre sete a doze anos de idade. As principais causas de óbitos nessa condição são as complicações pulmonares e cardíacas. Nos últimos anos estudos demonstram que a introdução de ventilação não invasiva pode diminuir significativamente a incidência de hospitalização e prolongar a vida destes indivíduos. Ao longo dos anos, o comprometimento motor em indivíduos com DMD têm sido avaliado com o emprego de diferentes escalas funcionais. No presente estudo foram analisadas as correlações entre as escalas funcionais EK e de Barthel com a força muscular periférica, dados espirométricos, gasométricos e pressões respiratórias máximas, de 26 pacientes com DMD. A idade média e desvio-padrão do grupo foi de $12,7 \pm 4,0$ anos e os escores das escalas EK e Barthel, respectivamente, de $8,1 \pm 7,3$ e $54,0 \pm 26,2$. Os escores da escala EK correlacionaram-se significativamente com a idade ($r = 0,596$), capacidade pulmonar total ($r = -0,773$), capacidade vital forçada ($r = -0,751$), volume expirado forçado no primeiro segundo ($r = -0,665$), pressão

inspiratória máxima ($r = -0,674$), pressão expiratória máxima ($r = -0,521$), força de preensão palmar direita ($r = -0,556$) e força de preensão palmar esquerda ($r = -0,623$). Os escores do índice de Barthel correlacionaram-se significativamente com a idade ($r = -0,512$), capacidade pulmonar total ($r = 0,727$), capacidade vital forçada ($r = 0,679$), volume expirado forçado no primeiro segundo ($r = 0,556$), índice de Tiffeneau ($r = -0,482$), pressão inspiratória máxima ($r = 0,562$), pressão expiratória máxima ($r = 0,442$), força de preensão palmar direita ($r = 0,567$) e força de preensão palmar esquerda ($r = 0,648$). Os coeficientes de correlação obtidos com a escala EK não diferiram significativamente em relação aos obtidos com o índice de Barthel. Em função de variáveis funcionais, os pacientes foram classificados em dois grupos, um de baixo risco ($n=15$) e outro de alto risco ($n=11$), para introdução de ventilação mecânica. Por meio de regressão logística foi possível se determinar que um escore de escala EK maior ou igual a 21 prevê risco aumentado para ventilação mecânica com sensibilidade de 90% e especificidade de 40%. Tal valor não foi possível de ser calculado com o índice de Barthel. Concluiu-se que ambas as escalas funcionais correlacionam-se, em grau semelhante, com parâmetros espirométricos, força muscular periférica e pressões respiratórias máximas. Um escore de escala EK maior ou igual a 21 aponta risco elevado para indicação de suporte ventilatório não invasivo.

AVALIAÇÃO DO QUANTIPLEX-BDNA PARA QUANTIFICAÇÃO DE RNA DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA TIPO 1 EM LÍQUOR, CONTEÚDO VAGINAL E SORO

Adriana Cunha Bandiera

Orientadora : Profa. Dra. Alcyone Artioli Machado
Dissertação de Mestrado apresentada em 27/09/2005

A quantificação de RNA do Vírus da Imunodeficiência Humana tipo-1 (HIV-1), também chamada de carga viral, mede a quantidade de partículas virais, presentes no sangue de um indivíduo infectado pelo HIV. Esta detecção está relacionada ao estágio da infecção, ao risco da evolução para aids e à eficácia do tratamento anti-retroviral. Níveis mais elevados de carga viral estão associados a maior risco da evolução para a doença, enquanto níveis mais baixos correlacionam-se a menor risco de progressão clínica. Um dos testes de biologia molecular utilizado para dosar a carga viral de um paciente infectado pelo HIV-1 é o QUANTIPLEX-bDNA[®], o qual permite apenas a quantificação do vírus em plasma. Este estudo analisou a utilização do teste QUANTIPLEX- bDNA[®] em diferentes materiais biológicos, quais sejam, líquido, conteúdo vaginal e soro. A análise des-

tes materiais foi realizada através da comparação entre a carga viral plasmática e a carga viral encontrada nos referidos materiais. Para tal foram selecionados 53 pacientes infectados pelo HIV-1, divididos em 3 grupos: grupo líquido com 17 pacientes, grupo conteúdo vaginal com 19 pacientes e grupo soro com 17 pacientes. Foi colhida de cada paciente, uma amostra de sangue para obtenção do plasma e uma de outro fluido entre líquido, conteúdo vaginal, ou sangue para obtenção de soro. Analisou-se para cada grupo, pelo teste de Spearman, a correlação entre a carga viral plasmática e a carga viral de cada material. Entre a carga viral plasmática e a carga viral líquórica obteve-se correlação significativa ($r = 0,6789$ e $p = 0,0027$). O grupo do conteúdo vaginal e o grupo soro, também apresentaram correlação significativa sendo que os valores encontrados para cada grupo foram $r = 0,7325$ e $p = 0,00040$ e $r = 0,8527$ e $p = < 0,00010$, respectivamente. Conclui-se que o teste analisado é capaz de detectar níveis de RNA do HIV-1 em todos os fluidos estudados.

CARACTERIZAÇÃO TECIDUAL ULTRA-SÔNICA DA PLACA CAROTÍDEA VULNERÁVEL: CORRELAÇÃO VIDEODENSITOMÉTRICA E HISTOPATOLÓGICA

Liz Andrea Villela Baroncini

Orientador: Prof. Dr. Antonio Pazin Filho

Dissertação de Mestrado apresentada em 03/10/2005

Objetivos: Estabelecer a correlação entre a avaliação quantitativa, através da caracterização tecidual videodensitométrica, de imagens ultra-sonográficas bidimensionais digitalizadas e a análise histopatológica de placas carotídeas vulneráveis removidas cirurgicamente,.

Métodos: Vinte e cinco pacientes (18 homens e 7 mulheres), com idade variando entre 57 e 78 anos (média \pm desvio padrão: 67.48 ± 6.4 anos) admitidos para cirurgia de endarterectomia da artéria carótida, com estenose acima de 70%, foram submetidos à caracterização tecidual ultra-sônica da placa antes do procedimento cirúrgico. Um software de computador (CaPAS – Carotid Plaque Analysis Software) foi especificamente desenvolvido para a análise videodensitométrica das imagens bidimensionais digitalizadas das placas carotídeas através de índices estatísticos de primeira (NMC - nível médio de cinza e DP - desvio padrão) e segun-

da (Entropia, Energia e Homogeneidade) ordens, baseados nos níveis de cinza da imagem. Os pacientes foram divididos em 3 grupos de acordo com a sintomatologia: **Grupo I**, pacientes com sintomas até 3 meses antecedendo o procedimento cirúrgico; **Grupo II**, pacientes com sintomas acima de 3 meses antecedendo o procedimento cirúrgico e **Grupo III**, pacientes assintomáticos. Os espécimes cirúrgicos foram analisados histopatologicamente para determinar as percentagens de gordura/necrose, fibrose e cálcio.

Resultados: O nível médio de cinza (primeira ordem) e os parâmetros de segunda ordem (entropia, energia e homogeneidade) foram capazes de diferenciar os grupos clínicos, mas não se correlacionaram com os achados histopatológicos, mostrando apenas uma tendência das variáveis videodensitométricas de primeira ordem (nível médio de cinza) em refletir tais achados.

Conclusões: A análise videodensitométrica de imagens bidimensionais digitalizadas pode ser usada para identificar placas vulneráveis e potencialmente instáveis, porém não se correlacionam com a proporção de componentes estruturais básicos avaliados pela histologia.

	I (6)	II (9)	III (10)	P
HISTOLOGIA				
Fibrose (%)	51.87 \pm 13.01	66.03 \pm 23.92	75.86 \pm 11.46	0.0467
Gordura (%)	40.10 \pm 15.80	27.14 \pm 18.69	19.57 \pm 9.964	0.0789
Calcificação (%)	8.032 \pm 6.544	6.834 \pm 8.750	4.578 \pm 7.276	0.4463
VIDEODENSITOMÉTRIA				
NMC	0.3112 \pm 0.1438	0.4418 \pm 0.09671	0.5655 \pm 0.1283	0.0052
DP	3.255 \pm 1.950	4.120 \pm 1.462	4.985 \pm 1.263	0.1209
Entropia	5.301 \pm 0.3266	5.909 \pm 0.2221	5.580 \pm 0.4334	0.0129
Energia	133.8 \pm 54.02	230.0 \pm 64.84	111.6 \pm 96.87	0.0118
Homogeneidade	4.305 \pm 0.7963	5.775 \pm 0.8135	4.564 \pm 1.089	0.0147

EFEITO DO MICOFENOLATO MOFETIL NAS ALTERAÇÕES INTRAGLOMERULARES NA GLOMERULONEFRITE MESANGIAL AGUDA INDUZIDA EM CAMUNDONGOS COM ANTICORPO HETERÓLOGO ANTICÉLULAS MESANGIAIS

Janaina Silva Martin

Orientador: Prof. Dr. Márcio Dantas

Dissertação de Mestrado apresentada em 18/10/2005

A eficácia do micofenolato mofetil (MMF) no tratamento de glomerulopatias, incluídas as formas mesangiais,

vem sendo avaliada, e os seus efeitos intraglomerulares não são totalmente conhecidos. A administração de antisoro de carneiro anticélulas mesangiais em camundongos leva a glomerulonefrite mesangial aguda (GMA) com expressiva albuminúria. O MMF não foi ainda testado neste modelo experimental de glomerulonefrite.

Objetivo: avaliar o efeito do MMF na albuminúria, morfologia glomerular, fenótipo das células mesangiais, proliferação celular e na infiltração glomerular de macrófagos nesse modelo de GMA em camundongos.

Material e Métodos: GMA foi induzida em camundongos pela administração intravenosa de anti-soro de carneiro anticélulas mesangiais, e os animais controles (sem glomerulonefrite) receberam soro de cabra não imunizada. Os camundongos foram tratados com MMF ou soro glicosado 5% (SG) pela via intraperitoneal, diariamente, do dia -1 até o dia +7 quando foram avaliadas a albuminúria (mg/15 horas), creatinina sérica, área glomerular, celularidade glomerular e, por imunohistoquímica, a ativação de células mesangiais (α -smooth muscle actin: α -SMA), proliferação celular (proliferating cell nuclear antigen: PCNA) e a infiltração glomerular de macrófagos. A absorção do MMF pelo peritônio foi comprovada pela dosagem sanguínea de áci-

do micofenólico por cromatografia líquida de alta performance em um grupo adicional de camundongos.

Resultados: Nos camundongos dos grupos com glomerulonefrite, não tratados ou tratados com MMF (grupos GMA/V e GMA/MMF, respectivamente), a albuminúria foi de 8.376 g/15h (variação: 4.332 ; 15.664) e 0.554 g/15h (variação:0.446; 0.815) ($p < 0,01$), respectivamente, e o escore de expressão de α -SMA foi de 2,78 (variação:2,21 ; 3,3) e de 1,61 (variação:0,96 ; 2,56) ($p < 0,05$). Não houve diferença na creatinina sérica, na celularidade e na área glomerular e na expressão de PCNA entre os grupos GMA/V e GMA/MMF. Houve forte tendência para menor expressão de macrófagos no grupo GMA/MMF em relação ao GMA/V; 1,48 (variação: 1;1,72) e 1,75 (variação:1,25;2,10), respectivamente; ($p=0,054$).

Conclusão: o MMF reduziu a lesão glomerular na GMA, diminuindo a ativação das células mesangiais e, possivelmente, também a infiltração de macrófagos.

EOTAXINA 2 EM CULTURA DE CÉLULAS DO ESCARRO E SUA RELAÇÃO COM A ASMA

Marcos Eduardo Scheicher

Orientador:Prof. Dr. Elcio dos Santos Oliveira Vianna

Tese de Doutorado apresentada em 03/11/2005

O exame do escarro é um método direto para investigar a inflamação das vias aéreas de maneira não invasiva. Nosso objetivo foi elucidar se a cultura de células do escarro pode ser um modelo apropriado para avaliar a produção de citocinas e quimiocina pelas células inflamatórias das vias aéreas. A indução de escarro foi realizada em 21 indivíduos normais e 30 pacientes asmáticos: 21 em uso de corticosteróide inalado e 9 asmáticos sem uso prévio de corticosteróides, avaliados antes e após 14 dias de tratamento com prednisona oral (40 mg/dia). O sobrenadante do escarro foi analisado e comparado com o sobrenadante da cultura. A concentração de TNF- α , IL-8, IL-1 β , IL-13, eotaxina 1 e eotaxina 2 foi determinada pelo teste de ELISA. A maior viabilidade celular e produção de mediadores foi

detectada com 48 - 72 horas de cultura com importante diminuição no 5º dia ($p < 0,0001$). Não houve diferença significativa nos níveis de TNF- α , IL-8, IL-1 β e eotaxina 2 quando as células em cultura foram ou não estimuladas com LPS ou fitohemaglutinina. A produção de eotaxina 2 foi maior no grupo asma ($105,4 \pm 31,7$ pg/ml) quando comparado com o grupo controle ($39,1 \pm 10,2$ pg/ml) e o tratamento com corticosteróide oral aboliu essa diferença. Além disso, a redução dos níveis de eotaxina 2 por este tratamento foi maior na cultura de células ($\Delta = 85,6\%$) do que no escarro ($\Delta = 67,7\%$) ($p < 0,05$). A diminuição na produção de eotaxina 2 induzida pelo tratamento com esteróide sistêmico foi associada com a diminuição no número de eosinófilos do sangue ($r = 0,85$; $p = 0,003$). A eotaxina 2 pode ter uma importante função na inflamação da asma. A significativa diferença entre escarro induzido e cultura celular em resposta ao tratamento com corticosteróide sugere que a análise da cultura de células pode ser um bom marcador inflamatório a ser empregado na prática clínica.

BRONCOPROVOCAÇÃO COM SOLUÇÃO SALINA HIPERTÔNICA: CARACTERIZAÇÃO DO PERÍODO REFRACTÁRIO E INFLUÊNCIA SOBRE A ASMA NOTURNA

Marcos de Carvalho Borges

Orientador:Prof. Dr. Elcio dos Santos Oliveira Vianna

Tese de Doutorado apresentada em 01/12/2005

A asma pode ser definida por hiperresponsividade brônquica, limitação reversível ao fluxo aéreo e inflamação

das vias aéreas. Estímulos broncoconstritores, como solução salina hipertônica (SSH), são freqüentemente utilizados para avaliação da responsividade. A inalação seqüencial de SSH reduz a resposta broncoconstritora, sendo este fenômeno denominado refratariedade. Avaliamos se o período refratário à SSH tem duração de, pelo menos, 10 horas (protocolo I). Posteriormente, avaliamos o efeito do período

do refratário à SSH na asma noturna (protocolo II). A dose provocadora de uma queda de 20% (PD_{20} SSH) do volume expiratório no 1º segundo (VEF_1) e a inclinação da curva dose-resposta foram determinadas e comparadas. Protocolo I: Treze asmáticos foram submetidos à broncoprovocação com SSH às 7:00 h e 17:00 h em um mesmo dia (dia estudo) e, com três a sete dias de intervalo, à outra broncoprovocação às 17:00 h (dia controle). Os dias estudo e controle foram randomizados. Após o teste das 7:00 h, foi determinado o tempo necessário para que o VEF_1 retornasse a, pelo menos, 90% do valor basal, sendo denominado recuperação espontânea do VEF_1 . A média geométrica do $\log PD_{20}$ SSH \pm d.p. às 17:00 h do dia estudo foi significativamente maior que a do dia controle, $1,00 \pm 0,48$ mg e $0,71 \pm 0,50$ mg, respectivamente ($p = 0,0005$). A inclinação da curva dose-resposta foi significativamente menor no dia estudo quando comparada com o dia controle ($5,63 \pm 5,47 \times 8,96$

$\pm 8,88$, $p = 0,0049$). O tempo de recuperação espontânea do VEF_1 foi $38,80 \pm 36,94$ minutos. Protocolo II: Treze voluntários com asma noturna foram submetidos à broncoprovocação com SSH às 16:00 h e 18:00 h e à avaliação do VEF_1 às 4:00 h, na mesma noite (dia estudo). Com intervalo de uma semana, foram submetidos à inalação com solução salina isotônica às 16:00 h e à avaliação do VEF_1 às 4:00 h, na mesma noite (dia controle). Foi comparada a variação do VEF_1 entre 16:00 h e 4:00 h nos dias controle e estudo. Nos voluntários que apresentaram refratariedade à SSH, a média de queda do VEF_1 no dia estudo foi 137 ± 369 mL ou $7,33 \pm 16,15$ % e no dia controle, 506 ± 332 mL ou $21,55 \pm 15,82$ %. A piora noturna foi significativamente maior no dia controle do que no dia estudo ($p = 0,024$). Este estudo demonstra que o período refratário à SSH dura, pelo menos, 10 horas e que a realização de duas broncoprovocações com SSH reduz o declínio do VEF_1 da asma noturna.

INVESTIGAÇÃO SOBRE A ADESÃO AO TRATAMENTO MEDICAMENTOSO EM PACIENTES COM DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS

Nathalie de Lourdes Souza Dewulf

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ernesto de Almeida Troncon
Dissertação de Mestrado apresentada em : 02/12/2005

A adesão ao tratamento medicamentoso é um importante fator determinante no sucesso terapêutico. A adesão do paciente pode ser influenciada por fatores diversos, ligados à doença, ao tratamento, ao paciente, às condições sociais e econômicas, como também, relacionada ao sistema de saúde que o atende. Ainda que existam inúmeros estudos sobre a adesão ao tratamento em portadores com doenças crônicas, são escassas as investigações sobre este tema nas doenças inflamatórias intestinais. O presente trabalho teve o objetivo de avaliar a adesão ao tratamento medicamentoso e os possíveis fatores que a influenciam, em pacientes portadores de doenças inflamatórias intestinais (DII): doença de Crohn (DC) e retocolite ulcerativa (RCU), do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP), da Universidade de São Paulo. Como controles, foram investigados pacientes portadores de pancreatite crônica e insuficiência pancreática (PC), com medicação fornecida pelo hospital, tal como os pacientes portadores de DII. Foram também investigados pacientes portadores de afecções digestivas variadas (ADV), grupo no qual a medicação prescrita não era fornecida pelo hospital. Por meio de estudo transversal e indireto, foi realizada entrevista estruturada para avaliar a adesão de 110 pacientes, que foram caracterizados como apresentando maior ou menor grau de adesão. Esta classificação foi baseada no cotejo entre os dados do prontuário e os informados pelo paciente em entrevista, considerando a afirmação do paciente que usava a

medicação e que conhecia o nome da droga em uso. Utilizou-se, também, o teste de Morisky, que permite avaliar o padrão de comportamento do paciente em relação ao uso diário do medicamento. Este teste consiste de quatro perguntas padronizadas relacionadas ao esquecimento, descuido com o horário de tomada do medicamento, percepção de efeitos colaterais e ausência de sintomas. Na análise dos medicamentos utilizados pelo paciente, foram observadas as seguintes proporções de pacientes classificados como menos aderentes: 15,4% em pacientes portadores de DC, 13,3% na RCU, 8,4% na PC e 16,6% nos pacientes do grupo ADV. Porém, o teste de Morisky mostrou as seguintes proporções de menos aderentes: 50% de pacientes portadores de DC, 63,3% na RCU, 54,2% na PC e 63,4% na ADV. Não houve diferenças estatisticamente significativas, entre os grupos de pacientes, tanto na análise dos medicamentos utilizados pelo paciente como pelos resultados do teste de Morisky. Em análise univariada, nenhum dos fatores demográficos, sociais, clínicos ou referentes ao tratamento medicamentoso apresentou relação estatisticamente significativa, comum a todos os grupos, que indicasse influência sobre a adesão ao tratamento. Apesar do alto grau de adesão, de acordo com a análise dos medicamentos utilizados, detectou-se alto percentual de não-adesão ao tratamento medicamentoso ligado ao comportamento habitual e independente do diagnóstico, ou do acesso gratuito aos medicamentos. Isto pode indicar a existência de um padrão específico de comportamento dos usuários do serviço, o que sugere a necessidade de maior atenção dos profissionais de saúde para o problema, bem como medidas de educação do paciente quanto ao uso dos medicamentos.

REVERSÃO DA ANTICOAGULAÇÃO ORAL: APLICAÇÃO DE PROTOCOLO DE CONDUTA EM SERVIÇO MÉDICO DE EMERGÊNCIA

David José Oliveira Tozetto

Orientador: Prof. Dr. Antônio Pazin Filho

Dissertação de Mestrado apresentada em 08/12/2005

A anticoagulação oral é amplamente utilizada em nosso meio para o tratamento e prevenção de várias doenças associadas a eventos tromboembólicos. Porém, o controle fino da anticoagulação é difícil, sendo freqüentes as complicações associadas a esta terapia, manifestadas na forma de sangramentos. O presente trabalho estudou pacientes, atendidos na urgência de um hospital terciário, que apresentavam complicações relacionadas ao uso de anticoagulantes orais (elevação do INR acima da faixa terapêutica, com ou sem sangramentos). A estes pacientes foi aplicado um protocolo para reversão do efeito anticoagulante, baseado no uso de baixas doses de vitamina K (1;2,5;5 mg) por via endovenosa, particularizadas na dependência da presença e da gravidade do sangramento (menor, maior ou ameaçador da vida). Nos casos em que o sangramento se encontrava ausente, a conduta foi pautada a partir do valor do INR inicial (inferior a cinco, entre cinco e 10 e maior do

que 10). Foram estudados 104 pacientes (45 homens, 43,26%) na fase prospectiva, com idade média de $69,9 \pm 15,4$ anos, sendo suas características comparadas a 46 pacientes (19 homens, 43,26%) com idade média de $64,7 \pm 13,5$ anos, atendidos previamente à implantação do protocolo, não se observando diferença nas características entre os dois grupos. No grupo prospectivo houve grande variabilidade das dosagens de vitamina K empregues, o que permitiu a comparação do efeito de dose da vitamina K na dependência da apresentação clínica e do valor inicial do INR. O uso da vitamina K em baixas doses por via endovenosa é seguro e eficaz na reversão da anticoagulação oral, não estando associada a efeitos colaterais e refratariedade à reintrodução do anticoagulante oral, reduzindo também a necessidade do uso de hemoderivados para a normalização dos valores do INR. A dose utilizada de vitamina K deve ser particularizada na dependência da presença de sangramento, valor inicial de INR e tipo de sangramento. O estudo permitiu ainda o seguimento dos pacientes após a alta hospitalar, sendo observado baixa qualidade da anticoagulação oral após o atendimento na emergência, independentemente do uso de vitamina K.

RECUPERAÇÃO DE IMAGENS BASEADA EM CONTEÚDO UTILIZANDO ATRIBUTOS DE TEXTURA E DATA MINING

Marcelo Ossamu Honda

Orientador: Prof. Dr. Paulo Mazzoncini de Azevedo Marques

Tese de Doutorado apresentada em 09/12/2005

Este trabalho apresenta o estudo e a implementação de um sistema de recuperação de imagens baseada em conteúdo para imagens radiológicas utilizando atributos de textura e “data mining”. Foram utilizadas imagens de diversas modalidades de exames e regiões anatômicas, caracterizadas por atributos de textura. Os dados da caracterização das imagens radiológicas e as informações pertinentes aos exames radiológicos estão armazenados em um banco de dados. Para o processo de indexação e recuperação de imagens é utilizada a metodologia de “data mining”, a qual

estipula através de análise e observações do conjunto de dados, os melhores agrupamentos ou padrões entre os dados tornando-os mais fáceis de serem observados e interpretados. Os resultados obtidos foram avaliados através do cálculo da precisão, que indica a proporção de objetos relevantes em relação ao total de objetos recuperados, obtendo-se para imagens de ressonância magnética nuclear (precisão = 0,70), mamografia (precisão=0,65), tomografia computadorizada (precisão = 0,62) e raio-x de tórax (precisão = 0,58). Os resultados indicam o potencial de utilização da metodologia proposta para ensino, pesquisa, auditoria e auxílio ao diagnóstico, seja por permitir a comparação visual entre os casos ou a classificação de uma nova imagem em disposição com as imagens armazenadas no banco de dados.

ESTUDO DA DEGLUTIÇÃO DE PACIENTES COM IMOBILIDADE UNILATERAL DE PREGA VOCAL

Geruza Costa Gonzaga

Orientador: Prof. Dr. Roberto Oliveira Dantas

Dissertação de Mestrado apresentada em 20/12/2005

Este trabalho objetivou o estudo das fases oral e faríngea da deglutição de 14 pacientes consecutivos portadores de imobilidade unilateral da prega vocal, sendo oito

com o diagnóstico sugestivo de lesão neurogênica dos ramos laríngeos (n=8), apontados pela eletroneuromiografia (grupo 1), e seis pacientes que apresentaram ausência de comprometimento neurológico sugerida pelo mesmo exame (n=6). Estes pacientes foram reunidos, independentemente do resultado eletroneuromiográfico, constituindo o grupo 3 (n=14). O grupo 4 (controles) foi formado por indivíduos saudáveis (n= 11).

Os pacientes do grupo 3 responderam um questionário a respeito das queixas de deglutição e, posteriormente, submeteram-se ao exame videofluoroscópico da deglutição. Os indivíduos do grupo 4 também foram submetidos ao mesmo exame. Foram consideradas as medidas do tempo de movimentação do osso hióide, trânsito oral, trânsito faríngeo, trânsito pelo segmento faringoesofágico, depuração faríngea e tempo de residência do alimento sobre o segmento faringoesfágico.

Todos os indivíduos do grupo 1 apresentavam queixas relacionadas à voz e à deglutição. No grupo 2, todos

apresentavam queixas vocais e quatro, queixas de deglutição. As principais alterações mencionadas foram: presença de tosse e/ou engasgo e cansaço durante a alimentação. Segundo eles, essas dificuldades ocorreram predominantemente de maneira esporádica. Dentre as consistências do alimento, a líquida foi apresentada como a de maior dificuldade

A partir da análise estatística, não foram verificadas diferenças entre os tempos dos fenômenos estudados, com exceção do trânsito do alimento pelo segmento faringoesofágico na deglutição de 10 ml da consistência líquida e 5 ml da consistência pastosa dos indivíduos do grupo 3 em relação ao grupo 4; e na deglutição de 5 ml do alimento pastoso dos indivíduos do grupo 1 comparados ao grupo 4.

Foram sequencializados os fenômenos do trânsito orofaríngeo dos indivíduos do grupo 3 e 4, a partir do início da fase oral, não sendo observadas alterações na seqüência dos eventos entre os grupos. De maneira geral, houve uma tendência a uma maior duração dos fenômenos estudados nos indivíduos do grupo 3 em comparação ao grupo 4

FARMACOLOGIA

O POSSÍVEL ENVOLVIMENTO DO ÓXIDO NÍTRICO NA MODULAÇÃO DE COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS INDUZIDOS EM RATOS POR ESTÍMULOS AMEAÇADORES

Vanessa Beijamini

Orientador: Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães
Tese de Doutorado apresentada em 01/07/2005

Diversas evidências têm sugerido que o óxido nítrico (NO), sintetizado pela enzima óxido nítrico sintase neuronal (NOSn), possa ter um papel modulador em reações defensivas, possivelmente facilitando a ansiedade. A localização da NOSn em regiões envolvidas com reações defensivas também sugere o envolvimento do NO na ansiedade. Entretanto, a maioria dos estudos tem investigado o papel do NO através de administração direta de fármacos em estruturas cerebrais envolvidas com reações defensivas. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi investigar se neurônios NOS positivos, localizados em regiões do SNC de ratos relacionadas a reações defensivas, seriam ativados após exposição a eventos ameaçadores de diferentes intensidades, a exposição a um labirinto em cruz elevado (LCE) e a um predador natural (gato). A ativação neuronal foi verificada pela detecção da imunorreatividade à proteína c-Fos (IR-Fos) e a presença da NOS por meio de histoquímica para NADPH-diaforase. A exposição ao gato

ou ao LCE ativou neurônios NOS positivos nos núcleos paraventricular, parte parvocelular (PVNp) e lateral (HL) do hipotálamo, núcleo dorsal da rafe (NDR) e substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (SCPdl). Somente a exposição ao gato ativou neurônios NOS positivos na amígdala medial (AmMe), no núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo (PMd) e no núcleo intersticial da estria terminal (BNST). Além disso, foi testada a hipótese de que o pré-tratamento i.c.v. com drogas ansiolíticas, o AP-7, um antagonista NMDA, ou o midazolam, um benzodiazepínico, atenuaria essa ativação. O pré-tratamento com midazolam, mas não com AP7, atenuou a ativação de neurônios NOS positivos no PVNp de ratos submetidos ao LCE. Em ratos expostos ao gato, a administração de AP7 produziu efeito antiaversivo e atenuou a ativação de neurônios nitrérgicos no PVNp, no PMd, na SCPdl e no NDR. Já a microinjeção de midazolam não alterou o comportamento dos animais expostos ao gato, mas atenuou a ativação de neurônios nitrérgicos no PVNp, na SCPdl e no NDR. Em conjunto, os resultados sugerem que a exposição a estímulos ameaçadores ativa neurônios NOS em regiões relacionadas com reações defensivas. Além disso, a administração prévia de drogas ansiolíticas atenua essa ativação em algumas dessas regiões.

EFEITOS DA LERCANIDIPINA SOBRE A ATIVIDADE DE METALOPROTEINASE(MMP)-2 E MMP-9 EM PACIENTES HIPERTENSOS

Márcio Luís Lombardi Martinez

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos
Dissertação de Mestrado apresentada em 05 /07/2005

Hipertensão é o principal fator de risco para o desenvolvimento de aterosclerose e doença da artéria coronária. Quando a hipertensão e diabetes estão associadas, o risco cardiovascular aumenta a índices muito elevados, e são acompanhados por uma alteração fisiopatológica comum, que é o remodelamento vascular acelerado, caracterizado pelo desarranjo na regulação na atividade/ expressão das metaloproteinases (MMPs) associado ao aumento do stress oxidativo.

Recentemente, um grupo de endopeptidases zinco-dependentes denominadas metaloproteinases têm sido implicadas no remodelamento vascular subjacente à aterosclerose. MMPs (metaloproteinases) têm sido reconhecidas como um grupo de enzimas envolvidas na degradação de componentes da matriz extracelular em processos fisiológicos, bem como patológicos, e uma aumentada expressão e atividade de MMP pode resultar num remodelamento cardiovascular alterado e aterosclerose da artéria coronária. Níveis circulantes elevados de MMP-9 (metaloproteinase 9) têm sido descritos em pacientes com hipertensão e em pacientes com diabetes tipo 2. Além disso, um recente estudo mostrou que níveis circulantes de MMP-9 (metaloproteinase 9) podem prever mortalidade em pacientes com doença da artéria coronária. Juntos estes achados, são consistentes com a noção de que a MMP-9 pode ter um papel na patofisiologia das alterações cardiovasculares associadas com hipertensão e diabetes mellitus, e que níveis circulantes de MMP-9 (metaloproteinase 9) podem ter valor prognóstico.

Lercanidipina é um bloqueador de canal de cálcio (CCB) da classe das diidropiridinas usado para tratamento da hipertensão. Além de reduzir a pressão arterial, há evidências de que a lercanidipina tenha ações pleiotrópicas que possam significativamente contribuir para os benefícios que ela produz na terapia da hipertensão. Por exemplo, a lercanidipina produziu efeitos antioxidantes em paci-

entes com hipertensão e em pacientes com hipertensão combinada a diabetes tipo 2. Além disso, incubação das células endoteliais com lercanidipina significativamente reduziu a formação de espécies reativas de oxigênio induzida por ox-LDL.

Enquanto os efeitos dos CCB (bloqueador de canal de cálcio) na atividade/ expressão das MMPs não são claros, é possível que a lercanidipina e outros CCB (bloqueador de canal de cálcio) com efeitos antioxidantes reduzam a atividade/ expressão das MMPs (metaloproteinases) em pacientes com hipertensão e diabetes mellitus. Esta hipótese é sustentada por evidências experimentais, que indicam que o stress oxidativo aumentado é o principal fator que modula a atividade/ expressão da MMP-2 (metaloproteinase 2) e MMP-9 (metaloproteinase 9), e que as espécies reativas de oxigênio estão envolvidas no remodelamento vascular da hipertensão via ativação de MMP (metaloproteinase).

Sendo assim, este estudo foi feito com o objetivo de investigar se a lercanidipina produz efeitos antioxidantes associados ou não a uma redução na atividade plasmática da MMP-2 (metaloproteinase 2) e MMP-9 (metaloproteinase 9) em pacientes hipertensos.

Os resultados deste estudo mostraram que o tratamento com lercanidipina reduziu a pressão arterial sistólica e diastólica nos pacientes hipertensos, o que não foi observado nos pacientes hipertensos diabéticos. Além disso, o tratamento com lercanidipina reduziu significativamente os níveis plasmáticos de malondialdeído (MDA) em pacientes hipertensos com ou sem diabetes ($P<0.05$). Em adição o tratamento com lercanidipina diminui a atividade da fração ativa da MMP-9 em pacientes hipertensos com ou sem diabetes ($P<0.05$) e da fração inativa da MMP-2 (metaloproteinase 2) apenas nos pacientes hipertensos diabéticos ($P<0.05$).

Em conclusão, nós demonstramos pela primeira vez que o tratamento com lercanidipina consistentemente diminui a atividade da fração ativa da MMP-9 em pacientes hipertensos. Este efeito foi associado com uma significativa redução no stress oxidativo, o que sugere provavelmente um mecanismo relacionado às ações pleiotrópicas da lercanidipina.

EFEITOS DA INTERAÇÃO ENTRE L-ARGININA E SILDENAFIL SOBRE A HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR INDUZIDA POR EMBOLIA PULMONAR AGUDA EM CÃES

Allethéa Robertha Souza e Silva

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos
Dissertação de Mestrado apresentada em 05/08/2005

A embolia pulmonar aguda (EPA) é uma importante causa de morbi-mortalidade. Foi demonstrado que o sildenafil atenua a hipertensão pulmonar secundária à EPA. No

entanto, não foram examinados ainda os efeitos do sildenafil ao ser administrado concomitantemente com outros fármacos em casos de EPA. Neste estudo, foram avaliados os efeitos hemodinâmicos da co-administração de sildenafil (0,25 mg/kg, i.v.) e um aminoácido, a L-arginina (100, 200, 500, e 1000 mg/kg/h, i.v.) em um modelo de microembolia em cães. As concentrações plasmáticas de nitrito/nitrato (NO_x) e de GMPc foram determinadas utilizando o método da quimioluminescência e um ensaio imunoenzimático (ELISA), respectivamente. Nos animais tratados apenas com L-arginina não houve redução da hipertensão pulmonar induzida por EPA. Porém, ocorreram reduções significativas

na pressão média da artéria pulmonar 30, 45, 60 e 75 min após a administração de sildenafil isoladamente ou após o tratamento combinado de sildenafil e L-arginina ($P < 0.05$). Não foram verificadas diferenças significativas nos parâmetros hemodinâmicos nos diferentes grupos. A L-arginina aumentou significativamente as concentrações de NO_x , enquanto que as concentrações de GMPc aumentaram apenas com a administração de sildenafil ($P < 0.05$). Estes resultados sugerem que o sildenafil atenua a hipertensão pulmonar; a L-arginina administrada após a EPA não reduz a hipertensão pulmonar em cães e que a L-arginina não aumenta os efeitos hemodinâmicos benéficos do sildenafil.

DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE AVALIAÇÃO DA NOCICEPÇÃO ARTICULAR EM CAMUNDONGOS: PARTICIPAÇÃO DE PROSTAGLANDINAS, LEUCOTRIENOS, FATOR DE ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIO E AMINAS SIMPÁTICAS

Ana Tereza Gomes Guerrero

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira

Dissertação de Mestrado apresentada em 05/08/2005

Embora a dor seja um sintoma importante associado com doenças artríticas, existem poucos modelos animais que avaliam precisamente a hipernocicepção articular. O presente estudo descreve uma nova metodologia que permite a avaliação direta e quantitativa da hipernocicepção articular dependente da flexão dorsal da articulação tibiotalar de camundongos. Neste modelo experimental de hipernocicepção artrítica foi utilizada uma ponteira de polipropileno cuja área ($4,15\text{mm}^2$) é maior que a padrão ($0,5\text{mm}^2$). Desta forma não há estimulação do tecido cutâneo plantar, mas sim flexão da articulação tibiotalar. Esta ponteira foi adaptada ao transdutor do anestesiómetro, o qual detecta a força aplicada a superfície plantar da pata, sendo esta proporcional a flexão dorsal da articulação. Além disso, a administração de zimosan na articulação tibiotalar induziu hipernocicepção dose-e-tempo-dependentes, observada por redução do limiar de retirada caracterizado por flexão articular. A hipernocicepção articular máxima foi detectada 7hs após a injeção de zimosan. O tratamento com morfina

inibiu de maneira dose-dependente (2, 4 e 8mg/Kg , 2hs após o estímulo) a hipernocicepção, a qual foi prevenida por naloxone (1mg/Kg). O papel dos mediadores nociceptivos (prostaglandinas, leucotrienos, PAF e aminas simpáticas) foi avaliado tanto na hipernocicepção articular quanto na migração leucocitária articular, neste modelo. Para tal os animais foram tratados com: indometacina (inibidor da ciclooxigenase), guanetidina (simpatolítico), dexametasona (glicocorticoide), fucoïdina (inibidor da migração celular), MK886 (inibidor da síntese de leucotrienos), CP105696 (antagonista do receptor de leucotrienos B4) e BN50730 (antagonista do receptor de PAF), estes pré-tratamentos inibiram tanto a hipernocicepção articular quanto a migração leucocitária articular induzida pelo zimosan, com exceção da guanetidina, que inibiu apenas a hipernocicepção articular. Em conclusão, o presente estudo demonstrou a viabilidade desta metodologia em avaliar quantitativamente a hipernocicepção articular em camundongos, além de demonstrar a participação de prostaglandinas, leucotrienos e PAF na hipernocicepção articular e migração leucocitária, as quais parecem ser dependentes destes mediadores, neste modelo. Entretanto, as aminas simpáticas parecem mediar apenas a hipernocicepção articular induzida pelo zimosan.

CONSEQÜÊNCIAS DA HOMOCISTEINEMIA SOBRE O SISTEMA ENDOTELINA EM CARÓTIDA DE RATOS: DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES À REATIVIDADE VASCULAR

Claudia Roberta de Andrade

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria de Oliveira

Tese de Doutorado apresentada em 12/08/2005

A hiperhomocisteinemia (HHcy) aumenta, de maneira tempo-dependente o E_{max} de endotelina-1 (ET-1) e fenilefrina (Phe) e reduz os relaxamentos dependentes do endotélio, desencadeados por Acetilcolina (Ach) e L-Arginina

em artéria carótida. A HHcy não altera a estrutura arterial e integridade do endotélio. As alterações na reatividade vascular são agonista e receptor específicas, uma vez que a HHcy não altera as curvas para KCl.

Os valores de E_{max} (Efeito máximo) de ET-1 e Phe foram significativamente aumentados nos períodos de tratamento estudados. Entretanto, aos 15 dias de tratamento esse aumento desencadeado pela HHcy foi mais acentuado.

Assim, foi escolhido esse período para o estudo dos mecanismos celulares envolvidos nessa patologia.

O BQ 123, antagonista seletivo de receptores ET_A , reduziu os valores de E_{max} e potência (pD_2) de ET-1, em artérias dos grupos controle e HHcy. Essa redução foi mais acentuada em artérias do grupo HHcy. O BQ 788, antagonista seletivo de receptores ET_B , reduziu o E_{max} e pD_2 de ET-1 em artérias dos grupos controle e HHcy. O relaxamento via ativação de receptores ET_B endoteliais foi reduzido pela HHcy devido à redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO). E_{max} e potência da Big-ET-1 foram reduzidos pela HHcy em artérias com endotélio. A expressão do RNAm para prepro-ET-1 e receptores ET_A e ET_B não foi alterada na HHcy. A expressão da proteína receptora ET_A foi aumentada na HHcy. A síntese e/ou liberação basal de ET-1 não foi alterada pela HHcy. Essa patologia acarreta ainda, em aumento endotelial da síntese e/ou liberação de tromboxano A_2 (TXA_2) uma vez que o aumento de E_{max} de ET-1, conseqüente da HHcy, foi revertido na presença de SQ 29,548 (antagonista de receptores de TXA_2). A mobilização e o influxo de Ca^{2+} desencadeados pela ativação de receptores para ET-1 e Phe foi aumentada na HHcy.

A HHcy acarretou em aumento do E_{max} de Phe em artérias com endotélio. Adicionalmente, o relaxamento induzido pela Phe via ativação de receptores α_{1D} -endoteliais ocorre via liberação e/ou síntese de NO. A HHcy reduz o E_{max} de relaxamento da Phe devido a redução de NO. O relaxamento via ativação de α_{1D} -adrenoceptores, em artérias de animais controle, foi totalmente inibido na presença de L-NNA (inibidor seletivo da enzima NO sintase endotelial, NOS_e). En-

tretanto, na HHcy o relaxamento foi inibido parcialmente por L-NNA e parcialmente por 1400W (inibidor seletivo NO sintase induzida, NOS_i). Curvas para nitroprussiato de sódio (NPS), um doador de NO, não apresentaram diferença significativa entre artérias de animais controle e HHcy, mostrando integridade da maquinaria de relaxamento.

A HHcy reduz o relaxamento da L-Arginina, indicando redução na atividade das NOS. Apesar de redução da atividade da NOS, a HHcy aumenta a expressão da NOS_e e NOS_i. Ocorreu ainda, redução nos níveis de nitrito em carótidas de animais do grupo HHcy. A nitrotirosina, um marcador estável no processo da reação de NO com os produtos do estresse oxidativo foi aumentada pela HHcy. Esses dados indicam que a HHcy promove redução de NO pelo estresse oxidativo. A redução da biodisponibilidade do NO está relacionada ao aumento de ânions superóxido (O_2^-). Esse aumento dos O_2^- pode ser devido à redução da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), enzima que degrada o O_2^- .

A HHcy está relacionada à isquemia cerebral, acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio. O presente estudo estabelece uma correlação positiva entre essa patologia e o comprometimento do sistema endotelinérgico. Os resultados mostram a HHcy como uma patologia que afeta diferentes mecanismos celulares que controlam as propriedades contráteis da artéria carótida. Nesse sentido, os resultados do presente trabalho possibilitam o entendimento de alguns dos processos celulares que são afetados na etapa mais precoce dos processos de aterosclerose desencadeados pela HHcy.

CONSEQÜÊNCIAS DA HIPERHOMOCISTEINEMIA NA REATIVIDADE DA ARTÉRIA CARÓTIDA EM ANIMAIS JOVENS

Glenda Andréa Déstro de Campos

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria de Oliveira

Dissertação de Mestrado apresentada em 19/08/2005

Hiperhomocisteinemia (HHcy) é um fator de risco independente para doenças cardiovasculares. O objetivo deste trabalho foi avaliar as conseqüências da HHcy em animais jovens. Ratos Wistar machos recém desmamados (21 dias) foram divididos em controles e tratados com DL-homocisteína tiolactona (DL-HcyT, 1g/Kg/dia) por 7, 14, 28 e 56 dias. Curvas concentração-efeito para KCl, acetilcolina (Ach), fenilefrina (Phe) e endotelina-1 (ET-1) foram realizadas nas artérias carótidas dos ratos. Foi observado que o efeito máximo (E_{max}) das contrações estimuladas por KCl, Phe e ET-1 diminuiu com o aumento da idade do animal. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas no relaxamento desencadeado pela Ach em função da idade. O tratamento com DL-HcyT não alterou o E_{max} de KCl em artérias com e sem endotélio. As curvas de relaxamento para Ach não sofreram modificações pelo tratamento com

DL-HcyT. A HHcy aumentou o E_{max} de ET-1 somente em artérias com endotélio de ratos tratados por 14 dias. Foi observado aumento do E_{max} de Phe em artérias carótidas com endotélio de ratos tratados por 14, 28 e 56 dias de tratamento. A retirada do endotélio fez com que todo o efeito de potencialização dos agonistas em artérias de animais tratados desaparecesse. O aumento do E_{max} para ET-1 e Phe foi decorrente de um aumento da ativação do sistema Rho-kinase, com possível conseqüência na diminuição da participação do NO, uma vez que na presença de L-NAME as respostas contráteis das artérias controle foram maiores do que aquelas provenientes de animais tratados. Não foi observada participação de prostanóides nas contrações induzidas por ET-1 e Phe. A HHcy aumentou a produção de ânion superóxido, porém sem alterar a marcação para nitrotirosina. Os níveis de nitrito e nitrato não foram diferentes entre os grupos controle e tratado. Os resultados revelam ainda que não houve alteração da participação do cálcio intra e extracelular nas artérias de animais tratados, bem como nenhuma alteração na produção basal de ET-1 e tromboxano A_2 .

CARACTERIZAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DE NOVOS DOADORES DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) EM AORTA DE RATOS NORMOTENSOS, SHAM-OPERADOS (2R) E HIPERTENSOS RENAI (2R-1C)

Daniella Bonaventura

Orientadora: Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack
Tese de Doutorado apresentada em 20/09/2005

Relatos da literatura têm mostrado que os mecanismos de relaxamento vascular estimulado pelo óxido nítrico (NO) parecem diferenciar na ativação das cascatas intracelulares, dependendo da fonte de NO utilizado. Alguns autores observaram haver heterogeneidade nos perfis farmacológicos de diversas fontes de NO, dentre estas diferenças destaca-se a ativação da guanilato ciclase solúvel. Além disso, a heterogeneidade nos perfis farmacológicos pode estar relacionada à espécie de NO produzido e/ou liberado. Baseados nestas informações, o objetivo do presente trabalho foi identificar o mecanismo de ação de novos doadores de NO em aortas de ratos normotensos, sham-operados e hipertensos renais. A caracterização dos novos doadores de NO em aorta de ratos normotensos e sham-operados mostrou que o composto *trans*-[RuCl([15]aneN₄)NO]²⁺ necessita ser reduzido quimicamente para promover seus efeitos vasculares. Dos doadores estudados, este composto é o que apresentou menor potência; necessita de mais tempo para obtenção do efeito máximo que o observado para os demais doadores; libera NO no meio extracelular, seu efeito parece ocorrer primordialmente pela liberação de NO

radicalar; ativa tanto a via dependente quanto a via independente de GMPc, a qual envolve a ativação de canais para potássio e da Ca²⁺-ATPase reticular e todos os subtipos de canais para potássio estudados participam do relaxamento deste doador, sendo que os canais para potássio ativados por Ca²⁺ de alta condutância parecem ser os mais importantes. Com relação à caracterização do doador Ru(terpy)(bdq)NO⁺]³⁺, nossos resultados mostram que este composto é menos potente que o doador de referência (NPS) e mais potente que o *trans*-[RuCl([15]aneN₄)NO]²⁺, promove seu efeito vasodilatador tão rapidamente quanto o NPS; libera NO no meio intracelular; parece envolver tanto a espécie radicalar do NO quanto os íons nitroxil; sua resposta vasodilatadora se deve principalmente à ativação da guanilato ciclase e ativação de canais para potássio operados por voltagem, os canais ativados por Ca²⁺ de alta condutância e a ativação da Ca²⁺-ATPase reticular parecem não estar envolvidos no processo de relaxamento desencadeado por este doador.

Em aorta de ratos hipertensos renais (2R-1C) o relaxamento induzido pelos doadores *trans*-[RuCl([15]aneN₄)NO]²⁺ e [Ru(terpy)(bdq)NO]³⁺ ocorre principalmente pela ativação da enzima guanilato ciclase; não parece envolver a ativação de canais para potássio e a enzima Ca²⁺-ATPase reticular participa apenas do relaxamento induzido pelo composto *trans*-[RuCl([15]aneN₄)NO]²⁺.

PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA NA REGULAÇÃO DO TÔNUS BASAL DE MÚSCULO LISO TÔNICO E DE MÚSCULO LISO FÁSICO

Márcio Augusto Fressatto de Godoy

Orientadora Profa. Dra. Ana Maria de Oliveira
Tese de Doutorado apresentada em 30/09/2005

Testamos a hipótese de que músculos lisos do tipo tônico (desenvolvem tônus espontâneo) possuem um SRA local nas células de músculo liso, sintetizam localmente angiotensina II (Ang II) e desenvolvem tônus. Por outro lado, músculos lisos do tipo fásico (sem tônus espontâneo) não possuem as mesmas características. Para testar esta hipótese, adotamos o músculo anococcígeo (MAC) de ratos e o esfíncter anal interno (EAI), respectivamente, como modelos experimentais de músculos fásico e tônico. Os resultados mostram que tanto o EAI como o MAC de ratos são capazes de converter angiotensinogênio em Ang II. Entretanto, o EAI é mais eficiente que o MAC nesse processo. Os resultados mostram ainda que o EAI possui níveis basais de Ang II significativamente mais elevados que o MAC. Tal diferença está relacionada à habilidade de cada tipo de músculo liso em sintetizar angiotensinogênio

localmente, uma vez que o EAI apresenta níveis de angiotensinogênio superiores ao MAC. Experimentos de Western blot confirmam a presença dos receptores AT₁ e AT₂ da Ang II em ambos os tipos de células de músculo liso. Entretanto, o EAI possui maior densidade de receptores do tipo AT₁ que o MAC de ratos. Por outro lado, o MAC possui maior densidade de receptores do tipo AT₂ que o EAI de ratos. Além desses resultados, nossos experimentos também mostram que a adição de losartan reduz significativamente o tônus basal do EAI (35,7 ± 3%) mas sem produzir qualquer efeito significativo no MAC. Concluímos que o tônus basal espontâneo do EAI deve-se, parcialmente, à atividade de um SRA local nas células de músculo liso, resultando em síntese e liberação local de Ang II e ativação de receptores do subtipo AT₁. Tal característica permite às células de músculo liso do EAI autoregularem-se de acordo com a demanda local por tônus. Por outro lado, o MAC de ratos não expressa níveis suficientes de todos os componentes do SRA necessários para a síntese local de Ang II.

CASCATA DE CITOCINAS MEDEIA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA EM CAMUNDONGOS

Thiago Mattar Cunha

Orientador: Prof. Dr. Sergio Henrique Ferreira

Dissertação de Mestrado apresentada em 30/09/2005

A dor inflamatória é caracterizada pela sensibilização dos nociceptores (hipernocicepção), a qual é resultado da ação dos mediadores inflamatórios. Foi demonstrado em ratos, que a liberação dos mediadores finais da hipernocicepção inflamatória (que atuam diretamente no nociceptor), como as prostaglandinas e aminas simpáticas, é precedida pela liberação de uma cascata de citocinas. Demonstrou-se que o TNF- α liberado pela bradicinina (BK) é a citocina chave nesta cascata, onde ele libera IL-1 β que induz a produção de prostaglandinas. Por outro lado, o TNF- α induz a liberação de IL-8/CINC-1 que por sua vez liberam aminas simpáticas. A generalização destes resultados, no entanto, dependem da confirmação em outras espécies animais. Os efeitos hipernociceptivos do TNF- α , quimiocina derivada de queratinócitos-KC, IL-1 β e da bradicinina (BK) e suas participações na hipernocicepção induzida pela carragenina (Cg) ou em um modelo de inflamação de origem imune foram investigados em camundongos. A hipernocicepção foi quantificada usando uma versão eletrônica do teste de von Frey filamentos em camundongos selvagens (WT) ou deficientes para o receptor para TNF- α do tipo 1 (TNFR1 $^{-/-}$). TNF- α , KC, IL-1 β e BK induziram hipernocicepção de maneira dose e tempo dependente. A hipernocicepção induzida pelo TNF- α estava abolida em camundongos TNFR1 $^{-/-}$, parcialmente inibida pelo pré-tratamento com IL-1ra ou indometacina e não foi afetada pelo anticorpo

contra KC (AbKC) ou guanetidina. O pré-tratamento com IL-1ra e indometacina inibiu fortemente a hipernocicepção induzida pela IL-1 β , a qual não foi alterada pelo pré-tratamento com AbKC ou guanetidina, ou nos animais TNFR1 $^{-/-}$. A hipernocicepção induzida pelo KC foi abolida pelo AbKC, pela associação de indometacina e guanetidina e parcialmente inibida pela IL-1ra, indometacina ou guanetidina. Em contraste, a hipernocicepção do KC não estava alterada nos animais TNFR1 $^{-/-}$. A hipernocicepção induzida pela Cg ou por um estímulo imune foi abolida pelo pré-tratamento com indometacina mais guanetidina, estava diminuída nos animais TNFR1 $^{-/-}$ e foi parcialmente inibida nos animais selvagens por AbKC, IL-1ra, indometacina ou guanetidina. As concentrações de TNF- α , KC e IL-1 β estavam elevadas na pele das patas injetadas com Cg ou antígeno. Bradicininina (BK) induziu hipernocicepção dependente de prostanoides e aminas simpáticas uma vez que a indometacina e guanetidina inibiram seus efeitos. No entanto, os efeitos hipernociceptivos da BK parecem não depender da liberação de citocinas, diferentemente do que tinha sido observado em ratos. Além disso, BK não induziu a produção de citocinas na pata dos animais. Portanto, a cascata de citocinas, em camundongos, começa com a liberação de TNF- α (agindo no receptor TNFR1) e KC, os quais estimulam a liberação de IL-1 β . Os mediadores finais desta cascata foram as prostaglandinas liberadas pela IL-1 β e as aminas simpáticas liberadas pelo KC. Estes resultados estendem para camundongos o conceito de que a liberação dos mediadores finais da hipernocicepção inflamatória é precedida por uma cascata de citocinas.

EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM ATORVASTATINA SOBRE AS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES AGUDAS INDUZIDAS PELO SILDENAFIL

Michele Mazzaron de Castro

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

Dissertação de Mestrado apresentada em 11/11/2005

As estatinas são drogas frequentemente utilizadas para o tratamento de doenças cardiovasculares. Além de seus efeitos de redução do colesterol, elas podem apresentar outros efeitos biológicos benéficos. Um deles é o aumento da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) vascular. Na maioria das vezes, pacientes que apresentam doenças cardiovasculares, possuem também quadros de disfunção erétil e são tratados frequentemente com sildenafil, um inibidor seletivo da fosfodiesterase do tipo 5. Ao inibir esta enzima, o sildenafil promove uma redução da degradação de GMPc, prolongando a ação da via NO-GMPc. Assim,

como ambas as drogas podem ativar a via NO-GMPc, produzindo vasodilatação, investigamos se o pré-tratamento com atorvastatina (0, 5 e 30 mg/kg/dia), por duas semanas, aumenta o relaxamento induzido pelo sildenafil (1pM – 100 mM) em anéis de aorta isolados de ratos Wistar. Além disso, examinamos as conseqüências hemodinâmicas desta interação. Neste estudo, foram também determinadas as concentrações de nitritos e nitratos (NOx) plasmáticas, por meio do método de quimioluminescência. Enquanto que o pré-tratamento com atorvastatina aumentou a potência do sildenafil em promover relaxamento nos anéis de aorta (P<0,01), nenhuma diferença foi observada no relaxamento máximo produzido pelo sildenafil nestes anéis. A incubação prévia dos anéis de aorta com N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) diminuiu a potência do sildenafil em promover

relaxamento nestes anéis, principalmente naqueles que foram tratados previamente com atorvastatina na dose de 30 mg/kg/dia. Além disso, o pré-tratamento com atorvastatina aumentou as concentrações plasmáticas de NOx e os efei-

tos de hipotensão e taquicardia induzidos pelo sildenafil (todos $P < 0,05$). Estes resultados sugerem que a atorvastatina aumenta a sensibilidade vascular ao sildenafil por meio de mecanismos mediados pelo NO.

ESTUDO FARMACOLÓGICO E NEUROANATÔMICO DAS INTERCONEXÕES ENTRE ESTRUTURAS MESENCEFÁLICAS E NÚCLEOS MONOAMINÉRGICOS ENVOLVIDOS NO CONTROLE DA DOR: PARTICIPAÇÃO DO NÚCLEO DORSAL DA RAFE E DE RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS NA ANALGESIA PÓS-ICTAL

Renato Leonardo de Freitas

Orientador: Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra

Dissertação de Mestrado apresentada em 08/12/2005

Tem sido descrito na clínica médica que alguns pacientes relatam hipalgesia, um fenômeno muito mal estudado em neurociência, quando consideramos serem sua causa reações convulsivas. Como alguns medicamentos antiepilépticos podem causar hipalgesia, e a maioria dos pacientes serem medicados já desde longa data, esse fato tem sido um agravante no estudo desse fenômeno. Sendo assim, o presente trabalho pretende dar um passo adicional, investigando o envolvimento das conexões anatômicas entre estruturas mesencefálicas que elaboram as atividades epileptogênicas e núcleos monoaminérgicos que participam no controle da dor em um modelo experimental de analgesia pós-ictal. Também foi avaliada a neurotransmissão serotoninérgica na analgesia que segue a síndrome de imobilidade pós-ictal, com administrações periféricas, por via intraperitoneal (i.p.), e por meio de microinjeção central, no núcleo dorsal da rafe (NDR), de antagonistas farmacológicos seletivos ou não-seletivos, com o objetivo de estudar a participação dos receptores serotoninérgicos nesse processo antinociceptivo. Estudou-se o envolvimento do NDR na analgesia pós-ictal através de lesões neurotóxicas locais (com ácido ibotênico) em um modelo experimental de crises convulsivas em *Rattus norvegicus* (*Rodentia, Muridae*). As características das crises convulsivas tônico-clônicas evocadas pelo pentilenotetrazol (PTZ, 64mg/kg, i.p.) e o efeito do pré-tratamento com os antagonistas serotoninérgicos (i.p. ou no NDR) sobre as convulsões foram avaliadas de acordo com o índice de gravidade de crises de Racine (1972), modificado por Maggio (1989). A performance motora dos animais

após as crises convulsivas e sob o pré-tratamento com os antagonistas serotoninérgicos foi avaliada através do teste rota-rod, e não houve mudanças da capacidade motora nos grupos estudados.

Nossos dados neuroanatômicos sugerem interconexões entre estruturas mesencefálicas, tais como o colículo inferior, camadas profundas do colículo superior e substância cinzenta periaquedutal, que elaboram pelo menos parcialmente as atividades convulsivas, segundo alguns relatos na literatura. Essas estruturas mesencefálicas enviam projeções para núcleos monoaminérgicos do sistema endógeno de inibição de dor, tais como o núcleo dorsal da rafe e o *Locus Coeruleus*, os quais encontram-se envolvidos no controle da dor no processo antinociceptivo pós-ictal.

A administração por via periférica de metisergida, um antagonista não-seletivo para receptores 5-HT, e de cetanserina, um antagonista com maior afinidade para receptores 5-HT_{2A/2C}, antagonizou de maneira dose-dependente a analgesia pós-ictal, ao passo que o pré-tratamento dos animais com metiotepina, um antagonista com afinidade por receptores 5-HT_{1A/1B}, causou um efeito facilitatório sobre a elevação dos limiares nociceptivos após as crises convulsivas. A lesão do NDR diminuiu a intensidade e duração da analgesia pós-ictal, evidenciando a participação relevante deste núcleo em processos antinociceptivos eliciados após crises convulsivas. A microinjeção de metisergida intra-NDR antagonizou desde o início a analgesia pós-ictal, ao passo que o pré-tratamento dos animais com cetanserina bloqueou a analgesia após 20 ou 30 minutos após as crises convulsivas. Esses dados sugerem o envolvimento de mecanismos serotoninérgicos e do recrutamento dos receptores 5-HT_{1A/1B} e 5-HT_{2A/2C}, e das redes neurais do NDR na analgesia pós-ictal.

TAK-778 : EFEITO OSTEOGÊNICO E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM LARGA ESCALA EM OSTEÓBLASTOS HUMANOS

Larissa Sverzut Bellesini

Orientador: Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa

Dissertação de Mestrado apresentada 19/12/2005

O TAK-778 é um composto não endógeno capaz de estimular a osteogênese *in vitro* e aumentar a formação óssea durante o processo de reparo *in vivo*.

No entanto, até o presente momento, nenhum estudo para avaliar as respostas celulares de osteoblastos humanos cultivados na presença de TAK-778 (10^{-5} M), foi realizado. Em adição, também não foram realizados estudos para avaliar o efeito do TAK-778 (10^{-5} M) sobre a expressão gênica em larga escala de osteoblastos humanos, obtidos de osso alveolar humano.

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi investigar o efeito osteogênico do TAK-778 (10^{-5} M) em células obtidas de osso alveolar humano e seu efeito sobre a expressão gênica, por meio da técnica de cDNA *microarrays*. Para isto, células da primeira passagem (2×10^4 células/poço) foram cultivadas em placas de 24 poços contendo meio de cultura, suplementado com TAK-778 (10^{-5} M) e veículo (controle) e, também, em frascos para cultura, a uma densidade celular inicial de 8×10^4 células/poço, na presença de meio de cultura suplementado com TAK-778 (10^{-5} M) e veículo (controle). Para investigar o efeito osteogênico do TAK-778 (10^{-5} M), foram avaliados os seguintes parâmetros: proliferação e viabilidade celulares, atividade de fosfatase alcalina (ALP), conteúdo de proteína total e formação de matriz mineralizada. Todos os parâmetros foram avaliados aos 7, 14 e 21 dias, exceto a formação de matriz mineralizada, que foi avaliada aos 21 dias. Os dados foram comparados por ANOVA e testes T e de Duncan.

Para o estudo da expressão gênica, osteoblastos humanos foram cultivados por 7 dias na presença TAK-778 (10^{-5} M) e veículo (controle). Após este período, o RNA total destas células foi extraído, e por sua vez, foi convertido em DNA complementar (cDNA), na presença do radioisótopo ^{33}P (sonda radioativa). Em adição, foi preparado um cDNA *microarray* em nylon contendo 687 clones de cDNA, referentes a genes relacionados com a sinalização intracelular,

apoptose, ativação e metabolismo celulares, regulação do ciclo celular, reparo, carcinogênese, autoimunidade e osteogênese. Tais clones são provenientes da biblioteca IMAGE HUMANA, totalmente caracterizada. As sondas complexas foram hibridadas com os *microarrays*, e às imagens de hibridação obtidas, foram atribuídos valores numéricos de quantificação, os quais foram normalizados. Com o auxílio de programas de bioinformática aplicados à análise de dados dos *microarrays*, foram realizados o agrupamento dos dados, por meio de dendrogramas e, também, cálculos estatísticos, para detecção de genes diferencialmente expressos.

Os resultados obtidos na avaliação do efeito osteogênico do TAK-778, mostraram que a viabilidade celular não foi afetada pelo TAK-778 (10^{-5} M). A proliferação foi reduzida, enquanto o conteúdo de proteína total, a atividade de ALP e a formação de matriz mineralizada foram aumentadas pelo TAK-778 (10^{-5} M).

Os resultados obtidos na avaliação da expressão gênica, de osteoblastos humanos, mostraram que o TAK-778 (10^{-5} M) induziu a expressão de genes relacionados ao desenvolvimento do esqueleto e histogênese, dentre os quais destacam-se os genes: BMP5, CDH11, ALPL, BMPRII, MSX2, SMURF1 e CTGF.

Os presentes resultados sugerem que os eventos que indicam diferenciação celular, como redução da proliferação, aumento na atividade de ALP e aumento da formação de matriz mineralizada são acentuados pela presença do TAK-778 (10^{-5} M).

Além disso, sugere-se que o TAK-778 (10^{-5} M) acelera o processo de diferenciação celular, uma vez que a expressão de certos genes como ALPL e OMD, é induzida aos 7 dias em cultura e, este mesmo padrão temporal de expressão, não é observado no grupo controle.

ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS 5-HT_{1A} E 5-HT_{2A} LOCALIZADOS NA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL NO EFEITO DE DROGAS USADAS NA TERAPÊUTICA DO TRANSTORNO DO PÂNICO: EVIDÊNCIAS OBTIDAS EM RATOS SUBMETIDOS AO LABIRINTO EM T ELEVADO

Janaina Menezes Zanoveli

Orientador: Prof. Dr. Hélio Zangrossi Junior

Tese de Doutorado apresentada em 20/12/2005

A substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD) tem sido implicada na mediação da resposta de fuga, um comportamento defensivo associado ao transtorno do pânico. A administração intra-SCPD de serotonina ou de drogas que mimetizam seu efeito inibe a resposta de fuga induzida pela estimulação elétrica/química desta mesma área cerebral. O tratamento crônico com o agente antipânico imipramina aumenta o efeito inibitório da administração intra-

SCPD do agonista de receptores 5-HT_{1A} e do agonista preferencial de receptores 5-HT_{2A}, 8-OH-DPAT e DOI, respectivamente, sobre a resposta de fuga induzida pela estimulação elétrica da SCPD.

No presente estudo, nós exploramos a hipótese de que a sensibilização de receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} da SCPD esteja envolvida no efeito antipânico da imipramina. Para tal, ratos Wistar, tratados sub-chronicamente ou cronicamente com imipramina receberam a administração intra-SCPD de 8-OH-DPAT (0,4 ou 3,2 nmoles) ou de DOI (16 nmoles) e foram testados no labirinto em T elevado, um modelo animal que também associa a resposta de fuga com o transtorno do pânico. Este teste também avalia a resposta de esquí-

va inibitória, um comportamento que tem sido associado ao transtorno de ansiedade generalizada. Os efeitos desses agonistas serotoninérgicos administrados na SCPD também foram investigados em ratos tratados cronicamente com o agonista parcial de receptores 5-HT_{1A} buspirona, uma droga clinicamente eficaz no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada, mas não no transtorno do pânico. Adicionalmente, nós investigamos o efeito da administração intra-SCPD de 8-OH-DPAT (0,4 nmol) em animais tratados cronicamente com duas outras drogas antipânico, a fluoxetina ou a sertralina. Enquanto a imipramina inibe a recaptação de serotonina e noradrenalina, a fluoxetina e a sertralina inibem seletivamente a recaptação de serotonina.

Os resultados mostraram que a administração intra-SCPD de 8-OH-DPAT (3,2 nmoles) e de DOI (16 nmoles) inibiu a resposta de fuga e este efeito panicolítico foi significativamente maior em animais tratados cronicamente, mas não sub-cronicamente, com imipramina. Adicionalmente, a administração intra-SCPD de 8-OH-DPAT (3,2 nmoles), mas não a de DOI, prejudicou a resposta de esquiva e este efei-

to ansiolítico não foi alterado pelo tratamento com imipramina. Embora a dose de 0,4 nmol de 8-OH-DPAT não tenha alterado a resposta de fuga em animais tratados com salina, favoreceu o efeito panicolítico causado pelo tratamento crônico com imipramina. O tratamento crônico com a buspirona não alterou os efeitos de 8-OH-DPAT e de DOI sobre a resposta de esquiva inibitória e de fuga. Ademais, embora a administração intra-SCPD de 0,4 nmol de 8-OH-DPAT não tenha alterado a fuga em animais tratados com salina, aumentou o efeito panicolítico causado pelo tratamento crônico com fluoxetina ou sertralina.

No conjunto, nossos resultados corroboram a sugestão que receptores serotoninérgicos na SCPD estão envolvidos no efeito terapêutico de drogas usadas no tratamento do transtorno do pânico. Mais especificamente, as evidências comportamentais obtidas na presente análise indicam que receptores serotoninérgicos dos subtipos 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} desta estrutura mesencefálica sejam sensibilizados pelo tratamento crônico com diferentes agentes panicolíticos.

FISIOLOGIA

INTERAÇÃO DE OCITOCINA, DO ESTRÓGENO E DO HORMÔNIO LIBERADOR DE GONADOTROFINAS NO CICLO ESTRAL E NA VARIAÇÃO DA OSMOLALIDADE

Claudia Simone Caligioni

Orientador: Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci
Tese de Doutorado apresentada em 29/07/2005

A ocitocina (OT) é sintetizada em neurônios dos núcleos paraventricular (PVN) e supraóptico (SON) do hipotálamo cujos axônios em parte se direcionam para a neuro-hipófise onde é armazenada e liberada após estímulo apropriado. Outros axônios se direcionam para a eminência mediana onde a OT é liberada, alcança a adeno-hipófise e influencia a secreção de vários hormônios adeno-hipofisários, dentre eles o hormônio luteinizante (LH). Além de atuar na hipófise, OT também regula os neurônios produtores do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), presentes na área preóptica medial (MPOA) de ratas. Entretanto, não se sabe da influência direta da OT nesses neurônios, pois não há estudos demonstrando a presença de receptores para OT (OTR) nos mesmos. A OT também participa do controle hidro-salino e, o aumento da osmolalidade plasmática é um estímulo para a sua secreção. Neurônios OT são influenciados por vários hormônios e dentre eles o estrógeno

(E₂). Estudos em nosso laboratório mostram que há aumento da secreção plasmática de OT durante o proestro e, o estímulo osmótico promove aumento significativo da concentração plasmática de OT em todas as fases do ciclo estral. Em ratas ovariectomizadas, o tratamento com E₂ e progesterona, potencializam a resposta da OT ao estímulo osmótico.

Deste modo, um dos objetivos deste trabalho foi analisar se a regulação dos neurônios GnRH pela OT pode ser direta. O outro objetivo foi verificar se há variação da expressão de receptores para E₂ α e β (ER α e ER β) em neurônios OT durante o ciclo estral e em condição de estimulação osmótica.

Para isso foi realizada imuno-histoquímica dupla para verificar a presença de OTR em neurônios GnRH, presença de fibras OT próximas de neurônios GnRH na MPOA e a presença da proteína FOS em neurônios OT no PVN e SON de ratas em proestro e metaestro. Além disso, foi verificada a presença de RNAm para OTR nesta região. Para o estudo dos ER, foi realizada imuno-histoquímica dupla no PVN e SON de ratas durante o ciclo estral, submetidas ou não ao estímulo osmótico. Nossos estudos mostram que 10% dos

neurônios GnRH expressam OTR no metaestro e no proestro e que há fibras OT próximas a esses neurônios. Foi observado também a expressão de RNAm para OTR na MPOA. Aproximadamente 30% dos neurônios OT no SON expressam proteína FOS, no metaestro e proestro, enquanto não foi detectada ativação desses neurônios no PVN. No estudo com os ERs, não foi detectada a presença de ER α em neurônios OT, enquanto ER β foi expresso nesses neurônios no SON e PVN. O estímulo osmótico promoveu diminuição da expressão de ER β no PVN de animais na

tarde do proestro. Esses dados permitem concluir que OT participa do controle de eventos do ciclo reprodutivo, podendo influenciar diretamente os neurônios GnRH, via OTR. Além disso, os neurônios OT são influenciados diretamente por E₂ tanto em condições fisiológicas como em condições de alteração da osmolalidade plasmática e ER β parece ser modulado negativamente após estímulo osmótico. Desse modo há uma interação desses sistemas hormonais que pode significar o sucesso da reprodução em fêmeas em condições de homeostase.

PARTICIPAÇÃO DO NÚCLEO DA RAFE OBSCURO NA MODULAÇÃO DO COMPONENTE PARASSIMPÁTICO DO QUIMIORREFLEXO NO RATO ACORDADO

Karin Vianna Weisheimer

Orientador: Prof. Dr. Benedito H. Machado

Dissertação de Mestrado Apresentada em 01/09/2005

Estudos têm demonstrado o envolvimento dos receptores 5-HT₃ na modulação dos reflexos cardiovasculares no núcleo do trato solitário (NTS). Além disso, evidências anatômicas de projeções dos núcleos da rafe caudal (pálido, obscuro e magno) para o NTS sugerem que o núcleo da rafe poderia ser a origem dos neurônios serotoninérgicos que estariam liberando serotonina no NTS e promovendo a modulação dos reflexos cardiovasculares. Considerando que não há evidências experimentais explorando a participação do núcleo da rafe obscuro (NRO) na neuromodulação do quimiorreflexo no NTS, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência da estimulação glutamatérgica das projeções serotoninérgicas do NRO sobre as respostas cardiovasculares decorrentes da ativação do quimiorreflexo com cianeto de potássio (KCN 40 μ g/rato) no rato acordado e verificar a participação dos receptores 5-HT₃ no NTS caudal nesta possível neuromodulação.

Os resultados deste trabalho mostram que a excitação química (L-glutamato 10 nmol/50 nL) do NRO promoveu

uma atenuação da resposta bradicárdica do quimiorreflexo, no entanto não alterou a resposta pressora do referido reflexo nem os parâmetros cardiovasculares basais. Também evidenciamos que o antagonismo dos receptores 5-HT₃ (granisetron 500 pmol/50 nL) no NTS caudal bilateralmente inibiu a redução da bradicardia do quimiorreflexo promovida pela excitação do NRO. Diante desses resultados, podemos sugerir que as projeções serotoninérgicas do NRO para o NTS caudal exercem influência neuromoduladora inibitória sobre a resposta bradicárdica do quimiorreflexo por meio da liberação de serotonina e subsequente ativação dos receptores 5-HT₃ no NTS.

Considerando que os receptores 5-HT₃ não parecem estar envolvidos no controle tônico dos parâmetros cardiovasculares basais no NTS e, ainda, que o núcleo da rafe recebe aferências dos núcleos hipotalâmicos e outras estruturas centrais envolvidas em determinadas condições de estresse, podemos sugerir que a ativação desses receptores 5-HT₃ no NTS pelas projeções serotoninérgicas do núcleo da rafe ocorre, provavelmente, somente em circunstâncias especiais, como a modulação dos reflexos cardiovasculares em condições de estresse, como por exemplo, a hipóxia e a reação de defesa, as quais requerem ajustes autonômicos temporários.

RESPOSTAS CARDIOVASCULARES À MICROINJEÇÃO DE NORADRENALINA NO NTS CAUDAL DE RATOS ACORDADOS: ASPECTOS CENTRAIS, PERIFÉRICOS E A NEUROTRANSMISSÃO DO QUIMIORREFLEXO

Luciana Cristina Silva de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Benedito Honório Machado

Dissertação de Mestrado apresentada em 04/09/2005

Várias evidências na literatura indicam um importante papel para a NOR e seus receptores na modulação dos componentes autonômicos cardiovasculares no NTS caudal.

Além disso, tem sido sugerido que a NOR tem um importante papel na neurotransmissão/neuromodulação do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo também no NTS caudal. Porém, considerando que os estudos até então realizados não exploraram suficientemente o envolvimento da NOR na modulação dos componentes autonômicos e do quimiorreflexo e foram conduzidos em ratos acordados, no

presente trabalho analisamos os aspectos centrais e periféricos das respostas cardiovasculares à microinjeção de NOR no NTS caudal e avaliamos também a possível participação da NOR na neurotransmissão/neuromodulação do quimiorreflexo no NTS caudal de ratos acordados.

Os resultados demonstraram que a microinjeção de NOR no NTS caudal de ratos acordados promoveu resposta hipertensora e bradicárdica de maneira dose-dependente, as quais não são secundárias a alterações no padrão ventilatório. No entanto, quando as microinjeções foram realizadas em áreas adjacentes ao NTS caudal promoveram alterações semelhantes. Baseados na literatura esperávamos que a ação da NOR fosse restrita ao NTS caudal devido à densa presença de neurônios e receptores adrenérgicos nessa região. Para investigarmos o fato do efeito da NOR não ter sido restrito ao NTS caudal realizamos uma série de experimentos onde comparamos a magnitude das respostas à NOR central e periférica e também analisamos o efeito do anestésico ou do hexametônio sobre essas respostas. Esses experimentos demonstraram que as alterações cardiovasculares observadas após a microinjeção de NOR no SNC são decorrentes de mecanismos periféricos e centrais (os quais não envolvem a atividade eferente simpática). Dessa forma, a NOR microinjetada tanto no NTS caudal

como em áreas adjacentes pode ter tido acesso à circulação sistêmica e atuado diretamente sobre receptores periféricos, bem como desencadeado mecanismos neuronais, promovendo as alterações cardiovasculares similares.

Para investigarmos o envolvimento da NOR e dos seus receptores na neurotransmissão/neuromodulação do quimiorreflexo no NTS caudal fez-se necessário um estudo farmacológico para o estabelecimento da DI_{50} do antagonista para bloquearmos os receptores e analisarmos o seu efeito sobre o quimiorreflexo. No entanto, ioimbina e fentolamina, nas doses máximas possíveis de serem diluídas, não foram efetivos em bloquear as respostas à NOR central. Uma alternativa foi avaliar o efeito que a própria NOR microinjetada no NTS caudal exerceria sobre o quimiorreflexo. Assim, com relação ao possível envolvimento da NOR e dos seus receptores na modulação do quimiorreflexo, os nossos resultados sugerem que a NOR exerce uma modulação inibitória, uma vez que sua microinjeção prévia atenuou significativamente a resposta pressora e bradicárdica do quimiorreflexo. Um aspecto relevante a ser considerado é que essa neuromodulação inibitória não foi observada quando as microinjeções de NOR foram realizadas em áreas adjacentes ao NTS caudal, ou seja, esse efeito foi restrito ao NTS caudal.

PARTICIPAÇÃO DA VIA DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZÍVEL NA SECREÇÃO DE PEPTÍDEO NATRIURÉTICO ATRIAL E OCITOCINA DURANTE O CHOQUE ENDOTOXÊMICO EXPERIMENTAL

Angelita Maria Stábile

Orientadora: Profa. Dra. Evelin Capellari Carnio

Dissertação de Mestrado apresentada em 16/09/2005

O choque endotoxêmico é um quadro clínico caracterizado por vasodilatação periférica, hipotensão, inadequada perfusão tecidual e falência de múltiplos órgãos, sendo geralmente induzido por produtos bacterianos, principalmente o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas. Tem se observado experimentalmente que a administração de altas doses de LPS leva ao aumento da produção de óxido nítrico (NO) pela isoforma induzível da óxido nítrico sintase (iNOS) e a queda acentuada da pressão arterial média (PAM). Estudos indicam que o NO possui ação reguladora sobre a liberação de diversos hormônios. O presente estudo objetivou avaliar o papel do NO, produzido durante a endotoxemia, na liberação de peptídeo natriurético atrial (ANP) e ocitocina (OT) e sendo os mesmos importantes hormônios vasoativos, avaliaremos essas alterações sobre os valores de pressão arterial média e frequência cardíaca. O choque endotoxêmico foi induzido em ratos Wistar machos pela injeção intravenosa (iv) de LPS. Após a injeção de LPS observamos acentuada queda da

PAM e aumento da frequência cardíaca. A concentração plasmática de OT aumenta na segunda hora após a injeção de LPS, seguindo em queda e retornando aos valores basais na sexta hora. A concentração plasmática de ANP aumenta na quarta hora após a injeção de LPS e permanece elevada até o final do experimento (6 horas). O grupo de animais que recebeu LPS após a administração iv de aminoguanidina (AG), um inibidor seletivo da isoforma induzível da óxido nítrico sintase (iNOS), apresentou aumento na concentração plasmática de ANP em 2, 4 e 6 horas em relação ao grupo de animais que apenas com LPS. Quanto à concentração plasmática de OT, não foram observadas diferenças entre os grupos que receberam LPS + AG e aqueles tratados apenas com LPS. A injeção de Ag por via intracerebroventricular, previamente à administração de LPS, levou ao aumento das concentrações plasmáticas de OT e ANP na sexta hora em relação aos animais tratados apenas com LPS, e a queda menos acentuada da PAM. Nossos dados mostraram que a inibição da via central da iNOS levou ao aumento da concentração plasmática de ANP e OT, indicando um papel inibitório do NO sobre a liberação deste dois hormônios. Além disso a inibição da iNOS leva a atenuação da hipotensão induzida pelo LPS.

ACÇÕES DOS ESTERÓIDES OVARIANOS NO LOCUS COERULEUS DE RATAS

Gisele Vieira Rodovalho

Orientadora: Profa. Dra. Janete Aparecida Anselmo Franci
Tese de Doutorado apresentada em 20/10/2005

O *locus coeruleus*, um dos principais núcleos noradrenérgicos do sistema nervoso central, está associado ao controle da secreção de gonadotrofinas, mediando parte da influência do estrógeno e da progesterona nos neurônios produtores do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). No entanto, ainda não está esclarecida a forma por meio da qual os esteróides ovarianos atuam neste núcleo. Assim, este trabalho se propôs avaliar a atividade do *locus coeruleus* de ratas em diferentes condições de concentrações de esteróides ovarianos. Para tanto, as concentrações de noradrenalina e de seu principal metabólito, 3-metoxi-4-hidroxi-feniletilenoglicol (MHPG) foram dosadas no *locus coeruleus* e em terminais noradrenérgicos da área pré-óptica medial (região onde se localiza corpos celulares dos neurônios GnRH) de ratas durante as fases de proestro e metaestro bem como de ratas ovariectomizadas tratadas com óleo (grupo OV-óleo), estradiol (grupo OVE2) e estradiol e progesterona (grupo OV-E2P4), às 10, 12, 14, 16, e 18 horas. Amostras sanguíneas foram colhidas em cada horário estudado e as concentrações plasmáticas de estradiol, progesterona, LH e FSH determinadas por radioimunoensaio. Em uma segunda abordagem, o efeito do estradiol na atividade elétrica espontânea dos neurônios do *locus coeruleus* de ratas ovariectomizadas foi avaliado *in vitro*, por meio de registros extracelulares unitários. Os resultados deste trabalho demonstram que as concentrações de noradrenalina e MHPG no *locus coeruleus* estão aumentadas durante todo o dia do proestro em relação ao metaestro, o mesmo ocorrendo no grupo OV-E2P4 em relação ao grupo OV-óleo. Além disso, as concentrações de MHPG no proestro possuem um perfil

ascendente no período da tarde atingido os maiores valores às 18 horas, coincidindo com os picos pré-ovulatórios de gonadotrofinas e com o aumento nos níveis plasmáticos de progesterona. Ainda, um aumento nas concentrações de noradrenalina do *locus coeruleus* foi observado às 18 horas no proestro e no grupo OV-E2P4. Na área pré-óptica medial, as concentrações de MHPG estão aumentadas durante todo do proestro em relação ao metaestro, bem como no grupo OV-E2P4 em relação ao grupo OV-óleo. Nesta área, a noradrenalina se encontra aumentada durante todo o dia de proestro em relação ao metaestro, contudo nenhuma diferença foi observada entre os grupos de ratas ovariectomizadas tratadas ou não com esteróides ovarianos. Em relação à atividade elétrica espontânea dos neurônios do *locus coeruleus*, o estradiol promoveu uma resposta predominantemente de queda na frequência de disparos destes neurônios. Em síntese, estes dados demonstram que as concentrações de noradrenalina e de MHPG no *locus coeruleus* variam nos dias de metaestro e proestro sendo esta resposta dependente dos níveis de esteróides ovarianos presentes em cada fase. Tanto no proestro quanto em ratas OV-E2P4, os altos níveis de estradiol e progesterona parecem aumentar a atividade dos neurônios do *locus coeruleus*, uma vez que concentrações de MHPG estão aumentadas nestes períodos. Adicionalmente, estes esteróides parecem modular as concentrações de noradrenalina e MHPG nos terminais noradrenérgicos da área pré-óptica medial, onde se encontram corpos celulares de neurônios GnRH. Além disso, o estradiol parece regular a atividade elétrica dos neurônios do *locus coeruleus*, sendo esta ação predominantemente inibitória. Estes dados, em conjunto, indicam que *locus coeruleus* é um importante local de ação dos esteróides ovarianos sendo que esta ação pode estar envolvida na regulação da secreção de gonadotrofinas durante o ciclo estral de ratas.

PAPEL DO SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO NA CAPTAÇÃO DE GLICOSE E NA GLICERONEOGÊNESE NO TECIDO ADIPOSEO BRANCO

Danubia Frasson

Orientador: Prof. Dr. Renato Hélios Migliorini
Dissertação de Mestrado apresentada em 26/10/2005

O presente trabalho teve o propósito de verificar os efeitos da desnervação simpática na geração de glicerol-3-fosfato por duas vias: através da via glicolítica, estimada pela captação de glicose e através da via gliceroneogênica, avaliada pela incorporação de piruvato em glicerol de triacilglicerol e pela atividade da fosfoenol-piruvato carboxiquinase (PEPCK). Os experimentos foram realizados no tecido adiposo branco retroperitoneal (TABR) de ratos

nas seguintes condições: normalmente alimentados, jejuados, diabéticos e expostos ao frio (4°C por 24 ou 72 horas). O peso do TABR não alterou nos ratos expostos ao frio, mas diminuiu nos animais jejuados e diabéticos. A redução do peso nestes dois grupos foi menor no tecido desnervado. O conteúdo de lipídios do TABR não se modificou nas diferentes condições e não foi afetado pela desnervação. O conteúdo de noradrenalina, índice da atividade simpática, mostrou-se aumentado no TABR de ratos jejuados, diabéticos e expostos ao frio, e foi marcadamente reduzido nos tecidos desnervados. A captação de glicose foi menor no TABR de animais jejuados ou expostos ao frio. A captação

da hexose aumentou com a desnervação no TABR de ratos normalmente alimentados e no dos submetidos a todas condições estudadas. A incorporação de piruvato em glicerol de triacilglicerol e a atividade da PEPCK encontravam-se aumentadas no TABR de animais jejuados, diabéticos e expostos ao frio. Estes processos foram marcadamente re-

duzidos pela desnervação nestas condições e nos ratos normalmente alimentados. Nossos dados sugerem que a desnervação simpática do TABR induz um aumento da sensibilidade do tecido à insulina, resultando numa maior da captação de glicose e numa redução na atividade glicero-neogênica.

PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA NITRÉRGICO CENTRAL NA MODULAÇÃO DAS RESPOSTAS NEUROENDÓCRINAS ENVOLVIDAS NO CONTROLE DA EXCREÇÃO DE ÁGUA E ELETRÓLITOS INDUZIDAS POR ESTIMULAÇÃO OSMÓTICA, ANGIOTENSINÉRGICA E COLINÉRGICA

Wagner Luis Reis

Orientador: Prof. Dr. José Antunes Rodrigues

Dissertação de Mestrado apresentada em 07/12/2005

Durante as últimas décadas, uma série de experimentos foram realizados com o objetivo de esclarecer como áreas específicas hipotalâmicas modulam a secreção de vasopressina (AVP) e ocitocina (OT) em resposta a variações de volume e osmolalidade do líquido extracelular. A presença da enzima sintase de óxido nítrico na lamina terminal e em neurônios paraventricular e supra óptico, tem sugerido o envolvimento do óxido nítrico (NO) na regulação da liberação de AVP e OT. Desta maneira, neste trabalho avaliou-se a participação do sistema nitrérgico central na modulação da liberação de hormônios neurohipofisários envolvida no controle da excreção renal de água e sódio.

Os resultados deste trabalho demonstram a administração icv de L-NAME (inibidor da NOS) determinou redução do fluxo urinário acompanhada por um aumento da excreção urinária de sódio e nitrato, correlacionadas ao

aumento da concentração plasmática de AVP, OT e ANP. Entretanto, a administração icv de SNAP e SIN-1 (doadores de NO) não induziram alterações significativas na concentração plasmática destes hormônios. O pré-tratamento icv com L-NAME determinou uma potencialização da antidiurese, natriurese e excreção urinária de nitrato e um aumento mais intenso das concentrações plasmáticas de AVP, OT e ANP em animais estimulados centralmente com salina hipertônica, ANG-II ou carbacol. Por outro lado, o tratamento prévio icv com SNAP eliminou os efeitos antidiurético, natriurético e excretório de nitrato da salina hipertônica e da ANG-II em resposta ao bloqueio do aumento das concentrações plasmáticas de AVP, OT e ANP, bem como, reduziu os efeitos hormonais e excretórios induzidos pelo carbacol. Desta forma, os dados sugerem que o sistema nitrérgico central modula as respostas neuroendócrinas envolvidas na homeostase hidroeletrolítica, uma vez que, o NO produzido no SNC tem um papel tônico inibitório sobre a secreção de AVP, OT e ANP, atenuando as respostas antidiuréticas e natriuréticas induzidas por estímulo osmótico, angiotensinérgico e colinérgico central.

ASPECTOS DA HOMEOSTASE HIDROELETROLÍTICA EM RATOS COM SOBRECARGA SALINA: PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA NITRÉRGICO E DA CORTICOSTERONA

Renato Rizo Ventura

Orientador: Prof. Dr. José Antunes Rodrigues

Tese de Doutorado apresentada em 19/12/2005

O equilíbrio hidroeletrolítico é sem dúvida uma condição de grande relevância para os organismos vivos dada a sua importância na manutenção da vida nas diferentes espécies existentes em nosso planeta. Tal afirmativa justifica o grande empenho de cientistas do mundo inteiro, que têm procurado entender cada vez mais os mecanismos neuroendócrinos e comportamentais envolvidos com a manutenção deste estado de equilíbrio. Nas últimas décadas nosso laboratório tem dado especial atenção ao hipotálamo por ser uma estrutura chave neste processo. Além de rece-

ber informações sobre o volume e a osmolaridade plasmática e gerar respostas homeostáticas corretivas, o hipotálamo é responsável pela síntese dos peptídeos vasopressina (AVP) e ocitocina (OT). Estes hormônios estão diretamente envolvidos no balanço hidrossalino, sendo liberados na circulação sanguínea em resposta a estímulos osmóticos, dependentes ou não da carga de sódio circulante.

Dentre os neurotransmissores envolvidos com o controle da liberação de AVP e OT o óxido nítrico (NO) e os glicocorticóides vêm apresentando um papel de destaque como moduladores do sistema hipotálamo-neurohipofisário. No entanto, poucos estudos têm evidenciado a participação de tais substâncias na manutenção da homeostase hidrossalina em situações de estresse osmótico prolongado.

Utilizando um modelo de sobrecarga salina, objeti-

vamos estudar algumas variáveis plasmáticas, urinárias, hormonais e comportamentais no rato. Além disso, avaliamos a participação do sistema nitrérgico e os efeitos da dexametasona, um análogo glicocorticóide, sobre alguns dos parâmetros estudados.

A sobrecarga salina promoveu um aumento gradativo da concentração sérica de sódio e da osmolaridade plasmática, aumentando também a carga excretada de sódio e o volume urinário. Houve ainda uma queda no hematócrito no primeiro dia de sobrecarga salina com um aumento progressivo a partir deste dia. O aumento exagerado no volume urinário promoveu uma redução da osmolaridade urinária, resultando numa urina bastante diluída. A desidratação progressiva induziu ao aumento da ingestão de NaCl 0,3 M ao longo dos 7 dias. Concomitantemente, houve redução da ingestão alimentar e do ganho de peso nos ratos com sobrecarga salina quando comparados com os controles. Interessantemente, a concentração plasmática e o conteúdo neurohipofisário de OT foram reduzidos progressivamente ao longo do período experimental, enquanto que a concentração plasmática de AVP permaneceu elevada apesar da queda progressiva do seu conteúdo na neurohipófise.

Além disso, houve um aumento da atividade da sintase do NO (NOS) nos núcleos paraventricular (PVN) e supraóptico (SON) 1 e 7 dias após a sobrecarga salina. Entretanto, na neurohipófise (NH) houve redução da atividade da NOS após 1 dia de sobrecarga salina e aumento deste parâmetro no sétimo dia pós-sobrecarga. A injeção intraperitoneal (/ip/) de 7-NI, um inibidor seletivo da NOS (isofor- ma neuronal), potenciou a liberação de OT 1 e 7 dias após a

sobrecarga salina, enquanto que reduziu a liberação de AVP somente após 1 dia de sobrecarga. Este resultado sugere que o NO pode atuar diferentemente no controle da secreção de AVP e OT em resposta ao aumento da osmolaridade.

Interessantemente, a sobrecarga salina de 7 dias promoveu um aumento gradativo na concentração plasmática de corticosterona a partir do terceiro dia. Logo, apesar do modelo adotado ser praticamente não invasivo, o estresse osmótico resultante da sobrecarga salina foi capaz de ativar o eixo HPA. O tratamento com dexametasona, um análogo glicocorticóide, alterou a secreção de OT e AVP nos ratos com sobrecarga salina. Além disso, o aumento do volume e sódio urinário induzido pela dexametasona reforça o papel inibitório dos glicocorticóides sobre a secreção neurohipofisária de AVP e OT.

A imunohistoquímica para c-fos nos neurônios magnocelulares do SON revelou que após 24 hs de sobrecarga salina, ambos os neurônios AVP e OT estão ativados. No entanto, 7 dias após o início da sobrecarga pouquíssimos neurônios OT estão ativados, achado este consistente com a queda na concentração plasmática de OT. É possível então, que o aumento da corticosterona plasmática durante a sobrecarga salina esteja inibindo direta ou indiretamente neurônios magnocelulares ocitocinérgicos, diminuindo assim a secreção neurohipofisária deste peptídeo. Aparentemente, a AVP é primordial para a sobrevivência do animal em condições de estresse osmótico intenso. Neste contexto, os sinais estimulatórios para os neurônios AVP poderiam se sobrepor aos efeitos inibitórios dos glicocorticóides, garantindo assim a secreção deste peptídeo.

GENÉTICA

ESTUDO DA AMPLIFICAÇÃO DOS PROTO-ONCOGENES MYCC E MYCN ATRAVÉS DOS MÉTODOS DE PCR SEMI-QUANTITATIVO (PCR-SQ) E PCR EM TEMPO REAL (PCR-RQ) EM MEDULOBLASTOMAS

Plínio Cerqueira dos Santos Cardoso

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone

Dissertação de Mestrado apresentada em 21/07/2005

O meduloblastoma (MB) é considerado o tumor pediátrico primário do sistema nervoso central (SNC) mais freqüente, sendo seu tratamento extremamente agressivo. Os membros da família Myc (em especial o *MYCC* e o *MYCN*), quando amplificados, têm se mostrado importante no surgimento de diversas malignidades humanas. Nos MBs,

as amplificações destes oncogenes são consideradas alterações relativamente incomuns apresentando uma maior freqüência em linhagens celulares de MBs e não em tumores primários. Grande parte dos trabalhos que estudam amplificações na família MYC utilizam métodos como CGH, Hibridação *in situ* Fluorescente (*FISH*), *Dot blot* e *Southern blotting* sendo que o emprego dos métodos de PCR-SQ e de PCR-RQ são escassos. Assim, no presente estudo avaliamos a amplificação dos oncogenes *MYCC* e *MYCN* através de PCR-SQ e de PCR-RQ em amostras de MBs do Ser-

viço de Neurocirurgia do Hospital das Clínicas (HC-FMRP-USP). Foi detectada a presença de amplificação do *MYCN* em dois tumores por PCR-SQ. Por outro lado, nenhuma evidência de amplificação foi observada para o gene *MYCC* nas amostras estudadas por este método. Através do mé-

todo de quantificação por tempo-real foi possível detectar seis amplificações em 5 amostras das 13 estudadas submetidas a esta técnica, mostrando que o método de PCR-RQ parece ser uma técnica mais acurada para a quantificação do número de cópias gênicas.

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE DUAS FAMÍLIAS DE DNA SATÉLITES COMPARTILHADAS ENTRE ESPÉCIES DO “CLUSTER” *DROSOPHILA BUZZATII* (DIPTERA; DROSOPHILIDAE)

Fernando de Faria Franco

Orientadora: Profa. Dra. Maura Helena Manfrin

Dissertação de Mestrado apresentada em 26/07/2005

Seqüências de DNA altamente repetitivas e organizadas em tandem, denominadas DNA satélite, representam uma porção substancial da heterocromatina dos eucariotos. No presente trabalho foram caracterizadas duas famílias de DNA satélites, denominadas pKoe150 e SCS139, que são compartilhados pelas espécies do “cluster” *Drosophila buzzatii*, que é formado por *D. buzzatii*, *D. koepferae*, *D. antonietae*, *D. gouveai*, *D. serido*, *D. seriema* e *D. borborema*. O pKoe150 possui monômeros ricos em C+G de aproximadamente 150pb, e é encontrado em todas as espécies do “cluster” *D. buzzatii*. Embora as seqüências deste DNA satélite estejam acumulando variação, não foram detectadas mutações diagnósticas para nenhuma espécie do “cluster” *D. buzzatii*. Tal resultado foi explicado como sendo consequência de baixas taxas de homogeneização de cadeia do DNA satélite pKoe150. Dentre as espécies do “cluster” *D. buzzatii*, *D. gouveai* e *D. koepferae* apresentam as maiores quantidades de cópias relativas do pKoe150 e os menores índices de diversidade nucleotídica ($Pi = 0.068$ em ambas). Este resultado pode ser um indicativo de que este DNA satélite foi recentemente amplificado e, conseqüentemente, homogeneizado nestas duas espécies.

Seqüências homólogas ao pKoe150 foram detectadas em *D. richardsoni*, que pertence ao “cluster” *D. stalker*, que é o grupo basal do complexo *D. buzzatii*, sugerindo que este DNA satélite estava presente na espécie ancestral deste complexo. O DNA satélite SCS139 possui seqüências de aproximadamente 139pb, ricas em A+T, e apresenta mutações diagnósticas para as espécies *D. gouveai* e *D. seriema*. Com exceção de *D. buzzatii*, seqüências homólogas ao SCS139 foram detectadas nas demais espécies do “cluster” *D. buzzatii*, que formam o “subcluster” serido. Este resultado coincide com dados morfológicos do edeago, indicando que estes marcadores poderão ser considerados sinapomorfias para o “subcluster” serido. Tanto as seqüências do pKoe150 quanto o SCS139 apresentam duplicações internas nas suas unidades de repetição, indicando que ambas podem ter evoluído de seqüências menores. As espécies do “cluster” *D. buzzatii* apresentam diferenças quantitativas em relação ao número de cópias dos DNA satélites pKoe150, SCS139 e pBuM (previamente descrito), sugerindo que evolução saltatória, através de processos de amplificação/deleção desigual de famílias de DNA satélite, deve ter ocorrido nestas espécies, resultando no padrão observado atualmente. Foram obtidas seqüências homólogas ao SCS139 associadas a um fragmento de 51pb do elemento móvel Galileu. Estas seqüências podem constituir uma subfamília do DNA satélite SCS139, entretanto, são necessários mais estudos para comprovar esta hipótese.

USO DE cDNA MICROARRAYS NA IDENTIFICAÇÃO DE PACIENTES COM GLIOBLASTOMA MULTIFORME POR MEIO DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO

Renata Camacho Miziara

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Aleixo da Silva Passos Júnior
Tese de Doutorado apresentada em 18/08/2005

O principal objetivo deste estudo foi avaliar a possibilidade do uso de células mononucleares do sangue periférico e a técnica de cDNA microarrays como um novo método para identificar pacientes com glioblastoma. O perfil

transcricional diferenciado de células mononucleares de sangue periférico de pacientes e controles foi observado usando análises por cDNA microarray, na qual a clusterização hierárquica foi usada para revelar genes induzidos e reprimidos e para discriminar pacientes com glioblastoma de controles. Nosso método fornece a detecção de genes induzidos implicados no reconhecimento da resposta inata e adaptativa (toll-like receptors 4 and 9, and interleukin 7

receptor), resposta anti-tumoral (tumor necrosis factor receptors 10B), apoptose (caspase 8, TNF receptor-associated factor3, CASP 2 and RIPK domain containing with death domain), fator de splicing de pré-mRNA (splicing factor arginine/serine-rich 11) e os genes reprimidos ligados a atividades imunossupressoras (transforming growth factor beta regulator 1) e implicados na cascata de sinaliza-

ção do cálcio (adenylate cyclase 1, calumenin, calmodulin 1 and calcium modulating ligand). O perfil de expressão gênica característico mostrou que esta técnica pode ser utilizada para a detecção de pacientes com câncer e até mesmo para diagnóstico, pois foi possível estratificar pacientes de acordo com o estágio do glioblastoma e respectivos aspectos clínicos.

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE JAVALIS (*SUS SCROFA SCROFA L.*) ATRAVÉS DE MARCADORES MICROSSATÉLITES – STRS

Lenícy Lucas de Miranda

Orientadora: Profa. Dra. Eucleia Primo Betioli Contel
Tese de Doutorado apresentada em 30/08/2005

No início do século XX, foram trazidos alguns javalis para a Argentina, que acabaram escapando e se espalhando pelo norte da Argentina, Uruguai e Sul do Brasil. Na década de 90 começaram a ser importados alguns animais puros, para fins de criação comercial, principalmente da França e Canadá. Ocorrem no Brasil também animais híbridos com $2n=37$ ou 38 cromossomos, resultantes do cruzamento do javali ($2n=36$) com o porco doméstico ($2n=38$). O presente trabalho tem como objetivo caracterizar geneticamente javalis considerados puros, originários da Europa, criados em cativeiros no país, através de marcadores microssatélites, com o intuito de contribuir com o monitora-

mento da variabilidade genética e sendo assim, auxiliar no manejo e gerenciamento de programas de melhoramento genético. Para estudar a pureza das linhagens de javalis, assim como estimar a variabilidade genética dentro de algumas linhagens, o DNA genômico foi extraído e posteriormente amplificado pela técnica de PCR para análise de microssatélites (IGF1, SW444, ACTG2, LOX12A, CGA e TNFB), os quais foram descritos para a subespécie *Sus scrofa domestica* (suíno doméstico). As condições de amplificação foram padronizadas para o javali (*Sus scrofa scrofa*). Todos os seis loci foram polimórficos, apresentando um total de 36 alelos nos dois grupos genéticos (indivíduos com $2n=36$ e $2n=37$ ou 38 cromossomos). A utilização de iniciadores heterólogos é importante, pois, elimina a necessidade do desenvolvimento de biblioteca genômica, tornando-se um método mais rápido e de menor custo.

ESTUDO DOS POLIMORFISMOS E DA EXPRESSÃO PROTÉICA DO GENE *CDKN1A* EM MEDULOBLASTOMA, ASTROCITOMAS E EPENDIMOMAS EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES

Mev Dominguez Valentin

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone
Dissertação de Mestrado apresentada em 06/10/2005

O câncer é uma doença genética provocada por distúrbios da progressão celular normal. Estes distúrbios são o resultado de alterações de genes que exercem o controle das várias etapas do ciclo celular como, por exemplo, os genes supressores de tumor.

O *CDKN1A* é um inibidor universal das cdk e cumpre funções críticas na regulação da transição G1/S e também na G2/M. *CDKN1A* pode induzir a diferenciação de células normais e transformadas, suprimir o crescimento de células malignas *in vitro* e *in vivo*. As alterações no gene *CDKN1A* e na sua expressão podem exercer um papel importante na patogênese do câncer, visto que a sua função normal é a detenção do ciclo celular, a diferenciação terminal e a apoptose.

Mutações somáticas no gene parecem ser raras nas neoplasias humanas. Entretanto, vários polimorfismos foram relatados em diversos tipos de tumor e as suas frequências estão associadas à etnia. Alterações na expressão de *CDKN1A* foram observadas numa ampla variedade de cânceres humanos, incluindo o ovariano, o uterino, o cervical, o coloretal, o hepatocelular, de pulmão, do pâncreas e nos carcinomas de cabeça e pescoço.

No presente trabalho, utilizamos como amostras de tumores de SNC (astrocitomas, ependimomas e meduloblastomas) de pacientes submetidos a tratamento cirúrgico, realizando o estudo de gene *CDKN1A* quanto à presença de polimorfismos e à expressão protéica.

Nossos resultados sugerem que os polimorfismos do gene *CDKN1A* não apresentam correlação com o desenvolvimento de tumores do sistema nervoso central assim como não apresentaram um padrão uniforme de expressão protéica.

ESTUDO DE MUTAÇÕES DO GENE RECEPTOR DE ANDRÓGENOS EM PACIENTES COM A SÍNDROME DE INSENSIBILIDADE AOS ANDRÓGENOS

Christina Vretos

Orientadora: Profa. Dra. Ester Silveira Ramos

Tese de Doutorado apresentada em 31/10/2005

A síndrome de insensibilidade aos andrógenos é uma das entidades de masculinização ausente (genitália feminina) ou deficiente (genitália ambígua) em indivíduos masculinos (46, XY). A incidência desta patologia é estimada em 1: 20.000-64.000 nascimentos masculinos. Pode apresentar um amplo espectro clínico [completa, incompleta (ou parcial) e leve], mesmo em indivíduos de uma mesma família, dependendo de alterações do receptor de andrógeno (AR). O padrão de herança da doença é ligado ao X recessivo. O gene AR localiza-se na região Xq11-12, contando com aproximadamente 90 kb e 2757 pb de região codificante, organizada em 8 exons.

Defeitos quantitativos ou qualitativos na proteína, que acarretam resistência ao andrógeno, são causados por uma grande variedade de mutações, que incluem deleções, inserções e mutações de ponto; que levam a substituições de aminoácidos, stop codon e splicing impróprio do RNA. A isto se credita a heterogeneidade da expressão fenotípica encontrada nos pacientes. Estas mutações têm sido estudadas por técnicas de biologia molecular, tais como PCR, SSCP e seqüenciamento de DNA. O presente trabalho teve como objetivos a avaliação de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), que apresentam o diagnóstico clínico de Síndrome da Insensibilidade aos Andrógenos, para classificação do quadro clínico, avaliação dos heredogramas, detecção de anomalias associadas e identificação de mutações do gene AR, visando a implantação destas novas técnicas para a sua utilização sistemática na rotina hospitalar, melhoria do atendimento, tratamento e aconselhamento genético mais específico. Foram levantados prontuários de um total de 57 pacientes com

diagnóstico provável de SIA, tendo sido analisados por citogenética todos os casos; e por biologia molecular, através de técnicas de PCR-SSCP para cada um dos 8 exons do gene AR (para posterior seqüenciamento), nove pacientes com diagnóstico final de SIAC, 14 com SIAP e oito com SIAL. Foram encontradas duas mutações pontuais que não foram descritas anteriormente na literatura, uma transversão G@T, que alterava o códon 104 ATG para ATT, levando a uma substituição de aminoácidos (Met623Ile) (em uma paciente de SIAP); e a segunda tratando-se de uma transversão A@G, que altera o códon 86 AAA para AAG, entretanto o aminoácido não é alterado, pois estes dois códons estão relacionados ao aminoácido lisina (paciente SIAP). Foram encontradas também três mutações pontuais descritas anteriormente na literatura (Arg607Gln) (em paciente SIAP), uma transversão G @ A que altera o códon 1, levando à substituição de aminoácidos (Gly589Gln) (paciente SIAL); e outra transversão sendo A @ C que altera o códon 175, levando à substituição de aminoácidos (Tyr602Pro) (paciente SIAL).

Nos casos nos quais não foram detectadas alterações moleculares pela técnica de PCR-SSCP, a causa poderia ser um problema da técnica empregada ou outras alterações que não eram objetivos deste estudo, tais como mutações intrônicas ou em seqüências regulatórias. Por intermédio dos resultados verificou-se que é possível fazer uso sistemático desta metodologia como um instrumento muito útil de screening dos pacientes encaminhados a serviços médicos com hipótese diagnóstica de SIA, uma vez que a análise de um gene tão extenso através de seqüenciamento em vários pacientes é um procedimento muito custoso. Este estudo molecular tem grande importância na confirmação da etiopatogenia da doença e pode servir como ferramenta para a condução clínica dos casos e posterior aconselhamento genético.

RESPOSTAS CELULARES AOS DANOS CAUSADOS PELO ANTITUMORAL CISPLATINA EM LINHAGENS DE FIBROBLASTOS HUMANOS NORMAIS (MRC-5) E ASTROCÍTICA (U343 MG-A)

Patrícia de Oliveira Carminatti

Orientador: Profa. Dra. Elza Tiemi Sakamoto Hojo

Dissertação de Mestrado apresentada em 06/12/2005

Uma variedade de agentes antitumorais é capaz de induzir danos no material genético e estimular várias. A resposta inicial das células é o bloqueio no ciclo e a ativa-

ção de vias de reparo das lesões induzidas no DNA. No entanto, se esse dano for muito extenso ou comprometer o metabolismo celular, uma cascata de sinalização aciona mecanismos alternativos que inibem a proliferação das células e acionam vias de morte, incluindo-se a apoptose.

Os astrocitomas malignos são os tumores cerebrais mais comuns que afetam o sistema nervoso central, compre-

endendo mais de 60% dos tumores cerebrais primários. O tratamento padrão é a radioterapia seguida de quimioterapia, no entanto, o prognóstico para pacientes portadores desse tipo de câncer ainda continua desanimador. A cisplatina é um agente genotóxico largamente empregado no tratamento de gliomas, além de outros tipos de câncer. Essa droga liga-se ao DNA, formando aductos, os quais levam a um bloqueio na duplicação e na transcrição, podendo induzir apoptose nas células dependendo da extensão do dano.

No presente trabalho foram avaliadas as respostas celulares ao tratamento com a cisplatina em linhagem de glioma (U343 MG-a) e em fibroblastos normais transformados por SV40 (MRC-5). Foram avaliadas as respostas em termos de sobrevivência celular, indução de apoptose e expressão gênica em larga escala pela técnica de microarranjos de cDNA, sendo esta última realizada somente para a linhagem U343.

A cisplatina causou uma redução acentuada na sobrevivência das células MRC-5 (~1%) e U343 (< 1%) após cinco dias de tratamento (teste de sobrevivência celular) com concentrações que variavam de 12,5 a 300 µM. O tratamento por 24 h com iguais concentrações de cisplatina reduziu a sobrevivência das linhagens em cerca de 20-80% (teste de citotoxicidade). Ambas as linhagens sofreram apoptose após o tratamento com diversas concentrações

de cisplatina (12,5, 25 e 50 µM). A linhagem U343 apresentou uma frequência máxima de apoptose de 20,4% após o tratamento com 25 µM de cisplatina por 72 h, enquanto a linhagem MRC-5 apresentou 11,0% de apoptose após 50 µM de cisplatina por 48 h.

Os dados de expressão gênica analisados pelo método de micro-arranjos de cDNA, obtidos 48 h após o tratamento das células U343 com 25 µM de cisplatina, mostraram genes significativamente ($p \leq 0,05$) reprimidos relacionados principalmente com alterações no citoesqueleto (*TBCD*, *RHOA*, *LIMK2* e *MARK1*), apoptose ou sobrevivência celular (*BCL2-XL*, *ING1*, *RHOA*, *VDP*, *TIMP2*, *DYRK3* e *NFKBIE*), invasão celular ou metástase (*LIMK2*, *TIMP2* e *CALU*), reparo de DNA (*SMC1L1*) e metabolismo celular (*DYRK3*, *MARK1*, *TBCD*, *LIMK2*, *VDP* e *P4HB*), entre outros processos. Esses dados apontam para um sério comprometimento da maquinaria celular como um todo após os danos induzidos pela cisplatina. Embora o mecanismo de apoptose justifique cerca de 20% da extensão de morte celular, conforme foi comprovado nos ensaios de sobrevivência e apoptose, uma grande porcentagem das células é provavelmente eliminada em consequência da ação da droga em vários níveis do metabolismo e manutenção da integridade celular, visto o elevado grau de citotoxicidade da cisplatina.

MICROSSATÉLITES DO GENE DO FATOR VIII EM POPULAÇÕES BRASILEIRAS

Juliana Doblas Massaro

Orientador: Prof.Dr. Aguinaldo Luiz Simões

Dissertação de Mestrado apresentada em 07/12/20065

A Hemofilia Clássica ou Hemofilia A (HA) é uma doença ligada ao X que afeta entre 1 e 2 homens em cada 10.000. A análise direta das mutações deste gene é difícil devido ao seu grande número e heterogeneidade. Portanto, a maioria dos testes para a detecção do portador e diagnóstico pré-natal emprega o estudo da ligação de polimorfismos de DNA com o *locus* do Fator VIII (FVIII). Nos poucos estudos em populações brasileiras, foram empregados marcadores do tipo RFLP, os quais não são suficientemente informativos. Portanto, com o objetivo de caracterizar a distribuição das frequências alélicas e haplótipos em amostras de indivíduos não aparentados de São Paulo, do Rio Grande do Sul e de Pernambuco nós utilizamos os STRs dos *Introns* 13 e 22 do gene do FVIII da coagulação. A distribuição dos alelos do *Intron* 13, com exceção da amostra PE, mostrou-se semelhante em ambos os sexos. Os alelos do *Intron* 22 mostraram distribuição diferente entre os sexos em PE (mais pronunci-

ada) e RS (menos pronunciada). A amostra RS diferenciou-se de PE e SP, considerando-se ambos os sexos. Entre SP e PE houve diferenciação significativa apenas no *Intron* 13, na comparação entre Homens. O dendrograma confirma esses dados, pois mostra SP e PE agrupadas próximas, enquanto que RS está mais distante. Observa-se que no *Intron* 13 a distribuição é centrada no alelo *Intron13*20*, caindo à medida que se considera o alelo maior. As comparações quanto ao *Intron* 22, mostraram nas três amostras aqui estudadas moda centrada no alelo *Intron 22*26*. O haplótipo mais frequente baseado nos *Introns* 13 e 22 para ambas as populações é o 20/26. Os haplótipos compostos pelos alelos 20/27 e 21/24, respectivamente – não ocorrem, nas amostras RS e SP, contrariamente ao que seria esperado pela frequência deles nas outras amostras. Os parâmetros forenses indicam que ambos os marcadores são significativamente informativos e podem ser empregados em situações forenses em que a identificação genética seja necessária, respeitadas as características de ser ligado ao cromossomo X e considerando cuidadosamente o uso de marcadores geneticamente ligados.

TRIAGEM DAS SÍNDROMES DO X FRÁGIL TIPO FRAXA E FRAXE, REALIZADA POR EXAME MOLECULAR DE PCR EM AMOSTRA DE PACIENTES DE UMA INSTITUIÇÃO PARA DEFICIENTES

Liane de Rosso Giuliane

Orientador: Prof.Dr. João Monteiro de Pina Neto

Dissertação de Mestrado apresentada em 15/12/2005

Nos países desenvolvidos, a deficiência mental (DM) ocorre em 2 a 3 % da população geral, chegando até 10% da população geral em países subdesenvolvidos, principalmente de DM leve. Das causas herdadas de DM, cerca de 20 a 25% dos homens com DM são portadores de DM ligada ao X. (DMLX), das quais as mais comuns são: a síndrome do FRAXA (DMLX Síndrômica) e a síndrome do FRAXE (DMLX Não Síndrômica). A triagem para estas síndromes é recomendada em toda criança com dificuldade de aprendizado ou deficiência mental de etiologia desconhecida, com problemas de comportamento ou atraso no desenvolvimento da linguagem. Com o objetivo de realizar uma triagem diagnóstica da Síndrome de DM tipo FRAXA e da Síndrome de DMLX não Síndrômica (FRAXE), numa população de deficientes mentais institucionalizados, foram avaliados os 430 pacientes da Associação de Pais e Amigos de Batatais. As análises moleculares das Síndromes do FRAXA e FRAXE por exame molecular de PCR foram realizadas em 144 indivíduos dos 201 pacientes masculinos previamente selecionados sem diagnóstico etiológico definido. O *Screening* do FRAXA foi feito conforme o protocolo de Haddad et al 1996, e o *Screening* do FRAXE foi realizado conforme o protocolo de Santos et al 2001,. O diagnóstico etiopatogênico foi estabelecido em 49 % dos pacientes, prevalecendo os outros 51% sem sua etiologia definida. Entre as etiologias definidas, 18,5% dos pacien-

tes tinham doença genética; 3,2% tinham defeito isolado do SNC; em 16,2% dos pacientes a causa da deficiência era ambiental; 9,5% apresentavam disfunção do SNC (DM com epilepsia ou DM com paralisia cerebral); 0,9% tinham DM com psicoses. Os pacientes com prováveis síndromes genéticas em que não foi possível a finalização das avaliações representaram 21,86% da amostra total e 29,76% eram pacientes não síndrômicos. A avaliação clínica da amostra total de pacientes detectou prevalência do sexo masculino com uma razão de 1.5 M: 1 F, consangüinidade em 2,32% dos casos. A deficiência mental foi estimada em 360 pacientes, cuja DM leve a moderada foi encontrada em 70% dos casos (30% DM leve e 40% DM moderada), em 12% foi diagnosticado DM grave e 18% dos pacientes foram classificados como RDNPM, pois não pôde-se estimar o grau de DM devido a faixa etária. A triagem diagnóstica por PCR para estas síndromes nos 144 pacientes, não revelou casos positivos. Considerando que as técnicas apresentam eficácia, e que 41% apresentavam: critérios clínicos muito sugestivos de do FRAXA, concluímos que nesta amostra ou não havia pacientes com Síndromes FRAXA e FRAXE ou há casos que são mosaicos e, portanto, não foram detectados. Isto nos leva a sugerir que estes casos sejam, num próximo momento, testados com exame molecular de Southern-Blotting para FRAXA e FRAXE, e que a investigação para a exclusão ou confirmação de síndromes de DM ligada ao X deva prosseguir. O conhecimento desta população de DM ajudou definir melhores estratégias preventivas e manejo das DM, e, o aconselhamento genético foi realizado em todos os casos avaliados neste trabalho.

ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL DO CERVO-DO-PANTANAL (*BLASTOCERUS DICHOTOMUS*)

Eddy José Francisco de Oliveira

Orientadora: Profa. Dra. Eucleia Primo Betioli Contel

Tese de Doutorado apresentada em 20/12/2004

O cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) é um dos mamíferos mais ameaçados da América do Sul. Para contribuir no manejo e conservação da espécie, o desenvolvimento de marcadores microssatélites foi uma etapa vital para definir os níveis da variabilidade e diferenciação genética das populações. No primeiro capítulo, sete locos polimórficos de microssatélites foram isolados por meio de uma biblioteca genômica enriquecida e estudados em 50 animais, mostrando uma variação no número de alelos de 3 a 12. A heterozigosidade observada variou de 0.69 a 0.89. No segundo capítulo, nós examinamos a estrutura genética espacial em 194 cervos-do-pantanal (seis populações) que ocu-

pam a bacia do Rio de Paraná e a ação do fluxo gênico e da filopatria. Cinco locos de microssatélites foram utilizados nas análises das populações. A diversidade genética foi significativamente elevada. A disposição geográfica das populações mostram baixa diferenciação genética, porém significativa (F_{ST} entre -0.003 e 0.08; R_{ST} entre -0.015 e 0.079). A associação entre posicionamento geográfico e diferenciação genética foi positiva entre as populações de cervo-do-pantanal (isolamento por distância). A estrutura genética espacial sugeriu que o processo de dispersão é baseado em machos e também a ocorrência de filopatria matrilinear. Os padrões genético e demográfico encontrados, e as implicações para a conservação das espécies e do ecossistema na região do Pontal do Paranapanema, são discutidos levando-se em consideração os diversos fatores que podem estar atuando sobre suas populações.

EFEITOS GENÉTICOS E AMBIENTAIS NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES UTILIZANDO SÊMEN DE TOUROS JOVENS SELECIONADOS PARA TESTE DE PROGÊNIE

Dante Gavio

Orientador: Prof.Dr. Raysildo Barbosa Lôbo
Tese de Doutorado apresentada em 20/12/2005

Sêmen criopreservado de 100 touros jovens, procedentes de seis centrais de Inseminação Artificial e selecionados para teste de progênie, foram avaliados pela motilidade, origem DNA mitocondrial e capacidade de desenvolvimento embrionário *in vitro*. Os procedimentos GLM e MIXED foram utilizados para identificar as possíveis fontes de variação: reprodutor, tipo de DNA mitocondrial, procedência do sêmen (Central de Inseminação Artificial), motilidade e vigor espermático, ano e réplica do experimento. Foi observado efeito significativo na produção de blastocistos para procedência, motilidade espermática e efeito aninhado da interação Touro-Central-Motilidade. A origem mitocondrial não apresentou efeito significativo ($p > 0,05$),

provavelmente e devido ao tamanho e à proporção de animais *indicus* (9,37%) na amostra estudada. Todavia, na genealogia materna se observam diferenças significativas ($P < 0,05$) favorecendo animais com origem taurina para todos os valores de médias nas DEPs para características reprodutivas, de crescimento, habilidade materna, com exceção das características MGT, DDPAC, DDSTAY e DDP8. Foi constatado efeito materno importante na PIV (Produção *in vitro*), existindo correlações positivas e significativas ($P < 0,05$) para características de habilidade materna (DMPP120, DMPP240 e DDPAC) e para Perímetro escrotal no primeiro ano de idade (DDPE365), embora de baixa magnitude ($r = 0,20$ $P < 0,05$). Finalmente, foram realizadas análises de pedigree nos touros jovens a partir da probabilidade de origem de um gene e foi observada participação predominante de dois ancestrais principais nos touros pertencentes ao grupo de maior produção de embriões *in vitro*.

GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA

CORRELAÇÃO ENTRE A MORFOLOGIA OOCITÁRIA E A QUALIDADE EMBRIONÁRIA PÓS ICSI (INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZÓIDE)

Fabiana Cristina Telles Tristão

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Maria dos Reis
Dissertação de Mestrado apresentada em 08 /08/2005

A Injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) é a melhor indicação para casais com infertilidade de causa masculina e com falha prévia na fertilização *in vitro* (FIV). Nesse tipo de tratamento, para que se aumente a possibilidade de gravidez, são transferidos mais de um embrião, que se correlaciona com um aumento da taxa de gestações múltiplas. A gestação múltipla relaciona-se com um maior risco de ocorrência de algumas patologias gestacionais e com uma maior morbi-mortalidade materno-fetal. A seleção embrionária prévia à transferência reduz o número de gravidez múltipla, desde que a transferência se faça em embriões morfológicamente perfeitos. Na ICSI, a estrutura morfológica dos oócitos após a retirada do *cumulus oophorus* é melhor visualizada se comparada com a FIV.

Foi realizado um estudo prospectivo, com 50 ciclos de pacientes submetidas à ICSI, num total de 322 oócitos

captados. A análise foi feita por método não invasivo, com fotos digitais obtidas através do microscópio de luz. Para cada oócito foram realizadas 3 fotos: A primeira foto foi feita após a retirada do *cumulus oophorus*, antes da ICSI (D0), para analisar alterações do espaço perivitelínico, fragmentação do primeiro CP e presença de inclusões citoplasmáticas, a segunda foi realizada em 18-20 horas após a ICSI (D1) e observamos a simetria e angulação dos pró-núcleos e número e simetria dos nucléolos e a terceira foi realizada no dia da transferência, 72 horas após a ICSI (D3), onde analisamos o número de blastômeros, sua simetria e a porcentagem de fragmentação.

A análise estatística foi feita com Teste χ^2 entre as variáveis. Levou-se em consideração a variável idade, sendo esta categorizada em três faixas etárias: < 30 anos, 30 a 35 anos e > 35 anos de idade. Não foi achada relação estatisticamente significativa entre as alterações morfológicas estudadas e a qualidade embrionária. Para a variável idade, houve diferença significativa quanto à qualidade embrionária ($p < 0,05$). O presente estudo demonstrou a influência negativa da idade materna na qualidade embrionária.

QUANTIFICAÇÃO DOS VOLUMES DO LÍQUIDO AMNIÓTICO E DO EMBRIÃO OBTIDOS PELA ULTRA-SONOGRAFIA BIDIMENSIONAL E TRIDIMENSIONAL NO PRIMEIRO TRIMESTRE DA GESTAÇÃO

Patricia Spara

Orientador: Prof. Dr. Francisco Mauad Filho

Tese de Doutorado apresentada em 29/09/2005

O objetivo desse estudo foi determinar os valores do volume do líquido amniótico e do embrião, pela ultra-sonografia bidimensional e tridimensional em gestantes normais da 8^a a 11^a semana de gestação. Realizamos estudo prospectivo longitudinal em 25 fetos normais. Os critérios de inclusão foram gestações únicas, avaliação clínica e laboratorial normal e os de exclusão, gestantes portadoras de patologias maternas e/ou próprias da gestação, como também as usuárias de fumo, álcool ou drogas. Todas as pacientes assinaram o termo de consentimento esclarecido pós-informado. Os exames foram realizados por dois observadores que utilizaram aparelho ultra-sonográfico modelo SA-9900 (MEDISON), transdutor endovaginal volumétrico, banda larga, de 5- 6,5 MHz, com 120^o de campo visual. Cada gestante foi avaliada na 8^a, 9^a, 10^a e 11^a semana de gestação. O estudo bidimensional consistiu da determinação das medidas volumétricas por cálculo matemático baseado na forma do elipsóide, averiguando-se o volume do saco amniótico total e do embrião. No estudo tridimensional o vo-

lume do líquido amniótico foi feito pela técnica VOCAL. Em ambos o volume do líquido amniótico foi obtido da subtração da medida do volume do saco amniótico pela medida volumétrica do embrião. Os dados foram analisados pela análise de variância (ANOVA), correlação e análise de regressão. Em todas as análises foi utilizado como nível de significância $p < 0,05$. O volume do líquido amniótico (V_{LA}) pela ultra-sonografia bidimensional aumentou de 5,45 cm³ para 39,52 cm³ da 8^a para a 11^a semana (ANOVA – $p < 0,05$). A correlação entre a idade gestacional e o volume do líquido amniótico foi forte e positiva ($p < 0,001$, $r^2 = 88,3\%$). No estudo tridimensional o volume do líquido amniótico aumentou de 5,75 cm³ para 42,96 cm³ da 8^a para a 11^a semana (ANOVA – $p < 0,05$). A correlação entre a idade gestacional e o volume do líquido amniótico foi forte e positiva ($p < 0,001$, $r^2 = 98,1\%$). Concluindo, o volume do líquido amniótico e do embrião aumenta progressivamente da 8^a para a 11^a semana de gestação tanto na avaliação bidimensional como na tridimensional. A estimativa do volume do líquido amniótico na ultra-sonografia tridimensional é menor que a bidimensional na 9^a e 10^a semana gestacional e maior na 11^a semana de gestação. O volume do embrião é maior pela técnica tridimensional do que pela bidimensional em todas as semanas gestacionais avaliadas.

INFLUÊNCIA DOS ESTERÓIDES SEXUAIS SOBRE A VOZ FALADA EM MULHERES DO CLIMATÉRIO

Janaína Mendes Laureano

Orientador: Dr. Gustavo Salata Romão

Dissertação de Mestrado apresentada em 08/11/2005

São freqüentes as queixas entre as mulheres, particularmente entre as cantoras, de que ocorrem alterações na voz após a menopausa. Há relatos na literatura de que a freqüência fundamental da voz da mulher se altera nesta fase da vida. Como a prega vocal possui receptores para os esteróides sexuais, é possível que essas alterações sejam decorrentes da deficiência estrogênica observada no climatério.

O presente trabalho teve como objetivo comparar a freqüência fundamental da voz (F0) de mulheres na pós-menopausa usuárias e não usuárias de terapia de reposição hormonal (TRH) com mulheres no menacme.

Foram estudadas 45 pacientes: grupo-controle (15 mulheres de 20 a 40 anos, não usuárias de anticoncepção

hormonal, não fumantes, com ciclos menstruais regulares), grupo com TRH (15 mulheres de 45 a 60 anos, menopausadas há mais de 2 anos, usuárias de valerato de estradiol 1mg/norgestimato 90 mcg há no mínimo 6 meses) e grupo sem TRH (15 mulheres com idade de 45 a 60 anos, menopausadas há mais de 2 anos sem TRH há no mínimo 6 meses). Todas as pacientes foram submetidas à avaliação otorrinolaringológica e videolaringoscopia para confirmar a integridade da laringe. Posteriormente, avaliou-se a F0 com a emissão das vogais “e” e “i” na altura de fala habitual da paciente. A F0 foi analisada através do programa Dr.Speech 3.0[®]. Foi utilizado o teste ANOVA para comparação das médias de F0 entre os grupos. A média da idade dos grupos controle, com TRH e sem TRH foi respectivamente 30,3 anos, 54,5 anos e 56,5 anos. A média da F0 dos grupos foram respectivamente: vogal “e”: 215,97 Hz; 206,21 Hz e 200,71 Hz, e vogal “i”: 229,89 Hz; 221,79 Hz e 212,79 Hz. Os resultados mostraram uma tendência de agravamento

da F0 em menopausadas, sendo a média do grupo com TRH mais próxima do grupo-controle que do grupo sem TRH. Entretanto não houve diferença estatisticamente significativa na F0 da voz para as vogais “e” ($p=0,2127$) e “i” ($p=0,193$), comparando os três grupos entre si.

De acordo com esses resultados, parece não haver diferença clinicamente relevante na F0 da voz falada entre

mulheres no menacme, menopausadas usuárias e não usuárias de TRH. A tendência à diminuição de F0 nas pacientes hipostrogênicas sugere a possibilidade de que pequenas diferenças, decorrentes da influência hormonal sobre a laringe, que não tenham sido detectadas neste estudo, possam atingir maiores níveis de significância, quando os grupos forem analisados para a voz cantada.

PADRÃO DE CRESCIMENTO DOS VOLUMES CARDÍACO E PULMONARES DE FETOS POR ULTRA-SONOGRAFIA TRIDIMENSIONAL

Luciano Silveira Pinheiro Filho

Orientador: Francisco Mauad Filho

Tese de Doutorado apresentada em 25/11/2005.

Objetivo: Construir uma curva de crescimento para o volume cardíaco e para os volumes pulmonares fetais, esquerdo e direito, por meio da ultra-sonografia tridimensional ao longo da gestação normal.

Introdução: As doenças cardíacas e pulmonares no feto mostram-se algumas vezes inicialmente como uma alteração nos volumes destes órgãos. Estas alterações são analisadas normalmente pela determinação dos perímetros torácico e cardíaco. A ultra-sonografia tridimensional tem se mostrado uma importante ferramenta para permitir que seja calculado o volume mais aproximado destes órgãos, podendo auxiliar na avaliação de suas alterações e quanto aos seus volumes.

Pacientes, Material e Métodos: Foram estudadas longitudinalmente 30 pacientes com idade gestacional inicial de 20 semanas até a 36ª semana. Todas estas pacientes possuíam um exame realizado no primeiro trimestre para a determinação mais aproximada da idade gestacional. Foram

obtidos ao final 1530 blocos tridimensionais torácicos por meio da ecografia tridimensional. Estes blocos foram analisados pelos softwares *3D View* e *VOCAL™* para a determinação dos volumes do coração e dos pulmões esquerdo e direito fetais.

Resultados: Foi possível representar os nossos dados sob a forma de curvas de crescimento dos órgãos coração, pulmões esquerdo e direito. A média do volume cardíaco entre 20 e 36 semanas variou de $4,76\text{cm}^3$ a $58,24\text{cm}^3$. A média do volume pulmonar esquerdo entre 20 e 36 semanas variou de $3,45\text{cm}^3$ a $36,80\text{cm}^3$. A média do volume pulmonar direito entre 20 e 36 semanas variou de $4,55\text{cm}^3$ a $47,30\text{cm}^3$. Todas as curvas se mostraram de caráter ascendente e puderam ser representadas por fórmulas polinomiais do sexto grau.

Conclusões: As curvas mostraram um crescimento ascendente com aceleração próxima da linear. Esta aceleração mostrou uma mais intensa a partir da 24ª semana até a 34ª quando se nota uma mudança neste padrão, sugerindo uma desaceleração. Embora a melhor representação tenha sido por meio de fórmulas polinomiais do sexto grau, todas puderam igualmente ser por representadas por fórmulas lineares.

TRATAMENTO DAS LESÕES INTRA-EPITELIAIS CERVICAIS DE ALTO GRAU COM CIRURGIA DE ALTA FREQUÊNCIA EM MULHERES PORTADORAS OU NÃO DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA

Patrícia Pereira dos Santos Melli

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Duarte

Dissertação de Mestrado apresentada em 20/12/2005

Introdução: Sabe-se que a elevada prevalência da infecção pelo HPV na população sexualmente ativa, associa-se ao desenvolvimento de lesões intra-epiteliais cervicais de alto grau e de baixo grau (LIEAG e LIABG). A cirur-

gia de alta frequência (CAF) veio contribuir para o tratamento da LIE, substituindo práticas invasivas e onerosas. A população contaminada pelo HPV é composta por pacientes imunocompetentes e imunodeprimidas, especialmente as infectadas pelo HIV, que poderão ter diferente resposta a esta cirurgia.

Objetivos: Avaliar a efetividade da CAF no tratamento das LIEAG no colo uterino e a taxa de complicações

tardias dessa modalidade terapêutica em pacientes portadoras ou não do HIV e avaliar se a infecção HIV favorece a persistência de LIEAG após a CAF.

Pacientes e Métodos: Estudo observacional prospectivo longitudinal onde foram selecionadas 97 pacientes portadoras de LIEAG e tratadas com CAF divididas em dois grupos: 38 pacientes portadoras do HIV e 59 não infectadas por esse vírus, todas atendidas em Hospital Universitário de referência terciária. As pacientes foram submetidas a CAF e reavaliadas com coleta de colpocitologia e colposcopia com três, seis, nove e 12 meses após o procedimento. As taxas de efetividade da CAF consideraram a evolução da doença cervical ao longo do seguimento desses dois grupos de pacientes por um ano.

Resultados: Após o seguimento de 12 meses foram observadas situações de cura (citologia e colposcopia normais), melhora (citologia e/ou com colposcopia com sinais de infecção HPV ou LIEBG) ou de piora da LIEAG inicial (lesão microinvasora/invasora). Sendo assim, foram obtidos para as pacientes portadoras do HIV: 55,2% de cura; 34,3% de melhora e nenhum caso de piora após o tratamento inicial. Para as pacientes não portadoras do HIV os resultados foram: 75,4% de cura; 14,1% de melhora e 1,7% de piora, indicando desfecho clínico mais favorável entre as

pacientes não portadoras do HIV ($X^2, p=0,02$). As taxas de estenose de canal cervical entre as pacientes portadoras do HIV (13,5%) não foram estatisticamente diferentes daquelas observadas entre as pacientes não portadoras do HIV (10,5%). A excisão completa da LIE que motivou a CAF ocorreu em 69 (71,2%) pacientes. Entretanto, 21 (21,7%) mulheres tiveram excisão incompleta com margens da peça cirúrgica comprometida pela LIE. Dessas 21 pacientes que apresentaram margens da peça cirúrgica comprometidas apenas cinco tiveram necessidade de novo tratamento. Também foram submetidas a novo tratamento três das mulheres que tiveram margens cirúrgicas livres da peça excisada e uma paciente com a margem cirúrgica carbonizada.

Conclusões: Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos estudados em relação ao número de complicações após a realização da CAF e também na necessidade de novo tratamento no caso de mulheres portadoras do HIV. Entretanto, o desfecho clínico favorável (cura e melhora) para essa população estudada foi significativamente melhor para as pacientes não portadoras do HIV que para as infectadas por esse vírus após um ano de seguimento pós-CAF. A recidiva da LIEAG é mais freqüente em pacientes com margens cirúrgicas comprometidas, independente da presença da infecção pelo HIV.

IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ALGUNS COMPONENTES DA VIA DE SINALIZAÇÃO MEDIADA POR *NOTCH* EM *SCHISTOSOMA MANSONI*

Lizandra Guidi Magalhães

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Rodrigues

Dissertação de Mestrado apresentada em 12/08/2005

Vias de transdução de sinal podem desempenhar um papel essencial para o desenvolvimento e a homeostase de *Schistosoma mansoni*. Entre as diversas vias de sinalização, a via mediada pelo receptor *Notch* se destaca por ser crítico na diferenciação celular em muitos organismos. Alguns dos componentes dessa via, como o receptor *Notch*, a protease *Presenilina* e a enzima ubiquitina ligase *Supressor de Deltex*, desempenham papéis fundamentais durante a ativação e a regulação da via *Notch*. O presente trabalho reconstituiu *in silico* essa via de sinalização e analisou o perfil de expressão dos referidos genes durante o ciclo de vida do parasita *S. mansoni*.

A reconstituição *in silico* demonstrou a presença de transcritos dos principais componentes da via *Notch*. Através da técnica de RT-PCR foi possível demonstrar que *Notch* é expresso em baixíssimos níveis durante o estágio de cercária, entretanto, *Presenilina* e *Supressor de Deltex* são expressos nos principais estágios evolutivos deste parasita. A análise dos fragmentos amplificados a partir do DNA genômico mostrou a ausência de íntrons nas regiões flanqueadas pelos oligonucleotídeos específicos.

Esta caracterização inicial constituiu uma abordagem pioneira no estudo dessa via em *S. mansoni*. Desta forma, as análises subseqüentes de caráter estrutural e funcional poderão ser empregadas para a elucidação dos mecanismos pelo qual a via *Notch* coopera para garantir tanto a diferenciação como o desenvolvimento deste parasita.

POLIMORFISMO DOS MICROSSATÉLITES DA REGIÃO DO FATOR DE NECROSE TUMORAL EM PACIENTES COM ASMA BRÔNQUICA

Luiz Otávio de Oliveira Guideroli

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Antônio Donadi

Dissertação de Mestrado apresentada em 13/09/2005

O Fator de Necrose Tumoral (TNF) é uma potente citocina pró-inflamatória altamente envolvida na patogenia da asma brônquica. O gene que codifica o TNF está localizado na região altamente polimórfica do Complexo Principal de Histocompatibilidade apresentando seis locus polimórficos de microssatélites (*TNFA-f*), como os microssatélites têm sido associados com a magnitude da produção de citocinas, no presente estudo avaliamos a frequência dos alelos e haplótipos do *TNFA-e* em pacientes apresentando asma brônquica, estratificados de acordo com a gravidade da doença, ou seja, asma grave, moderada e leve. DNA do sangue periférico foi amplificado e hibridizado com iniciadores específicos. A tipificação dos microssatélites do TNF foi realizada de acordo com a mobilidade do DNA amplificado em géis de poli-acrilamida. Análises estatísticas foram realizadas utilizando-se os programas GENEPOP, GRAPHADInStat3 e ARLEQUIN. Considerando o grupo de pacientes como um todo, o alelo *TNFA2* estava associado com proteção, embora o *TNFE2* estivesse associado com susceptibilidade para a asma brônquica. Após estratificarmos os pacientes

de acordo com a gravidade da doença, o grupo de pacientes com a forma moderada da doença apresentava baixa frequência do alelo *TNFA4*, que está associado com reduzida produção de TNF, enquanto pacientes com a forma grave apresentavam frequências aumentadas dos alelos do *TNFA* associados com baixa produção de TNF (*TNFA7*) ou frequência diminuída do alelo do *TNFA* associado com elevada produção da citocina (*TNFA2*). *TNFB1* estava associado com proteção, embora o alelo *TNFB4* apresentava susceptibilidade para o desenvolvimento das formas graves da doença. Nenhuma associação foi observada entre os alelos do microssatélite *TNFC* e asma. Os alelos *TNFD2* e *TNFD3* estavam associados com susceptibilidade para o desenvolvimento da asma grave, enquanto os alelos *TNFD4* e *TNFD5* estavam associados com proteção contra o desenvolvimento das formas grave e moderada, respectivamente. O alelo *TNFE1* estava associado com proteção contra o desenvolvimento da asma grave. Concluindo, a asma grave foi associada com alelos *TNFA* relacionados com baixa produção de TNF e a asma leve com alelos relacionados com alta produção. Ainda, este estudo mostrou que alelos individuais *TNFA-e* estavam associados com formas específicas de asma brônquica. Finalmente, este é o primeiro estudo avaliando os alelos dos microssatélites do TNF na asma brônquica.

INTERAÇÃO JACALINA-DPS REVELA PROVÁVEL MECANISMO DE GLICOSILAÇÃO BACTERIANO

Ebert Seixas Hanna

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Brocchi

Tese de Doutorado apresentada em 03/10/2005

Microrganismos são comumente expostos a ambientes de carência nutricional, e desenvolveram um novo sistema de resistência independente de energia, onde formam estruturas intracelulares muito organizadas, na qual moléculas de DNA são seqüestradas e estruturalmente protegidas. Esse mecanismo foi bem caracterizado em *Escherichia coli*, que produz uma proteína ligante de DNA denominada Dps (DNA binding protein from starved cells). Uma proteína de 18 kDa, purificada do antígeno bruto de *S. enterica* Typhimurium, com seqüenciamento parcial apresentando 100% de homologia com Dps, foi isolada e caracterizada por sua habilidade de ligar-se à jacalina imobilizada. Dps é uma proteína presente em altas concentrações no citosol de células bacterianas em fase estacionária de cres-

cimento e/ou injúria oxidativa, com o intuito de manter a integridade do microrganismo através de um processo denominado de biocristalização do DNA. A fração homóloga à Dps de *S. enterica* Typhimurium (J-Dps) mostrou afinidade e especificidade de ligação à jacalina em ensaios lectinoenzimáticos, e essa interação foi inibida por alfa-metilgalactose, indicando que o domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD) esteja envolvido nesse processo. Análises de espectrometria de massa (ESI-MS) reforçaram a idéia de que a fração purificada seja glicosilada e que contenha manose como um dos constituintes de sua glicana. Além disso, a busca de um glicopeptídeo de digestão tripsínica de J-Dps, por "parent ion scanning", revelou um íon m/z 841 que foi objeto de investigação, mas não produziu resultados conclusivos. Ressalta-se que a glicosilação em Dps nunca fora descrita anteriormente, e a descrição da presença de cadeias glicídicas ligadas à Dps abre novas perspectivas ao estudo de glicoproteínas bacterianas.

CONTRIBUIÇÃO DA IL-5 E DE LEUCOTRIENOS NA EOSINOFILIA, NA LIBERAÇÃO DE CITOCINAS E NA PRODUÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS DURANTE A SÍNDROME DA LARVA MIGRANS VISCERAL

Fernanda de Freitas Anibal

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli
Tese de Doutorado apresentada em 16/11/2005

Dentre as doenças parasitárias que acometem principalmente as crianças, podemos destacar a Síndrome da Larva Migrans Visceral (SLMV) causada pelo *Toxocara canis*, um dos helmintos mais frequentes em cães. Uma das principais conseqüências desta infecção é o aumento sistêmico de eosinófilos. Neste trabalho verificamos que é possível induzir SLMV em camundongos C57BL/6 e camundongos 129. Além disso, ambas as linhagens de camundongos apresentam aumento: sistêmico de eosinófilos, dos níveis de IL-8, TNF- α , IL-4 e IL-5 nos e de anticorpos do isotipo IgE, sendo IgG1 e IgG2a detectáveis somente no

soro. De forma inédita analisamos o papel dos leucotrienos durante SLMV tanto pelo tratamento com MK-886 ou infectando animais 5LO-KO, onde verificamos que leucotrienos são importantes para mobilizar a saída de eosinófilos e células mononucleares da medula óssea para o sangue e favorecer parcialmente a migração destas células do sangue para o LBA; e que contribui para que ocorra infiltrado inflamatório e lesão pulmonar em camundongos BALB/c, mas, não em C57BL/6, 129 e 5LO-KO. Demonstramos ainda que a IL-5 é produzida durante a SLMV e que é importante para o recrutamento de eosinófilos e células mononucleares, e que esta citocina modula os níveis de IL-8, IL-10 e IgE nos animais infectados com *T. canis*. Nossos resultados sugerem que a IL-5 e leucotrienos contribuem para as alterações imunopatológicas pulmonares presentes na SLMV em camundongos.

EXPRESSÃO DE FRAGMENTOS DE ANTICORPOS HUMANOS RECOMBINANTES CAPAZES DE INIBIR AS ATIVIDADES FOSFOLIPÁSICA E MIOTÓXICA DO VENENO DE *BOTHROPS JARARACUSSU*

Mirela de Barros Tamarozzi

Orientador: Prof. Dr. José Elpídio Barbosa
Dissertação de Mestrado apresentada em 07/12/2005

Envenenamentos por peçonhas de serpentes representam um sério problema de saúde pública, especialmente nos países tropicais, onde eles ainda causam altas taxas de morbidade e mortalidade. No Brasil, serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por mais de 90% dos acidentes ocorridos. O tratamento específico ainda utilizado para os casos de envenenamento é a soroterapia, ou seja, a injeção de quantidades empíricas de anticorpos, sendo uma parte (cerca de 20%) direcionada aos componentes do veneno. Embora a imunoterapia tenha provado a sua eficácia na redução da mortalidade e morbidade em casos de picadas de serpentes, ela é também responsável pelas reações alérgicas agudas ou tardias, cuja incidência depende principalmente da quantidade de anticorpos heterólogos injetados e da pureza do antiveneno. Os efeitos colaterais são principalmente causados pela sensibilização de alguns indivíduos às proteínas de equínos. Algumas alternativas têm sido buscadas para evitar esses inconvenientes do uso de soros heterólogos e uma delas é a produção de fragmentos de anticorpos humanos pela tecnologia de “phage display” para a produção de antivenenos. Neste trabalho, buscou-

se a produção de anticorpos monoclonais capazes de inicialmente inibir uma das atividades do veneno de *B. jararacussu*, a fosfolipásica, utilizando-se a biblioteca de fragmentos de anticorpos humanos (scFv) “Griffin.1”, produzida no Medical Research Council – MRC, Cambridge, Reino Unido. O protocolo adotado para a seleção dos fagos-anticorpos contra veneno bruto foi o de imobilização das proteínas em imunotubo. Foram realizados quatro turnos de seleção e os fagos-anticorpos selecionados em cada um foram analisados por ELISA para a escolha do turno com maior título de anticorpos específicos para as proteínas. O terceiro e o quarto turnos de seleção foram escolhidos para a produção de fagos-anticorpos monoclonais em placas de cultura de 96 poços. Como o ELISA monoclonal utilizando as placas do quarto turno de seleção demonstrou que a maioria dos clones foi capaz de produzir fagos-anticorpos com especificidade para o veneno, estas placas foram escolhidas para a realização dos ensaios de inibição de hemólise. Após a padronização de um método de quantificação da atividade fosfolipásica *in vitro* compatível com as necessidades deste trabalho, puderam-se identificar quatro clones capazes de inibir tal atividade. Os quatro clones produtores de fagos-anticorpos selecionados foram utilizados para a produção de fragmentos solúveis de anticorpos, porém, devido à ausência de marcadores que facilitas-

sem a detecção destes anticorpos, a purificação dos scFv não foi conseguida. Visando a obtenção de scFv puro, algumas resinas cromatográficas foram testadas e, ao final, não se conseguiu a purificação total do scFv, porém eliminou-se boa parte dos contaminantes presentes no meio. Depois de confirmada a capacidade de inibição da atividade

de enzimática pelos anticorpos, resolveu-se verificar se a ligação destes interferia em outras atividades induzidas pelo veneno, como a miotóxica e a anticoagulante. Os clones selecionados foram capazes de inibir a atividade miotóxica *in vivo*, porém não tiveram influência sobre a atividade anticoagulante.

NEUROLOGIA

DISFUNÇÃO TEMPOROMANDIBULAR NA MIGRÂNEA EPISÓDICA E NA MIGRÂNEA CRÔNICA. UM ESTUDO CONTROLADO

Henrique Roberto de Macedo

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo Speciali

Dissertação de Mestrado apresentada em 03/08/2005

As disfunções temporomandibulares (DTMs) podem ser definidas como um conjunto de sinais e sintomas envolvendo os músculos mastigatórios, as articulações temporomandibulares ou ambos. Informação anedotal sugere a correlação entre migrânea e DTMs. A correlação entre DTM e migrânea crônica não foi estudada. Decidimos então, verificar de forma controlada e prospectiva, a relação entre DTMs, migrânea e migrânea crônica. Três grupos foram formados: 1 – Migrânea (n = 31); 2 – Migrânea Crônica (n = 34); 3 – Controle (n = 28). Como controle, foram

selecionadas pessoas sem cefaléia nos últimos 6 meses. Os participantes dos três grupos foram pareados, de acordo com sexo e idade. A avaliação de DTM foi feita com um protocolo específico para essas disfunções, para determinação do Índice de Helkimo (IH). Participantes com Migrânea Crônica e Migrânea apresentaram escores no IH significativamente superiores aos obtidos no grupo controle (39 vs. 29 vs. 22, $p < 0.05$). Adicionalmente, os escores do IH do grupo Migrânea Crônica foram significativamente maiores que os do grupo Migrânea ($p < 0,05$). A intensidade do acometimento também foi maior em pacientes do grupo migrânea crônica (50% apresentavam DTM intensa), comparados com o grupo da migrânea (32%) e do controle (10%). Nossos resultados demonstram, que as DTMs estão associadas com as cefaléias refratárias.

AVALIAÇÃO DO DANO NEURONAL E AXONAL TARDIO, SECUNDÁRIO AO TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO MODERADO E GRAVE, POR TÉCNICAS QUANTITATIVAS EM RESSONÂNCIA MAGNÉTICA

Augusto Elias Mamere

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos dos Santos

Dissertação de Mestrado apresentada em 05/08/2005

O traumatismo cranioencefálico (TCE) fechado é, classicamente, um modelo de lesão neuronal e axonal monofásica, onde a destruição do parênquima, incluindo neurônios e células gliais, ocorre principalmente no momento do trauma, seguida pela degeneração Walleriana anterógrada

e retrógrada nos dias subsequentes. Há evidências de progressão da perda neuronal e axonal na fase tardia após o trauma, observada principalmente pela evolução da atrofia cerebral, secundária a vários fatores, incluindo a apoptose neuronal. Com o objetivo de testar a hipótese de que as técnicas quantitativas em ressonância magnética (RM) permitem identificar, de modo não invasivo, as variáveis biológicas que estimam a perda neuronal e axonal no cérebro relacionadas ao TCE moderado e grave e à lesão axonal difusa, na fase tardia, foram avaliados 9 pacientes, sendo 5

do sexo masculino e 4 do sexo feminino, com idades variando de 11 a 28 anos (média de 21,1 anos), que foram vítimas de TCE moderado ou grave (Escala de Coma de Glasgow menor que 12 na admissão hospitalar após o TCE) e que tiveram boa recuperação. O tempo médio entre o trauma e o exame de ressonância magnética foi de 3,1 anos ($\pm 0,5$ anos). Foram utilizados os índices ventrículo-cerebrais bifrontal (IVC_F) e bicaudado (IVC_C), a medida do tempo de relaxação T2, o índice de transferência de magnetização (MTR), o coeficiente de difusão aparente (ADC) e a espectroscopia de prótons *multi-voxel*, com o cálculo dos índices metabólicos N-acetilaspártato/creatina (NAA/Cre) e colina/creatina (Cho/Cre). Foram estudados a substância branca (SB) frontal e parietal bilateralmente, o joelho e o esplênio do corpo caloso (CC) e a substância cinzenta (SC). As médias dos valores medidos foram comparadas às de um grupo contro-

le formado por 9 pessoas saudáveis, pareadas pela idade e sexo. Observou-se aumento estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$) do IVC_F e do IVC_C nos pacientes, devido ao aumento ventricular secundário à atrofia subcortical; aumento no tempo de relaxação T2 na SB e no CC, que reflete o aumento da concentração de água por provável perda axonal e gliose; aumento do ADC e redução do MTR na SB e no CC, que demonstram lesão das fibras axonais mielinizadas, e redução do índice NAA/Cre no CC, indicando perda axonal. Não houve diferença estatisticamente significativa nas medidas realizadas na SC e nem no índice Cho/Cre ($p > 0,05$). Os resultados encontrados mostram que as técnicas quantitativas em RM foram capazes de detectar, de modo não invasivo, o dano neuronal e axonal na substância branca e no corpo caloso de cérebros humanos, secundário ao TCE moderado e grave.

ESTUDO NEUROMORFOLÓGICO E PSICOFISIOLÓGICO DA VIA INIBITÓRIA GABAérgica ESTRIADO-NIGRO-COLICULAR E DE SUA INFLUÊNCIA SOBRE O COMPORTAMENTO DE DEFESA ELICIADO POR ESTIMULAÇÃO DO COLÍCULO INFERIOR

Lissandra Castellan Baldan

Orientador: Dr. Norberto Cysne Coimbra

Tese de Doutorado apresentada em 05/08/2005

O objetivo deste trabalho foi investigar se as conexões GABAérgicas estriado-nigro-tectais se estendem ao substrato neural responsável pela organização dos comportamentos defensivos e do medo no colículo inferior (CI) de ratos, determinando sua influência sobre a modulação de respostas defensivas eliciadas por estimulação elétrica e química de aspectos caudais do teto mesencefálico. Também foi estudada a neuroanatomia funcional das conexões estriado-nigro-coliculares.

O neurotraçamento retrógrado realizado com a microinjeção de "fast blue" na substância negra, parte reticular (SNpr), mostrou células neuroniais e seus prolongamentos localizadas no caudado-putame, no globo pálido em suas porções medial e lateral e nos aspectos dorsais e ventrais dos núcleos subtalâmicos. Corpos celulares neuroniais e fibras axônicas foram observadas no caudado-putame, após as microinjeções do neurotraçador biodextran conjugada a "Texas red" na SNpr. Este procedimento permitiu-nos identificar fibras positivas para biodextran nos núcleos cortical dorsal e central do colículo inferior, demonstrando assim a existência da via estriado-nigro-tectal, a qual se destina também para sítios caudais do mesencéfalo dorsal.

Os efeitos da diminuição da atividade na via nigro-colicular foram estudados, através de lesões neuroquímicas, com ácido ibotênico, ou por meio de microinjeções de muscimol na SNpr. Os resultados obtidos após as lesões neuroquímicas da SNpr mostraram um aumento das res-

postas defensivas (número de cruzamentos) eliciadas após as microinjeções de bicuculina no colículo inferior. Os resultados observados após as microinjeções de muscimol na SNpr mostraram uma redução dos limiares do comportamento de defesa, evocados pela estimulação elétrica do colículo inferior, e causaram um claro aumento das respostas defensivas (expressas por corridas e rotações) eliciadas após as microinjeções de bicuculina no colículo inferior. Foi também observado um aumento no número de rotações entre o grupo que recebeu microinjeção de muscimol na SNpr comparado com aquele pré-tratado com salina fisiológica nessa mesma estrutura.

Os efeitos do aumento da atividade na via nigro-colicular foram investigados, através de microinjeções de bicuculina na SNpr. Os resultados observados após as microinjeções de bicuculina na SNpr mostraram um aumento dos limiares do comportamento de imobilidade defensiva e de fuga, assim como uma clara diminuição das respostas defensivas (expressas por corridas e saltos) eliciadas após as microinjeções de bicuculina no colículo inferior, tendo havido também uma redução do número de cruzamentos, saltos e rotações entre o grupo administrado com bicuculina na SNpr quando comparado com o grupo pré-tratado com salina na SNpr.

Os resultados sugerem que a substância negra, parte reticular, envia projeções inibitórias para o substrato neural envolvido com a organização dos comportamentos defensivos no mesencéfalo dorsal e também sugerem uma função adicional da substância negra, parte reticular, no controle das respostas defensivas organizadas pelas redes neurais do colículo inferior.

AValiação Fisioterapêutica Cranio-Cervical em Pacientes com Cefaléia Primária

Paulo de Tarso T. Guimarães

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Speciali

Dissertação de Mestrado apresentada em 11/08/2005

Não encontramos na literatura consultada um exame fisioterapêutico que possa ser rotineiramente realizado em pacientes com cefaléia primária.

No presente estudo, decidiu-se avaliar as alterações do segmento crânio-cervical em cento e vinte participantes, agrupados em grupos de 30, selecionados em sua primeira consulta no Ambulatório de Cefaléias do Hospital das Clínicas, na cidade de Ribeirão Preto-SP. Os grupos foram diagnosticados, segundo os critérios da International Headache Society (IHS, 2004), e Silberstein, (1998); em Migrânea (M), Cefaléia do Tipo Tensional Crônica (CTTC), Migrânea Transformada (MT) e Grupo Controle (GC). Foi proposto um protocolo de avaliação fisioterapêutica do segmento crânio-cervical, onde foram analisadas a presença de dor espontânea, amplitude articular da coluna cervical, estruturas ósse-

as (processo espinhoso e articular posterior de C2-C7, e processo mastóideo); estruturas nervosas (nervos occipitais maior e menor, e supra-orbitário); estruturas musculares (trapézio, escaleno, esternocleidomastóideo, elevador da escápula, masseter, pterigóideo, occipital, suboccipital, temporal, frontal) e a abertura e presença de estalido da Articulação Temporomandibular (ATM).

Os grupos com cefaléias apresentaram perda da amplitude articular da coluna cervical, sensibilidade dolorosa aumentada nos pontos avaliados e alterações da Articulação Temporomandibular (ATM), em relação ao Grupo Controle (GC) e quando comparados entre si, apresentaram as mesmas alterações, não importando o diagnóstico dos tipos de cefaléias referenciadas nesse estudo.

Concluiu-se que a realização da avaliação fisioterapêutica específica e direcionada às estruturas cranianas e pericranianas se faz necessária para a análise das características individuais de cada paciente, contribuindo assim para a complementação no diagnóstico e no tratamento das cefaléias primárias.

ESTUDO SOBRE AJUSTES POSTURAIIS DURANTE TESTE DE ATENÇÃO EM LACTENTES COM 7 MESES DE IDADE NASCIDOS PRÉ-TERMO

Sílvia Penedo Leme

Orientadora: Profa. Dra. Carolina A. R. Funayama

Dissertação de Mestrado apresentada em 03/10/05

A avaliação de movimentos espontâneos tem sido considerada excelente recurso para o diagnóstico neurológico. Ajustes posturais frente a situações estruturadas é objeto de estudos no sentido de ampliar o conhecimento sobre características motoras de grupos específicos, como os nascidos adequados ou pequenos para a idade gestacional, de termo ou pré-termo.

Esse conhecimento pode ajudar na detecção de parâmetros que possam correlacionar-se precocemente com processos como atenção, memória e outras funções corticais e auxiliar profissionais a detectar o que é patológico em padrões de movimento, reconhecer anormalidades o mais cedo possível para intervir precocemente e auxiliar na redução de seqüelas funcionais.

Na presente pesquisa, considerou-se importante comparar características nos ajustes posturais durante a exposição a estímulo visual e auditivo, em crianças nascidas pré-termo adequadas e pequenas para a idade gestacional simétricas, com 7 meses de idade corrigida, sem sinais de alterações neurológicas, em situação de atenção.

Os objetivos desta pesquisa foram verificar alguns aspectos de quantidade e qualidade das categorias de catalogadas, comparar gênero feminino e masculino e condi-

ção de pequeno para idade gestacional (PIG) ou adequado para idade gestacional (AIG).

Através de filmagem e posterior análise, foram identificadas e catalogadas as variações nas posições durante um minuto de exposição a estímulo, estando o lactente colocado em decúbito ventral ou sentado.

No presente trabalho, os achados de ocorrência de categorias que não se repetiram em maior número no grupo AIG, sugere maior variabilidade no repertório destes lactentes. Juntamente com a análise qualitativa daquelas categorias exclusivas que se repetiram, apresentaram diversificação, complexidade e padrão avançado neste grupo. As categorias com transferência de peso foram exemplos disto, não ocorrendo entre as categorias que se repetiram nos nascidos PIG.

Nesta amostra de lactentes, foi possível perceber que aos 7 meses de idade corrigida nascidos pré-termo são capazes de manter-se em determinada posição e ajustar-se a ela, em momentos que requerem atenção.

Conclui-se que houve diferenças na quantidade e qualidade de ajustes posturais em situação atencional, segundo a relação peso/idade gestacional ao nascimento. Houve diferença quanto à relação peso/idade gestacional, sendo desfavorável para o grupo PIG. Não se observou diferenças segundo o gênero. Não houve correlação entre as variáveis relacionadas aos ajustes posturais e o tempo total de atenção.

STATUS EPILEPTICUS NO PERÍODO NEONATAL: ASPECTOS CLÍNICOS E TRATAMENTO ASSOCIADOS À AVALIAÇÃO POLIGRÁFICA

Fabiana Penedo Leme

Orientadora: Profa. Dra. Regina Maria França Fernandes
Dissertação de Mestrado apresentada em 20/10/2005

Crises epiléticas são a manifestação mais frequente de comprometimento encefálico no recém-nascido devido à maior excitabilidade cerebral nesta época da vida em comparação com outras idades. Através do eletrencefalograma, as crises epiléticas podem ser melhor diagnosticadas, especialmente no recém-nascido, cujas manifestações clínicas costumam ser sutis, com maior frequência de crises eletrográficas sem manifestação clínica aparente. Devido à maior propensão para crises epiléticas e seu alto risco de desenvolvimento de encefalopatias primárias ou secundárias, o recém-nascido também apresenta maior chance de manifestar estado de mal epilético. Os objetivos deste trabalho foram de estudar características diversas do estado de mal epilético neonatal, diagnosticado através de registros poligráficos, em serviço terciário de referência, com vistas ao melhor conhecimento de aspectos relacionados à resposta ao tratamento, ao contexto clínico-etiológico e evolutivo, em conexão com características do traçado poligráfico durante o estado de mal, em recém-nascidos atendidos no HCFMRP-USP.

Foram incluídos neste estudo os recém-nascidos com diagnóstico de estado de mal epilético confirmado por um ou mais registros poligráficos, no período de 01 de janeiro de 2000 a 01 de janeiro de 2004. Dos 419 neonatos submetidos a este exame no período, o estado de mal epilético foi documentado em 42 (10,02%), sendo 20 nascidos pré-termo e 22 a termo. O *Status Epilepticus* (SE) ocorreu em 13,18% (92 de 698) das poligrafias neonatais registradas no período e a taxa de refratariedade ao tratamento

com fenobarbital e fenitoína foi de 66,6% (28 de 42 crianças), sendo usados midazolam em todos estes casos, dos quais 7 foram também resistentes a esta droga, necessitando de uso do thiopental.

As etiologias do estado de mal epilético foram: Encefalopatia Hipóxico Isquêmica (11), Hemorragia Peri-Intraventricular (7), Malformações do SNC (5), Síndromes Genéticas (7), Erros Inatos do Metabolismo (4), Meningites (2), Infecção Congênita (1), Kernicterus (1) e uma miscelânea de fatores em 4 crianças. Dois casos tiveram diagnóstico eletroclínico de Síndrome de Ohtahara.

O primeiro registro de estado de mal foi feito em idade de termo para a maioria das crianças (30 termos e 11 pré-termos), tendo sido diagnosticado *status* com base em sinais clínicos evidentes, em um neonato com intensa depressão cortical, devida a EHI grave. As descargas ictais predominaram nas regiões do vértex e rolândicas em todas as faixas etárias.

O estado de mal epilético multifocal relacionou-se com maior chance de refratariedade às drogas de segunda linha do que o focal ($p=0,02$), não havendo influência da idade gestacional nem da idade pós-concepcional da criança à época do primeiro exame da em relação a esta variável, bem como, em relação à evolução favorável ou desfavorável, ou ao óbito. A idade gestacional mostrou tendência a se correlacionar com o óbito, com maior risco nos neonatos que nascem prematuramente, mesmo que o *status* tenha se instalado já em idade pós-concepcional de termo ($p=0,08$). O óbito ocorreu em 20 das 42 crianças (40,4%) e em 5 das 7 crianças que usaram thiopental (70,1%). O registro de um ciclo vigília-sono durante o estado de mal epilético não teve influência na evolução favorável ou desfavorável após o estado de mal ($p=1,0$).

EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL MESIAL: ESTUDO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO DAS FORMAS FAMILIARES E ESPORÁDICAS

Luciana Patrícia Alves de Andrade-Valença

Orientador: Prof. Dr. João Pereira Leite
Tese de Doutorado apresentada em 21/10/2005

Objetivo: A epilepsia do lobo temporal mesial familiar (ELTMF) é uma síndrome clínica heterogênea composta por indivíduos com diferentes controles de crises epiléticas, e com presença de atrofia hipocampal em um percentual elevado dos casos. Apesar da ELTMF já estar bem caracte-

rizada do ponto de vista clínico e de neuroimagem, em especial nos pacientes com bom controle de crises, pouco se investigou a respeito do substrato histopatológico da atrofia hipocampal, bem como da possível influência das diferentes variáveis clínicas e do prognóstico pós-cirúrgico nos pacientes com ELTMF farmacologicamente intratáveis. Neste estudo avaliamos aspectos clínicos e histológicos de uma série de pacientes cirúrgicos com ELTM associada à esclerose hipocampal nas formas esporádica e familiar,

objetivando definir a influência do componente genético sobre as variáveis clínicas e histológicas.

Pacientes e métodos: Os pacientes, ELTM esporádica (n = 39) e ELTMF (n = 20), foram selecionados do ambulatório de epilepsia de difícil controle do Hospital das Clínicas-Universidade de São Paulo-Ribeirão Preto, e avaliados com protocolo específico para epilepsia do lobo temporal. Definiu-se ELTMF quando dois ou mais indivíduos parentes de primeiro ou segundo grau preenchem critérios para ELTM. As amostras teciduais dos hipocampus foram processadas pela técnica de Nissl/HE e neo-Timm. Os dois grupos foram comparados em relação às variáveis clínicas e histopatológicas qualitativas e quantitativas (densidade celular em diferentes regiões do hipocampo e intensidade da reorganização sináptica das fibras musgosas).

Resultados: Não houve diferença significativa entre os grupos de pacientes com ELTMF e ELTM esporádica nos seguintes parâmetros clínicos: idade no momento da inclusão no estudo, sexo, presença e tipo de injúria precipitante inicial (IPI), idade da IPI, idade da primeira crise usual, período latente, tempo de doença, padrão eletrográfico interictal e ictal no vídeo-EEG, avaliação qualitativa da RM no que se refere à presença de atrofia ou aumento de sinal

hipocampal, tempo de acompanhamento pós-cirúrgico, e prognóstico pós-lobectomia temporal. Não observamos também diferenças significativas na intensidade da perda neuronal nos diferentes subcampos (CA1, CA2, CA3, CA4), bem como também na camada polimórfica do hilo, fásia denteada, *prossubiculum* e *subiculum*. Entretanto, detectamos uma maior intensidade na marcação do Timm nos terminais sinápticos da camada molecular interna do grupo de pacientes com ELTM esporádica em relação ao grupo com ELTMF ($p < 0,05$).

Conclusão: Apesar da diferença na intensidade da reorganização sináptica na camada molecular interna entre os pacientes com ELTMF e ELTM esporádica observamos um perfil clínico, bem como histológico, bastante semelhante entre os dois grupos, inclusive uma boa resposta ao tratamento cirúrgico. Provavelmente os pacientes com as formas familiares respondem de forma diferente às alterações plásticas induzidas por perda celular, desnervação neuronal e possivelmente por crises epiléticas. Por outro lado, a intensidade da reorganização sináptica na camada molecular interna parece não exercer influências que possam modificar a história natural dos pacientes com ELTM farmacoresistentes.

ESTUDO DE CATEGORIAS DE MUDANÇAS DE MOVIMENTO DURANTE OS AJUSTES POSTURAIS EM LACTENTES AOS 7 MESES DE IDADE EM SITUAÇÃO DE ATENÇÃO

Adriana Tonhão Tribucci

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Carolina Araújo Rodrigues Funayama
Dissertação de Mestrado apresentada em 30/11/2005

O estudo dos ajustes posturais associados a estímulos externos pode contribuir para novos instrumentos de avaliação para o diagnóstico precoce e avanços no tratamento de crianças com atraso no desenvolvimento. Neste sentido, o presente estudo tem por objetivo, catalogar e analisar algumas categorias de mudanças de movimento durante os ajustes posturais, em situação de atenção de crianças com 7 meses, e a relação entre tais categorias e o tempo total de atenção visual, comparando: os grupos nascidos a termo e pré-termo com idade corrigida; os percentis da relação peso ao nascimento/idade gestacional (PN/IG). Para isso, foram incluídas 29 crianças, 7 nascidas a termo e 22 pré-termo, com 31 a 39 semanas de idade gestacional e peso de 1060 a 3665 gramas ao nascimento, com ausência de sinais de lesão neurológica, anormalidades sensoriais ou motoras e, com desenvolvimento postural esperado para a idade, de acordo com a avaliação neurológica e físico-funcional. Foi realizada filmagem da criança, com 3 câmeras digitais, durante um minuto de exposição de uma boneca

“Emília”, apresentada por um orifício em painel, com animação, através de uma gravação falada, dirigida à criança. A mesma foi posicionada em decúbito ventral ou, no caso de desconforto, sentada, em um colchonete a um metro de distância do painel. Foram consideradas para estudo, após análise e catalogação das categorias: número total de posições; posições com transferência de peso; número de vezes de mudanças do eixo, do apoio, decúbitos, movimentos da coluna cervical e tronco e o tempo total de atenção visual. Os resultados mostraram principalmente que, não houve diferença significativa quanto as variáveis estudadas, entre os grupos nascidos a termo e pré-termo. No grupo pré-termo com percentis PN/IG > 25, houve maior frequência no número de posições com transferência de peso e de mudanças dos movimentos do tronco ($p < 0,05$), em relação as nascidas com percentil ≤ 25 . Considerando a amostra total, houve correlação positiva significativa entre o número de posições com transferência de peso e tempo total de atenção visual ($r = 0.39$; $p = 0.04$), e quanto maior o Percentil PN/IG, maior a frequência do número de posições com transferência de peso. A metodologia utilizada evidenciou diferenças segundo a maturação, em algumas variáveis posturais, e permitiu sugerir a relação entre número de posições com transferência de peso e a persistência da atenção.

ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES OPIÓIDES μ_1 E DAS REDES NEURAIS DO COLÍCULO INFERIOR NA ANALGESIA PÓS-ICTAL

Tatiana Tocchini Felippotti

Orientador: Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra

Dissertação de Mestrado apresentada em 09/12/2005

A antinocicepção é descrita como redução na capacidade de perceber a dor, sendo importante componente para o organismo, quando este está envolvido em situações de emergência. Muitos neurotransmissores e seus receptores estão envolvidos nas diversas formas de analgesia, como por exemplo, monoaminas, acetilcolina e opióides endógenos. A analgesia pós-ictal é uma das muitas formas de antinocicepção em que o recrutamento de cada um desses neurotransmissores é descrito.

Algumas evidências mostram o envolvimento de estruturas mesencefálicas em processos antinociceptivos (GEBHART & TOLEIKIS, 1978; COIMBRA e col., 1992; COIMBRA & BRANDÃO, 1997; CASTILHO e col., 1999) O colículo inferior é a estrutura mesencefálica responsável pela origem e expressão de crises audiogênicas (MCCOWN e col., 1987). Estruturas como a substância cinzenta periaquedutal, camadas profundas do colículo superior e núcleo central do colículo inferior, têm sido implicadas em processos convulsivos (DE PAULIS e col., 1990; CARDOSO e col., 1994, MCCOWN e col., 1984). Recentes relatos demonstraram que a estimulação dessas estruturas, em cujo substrato neural há neurônios positivos para β -endorfina e leu-encefalina (EICHENBERGER e col., 2002; OSAKI e col., 2003) pode gerar processos antinociceptivos (CASTILHO

e col., 1999; GEBHART & TOLEIKIS, 1978), seja de natureza opióide (NICHOLS e col., 1989), seja de natureza monoaminérgica (COIMBRA e col., 1992; COIMBRA & BRANDÃO, 1997).

Neste trabalho, foi realizado o estudo periférico para investigar o envolvimento, mais especificamente, dos receptores opióides μ_1 na analgesia que segue as crises convulsivas evocadas pela administração de um antagonista de canais de Cl^- ligados ao GABA, como é o caso do pentilenotetrazol, administrado por via intraperitoneal, após o pré-tratamento com o bloqueador opióide específico, o naloxonazine, administrado em diferentes doses. Assim também, estudou-se a participação do colículo inferior nesse processo de inibição de dor, mensurado pelo teste de retirada de cauda.

O pré-tratamento com naloxonazine, administrado por via intraperitoneal por tempo prolongado (24h), mas não agudamente (10 min), antagonizou a antinocicepção evocada por convulsões tônico-clônicas. Microinjeções de naloxonazine realizadas nos núcleos central, cortical externo e cortical dorsal do colículo inferior antagonizaram a analgesia induzida por crises convulsivas tônico-clônicas, efeito que segue uma curva dose-resposta, bem como, causaram a redução do tempo do processo convulsivo induzido pelo bloqueio ionóforo de canais de cloro ligados ao GABA. Em vista disso, podemos sugerir o envolvimento de receptores μ_1 -opióides e das redes neurais do colículo inferior na elaboração da analgesia pós-ictal, e na modulação de crises convulsivas tônico-clônicas.

SUBSTRATOS NEUROANATÔMICOS E CELULARES DO COMPORTAMENTO DE AUTOLIMPEZA EXACERBADA (*HYPERGROOMING*) INDUZIDO PELA INJEÇÃO DE OCITOCINA NO NÚCLEO CENTRAL DA AMÍGDALA, UM MODELO EXPERIMENTAL DE TRANSTORNO OBSESSIVO-COMPULSIVO

Simone Saldanha Marroni

Orientador: Prof. Dr. Norberto Garcia-Cairasco

Dissertação de Mestrado apresentada em 16/12/2005

Ocitocina (OT) é um nonapeptídeo neurosecretório sintetizado nas células hipotalâmicas que se projetam para a neurohipófise e para locais extensamente distribuídos no sistema nervoso central. As microinjeções centrais de OT induzem uma variedade de comportamentos em animais no âmbito cognitivo, sexual, reprodutivo, de autolimpeza e afiliativo. O transtorno obsessivo-compulsivo (TOC) inclui uma escala dos sintomas cognitivos e comportamentais que tem alguma relação com dimensões de comportamento associadas com a OT. A administração de OT no

núcleo central da amígdala (CeA) induz autolimpeza exacerbada, considerada um sintoma de TOC. Neste trabalho, nós estudamos os substratos neuroanatômicos e celulares deste comportamento. Nossos dados sugerem uma ligação entre o CeA e a "área hipotalâmica de *grooming*" (HGA). A HGA inclui parte do núcleo paraventricular do hipotálamo e a área hipotalâmica dorsal. Nossos dados mostrando colocalização de OT (imunofluorescência para peptídeo), receptor para OT (ensaio de *binding*) e marcação de células retrogradamente depois da injeção de *Fluoro-Gold* no CeA sugerem que o CeA e conexões são substratos importantes nos circuitos subjacentes de comportamento normal e de quadro patológico tal como o TOC dependente de OT descrito neste trabalho.

ESTUDO DO EFEITO DA DIMINUIÇÃO DE ATIVIDADE DAS PROJEÇÕES NIGRO-TECTAIS GABAérgicas SOBRE O COMPORTAMENTO DE DEFESA ELICIADO POR *RATTUS NORVEGICUS* (RODENTIA, MURIDAE) EM CONFRONTO AGRESSIVO COM *CROTALUS DURISSUS TERRIJICUS* (REPTILIA, VIPERIDAE)

Valéria Borelli

Orientador: Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra

Dissertação de Mestrado apresentada em 21/11/2005

A Substância Negra, rica em neurônios GABAérgicos, recebe aferências também GABAérgicas provenientes do corpo estriado e se projeta para o mesencéfalo dorsal, modulando o substrato neural do medo no colículo superior e SCPd. O objetivo deste trabalho consiste em investigar as influências das conexões GABAérgicas nigro-tectais sobre as respostas defensivas eliciadas por confronto entre presa (*Rattus norvegicus*) e predador (*Crotalus durissus terrificus*). A diminuição de atividade dessa via foi estudada através da lesão neuroquímica da substância negra, parte reticulada (SNpr), com ácido ibotênico. Os efeitos dessa manipulação farmacológica sobre a elaboração do comportamento de defesa foram avaliados pelo registro das diversas respostas comportamentais evocadas pelo confronto aversivo entre roedor e serpente do gênero *Crotalus*. Tanto a lesão aguda como subaguda, unilaterais, de neurônios localizados na parte reticulada da substância negra causaram um aumento da eliciação de imobilidade defensiva, seguida de ativação do sistema nervoso neurovegetativo, assim como uma diminuição no número de cruzamentos e do número e tempo de interação com a serpente. Esses acha-

dos refletem uma sensibilização de áreas que elaboram o comportamento de defesa à presença de um predador natural, provavelmente induzida pela diminuição de atividade da via GABAérgica nigro-tectal. Com efeito, após lesão neurotóxica da SNpr, os animais exploraram menos a arena, evitando claramente o predador, do qual mantinham uma distância segura. Como o contato com a serpente diminuiu, provavelmente devido ao aumento do medo na presa, houve uma diminuição no número de acionamento do chocalho e no desferimento de botes ofensivos por parte do predador. Nossos dados são uma clara evidência do envolvimento da SNpr na modulação das emoções, provavelmente através da via nigro-tectal GABAérgica, sugerindo a participação da Substância Negra, parte reticulada, na regulação e controle de algumas respostas emocionais, como as sensações de medo, que propiciam a elaboração do comportamento de fuga.

Os presentes achados consistem na primeira evidência de participação efetiva das vias GABAérgicas nigro-tectais sobre os estados emocionais elaborados no teto mesencefálico em um modelo experimental de confronto entre presa e predador. A técnica experimental empregada permite analisar claramente os comportamentos frente a situações de risco iminente de vida, possibilitando, também, estabelecer alguns aspectos da modulação do substrato neural responsável pela organização de respostas emocionais.

OFTALMOLOGIA

CONDIÇÕES OFTALMOLÓGICAS E IMUNOGENÉTICAS DE PACIENTES COM SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (AIDS) DE PROGRESSÃO LENTA

Márcia Abelin Vargas

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes V. Rodrigues

Dissertação de Mestrado apresentada em 05/08/2005

Objetivos: os principais objetivos deste estudo foram: 1) avaliar as condições oftalmológicas de pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (aids), sobreviventes de longa data, previamente avaliados por oftalmologista, e correlacioná-las com a contagem de células

T CD₄⁺, carga viral e uso da terapia anti-retroviral de alta potência (HAART); 2) verificar se a presença de subtipos HLA, descritos como associados à progressão rápida ou lenta para a aids, influenciam na taxa de sobrevivência dos pacientes com aids e retinite por citomegalovírus (RCMV) prévia, e nos pacientes com aids que não desenvolveram RCMV; e 3) determinar se o subtipo HLA-B8, que apresentou uma tendência a proteção para o desenvolvimento de RCMV (RODRIGUES, 2000), protegeu os pacientes com aids com

fatores de risco para o desenvolvimento de RCMV.

Método: estudo observacional de 42 pacientes com aids, subdivididos em dois grupos: Grupo I – 8 pacientes com aids e RCMV prévia, Grupo II – 34 pacientes com aids sem RCMV. No momento atual, cada paciente foi submetido a um exame oftalmológico. Para avaliar a sobrevida, foram incluídos pacientes falecidos com aids e RCMV (Grupo III- 32 pacientes) e pacientes falecidos com aids sem RCMV (Grupo IV- 33 pacientes). Dados do estado imunológico e datas de óbitos foram obtidos pela análise dos prontuários médicos. Foi realizada sorologia para o citomegalovírus (CMV) nos pacientes do Grupo II. Para a análise de antígenos e alelos de histocompatibilidade, de classes I (HLA-A e HLA-B) e II (HLA-DRB1* e HLA-DQB1*), foram utilizados os dados de pesquisa anterior, da qual os pacientes desse estudo haviam participado e nos quais tais antígenos e alelos foram tipificados (RODRIGUES, 2000). Foram considerados fatores de risco para a RCMV a contagem de células T CD₄⁺ < 100 células/mm³ e o logaritmo da carga viral > 3,60 (>4.000 cópias/mm³), independente do uso da HAART e independente de já ter desenvolvido RCMV em alguma época de sua vida. A análise estatística foi realizada através do cálculo de valores de probabilidade, método de Kaplan-Meier e teste de Wilcoxon.

Resultados: a maioria dos pacientes apresentou acuidade visual (AV) no melhor olho entre logMAR 0.0 (68,3%) e 0.1(26,2%). No Grupo I, 87,5% apresentaram AV ≥ logMAR 0.1 em pelo menos um dos olhos. A prescrição óptica para longe beneficiou 57,6% dos pacientes do Grupo II, mas nenhum dos pacientes do Grupo I. A presbiopia foi corrigida em 27,3% do Grupo II e 12,5% no Grupo I. Não foram encontradas manifestações oculares atuais relacionadas a aids em nenhum dos grupos. As alterações fundoscópicas encontradas em dez pacientes foram cicatriciais de retinite/retinocoroidite, sendo sete (16,7%) pacientes pertencentes ao Grupo I e três (7,1%) pacientes pertencentes ao Grupo II. Todos os pacientes que realiza-

ram a sorologia para o CMV apresentaram positividade sorológica para o mesmo. A estimativa da função de sobrevivência demonstrou que desenvolver RCMV diminuiu muito a taxa de sobrevida (p<,0001). A análise do uso da HAART pelos pacientes com imunidade gravemente comprometida não apresentou significância estatística. No que diz respeito ao perfil HLA, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para os antígenos HLA-A23, HLA-A30 e HLA-A33, quando comparados o total dos sobreviventes com o total dos pacientes falecidos; para o antígeno HLA-A30, quando comparados os sobreviventes sem RCMV e os pacientes falecidos sem RCMV; e ao se comparar os pacientes falecidos com RCMV e os falecidos sem RCMV, houve significância estatística para os grupos de alelos HLA-DRB1*13, HLA-DQB1*02 e HLA-DQB1*06. A análise estatística do HLA-B8 demonstrou significância ao se comparar os pacientes sobreviventes e os pacientes falecidos, ambos com fatores de risco para o desenvolvimento da RCMV.

Conclusão: Somente quatro (9,5%) pacientes apresentaram piora das condições oftalmológicas por causas atribuíveis às seqüelas da RCMV. Dez (24,4%) pacientes apresentaram alteração visual decorrente do envelhecimento. Todos os outros pacientes estavam em boas condições oftalmológicas e a maioria dos mesmos se encontrava em recuperação imunológica, devido ao uso da HAART. A sobrevida foi maior nos pacientes com aids sem RCMV, demonstrando que ter RCMV aumenta as chances de óbito (p<,0001). Os resultados não confirmam associação entre moléculas HLA e o tempo de sobrevida dos pacientes com aids. Os antígenos HLA-A23 e HLA-A33 tiveram uma tendência a proteger do óbito e o antígeno HLA-A30 apresentou uma tendência ao óbito, ao se comparar os pacientes sobreviventes e os que faleceram. Ao se comparar os pacientes com fatores de risco para o desenvolvimento da RCMV, o subtipo HLA-B8 apresentou uma tendência a proteção contra o óbito, mas não ao se comparar todos os grupos.

ESTUDO DAS CÉLULAS SATÉLITES DE MÚSCULO OBLÍQUO INFERIOR DE PACIENTES COM HIPERFUNÇÃO DE MÚSCULO OBLÍQUO INFERIOR E DE PACIENTES SEM ESTRABISMO

Rosália Maria Simões Antunes Foschini

Orientador: Prof. Dr. Harley E. A. Bicas

Tese de Doutorado apresentada em 19/08/2005

Alterações no número de células satélites em diferenciação podem estar correlacionadas com as disfunções do músculo oblíquo inferior comumente encontradas nos pacientes com estrabismo. O estrabismo caracteriza-se pelo desequilíbrio entre as forças que mantêm o alinhamento ocular (musculatura ocular externa (MOE) e tecidos

conectivos). Ao contrário da musculatura esquelética (ME), que é pós-mitótica, a MOE apresenta-se em contínua renovação celular, às custas das células satélites (CS), que, quando ativadas, expressam o MyoD1, marcador de diferenciação celular da linhagem mio gênica. Sua expressão em MOE de humanos adultos, sob condições normais, ocorre numa frequência de dois a quatro núcleos de CS para cada cem miofibras examinadas. O aumento da força da MOE guarda alta relação com o aumento no número de CS ativadas. Variações na capacidade de proliferação/diferenciação das CS

podem estar relacionadas com as disfunções musculares ocorridas no estrabismo, como as hiperfunções dos músculos oblíquos inferiores (MOI). Outros marcadores para as CS incluem o PCNA, expresso em CS em proliferação e o c-met, marcador de CS ativadas, em proliferação ou em repouso. Este estudo teve como objetivos quantificar as CS ativadas pela expressão do MyoD1 e as CS em proliferação pela dupla marcação pelo PCNA e pelo c-met em MOI hiperfuncionantes de pacientes estrábicos e em MOI de pessoas sem estrabismo, além de investigar hipertrofia muscular. Os pacientes foram divididos em: 1. Grupo estrabismo (GE) – 26 pacientes submetidos a miectomia por hiperfunção do MOI; 2. Grupo controle (GC) – 10 globos oculares doados ao Banco de Olhos, de pessoas sem estrabismo/doenças neuromusculares). Por estudo imunohistoquímico em cortes transversais de MOI, as CS foram identificadas por técnica de dupla marcação para o PCNA e o c-met e pela marcação para o MyoD1, sendo os resultados expressos e porcentagem de núcleos marcados em relação ao número total de miofibras. Para a medida da área seccional e do perímetro das fibras, estudaram-se cortes transversais de fibras de MOI de 18 pacientes do GE e 7 do GC. Os GE e GC tiveram marcações medianas de, respecti-

vamente, 29,0 e 3,0% ($p < 0,0001$) para o MyoD1 e de 30,0 e 31,0% ($p < 0,05$) para a expressão simultânea de PCNA e c-met. O número de fibras avaliadas por paciente e as médias da área seccional e do perímetro foram, respectivamente, para o GE e GC, 305 (DP 91) e 280 (DP90) ($p > 0,05$), $734 \mu\text{m}^2$ (DP $256 \mu\text{m}^2$) e $697 \mu\text{m}^2$ (DP $172 \mu\text{m}^2$) ($p > 0,05$) e $98 \mu\text{m}$ (DP $16 \mu\text{m}$) e $98 \mu\text{m}$ (DP $12 \mu\text{m}$) ($p > 0,05$). A marcação aumentada das CS pelo MyoD1 no GE ($p < 0,0001$) em relação ao GC mostra que os MOI mantêm características de miofibras imaturas, com um padrão de marcação pelo MyoD1 semelhante ao encontrado em Medes neonatos. Suas CS possivelmente diferenciam-se numa taxa superior àquela encontrada nos MOI do GC, o que poderia estar relacionado com uma heterogeneidade na população de CS. Embora no GE não tenha sido encontrada hipertrofia (medida pela área seccional e perímetro) em relação ao GC, a hiperfunção dos MOI no GE pode estar relacionada com o aumento do número de CS ativadas, à semelhança do que ocorre com a hipertrofia da MOE experimentalmente induzida em coelhos e com a ME hipertrófica de atletas. A dupla marcação pelo PCNA e c-met não revelou diferenças significativas entre os grupos, sugerindo não haver correlação entre hiperfunção do MOI e proliferação das CS.

LIBERAÇÃO PROLONGADA DE DEXAMETASONA INTRAVÍTEA EM COELHOS ATRAVÉS DE UM SISTEMA BIODEGRADÁVEL

Marcelo Guimarães Brandão do Rêgo

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Jorge

Tese de Doutorado apresentada em 19/08/2005

O objetivo do estudo foi avaliar o perfil de liberação intravítrea de dexametasona a partir de um sistema biodegradável, em olhos de coelhos, além da ocorrência de possível toxicidade retiniana que pudesse ser causada pela presença da droga ou do polímero na cavidade vítrea.

Foram utilizados sessenta coelhos albinos machos no estudo. Os animais foram divididos em dois grupos. O grupo I era composto de 38 coelhos, que receberam implantes intravítreos no olho direito preparados com o co-polímero derivado dos ácidos lático e glicólico (PLGA) em proporções iguais (50:50) e contendo 1,0 mg de dexametasona. O grupo II (grupo controle) era formado por 22 animais nos quais foram colocados implantes também no olho direito contendo apenas o PLGA, sem a droga. Para o estudo de dosagem de dexametasona pelo método *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) foram empregados 48 coelhos, sendo escolhidos aleatoriamente 32 animais do grupo I e 16 do grupo II. Para o estudo de toxicidade, 12 coelhos foram utilizados, sendo escolhidos aleatoriamente seis de cada grupo. Vinte e quatro horas antes da cirurgia e na oitava semana, os 6 coelhos do grupo I foram submetidos

ao eletroretinograma. Após oito semanas, esses 12 animais foram sacrificados e tiveram os olhos direitos processados para análise histopatológica.

A concentração intravítrea de dexametasona observada nos olhos dos animais do grupo I apresentou média de 613,6 ng/ml na primeira semana de avaliação; nas semanas dois e três as médias foram de 308,6 ng/ml e 326,5 ng/ml, respectivamente. Na quarta semana a média encontrada foi de 856,1 ng/ml, e na quinta semana, 2172,3 ng/ml. Após seis semanas da cirurgia para a colocação do implante a média foi de 2589,3 ng/ml. Na sétima semana esse valor foi de 2660,3 ng/ml e na oitava, de 2559,2 ng/ml. Não foram observadas alterações morfológicas na retina dos animais de ambos os grupos ao exame através de microscopia de luz e eletrônica, assim como sinais de toxicidade retiniana no exame de eletroretinograma. Um coelho evoluiu com endoftalmite e outro com descolamento de retina, ambos do grupo I.

Os resultados mostraram que o implante biodegradável contendo dexametasona permitiu a liberação prolongada da droga para a cavidade vítrea em níveis terapêuticos, sem causar toxicidade. Estudos futuros poderão garantir sua aplicabilidade clínica, como uma importante alternativa para o tratamento de diversas doenças vítreo-retinianas.

INVESTIGAÇÃO DA FLORA OCULAR EM PACIENTES COM CERATITE INFECCIOSA NÃO VIRAL ATENDIDOS NO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DE RIBEIRÃO PRETO, BRASIL

Cristiane Santos Bernardes

Orientador: Prof. Dr. Sidney Júlio de Faria e Sousa
Dissertação de Mestrado apresentada em 03/10/2005

Objetivo: Comparar com a microbiota ocular de ambos os olhos na eventualidade de uma ceratite infecciosa unilateral não viral e identificar com que frequência as úlceras corneanas são causadas pela flora ocular.

Métodos: Foram incluídos os pacientes que procuraram atendimento oftalmológico no ambulatório do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, com ceratite infecciosa de etiologia bacteriana ou fúngica confirmada através de exame microbiológico, infecção corneana unilateral e não usuário de lente de contato. Os pacientes foram submetidos a exame oftalmológico completo e colheita de material da córnea infectada e da borda palpebral e conjuntival do olho sadio. Novas culturas de controle da borda palpebral e conjuntiva, de ambos os olhos, foram colhidas com intervalos de 1, 3 e 6 meses após término do tratamento tópico. Utilizou-se o teste estatístico de McNemar para análise das amostras.

Resultados: Foram incluídos 57 pacientes no estudo. Quanto aos agentes etiológicos das ceratites, 80,7% dos casos foram causados por bactérias e 19,30% por fungos. As culturas da borda palpebral e conjuntival foram analisadas nos meses 0, 1, 3 e 6 e não se encontrou diferença estatisticamente significativa entre os dois locais com rela-

ção aos germes isolados. Ao se comparar os resultados das culturas da borda palpebral inferior de ambos os olhos, nos meses 1, 3 e 6, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre elas, com relação aos germes isolados. Um mês após término do tratamento tópico evidenciou-se efeito residual do colírio sobre a flora conjuntival do olho tratado. Na borda palpebral este efeito não foi encontrado após o mesmo período. *Staphylococcus epidermidis* foi a bactéria mais frequente na borda palpebral dos pacientes seguida, em ordem decrescente, por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus veridians*. Fungos não foram isolados nas culturas da flora palpebral. Fungos não foram isolados nas culturas da flora palpebral. Em 22,80% dos casos foi isolado o mesmo germe na úlcera e na flora palpebral do olho adelfo e em 77,2% os resultados foram diferentes.

Conclusão: No olho normal as floras da borda palpebral e da conjuntiva tendem a ser idênticas num mesmo tempo de exame. Uma vez cessado o estímulo modificador da flora da superfície de um olho, ela tende a se igualar à flora do olho adelfo. Uma vez cessado o estímulo modificador da flora ocular, ela tende a se igualar à flora do olho adelfo, mais rapidamente na borda palpebral do que na conjuntiva. No presente trabalho, cerca de ¼ das úlceras foram presumivelmente causadas por microorganismos da própria flora ocular. Para um intervalo de confiança de 95%, a expectativa de ceratites infectadas causadas por microorganismos da flora varia de 13 a 36%.

MÉTODO DE AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE CORTE NA CONFEÇÃO DE LAMELA CORNEANA PEDICULADA POR MICRO CERÁTOMO EM LASER *IN SITU* CERATOMILEUSIS

Gustavo Victor de Paula Baptista

Orientador: Prof. Dr. Sidney Júlio de Faria e Sousa
Tese de Doutorado apresentada em 07/11/2005

Introdução: O *laser in situ keratomileusis* (LASIK) é atualmente a cirurgia refrativa mais realizada em todo mundo para correção de miopia baixa e moderada, astigmatismo e hipermetropia. O corte feito pelo microcerátomo na confecção da lamela corneana pediculada é relevante para o resultado visual e pode induzir as mais comuns e mais graves complicações do procedimento. A monitoração da qualidade de corte dos microcerátomos com o objetivo de se obter resultados melhores e mais seguros é imprescindível quando o procedimento e as tecnologias envolvidas mudam continuamente. Esta pesquisa propõe uma metodologia de avaliação *in vivo* de desempenho de microcerátomo-

mos, na confecção de lamelas corneanas pediculadas em LASIK.

Métodos: Realizou-se estudo clínico prospectivo na Eye Clinic Day Hospital, São Paulo (SP), entre maio e julho de 2004, com população composta por 35 pacientes (70 olhos) portadores de miopia com ou sem astigmatismo que se submeteram à cirurgia de LASIK. Para a avaliação da qualidade de corte dos microcerátomos foram constituídos dois grupos: grupo Hansatome (35 olhos) e grupo Masyk (35 olhos). Com o emprego de microscopia confocal, em cada grupo, foram avaliadas as seguintes variáveis: espessura do epitélio corneano, espessura total corneana, espessura efetiva da lamela pediculada corneana, espessura efetiva do estroma residual corneano, profundidade e densidade de partículas na interface lamela-estroma corneano, presença, orientação e maior diâmetro de micro-estrias na

interface lamela-estroma corneano, pico de refletividade e índice de opacificação corneana (IOC).

Resultados: 1) Não houve diferença entre os dois grupos em relação a: sexo ($p = 1,0$), idade ($p = 1,0$), poder dióptrico dos meridianos mais plano ($p = 0,81$) e mais curvo ($p = 0,98$), poder corneano médio ($p = 0,94$), poder corneano central ($p = 0,86$), espessura central da córnea ($p = 0,73$), componentes refrativos esfera ($p = 0,88$), cilindro ($p = 0,79$) e equivalente esférico ($p = 0,79$) e acuidade visual LogMAR com a melhor correção ($p = 0,72$); 2) Não houve diferença significativa entre os grupos no pós-operatório quanto à espessura do epitélio ($p = 0,72$), espessura da lamela pediculada ($p = 0,87$), espessura do estroma residual ($p = 0,68$), espessura total da córnea ($p = 0,80$), profundidade de partículas ($p = 0,61$), densidade de partículas ($p = 0,12$), presença, orientação ($p = 0,33$; $p = 0,53$; $p = 0,56$) e maior diâmetro de microestrias ($p = 1,0$), pico de refletividade ($p = 0,77$), índice de opacificação corneana ($p = 0,67$), ablação total ($p = 0,79$) e acuidade visual LogMAR com a melhor

correção ($p = 0,75$); 3) Não houve correlação nos dois grupos ($p = 0,14$ e $p = 0,93$) entre densidade de partículas e índice de opacificação corneana, espessura total do centro da córnea e espessura efetiva da lamela ($p = 0,09$ e $p = 0,78$) e entre a espessura efetiva da lamela e o poder corneano médio ($p = 0,44$ e $p = 0,26$); 4) Houve correlação ($p = 0,02$) no grupo Hansatome entre o equivalente esférico e a espessura efetiva média da lamela corneana. Não houve esta correlação ($p = 0,77$) no grupo Masyk; 5) No grupo Hansatome mais de 97% das lamelas corneanas apresentaram espessura menor que a programada, enquanto no grupo Masyk mais de 31% apresentaram espessura maior que a programada.

Conclusão: O modelo de avaliação *in vivo* da qualidade de corte de microcerátomos pela MC proposto e utilizado neste estudo mostrou-se ser uma ferramenta útil na avaliação do corte de microcerátomos e poderá ser utilizado em controles de qualidade de cirurgias refrativas e no desenvolvimento de novos métodos de *ceratomileusis*.

ESTUDO SOBRE A VARIAÇÃO DA PRESSÃO INTRA- OCULAR DURANTE CIRURGIAS OFTALMOLÓGICAS EM COELHOS E SEUS EFEITOS NA RETINA DE MACACOS

Eduardo Soares Maia Vieira de Souza

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes V. Rodrigues
Tese de Doutorado apresentada em 09/12/2005

Objetivos: Analisar a variação da pressão intra-ocular e da pressão de infusão durante as cirurgias de vitrectomia e facectomia (extracapsular, facofragmentação e facoemulsificação), em olhos de coelhos e determinar eventuais alterações na retina de macacos-prego submetidos a variações semelhantes da pressão intra-ocular.

Materiais e Métodos: Um polígrafo computadorizado registrou a pressão intra-ocular, através de uma cânula na câmara vítrea de coelhos submetidos a vitrectomia (25 olhos), facectomia extracapsular (14 olhos), facofragmentação (14 olhos) e facoemulsificação (14 olhos). A pressão de infusão foi medida somente durante os procedimentos de vitrectomia e facofragmentação. Em 4 olhos de 4 macacos-pregos provocou-se variações controladas da pressão intra-ocular, entre 0mmHg e 100mmHg, durante 40 minutos. Os olhos adelfos serviram de controle. Os animais foram sacrificados 22 dias depois e os olhos foram enucleados para posterior análise bioquímica do vítreo (quantificação de proteínas *totais* e aminoácidos excitatórios) e histológica da retina (contagem de células ganglionares e medida da espessura das camadas retinianas).

Resultados: Apesar de transitórios, foram constatados picos pressóricos acima de 100 mmHg, chegando a quase 200 mmHg. A facoemulsificação registrou a maior variação e, a facofragmentação, a menor. As pressões mínimas, em todas as cirurgias, foram muito próximas de 0 mmHg. As etapas que provocaram os maiores picos pressóricos foram a esclerotomia e a introdução das ponteiras, durante a vitrectomia, e a abertura da córnea, lavagem da câmara anterior, injeção de metilcelulose, hidrodissecção, ampliação da incisão e refazer a câmara anterior durante as facetomias. A pressão de infusão durante a vitrectomia e facofragmentação variou menos do que a pressão intra-ocular. A análise bioquímica do vítreo evidenciou um aumento significativo das proteínas totais nos olhos experimento em relação aos olhos controle. A análise histológica não encontrou qualquer alteração significativa.

Conclusões: Podem ocorrer grandes variações da pressão durante a realização das cirurgias intra-oculares de vitrectomia, facectomia extracapsular, facofragmentação e facoemulsificação, em coelhos. A pressão de infusão não mostrou uma boa correlação com a pressão intra-ocular. A análise bioquímica e histológica da retina de macacos-prego submetidos à variação da pressão intra-ocular, segundo o modelo proposto, não constatou lesão permanente, somente um processo inflamatório reversível.

ORTOPEDIA, TRAUMATOLOGIA E REABILITAÇÃO

AValiação DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO FENTANIL, CETAMINA E CLONIDINA POR VIA TRANSDÉRMICA NO CONTROLE DA DOR CRÔNICA NEUROPÁTICA

Márcio Matsumoto

Orientadora: Profa. Dra. Gabriela Rocha Lauretti
Dissertação de Mestrado apresentada em 08/08/2005

Introdução: As dores de origem lombar e cervical, classificadas como crônicas com componente neuropático, permanecem como uma das causas prevalentes e onerosas a qual atingem adultos jovens em idade produtiva, usualmente de forma recorrente. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia analgésica da administração por via transdérmica do fentanil, cetamina e clonidina, ou suas combinações, em pacientes portadores de dor crônica de origem neuropática.

Metodologia: 54 pacientes com história de dor crônica de origem cervical ou lombar com componente neuropático, em uso de antiinflamatórios não-esteroidais, porém não satisfeitos com o resultado e não responsivos aos tratamentos convencionais, foram de forma aleatória e duplamente-encoberta, alocados a um dos grupos do estudo prospectivo. Os grupos foram seis, com 9 pacientes em cada, denominados Grupos: Clonidina (Clo) (25 µg/g), Cetamina (Cet) (25 mg/24 horas), Fentanil (Fen) (25 µg/hora), Clonidina+Cetamina (Clo+Cet), Fentanil+Cetamina (Fen+Cet) e Fentanil+Clonidina (Fen+Clo). Valores da EAN

de dor e coletas sanguíneas para medidas da noradrenalina plasmática foram realizadas às: 0 hora, 3 horas e 6 horas após a aplicação transdérmica dos medicamentos.

Resultados: Todos os grupos avaliados apresentaram analgesia durante a sexta hora do estudo, mensurada clinicamente através da Escala Numérica de Dor (10 cm) ($p < 0,05$). Entretanto, apenas nos grupos que incluíram fentanil por via transdérmica foi correlacionado valores em declínio de noradrenalina plasmática a partir da sexta hora, quando era utilizado apenas o fentanil, e a partir da terceira hora quando foi associado clonidina ou cetamina ao fentanil ($p < 0,05$ e $p < 0,02$, respectivamente). O grupo que utilizou a combinação de clonidina e cetamina por via transdérmica não resultou em analgesia superior à administração isolada dos mesmos fármacos, sendo que as concentrações plasmáticas de noradrenalina mantiveram-se semelhantes durante o período de estudo neste grupo, e este mesmo grupo apresentou maior incidência de sedação ($p < 0,05$).

Conclusões: Foi demonstrada clinicamente e através da mensuração plasmática da noradrenalina, que em pacientes portadores de dor crônica não-neoplásica de origem lombar ou cervical, a combinação de fentanil com clonidina ou com cetamina transdérmica representam alternativas promissoras para o controle da dor crônica não responsiva aos tratamentos convencionais.

AValiação DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA MORFINA INTRATECAL ASSOCIADA A BAIXAS DOSES DE NEOSTIGMINA INTRATECAL NA DOR AGUDA PÓS- OPERATÓRIA

Raquel Alves de Almeida

Orientadora: Profa. Dra. Gabriela Rocha Lauretti
Tese de Doutorado apresentada em 12/08/2005

Este estudo foi proposto para determinar se a combinação de baixas doses de neostigmina intratecal (1 a 5µg) potencializaria a analgesia de uma dose fixa de morfina intratecal. Sessenta pacientes submetidas à cirurgia ginecológica foram distribuídas aleatoriamente em cinco grupos. As pacientes receberam 15 mg de bupivacaína mais 2ml de droga-teste intratecal (salina 100µg de morfina ou de

1 a 5µg de neostigmina). O grupo controle recebeu solução salina como droga-teste e o grupo morfina recebeu somente morfina. O grupo morfina + 1µg de neostigmina recebeu a dose fixa de morfina intratecal (100µg) mais 1µg de neostigmina. O seguinte grupo, morfina + 2,5µg de neostigmina, recebeu morfina espinal e 2,5µg de neostigmina. Finalmente, o grupo da morfina + 5µg recebeu morfina espinal e 5µg de neostigmina. Os grupos foram demograficamente similares. A requisição da primeira dose de analgésico, em minutos, foi maior em todas as pacientes que receberam morfina intratecal associadas às doses de neostigmina (média de 6 horas) comparadas ao grupo controle (média

de 3 horas) ($p < 0,02$). O grupo morfina ($p < 0,05$) e os grupos que receberam a combinação de morfina e neostigmina intratecais ($p < 0,005$) requisitaram menos analgésicos nas primeiras 24 horas pós-operatórias comparados ao grupo controle. A incidência de efeitos adversos foi similar entre os grupos ($p > 0,05$). Sendo assim, adição de baixas doses

de neostigmina espinal a 100 μ g de morfina intratecal duplicou o tempo do primeiro resgate analgésico na população estudada e diminuiu o consumo de analgésico nas primeiras 24 horas, sem aumentar a incidência de efeitos adversos. Os dados sugerem que baixas doses podem melhorar a analgesia da morfina intratecal.

FIXAÇÃO CERVICAL ANTERIOR C2-C3 COM PARAFUSOS: ESTUDO BIOMECÂNICO COMPARATIVO

Orli José Néri

Orientador: Prof. Dr. Helton Luiz Aparecido Defino
Dissertação de Mestrado apresentada em 13/09/2005

Foi realizado um estudo experimental com o objetivo de comparar a estabilidade biomecânica da fixação cervical anterior do segmento C2-C3 com parafusos e a fixação com placa cervical. Foram utilizadas 80 colunas cervicais de suínos, nas quais o segmento C2-C3 foi dissecado e preparado. Ambos os tipos de fixação foram avaliados biomecanicamente por meio de ensaios mecânicos de flexão, extensão, flexão lateral e torção, tendo sido formados oito grupos experimentais com 10 espécimes cada um. Os parâmetros utilizados para análise dos resultados foram a rigidez, a força necessária para uma deflexão (4,0mm) ou deslo-

camento angular (6,5mm) específicos e o momento de força do sistema formado pelo segmento C2-C3 e a fixação correspondente. Os resultados foram submetidos ao teste não-paramétrico de Mann-Whitney com nível de significância em cinco por cento. A fixação anterior do segmento C2-C3 com parafusos proporcionam estabilidade, é de fácil aplicabilidade, apresenta menor risco de lesão das estruturas adjacentes da coluna cervical superior, contornando as dificuldades do acesso. Não foi observada diferença significativa entre os tipos de fixação nos testes de flexão e torção. No entanto, nos ensaios de extensão foi observada maior estabilidade do sistema de fixação com parafusos, quando comparado com a fixação com placa cervical. Para flexão lateral, houve maior estabilidade do sistema de fixação com o parafuso, na análise da carga necessária para deflexão de 4,0mm e momento de flexão lateral.

ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA TRANSCUTÂNEA DO NERVO: ANALGESIA PREEMPTIVA EM COLECISTECTOMIA POR LAPAROTOMIA

Danilo Ribeiro Guerra

Orientador: Prof. Dr. Luís Vicente Garcia
Dissertação de Mestrado apresentada em 13/12/2005

Introdução. O uso da Estimulação Elétrica Transcutânea do Nervo (TENS) vem sendo muito pesquisado em pós-operatórios, todavia os estudos não analisam se a TENS de baixa frequência — que estimula a liberação de opióides endógenos — seria eficiente em promover analgesia preemptiva.

Objetivo. Analisar se essa modalidade de TENS, aplicada antes de colecistectomias por laparotomia, poderia proporcionar analgesia preemptiva.

Casuística e método. A pesquisa — clínica, controlada, randomizada e duplamente encoberta — foi realizada no Hospital São Domingos Sávio, e teve uma amostra de 50 pacientes, todas do sexo feminino: grupo preemptivo ($n = 25$) e placebo ($n = 25$). As pacientes do primeiro grupo foram submetidas à aplicação da TENS de baixa frequência antes

da cirurgia; e as do grupo placebo, a uma falsa estimulação. Houve a padronização do cloridrato de bupivacaína (0,5%) como droga anestésica, associado ao fentanil (2 ml) para a realização das colecistectomias; e da medicação analgésica utilizada no pós-operatório: dipirona, prescrita de 6 em 6 horas, e diclofenaco de sódio, como medicação de resgate. A intensidade de dor pós-operatória foi mensurada pela Escala Numérica de Mensuração da Dor (END), em 8 momentos (2½, 3½, 4½, 5½, 7, 8 e 16 horas após a indução do bloqueio anestésico, além de uma última verificação no momento da alta hospitalar), e pelo Questionário de Dor McGill (MPQ), aplicado 16 horas após a indução do bloqueio anestésico. Outrossim, o grau de satisfação das pacientes com o tratamento foi mensurado pela Escala de Satisfação do Paciente (ESP). Os dados foram analisados por meio de testes estatísticos descritivos, Teste de Mann-Whitney, Teste-t de Student para amostras não-pareadas e qui-quadrado, sendo o nível de significância de 95%.

Resultados. A intensidade de dor, mensurada pela END, foi significativamente menor no grupo preemptivo nas terceira e quarta coletas. Não houve diferença significativa quanto aos índices obtidos pelo MPQ, e nem quanto à satisfação das pacientes, o consumo de drogas analgésicas

no pós-operatório e o tempo para o primeiro requerimento de diclofenaco de sódio.

Conclusão. A TENS de baixa frequência proporcionou analgesia preemptiva após colecistectomia por laparotomia.

EFEITOS DA ELETROESTIMULAÇÃO NEUROMUSCULAR DURANTE A IMOBILIZAÇÃO NAS PROPRIEDADES MECÂNICAS DO MÚSCULO ESQUELÉTICO

João Paulo Chieregato Matheus

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Shimano

Dissertação de Mestrado apresentada em 14/12/2005

A estimulação elétrica neuromuscular (EENM) é um importante recurso utilizado na medicina esportiva para acelerar processos de recuperação. O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos da EENM durante a imobilização do músculo gastrocnêmio, em posições de alongamento (LP) e encurtamento (SP). Para tanto, 60 ratas fêmeas jovens Wistar foram distribuídas em seis grupos e acompanhadas durante 7 dias: controle (C), eletroestimuladas (EE), imobilizadas em encurtamento (ISP), imobilizadas em alongamento (ILP), imobilizadas em encurtamento e eletroestimuladas (ISP+EE) e imobilizadas em alongamento e eletroestimuladas (ILP+EE). Para a imobilização, o membro posterior direito foi envolvido por uma malha tubular e ataduras de algodão juntamente à atadura gessada. A EENM foi utilizada com uma frequência de 50 Hz, 10 minutos por dia, totalizando 20 contrações em cada sessão. Após 7 dias os animais foram submetidos à eutanásia e os músculos gas-

trocnêmios foram retirados para a realização do ensaio mecânico de tração em uma máquina universal de ensaios (EMIC®). A partir dos gráficos carga *versus* alongamento foram calculadas as seguintes propriedades mecânicas: alongamento no limite de proporcionalidade (ALP), carga no limite de proporcionalidade (CLP), alongamento no limite máximo (ALM), carga no limite máximo (CLM) e rigidez. As imobilizações SP e LP promoveram reduções significativas ($p < 0,05$) nas propriedades de ALP, CLP, ALM e CLM sendo mais acentuada, principalmente, no grupo ISP. Quando utilizada a EENM, houve acréscimo significativo ($p < 0,05$) destas propriedades somente no grupo ISP. Já, em relação à rigidez, foi observada redução significativa ($p < 0,05$) somente do grupo C para o grupo ISP. Quando utilizada a EENM, a rigidez do grupo ILP+EE foi significativamente ($p < 0,05$) maior e mais próxima do grupo C que a do grupo ISP+EE. Neste modelo experimental, a imobilização dos músculos em alongamento atrasou a queda das propriedades e a estimulação elétrica, contribuiu para a manutenção das propriedades mecânicas durante o período de imobilização, principalmente no grupo ILP+EE.

EFEITOS DO ULTRA-SOM PULSADO DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE A CICATRIZAÇÃO POR SEGUNDA INTENÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS TOTAIS EM RATOS, MEDIANTE AVALIAÇÃO POR PLANIMETRIA

Adriana da Silva Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Henrique Barbieri

Dissertação de Mestrado apresentada em 21/12/2005

Foram avaliados os efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a cicatrização de lesão cutânea produzida na região dorsal de ratos. Utilizamos 60 ratos machos (Wistar, peso médio de 300g) divididos em dois grupos de acordo com o tratamento, sendo: 1) irradiação simulada (controle); 2) irradiação efetiva (irradiado) Frequência fundamental de 1,5MHz, frequência de repetição de pulsos de 1KHz, largura de pulso de 200 μ s, intensidade de 30mW/cm² (SATA), 10 minutos de aplicação em dias alternados).

Cada grupo foi subdividido em três grupos, de acordo com o período de irradiação ultrasônica; 3, 7 e 14 dias, e a cicatrização foi avaliada através de análise planimétrica. Aumento significativo ($p < 0,05$) da área cicatrizada foi observado no Grupo 2 ($141,88 \pm 18,50$ mm²) em relação ao Grupo 1 ($117,38 \pm 15,14$ mm²), no 14º dia. Não foram observadas diferenças entre os grupos nos outros tempos experimentais estudados. Concluiu-se que o ultra-som pulsado de baixa intensidade não apresenta efeitos deletérios e estimula moderadamente a cicatrização cutânea por segunda intenção em condições experimentais, com potencial para aplicação clínica em humanos. Ainda, a planimetria, como método de acompanhamento da evolução da lesão cutânea, mostrou-se adequada e eficaz.

OTORRINOLARINGOLOGIA

AVALIAÇÃO AUDIOLÓGICA DE CRIANÇAS COM ANTECEDENTES DE OTITES MÉDIAS NOS DOIS PRIMEIROS ANOS DE VIDA POR MEIO DE POTENCIAIS EVOCADOS AUDITIVOS DE TRONCO CEREBRAL

Milton Malheiros da Silva

Orientador: Profa. Dra. Myriam Lima Isaac

Dissertação de Mestrado apresentada em 03/10/2005

Os Potenciais Evocados Auditivos do Tronco Cerebral (P.E.A.T.C.) foram registrados em um grupo estudo de doze crianças, com idade de quatro anos a seis anos e onze meses, história de otites médias de repetições no primeiro e segundo anos de vida e sem queixas auditivas, e em um grupo similar de treze crianças sem história de otites. As crianças tinham audição normal no momento desta avaliação. Os P.E.A.T.C. foram realizados após análise dos pron-

tuários médicos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (H.C.F.M.R.P. -USP), história clínica, otoscopia, imitanciométrica e audiometria. Foram analisadas as latências absolutas das ondas I, III e V e os intervalos interpicos destas respostas. O objetivo principal deste estudo foi comparar os P.E.A.T.C. destes dois grupos. Os resultados mostraram que o grupo com história de otites médias nos dois primeiros anos de vida apresentou significativo aumento da latência da onda I. Estes resultados indicam que a diferença entre os grupos deve-se a alterações mais caudais nas vias auditivas, possivelmente causadas pelas otites médias no período crítico do desenvolvimento.

PATOLOGIA

ALTERAÇÕES DE COR, BRILHO E SUPERFÍCIE DE RESINAS COMPOSTAS FOTOPOLIMERIZÁVEIS DENTAIS SUBMETIDAS A ALTAS TEMPERATURAS

Renata Bueno Brandão

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Cinira Santos Martin

Dissertação de Mestrado apresentada em 01/07/2005

Objetivos: O objetivo deste estudo foi investigar alterações de cor, brilho e superfície em resinas compostas dentais submetidas a altas temperaturas por diferentes tempos de exposição para avaliação da aplicabilidade em análises forenses.

Materiais e Método: Foram confeccionados espécimes (pastilhas) de dois tipos de resinas compostas (Z100® e Charisma®; n=8), que foram submetidos a um tratamento térmico em forno especial para fundição à 200°C, 400°C, 600°C e 1000°C por 15, 30 ou 45 minutos. As alterações de cor (ΔE^*) e brilho (ΔL^*) foram obtidas através de espectrofotômetro na escala de cor CIE $L^*a^*b^*$ pela comparação entre as amostras submetidas ao calor e o grupo controle sem alterações térmicas. Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey para grupos amostrais de mesmo tamanho ($p < 0.05$ e $p < 0.01$). Os

danos superficiais dos espécimes foram observados através de microscópio eletrônico de varredura (MEV).

Resultados: A resina Z100® apresentou maior alteração de cor e brilho após a exposição ao calor do que a CHARISMA®. Pelos resultados, observou-se um padrão bifásico de alteração de cor e brilho das resinas compostas após a exposição ao calor, inicialmente escurecendo e posteriormente clareando em relação a sua cor original. Os valores de ΔL^* mostraram-se como melhor parâmetro instrumental para a avaliação das alterações visuais observadas nas amostras de resina. Através da Microscopia Eletrônica de Varredura observou-se que a resina Z100 apresentou menores danos superficiais pela ação do calor do que a resina Charisma.

Conclusões: Os resultados indicam que as alterações de cor e brilho observadas em ambas resinas compostas, assim como as alterações superficiais são úteis como guia para análise odontoforense funcionando como indicadores confiáveis de temperatura e tempo de exposição de um corpo ao fogo.

CÉLULAS ESTRELADAS HEPÁTICAS NA FIBROSE ESQUISTOSSOMÓTICA HUMANA: UM ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO COMPARATIVO COM A CIRROSE HEPÁTICA

Daniel Chang

Orientadora: Profa. Dra. Leandra Náira Zambelli Ramalho
Dissertação de Mestrado apresentada em 15/08/2005

A infecção pelo *Schistosoma mansoni* pode acarretar fibrose hepática. As células mesenquimais hepáticas (CMH) estão envolvidas na fibrogênese hepática. O presente estudo teve por objetivo comparar as populações de CMH e suas atividades proliferativas na fibrose esquistossomótica (FE) e na cirrose hepática induzida pelo vírus C da hepatite (CH). As CMH foram avaliadas por dupla marcação imunoistoquímica para antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e proteína ácida fibrilar glial (GFAP), e para PCNA e alfa-actina de músculo liso (α -SMA) em biópsias hepáticas com FE (n=40), CH (n=20) e fígado normal (n=20). O número de CMH foi maior na esquistossomo-

se que no fígado normal, porém menor que na cirrose. Na cirrose, as células α -SMA predominaram em relação às GFAP-positivas. Houve maior prevalência de células GFAP em relação às α -SMA-positivas na esquistossomose. O índice de marcação pelo PCNA foi maior nas células α -SMA que nas GFAP-positivas, não havendo diferença entre FE e CH em relação à proporção de células α -SMA ou GFAP-positivas marcadas pelo PCNA. O GFAP tem sido considerado marcador de células estreladas hepáticas (CEH) na fibrose hepática humana. A predominância de células GFAP-positivas observada na esquistossomose sugere que as CEH possuem um papel fundamental na fibrogênese da esquistossomose humana. O menor número de CMH na FE em relação à CH deve estar associada à resposta inflamatória menos acentuada induzida pelos ovos do *S. mansoni* em comparação com o processo necroinflamatório de interface desencadeado pela hepatite viral C.

COLONIZAÇÃO HEPÁTICA PELAS CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS

Marissa Rabelo Tarlá

Orientadora: Profa. Dra. Leandra Naira Zambelli Ramalho
Dissertação de Mestrado apresentada em 17/08/2005

Durante a regeneração hepática, a massa tecidual perdida pode ser restituída, principalmente devido à proliferação hepatocitária. Todavia, as células ovais hepáticas podem assumir o papel regenerativo dos hepatócitos quando estes estão impedidos de proliferar. Recentemente, foi demonstrado que células tronco hematopoéticas, enxertadas em tecido hepático, podem contribuir como uma outra fonte de reserva nos processos de regeneração hepática. O objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade de colonização e transdiferenciação das células tronco hematopoéticas durante a regeneração hepática. Ratas fêmeas Wistar foram submetidas a tratamento com 2-acetilamino-fluorene e hepatectomia parcial, seguida por infusão portal de medula óssea oriunda de ratos isogênicos machos. Após

sete (n=7) e quatorze dias (n=9), os animais foram sacrificados e nas amostras hepáticas foi realizado o estudo por hibridização *in situ* cromatogênica (CISH) para a região sry do cromossomo Y (SRY), com dupla marcação imuno-histoquímica para CK19, CD34 e Thy-1. Em ambos os períodos foi possível identificar células marcadas pelo SRY, algumas já com morfologia de hepatócitos e colangiócitos. Numerosas células foram marcadas por CK19+; CD34+; Thy-1(-/+), possivelmente células ovais, porém sem expressão de SRY. Entretanto, parte da população de células CD34+ apresentava positividade para o SRY, mas não para CK19 e Thy-1 (CD34+, SRY+; CK19- e Thy-1-), provavelmente eram células de origem hematopoética. Assim, é possível que o fenômeno da transdiferenciação de células hematopoéticas em tecido hepático, não ocorra através das células ovais, sendo estes progenitores uma outra reserva de células capaz de colonizar o fígado e diferenciar-se diretamente em hepatócitos e colangiócitos.

EXPRESSÃO DE P63 EM ADENOMAS E ADENOCARCINOMAS COLORRETAIS

Fabiana Pirani Carneiro

Orientadora: Profa. Dra. Leandra Naira Zambelli Ramalho
Dissertação de Mestrado apresentada em 25/08/2005

O objetivo deste estudo foi determinar a relação da expressão de p63 com o desenvolvimento da neoplasia co-

lorretal. Imuno-histoquímica com o p53, p16 e p63 foi realizada em 30 adenomas e 30 adenocarcinomas colorretais com diferentes graus de diferenciação. Os casos p63-positivos foram submetidos a estudo de dupla marcação com citoqueratina 5 (CK5). A expressão de p53 e p16 foi observada em alguns adenomas assim como em adenocarcinomas mas não houve relação com o grau de diferenciação. A expres-

são de p63 foi encontrada principalmente em adenocarcinomas pouco diferenciados e nos adenomas vilosos. Os adenocarcinomas pouco diferenciados também exibiram co-expressão de p63 e CK5. Os dados deste estudo suportam achados prévios que sugerem possível papel do p63 na regulação da diferenciação e proliferação epitelial. E como

p63 e CK5 têm sido descritos como marcadores de células precursoras em várias neoplasias, principalmente de origem escamosa, é possível que a co-expressão destes marcadores observada no presente estudo possa estar relacionada com o fenômeno de diferenciação divergente durante o desenvolvimento do câncer colorretal.

QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA DO GENE E7 POR PCR EM TEMPO REAL EM AMOSTRAS CERVICAIS DE MULHERES INFECTADAS POR HPV

Jussara de Sousa Ribeiro Bettini

Orientador: Prof. Dr. Edson Garcia Soares

Tese de doutorado apresentada em 31/08/2005

O Papiloma vírus humano (HPV) é conhecido como agente etiológico do câncer de colo uterino. Há muitos anos sabe-se que o genoma do HPV persiste em tumores malignos. Porém, pouco se sabe sobre os determinantes de risco da infecção persistente do HPV. Estudos epidemiológicos tem indicado que quando uma mulher é persistentemente infectada por tipos oncogênicos de HPV, ela está mais susceptível para desenvolver câncer cervical, do que se estivesse sendo infectada transitoriamente. O gene E7 dos HPVs de alto grau oncogênico, principalmente HPV16 e o HPV18, atuam diretamente sobre os genes que regulam o crescimento celular, levando ao desenvolvimento de lesões intraepiteliais escamosas (SIL - Squamous intraepithelial Lesions), que podem evoluir para câncer cervical invasor.

A PCR em tempo real é um método de detecção molecular, que utiliza-se de *primers* e sondas fluorogênicas para determinar a presença ou ausência de uma seqüência específica de DNA ou RNA em amostras clínicas e industriais, usando termocicladores para amplificar essas seqüências de ácidos nucléicos e medir a concentração dos mesmos simultaneamente.

Foram coletadas sessenta amostras de esfregaço cérvico-vaginal, de mulheres infectadas pelo HPV, sem e com LSIL ou HSIL ou câncer cervical invasivo e 10 amostras de mulheres sadias, sem lesões de colo uterino. Nós observamos que nas amostras HPV16, a quantidade, em número de cópias do gene E7, é bastante superior às quantidades deste mesmo gene nas amostras infectadas pelo HPV18. Nessa análise também foram observadas diferenças significantes entre os grupos de amostras HPV18 sem lesões de colo uterino e HPV18 com LSIL ou HSIL ou câncer cervical invasivo, com relação ao número de cópias do gene E7 que é maior no grupo com lesões.

PLASMÓCITOS NA HEPATITE CRÔNICA PELO VÍRUS C: HÁ ASSOCIAÇÃO COM A GRAVIDADE DA DOENÇA?

Luciana Ximenes

Orientadora: Profa. Dra. Leandra Naira Zambelli Ramalho

Dissertação de Mestrado apresentada em 13/12/2005

A hepatite C é uma doença inflamatória crônica do fígado que frequentemente resulta em cirrose. O presente estudo objetivou determinar a relação entre plasmócitos (PC) e a gravidade da doença nos pacientes com hepatite C (HC), assim como a associação entre PC e células mesenquimais hepáticas (CMH) na determinação da fibrose hepática. Foram avaliadas oitenta biópsias hepáticas de pacientes com hepatite C crônica com diferentes graus de inflamação (atividade) e fibrose. Em todas as biópsias foram determinados: índice de atividade histológica (HAI), grau de fibrose e depósitos de ferro. A presença de auto-anticorpos e o genótipo viral também foram pesquisados. O número de PC e de CMH foram avaliados pelo método de imunohistoquímica para os marcadores plasma cell marker

e alfa actina de músculo liso (α -SMA), respectivamente. Apesar de um maior número de PC não ter sido observado em concordância com a atividade inflamatória, observou-se um importante aumento do número de plasmócitos nos casos de fibrose moderada e acentuada, o que não foi visto nos casos de fibrose leve. Nos pacientes com hepatite C crônica, houve um acentuado aumento de células estreladas hepáticas nos estádios mais avançados da doença, associado ao grau de fibrose. Este aumento foi associado a um maior número de plasmócitos. Porém, o aumento do grau de fibrose não esteve associado com as outras variáveis como depósitos de ferro, presença de auto-anticorpos ou a um específico genótipo viral. A presença de plasmócitos na hepatite C crônica é um achado freqüente e está associado à fibrose hepática.

Sugere-se assim que os PC podem estimular as CMH, as quais são responsáveis pela fibrogênese hepática, e assim contribuir na progressão para cirrose nos casos de hepatite crônica pelovírus C.

EFEITO DA EXPANSÃO RÁPIDA DA MAXILA SOBRE AS DIMENSÕES DA CAVIDADE NASAL, RESISTÊNCIA AÉREA NASAL E MORFOLOGIA FACIAL

Carla Enoki

Orientadora: Profa. Dra. Wilma T. Anselmo Lima
Tese de Doutorado apresentada em 14/12/05

A expansão rápida da maxila é um procedimento ortodôntico com o propósito de corrigir atresia da maxila, que é uma displasia esquelética transversal, podendo estar associada a problemas respiratórios. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da expansão rápida da maxila sobre a cavidade nasal através da rinometria acústica e rino-manometria computadorizada e determinar as alterações no padrão morfológico da face, no plano transversal, horizontal e vertical analisado por meio das radiografias cefalométricas frontal e lateral, após a expansão rápida da maxila. Foram selecionadas vinte e nove crianças com respiração bucal e ou mista, de ambos os gêneros, com idade variando

entre 07 e 10 anos, na fase da dentição mista, portadoras de mordida cruzada posterior, uni ou bilateral, envolvendo caninos e molares decíduos e primeiros molares permanentes, sem qualquer tipo de tratamento otorrinolaringológico ou ortodôntico. Os exames rinológicos e documentações ortodônticas foram realizados em três tempos: antes, imediatamente e após 90 dias a expansão. Os resultados mostraram que não houve diferenças na área de secção transversa ao nível da válvula e concha nasal inferior, entretanto, houve diferenças estatisticamente significantes na resistência nasal que diminuiu após a expansão. Com relação às medidas ortodônticas, houve diferenças em determinados tempos da pesquisa para a altura facial anterior (N-Me) e posterior (AFP), inclinação do plano mandibular, largura óssea nasal e maxilar, posição da maxila e inclinação de incisivos superiores.

DETERMINAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, IMUNOISTOQUÍMICA E GENÉTICA NA DIFERENCIAÇÃO ENTRE MOLA HIDATIFORME COMPLETA, MOLA HIDATIFORME PARCIAL E ABORTO HIDRÓPICO

Mariana Spigiorin Maggiori

Orientador: Prof. Dr. Luiz César Peres
Dissertação de Mestrado apresentada em 16/12/2005

Dentre as perdas gestacionais do primeiro trimestre encontram-se três condições distintas, quer seja do ponto de vista histo e patogênico, quer seja prognóstico, cujo diagnóstico diferencial é usualmente fácil, mas ocasionalmente podem causar muitas dificuldades. São elas as molas hidatiformes, parcial e completa, e o aborto hidrópico. As duas primeiras fazem parte da chamada Doença Trofoblástica Gestacional (DTG), enquanto a última é resultado da retenção placentária após a morte embrionária ou fetal. O objetivo do presente estudo foi identificar quais aspectos histopatológicos, imunoistoquímicos e genéticos, representado pela Hibridação *in situ* Cromossômica (CISH), são adequados para a distinção entre elas em casos de apresentação histológica duvidosa. Foram selecionados 10 casos de cada uma das três condições dos arquivos do HCFMRP-USP, submetidos à análise histológica em que se avaliou a presença ou ausência de hiperplasia trofoblástica, hipoplasia trofoblástica, pseudoinclusão trofoblástica, cisterna central e vasos sanguíneos intravilositários; a expressão

imunoistoquímica de Fator VIII e p57kip2; bem como a ploidia através do método de CISH em cortes histológicos. A hiperplasia trofoblástica foi comum nas molas, sendo difusa nas MHC e focal nas MHP e nos AH. A hipoplasia trofoblástica esteve presente nas três condições, da mesma forma que as pseudoinclusões trofoblásticas e as cisternas centrais, apesar de terem intensidades diferentes. Os vasos sanguíneos foram vistos somente na MHP e AH, confirmados pela IH para Fator VIII, porém não em todos os casos. Quanto à expressão de p57kip2, nenhum dos casos de MHC apresentou acima de 50% de positividade, o oposto da MHP e AH. Com o método CISH, identificou-se que dos 20 casos de MHC e AH, 19 foram diplóides e apenas um caso, diagnosticado previamente como MHC, apresentou uma constituição genética triplóide, sendo reclassificado como MHP. Dos 10 casos de MHP, 9 apresentaram um genótipo triplóide e um caso apresentou constituição diplóide que, associado aos achados morfológicos e imunoistoquímicos, foi reclassificado como AH. Nosso estudo demonstrou que nenhum critério histológico isolado foi suficiente para a distinção entre as três condições e que ambas expressões de p57kip2 e técnica de CISH foram essenciais na diferenciação entre as três condições, permitindo a reclassificação de dois casos.

SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

O EFEITO DO TRABALHO INFANTIL NA ESTATURA FINAL DE ADULTOS JOVENS E CARACTERÍSTICAS DE SUA ESCOLARIDADE - ESTUDO DA COORTE DE NASCIDOS VIVOS ENTRE 1978/79, NOS HOSPITAIS DE RIBEIRÃO PRETO, SP

Solange Aparecida Estevão Cortez

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Barbieri

Tese de Doutorado apresentada em 05/08/2005

Justificativa: Efeitos negativos a saúde da criança têm sido associados ao trabalho infantil. Entretanto, seus efeitos sobre o desenvolvimento humano ainda precisam ser melhor avaliados em razão do pequeno número de estudos existentes da deficiência de controle de fatores socioeconômicos.

Objetivo: avaliar o efeito do trabalho infantil na estatura final e algumas características da escolaridade de jovens entre 22-25 anos pertencentes à coorte de nascidos vivos de parto único hospitalar de Ribeirão Preto, SP - 1978/79.

Métodos: O presente estudo incluiu 2063 jovens, pertencentes a coorte inicial de 6827 nascidos vivos na cidade de Ribeirão Preto, Brasil (1978/79). Foram seguidos 30,2% dos homens e 33,5% das mulheres. O trabalho infantil foi classificado de acordo com a idade de início do primeiro trabalho: < 14, 14-16 e 17+ anos. Determinantes da altura foram considerados variáveis de confusão na análise, ao nascer (restrição do crescimento intra-uterino – RCIU; comprimento ao nascer, idade materna, escolaridade materna, hábito de fumar na gravidez e ocupação do chefe de família) e na vida adulta (cor/etnia, número de irmãos e atividade física). Para as mulheres, idade da menarca também foi considerada. Análise de regressão linear múltipla estratificada por sexo foi realizada após análise bivariada. As variáveis foram selecionadas para o modelo utilizando-se o procedimento passo a passo com seleção retrógrada das variáveis. Interações plausíveis foram testadas. Análise sequencial dos

fatores associados à altura final também foi realizada, separadamente por sexo.

Resultados: A altura média foi 176,0 cm (IC 95% 175,6–176,4) para homens e 162,7 cm (IC 95% 162,3 - 163,0) para mulheres. Trabalho antes dos 14 anos de idade foi observado em 20,4% dos homens e 12,4% das mulheres e trabalho entre 14 – 16 anos foi observado em 41,7 % dos homens e 36,7% das mulheres. Na análise bivariada o trabalho infantil foi associado à mais baixa estatura final tanto para homens ($p= 0.007$) quanto para mulheres ($p=0.004$). No entanto, esta associação não se manteve após o controle pelos fatores de confusão. A análise sequencial sugere que tanto para os meninos como para as meninas as variáveis sócio econômicas interferiram na associação do trabalho infantil e altura final. Ter trabalhado na infância resultou em pior resultado escolar comparados com quem não trabalhou na infância. Aqueles que iniciaram no trabalho antes dos 14 anos e que não estudavam no momento da pesquisa, 62,3% pararam seus estudos no ensino médio sendo que 30,2% pararam de estudar antes de completar 9 anos de estudo. Para quem iniciou o trabalho entre 14-17 anos, 66% chegaram ao ensino médio e 16,4% tem escolaridade acima de 12 anos.

Conclusão: Os resultados deste estudo não corroboram com a hipótese de associação independente entre trabalho infantil e altura final. Este resultado se explica pela ação dos confundidores sociais. Observou-se também que não ter trabalhado na infância propicia um melhor resultado escolar, sendo observado que 60,2 % dos que iniciaram atividade laborativa após 17 anos tem escolaridade alta (acima de 12 anos).

IMUNIZAÇÃO GESTACIONAL COM A VACINA PNEUMOCÓCICA POLISSACARÍDICA EM MULHERES INFECTADAS COM O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA. SEGURANÇA, IMUNOGENICIDADE, TRANSFERÊNCIA PLACENTÁRIA E CINÉTICA DE ANTICORPOS CONTRA O *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* ATÉ 6 MESES DE IDADE

Volia de Carvalho Almeida

Orientadora: Profa. Dra. Marisa Márcia Mussi Pinhata

Tese de Doutorado apresentada em 10/08/2005

Introdução: Vacina Pneumocócica Polissacarídica (VPP) tem sido usada em mulheres saudáveis resultando

em maiores níveis de anticorpos em recém-nascidos, permitindo níveis protetores de anticorpos até 2 meses de idade. Crianças nascidas de mães portadoras do vírus da imunodeficiência humana (HIV) podem ter risco aumentado de doença pneumocócica mesmo se não infectados com HIV, considerando-se que estas crianças não são amamentadas

e são freqüentemente expostas a pessoas colonizadas ou infectadas com pneumococo. Imunização durante a gestação com VPP, assim como a transferência de anticorpos contra o pneumococo, não foi estudada em mulheres infectadas pelo HIV.

Objetivos: Avaliar a segurança e imunogenicidade da VPP 23-valente em gestantes infectadas pelo HIV vacinadas durante o terceiro trimestre da gestação. Quantificar anticorpos pneumocócicos contra os sorotipos 1, 3, 5, 6B, 9V e 14, do nascimento até 6 meses de idade em crianças nascidas de mães infectadas pelo HIV, e verificar a proporção de crianças com níveis protetores em diferentes idades comparando aquelas cujas mães foram vacinadas com aquelas não vacinadas durante a gestação.

Métodos: Anticorpos anti-polissacarídicos capsulares (PCP) sorotipo específicos 1, 3, 5, 6B, 9V e 14 cujas concentrações foram aferidas por ELISA, foram analisados antes da vacinação com VPP e que ocorreu entre 32 e 34 semanas de gestação e no parto, em 44 gestantes infectadas pelo HIV. Todas possuíam contagens $CD4 \geq 200$ céls/mm³, 97,7% eram assintomáticas e 97,8% receberam profilaxia antiretroviral durante a gestação antes de serem imunizadas. Resposta adequada foi definida como concentração de anticorpos pós vacinais (PTV) ≥ 1.3 µg/ml ou $> 4x$ níveis pré-vacinais (PRV). As crianças foram seguidas prospectivamente a partir do nascimento (0, 1, 2, 3 e 6 meses de idade). Anticorpos IgG contra 6 sorotipos do pneumococo foram quantificados em 44 crianças de mães VPP+ e 40 de mães VPP-.

Resultados: Reações locais leves foram encontradas em 3/44 (6,8%) mulheres. Carga viral do HIV foi mais baixa após vacinação do que antes (2,96 vs. 1,59 log), po-

rém, contagens de CD4 não variaram. Em geral, anticorpos PRV $> 1,3$ µg/ml foram encontrados em 48 a 82% de 44 mulheres. Após vacinação, 36 (85,7%; 95% CI:67-91) responderam a pelo menos 4 de 6 PCP. Aumentos significantes da concentração de anticorpos PTV foram encontrados para todos os sorotipos, exceto o sorotipo 3. Em ambos os grupos VPP+ e VPP- houve uma queda progressiva de anticorpos até 6 meses de idade. Em recém nascidos, VPP+ foi maior que VPP- apenas para sorotipos 6B (2,2 vs. 1,2 µg/ml), 9V (1,2 vs. 0,8 µg/ml) e 14 (4,8 vs. 2,3 µg/ml). Com um mês, somente anticorpos contra sorotipo 14 mantiveram títulos mais elevados quando comparados VPP+ com VPP- (2,7 vs. 1,3 µg/ml). A partir dessa idade, as concentrações foram semelhantes para os dois grupos. A freqüência de crianças com níveis protetores contra os sorotipos estudados foram semelhantes em ambos os grupos (recém-nascidos=37-70%; 1m=29-57%; 2m=7-53%; 3m=9-37%; e 6m=9-23%). Com exceção dos S6 e S14, limites inferiores aos protetores foram estimados a partir de 1 mês em 4 de 6 sorotipos, independentemente do grupo a que pertenciam.

Conclusões: A vacina 23-valente é segura em gestantes infectadas pelo HIV. Polissacarídeos capsulares 1, 5, 6B, 9V e 14 foram imunogênicos enquanto o PCP 3 não. Diferentemente de crianças nascidas de mulheres saudáveis vacinadas durante a gestação, crianças nascidas de mães infectadas pelo HIV vacinadas durante a gestação não possuem níveis protetores de anticorpos após 1 mês de idade contra a maioria dos sorotipos estudados, exceto S14. Para avaliar se crianças expostas ao HIV irão se beneficiar pelo aumento dos níveis de anticorpos maternos, mais estudos serão necessários.

AVALIAÇÃO DA DEFICIÊNCIA DE VITAMINA A EM CRIANÇAS ATENDIDAS EM UMA UNIDADE DE SAÚDE

Viviane Imaculada do Carmo Custódio

Orientador: Prof.Dr. Julio César Daneluzzi

Dissertação de Mestrado apresentada em 15/09/2005

A vitamina A é uma substância lipossolúvel obtida através da dieta e sua deficiência é um sério problema de saúde pública em diversas regiões do globo, inclusive no Brasil, gerando aumento da morbimortalidade infantil, principalmente devido a infecções do trato respiratório e digestório em populações de risco (desnutridos, baixas taxas de aleitamento materno, baixo nível sócio-econômico etc). No Centro Médico Social Comunitário de Vila Lobato, vinculado à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, nos últimos anos foram verificados altos índices de deficiência de vitamina A em lactentes e pré-escolares previamente hígidos. De forma a prosseguir a verificação da situação dessa vitamina em crianças entre 5,5 anos e 11 anos atendidas nessa unidade, foi pesquisada a presença de xeroftalmia e realizado o teste conhecido por

RDR (relative dose response), sendo o mesmo capaz de detectar a deficiência de vitamina A ainda em níveis subclínicos. No momento da entrada da criança no estudo foram avaliadas as seguintes variáveis e sua relação com a DVA: peso e estatura, exame parasitológico de fezes, valores de hemoglobina, ferro sérico, capacidade latente de fixação do ferro, saturação da transferrina, proteína C-reativa, $\alpha 1$ -glicoproteína ácida e zinco sérico. Foram realizadas entrevistas com os responsáveis diretos das crianças a fim de se obterem informações sobre a presença de doenças diarreicas e/ou febris, participação em estudo anterior de dosagem de vitamina A, grau de escolaridade dos pais, renda per capita da família e número de pessoas residentes no domicílio. Não foram encontrados sujeitos com xeroftalmia, 20,4% das crianças apresentaram DVA subclínica e nenhuma das variáveis analisadas foi considerada como fator de risco relacionado à DVA, tal resultado demonstra ser esse distúrbio também um problema de saúde pública nessa população.

TESTE DE ESTÍMULO COM ACTH POR MEIO DA DOSAGEM DO CORTISOL SALIVAR EM RECÉM-NASCIDOS PRÉ-TERMO NA PRIMEIRA SEMANA DE VIDA

Cristina Calixto

Orientador: Prof. Dr. Francisco Eulógio Martinez

Tese de Doutorado apresentada em 28/09/2005

Existem muitos pontos a serem esclarecidos quanto ao perfil do cortisol salivar em recém-nascidos pré-termo. Não se encontra na literatura, por exemplo, o padrão da resposta do cortisol salivar após estímulo com ACTH.

O objetivo do presente estudo foi estabelecer o tempo de resposta ao teste com ACTH por meio da dosagem seriada do cortisol salivar em recém-nascidos pré-termo na primeira semana de vida. Como objetivos secundários procurou-se definir a variação da concentração salivar do cortisol a ser considerada como indicativo de resposta ao estímulo com ACTH e analisar as características dos recém-nascidos que respondem ou não ao estímulo com ACTH seguindo o critério de definição de resposta.

Foram estudados 49 recém-nascidos, com idade ges-

tacional entre 25 e 34 semanas, idade pós-natal entre 3 e 7 dias de vida e clinicamente estáveis. Cada recém-nascido pré-termo foi submetido aos dois testes, aleatoriamente com ACTH (3,5 µg/kg) e soro fisiológico, com intervalo de 24 horas entre um teste e outro. A saliva foi coletada basal e 30, 60, 90 e 120 minutos após o estímulo com ACTH ou SF para a dosagem do cortisol.

Enquanto as concentrações salivares do cortisol permaneceram sem diferença estatisticamente significativa no teste controle, elas aumentaram progressivamente após o estímulo com ACTH. A partir de 30 minutos a diferença entre os grupos já atingiu significância estatística, mas a diferença foi mais significativa com 120 minutos. Tomando-se como definição de resposta ao ACTH aumento de 175 % da concentração basal com 120 minutos encontrou-se sensibilidade de 81% e especificidade de 91 %. Os recém-nascidos com concentrações mais altas de cortisol salivar e com quadro clínico mais grave seriam os com maior possibilidade de não responderem ao estímulo com ACTH.

ESTUDO DO GENE DO RECEPTOR DO MINERALOCORTICÓIDE EM FAMÍLIAS BRASILEIRAS COM A FORMA RENAL DO PSEUDOHIPOALDOSTERONISMO TIPO 1

Fábio Luiz Fernandes Rosa

Orientador: Prof. Dr. Sonir Roberto Rauber Antonini

Dissertação de Mestrado apresentada em 12/12/2005

A forma renal do pseudohipoadosteronismo tipo 1 (PHA1) é uma doença genética rara, transmitida por padrão de herança autossômico dominante ou esporádico, caracterizada por perda urinária de sal no período neonatal, vômitos, desidratação e baixo ganho ppondero-estatural. Os pacientes afetados apresentam hiponatremia, hipercalemia, aumento da atividade de renina plasmática e concentrações muito elevadas de aldosterona plasmática, secundários a uma resistência renal à aldosterona. Mutações inativadoras do gene do receptor do mineralocorticóide (MR) estão associadas à forma renal do PHA1 em várias famílias afetadas cujo padrão de herança é autossômico dominante bem como em casos esporádicos. No presente trabalho estudamos o gene do MR em duas famílias brasileiras com indivíduos afetados por PHA1. Encontramos duas mutações em heterozigose no gene do MR, uma mutação *nonsense* (R947X) em três gerações de uma família e uma nova muta-

ção *missense* (L848P) em dois indivíduos da segunda família. As duas mutações encontradas nas famílias brasileiras com PHA1 estão localizadas na região do gene do MR que codifica o domínio de ligação ao hormônio (LBD). RIEPE *et al.* (2004) descreveram previamente a mutação R947X, em heterozigose, no gene do MR em dois indivíduos de uma família turca com a forma renal do PHA1. A mutação L848P não havia sido descrita previamente e é a única alteração descrita no éxon 7 do gene do MR até o momento. Na análise de toda a região codificadora e regiões de transição íntron-éxon do gene do MR encontramos dois polimorfismos. O polimorfismo I180V foi encontrado em heterozigose nos indivíduos carreadores da mutação R947X, mas não nos indivíduos não-carreadores, sugerindo segregação comum. O polimorfismo A241V foi encontrado em homozigose em todos os indivíduos analisados nessa família, carreadores ou não da mutação. Nas duas famílias estudadas houve uma variação de apresentação fenotípica, seja em relação à apresentação clínica ou em relação à concentração de aldosterona. Os polimorfismos no gene do MR não estão associados a esta variação fenotípica nos indivíduos estudados.

SAÚDE NA COMUNIDADE

RISCO DE DESNUTRIÇÃO EM IDOSOS NA COMUNIDADE

Larissa Joana Exposto de Carvalho Matos

Orientadora: Profa. Dra. Amábele Rodrigues Xavier Manço
Dissertação de Mestrado apresentada em 12/08/2005

O trabalho estudou o estado nutricional de uma amostra aleatória ($n = 98$) de idosos vivendo na zona urbana do Distrito Bonfim Paulista e procurou identificar alguns fatores relacionados ao risco de desnutrição. Os idosos selecionados foram avaliados quanto ao estado nutricional através da “Mini Avaliação Nutricional” (MAN) e através do recordatório alimentar de 24 horas. Também foi elaborado um questionário domiciliar específico contendo questões relacionadas à escolaridade, renda do idoso e da família, perfil multidimensional, impressão subjetiva de saúde e de qualidade de vida, atividade de trabalho, moradia, doenças crônicas, atividade de vida diária e participação social. Procuramos, desta forma, identificar a prevalência de desnutrição e risco de desnutrição na comunidade e identificar fatores associados com a menor pontuação na MAN, ou seja, fatores que possam contribuir para um pior prognóstico nutricional. Participaram do trabalho 98 voluntários sendo 30 (30,6%) idosos do sexo masculino e 68 (69,4%) do sexo feminino. Detectamos a prevalência de 11,2% de idosos desnutridos, 37,7% de idosos sob risco de desnutrição e 51,1% de bem nutridos de acordo com MAN. Após avaliação da normalidade, usamos testes não paramétricos (*Kruskall-Wallis*) quando estes três grupos foram comparados em relação às diferentes variáveis estudadas como idade, IMC, consumo energético, gasto energético e variáveis neuropsiquiátricas. Observamos que a

MAN é um método viável e de fácil aplicabilidade em idosos vivendo em comunidades brasileiras e que nossos resultados foram semelhantes à maioria dos estudos que usaram a MAN como instrumento de investigação da prevalência de “risco de desnutrição” na comunidade. Paralelamente, acreditamos que a variável IMC não é um bom parâmetro para caracterização de desnutrição e que o estado de saúde mental do idoso contribui fortemente para o seu estado nutricional. Em relação ao consumo energético podemos dizer que, continua sendo uma das principais causas de desnutrição na terceira idade e pode estar presente mesmo entre os idosos caracterizados como nutridos. Para avaliação de associações de determinados fatores, discriminados no questionário geral, com o estado nutricional, montamos tabelas 2X2 e usamos o teste exato de Fisher. Procuramos observar associações entre algumas variáveis com dois grupos: o primeiro que tinha escore inferior a 23,5 e outro que possuía escore superior a 24 na MAN acreditando que estes valores definem, respectivamente, um pior e melhor estado nutricional. Desta forma foi possível observar que fatores como o analfabetismo, baixa renda familiar, falta de participação social e em atividades de trabalho possuem forte correlação com escores inferiores na Mini Avaliação Nutricional apesar de não fazerem parte do seu conteúdo. A auto avaliação do estado de saúde ou impressão subjetiva de saúde possui forte correlação com a maior ou menor pontuação na MAN. Finalmente, apesar de não ter havido correlação estatística, acreditamos que haja uma tendência à maior prevalência de desnutrição em faixas etárias mais elevadas.

SAÚDE MENTAL

SEGUIMENTO DE CRIANÇAS ATENDIDAS EM UM PROGRAMA DE SUPORTE PSICOPEDAGÓGICO NA ESCOLA: AUTOCONCEITO E COMPORTAMENTO

Cynthia Barroso Okano

Orientadora: Profa. Dra. Sonia Regina Loureiro
Tese de Doutorado apresentada em 08/07/ 2005

As dificuldades escolares têm sido reconhecidas como condições de vulnerabilidade para o desenvolvi-

mento das crianças em idade escolar, requerendo medidas que atuem com mecanismos de proteção, incluindo-se com tal o suporte psicopedagógico. Objetiva-se identificar indicadores de proteção associados a um programa de suporte psicopedagógico oferecido na escola à crianças com dificuldades escolares. Para tal desenvolveu-se um estudo de

seguimento prospectivo, de comparação de grupos considerando-se as variáveis pessoais das crianças relativas à maturidade, ao comportamento e ao autoconceito, em dois momentos de avaliação. O primeiro momento, nos anos iniciais de escolarização fundamental, quando do atendimento em um programa de suporte psicopedagógico na escola, e o segundo momento, após aproximadamente dois a três anos dessa primeira avaliação. Foram estudadas 48 crianças de ambos os sexos, com nível intelectual pelo menos médio (Raven), alunas do ensino fundamental, distribuídas em três grupos. O Grupo 1 (G1) foi composto por 16 crianças que apresentaram dificuldades escolares e receberam suporte psicopedagógico na escola, quando freqüentavam a 1ª ou 2ª série; o Grupo 2 (G2) foi composto por 16 crianças que apresentaram dificuldades escolares e não receberam qualquer suporte psicopedagógico, quando freqüentavam a 1ª ou 2ª série do ensino regular; e o Grupo 3 (G3) foi composto por 16 crianças, que não apresentaram dificuldades escolares quando freqüentavam a 1ª ou 2ª série do ensino fundamental. Nos dois momentos, as crianças foram avaliadas por meio do teste Desenho da Figura Humana –

DFH e da Escala Piers-Harris de Autoconceito e aplicou-se com as mães a Escala Comportamental Infantil A2 de Rutter, e um questionário com informações gerais. Os dados foram codificados, quantificados conforme as recomendações técnicas, e tratados por procedimentos estatísticos, comparando-se o perfil dos grupos nos dois momentos ($p < 0,05$). O grupo que freqüentou o suporte psicopedagógico (G1) apresentou, no segundo momento, melhoras significativas quanto ao comportamento e ao autoconceito, inclusive na área status intelectual, ainda que permanecendo com indicadores de imaturidade. O G2 que freqüentou somente o ensino regular permaneceu com as dificuldades comportamentais e não melhorou o autoconceito status intelectual. O G3, sem dificuldades escolares, permaneceu com indicadores mais positivos quanto a maturidade e o autoconceito, sugerindo que o bom rendimento no início da escolarização foi um bom preditor de um desenvolvimento favorável. Considera-se que o suporte psicopedagógico, oferecido na escola, foi benéfico para as crianças com dificuldades escolares no que diz respeito ao rendimento acadêmico e a socialização.

ESPECTROSCOPIA DE PRÓTON POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA EM PACIENTES ESQUIZOFRÊNICOS: CORRELAÇÕES COM RESPONSIVIDADE ELETRODÉRMICA E DÉFICITS NA ATENÇÃO SELETIVA

Rafael Faria Sanches

Orientador Prof. Dr. Antonio Waldo Zuardi

Tese de Doutorado apresentada em 29/07/2005

O diagnóstico atual da esquizofrenia, baseado em agrupamentos de sintomas, pode justificar muitos resultados contraditórios encontrados nas pesquisas com pacientes esquizofrênicos. Uma das formas de diminuir esta dificuldade seria a seleção de amostras mais homogêneas de pacientes com esquizofrenia. A atividade eletrodérmica tem sido considerada como uma variável eletrofisiológica capaz de identificar subgrupos de esquizofrênicos. O presente trabalho tem como objetivo verificar se subgrupos de pacientes com esquizofrenia, com diferentes características quanto à condutância da pele, apresentam diferenças nas razões de N-acetilaspártato/creatina+colina (NAA/Cre+Cho) na região dorsolateral pré-frontal, cíngulo e lobo parietal. Participaram do estudo 37 pacientes, emparelhados com voluntários saudáveis em relação ao sexo, idade, nível sócio-econômico pessoal e dos pais, escolaridade e dominância manual. Todos os pacientes estavam em uso de antipsicóticos e tiveram seu diagnóstico de esquizofrenia confirmado por meio da Entrevista Clínica Estruturada para o DSM-IV (SCID). Os sujeitos foram avaliados individualmente, por meio de entrevista clínica e dos seguintes instrumentos: Escala de Avaliação Psiquiátrica Breve (BPRS), Subescala Negativa

da Escala de Avaliação de Sintomas Positivos e Negativos da Esquizofrenia (PANSS), Inventário de Dominância de Edimburgo e Stroop Color Word Test (SCWT). Os participantes foram também submetidos a medidas de condutância eletrodérmica e avaliações por espectroscopia de próton por ressonância magnética. Comparados aos controles, os esquizofrênicos apresentaram valores significativamente menores nas razões de NAA/Cre+Cho na região dorsolateral pré-frontal direita e cíngulo bilateralmente. Confirmando dados anteriores, o grupo de esquizofrênicos eletrodermicamente não responsivos apresentou significativamente mais erros no SCWT. Entretanto, os dois subgrupos de esquizofrênicos, divididos segundo a responsividade eletrodérmica, não diferiram entre si na concentração de NAA, nas áreas estudadas. A variável “nível basal de condutância” identificou claramente dois subgrupos de pacientes esquizofrênicos, um com nível comparável aos controles normais e outro com baixo nível de condutância. Este subgrupo de esquizofrênicos, com baixo nível de condutância eletrodérmica, apresentou diminuição dos níveis de NAA/Cre+Cho no cíngulo esquerdo, que foi estatisticamente significante em comparação aos controles normais e ao outro subgrupo de pacientes esquizofrênicos. Estes resultados sugerem a existência de um subgrupo de esquizofrênicos caracterizado pelos baixos níveis de condutância da pele e que apresentam uma redução significativa de NAA no cíngulo esquerdo.

PROBLEMAS EMOCIONAIS E DE COMPORTAMENTO EM CRIANÇAS DE 6 A 12 ANOS CADASTRADAS EM UM NÚCLEO DE ATENÇÃO PRIMÁRIA E SAÚDE DA FAMÍLIA

Ludmila Palucci Puntel

Orientadora: Prof^a Dr^a. Edna Maria Marturano

Dissertação de Mestrado apresentada em 16/09/2005

A literatura evidencia associações entre problemas de comportamento, dificuldades de aprendizagem e a presença de eventos de vida adversos como condições de risco para distúrbios psiquiátricos em crianças e adolescentes. E as crianças na fase escolar, por sua vez, representam a maior parte da demanda por atendimento psicológico na rede pública de saúde e nas clínicas-escola de Psicologia. Nesse sentido, faz-se necessária a obtenção de informações mais precisas sobre as condições de risco ao desenvolvimento psicossocial, a fim de promover a melhor estruturação dos serviços e implantação de estratégias preventivas na área da saúde mental infantil. Esse interesse converge com os objetivos do Programa de Saúde da Família, que enfatiza ações de proteção e promoção à saúde de cada membro da família, identificando as condições de risco para a saúde do indivíduo. Este trabalho tem como objetivo identificar crianças em risco para transtornos emocionais / comportamentais na clientela de um Núcleo de Atenção Primária do Programa de Atenção Primária e Saúde da Família. Como objetivos subsidiários, buscou-se identificar crianças com sintomas emocionais e de comportamento em nível acima da faixa considerada normal, descrever o perfil das dificuldades comportamentais e investigar associações entre indicadores de problemas emocionais / comportamentais, desempenho escolar e adversidade ambiental. As famílias foram convidadas a participar da pesquisa pelo agente comunitário de saúde. Cem crianças (48 meninos e 52 meninas) de 6 a 12 anos foram avaliadas. A avaliação foi realizada com a mãe ou responsável. A identificação foi feita empregando-se dois instrumentos, um de rastreamento, o Questionário de Capacidades e Dificuldades da Criança – SDQ, e um de diagnóstico de problemas emocionais e de comportamento, o Inventário de Comportamentos da Infância e da Adolescência de Achenbach – CBCL. Foi empregado também um teste de nível intelectual – o Teste de Matrizes Progressivas Coloridas de Raven, bem como o Teste de Desempenho Escolar. Através dos resultados apresentados no teste de desempenho escolar, verificou-se que, das crianças que frequenta-

vam escola, 65% apresentavam desempenho compatível ao da série cursada. Quanto ao nível intelectual, resultado compatível com deficiência mental foi encontrado em 2% da amostra total. Os problemas de comportamento mais frequentes segundo o SDQ foram sintomas emocionais, hiperatividade e problemas de conduta. No CBCL, os problemas mais frequentes foram ansiedade/depressão, problemas de atenção e retraimento. Com relação à comorbidade de problemas internalizantes e externalizantes no CBCL, os dados mostraram essa associação em 17% da amostra. A correlação entre o SDQ e o CBCL foi de 0,81 para os escores brutos totais e 0,60 para a classificação clínica, indicando menor concordância nos resultados que remetem a normas. Segundo o SDQ, 19% das crianças apresentavam problemas de comportamento em nível clínico, ao passo que o CBCL classificou como clínicos 38% dos casos. Houve concordância entre os instrumentos na classificação clínica de 16 crianças. Esse grupo de crianças que apresentaram classificação clínica tanto no CBCL como no SDQ foi comparado com o grupo de crianças classificadas como normais em ambos os instrumentos, em relação a variáveis demográficas, pessoais e ambientais. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos para gênero, idade, escolaridade das mães, composição familiar e nível sócio-econômico. O grupo clínico apresentou desempenho mais pobre no teste de desempenho escolar e mais eventos de vida adversos. Os participantes do grupo clínico apresentaram mais situações adversas nos contextos familiar e escolar, assinaladas por problemas financeiros, problemas no relacionamento do casal parental, mudança de escola, suspensão e troca de professora. O estudo fornece indícios para a identificação precoce dos indivíduos em situação de vulnerabilidade, essencial no atendimento primário à saúde mental da criança. Os resultados poderão facilitar a atuação da equipe do Programa de Saúde da Família frente à população estudada, contribuindo com informações sobre o perfil psicossocial e as condições ambientais que apresentam risco ao desenvolvimento da criança na faixa etária de 6 a 12 anos. Com base nessas informações, as equipes do PSF podem ser instrumentalizadas para identificar casos em risco e promover condutas e encaminhamentos no sentido de reduzir o risco de desadaptação psicossocial na adolescência.

ADAPTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE CONSTRUTO DE UM QUESTIONÁRIO DE LEVANTAMENTO DO COMPORTAMENTO DE DEFESA EM SERES HUMANOS

Rosana Shuhama

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Marta Del Ben

Dissertação de Mestrado apresentada em 16/09/2005

Da teoria darwiniana da evolução por seleção natural, cumulativa, deriva a hipótese de um passado filogenético comum às espécies e um conseqüente compartilhamento

de estratégias defensivas entre mamíferos humanos e não-humanos. Sobre o tema, destacam-se os trabalhos de pesquisadores da Universidade do Havaí, que têm investigado como as topografias desses comportamentos de defesa se relacionam com características específicas do contexto de ameaça. Para estudar as estratégias de defesa em humanos, este grupo construiu um questionário que tem por base cenários que descrevem ameaças co-específicas. O objetivo do presente estudo foi traduzir e adaptar este instrumento, o *Defensive Behavior: a survey of normal responses to threats*, visando estudar a sua validade de construto a partir de aplicação em amostra de universitários da cidade de Ribeirão Preto, São Paulo. O enfoque transcultural do estudo justifica-se pelo reconhecimento da possível influência de atitudes culturalmente adquiridas sobre a experiência emocional. Como resultado, elaborou-se uma versão em português do questionário, denominada *Questionário de Avaliação do Comportamento Defensivo em Seres Humanos (QCD)*. Na análise dos dados de 248 alunos de Medicina, de ambos os gêneros, aos quais o QCD foi aplicado, foram observadas semelhanças com o original havaiano. Os cenários do QCD que ocuparam os extremos das cinco dimensões influentes da resposta de defesa corresponderam, em sua maioria, aos que ocuparam estes postos no *Defensive Behavior*. As mulheres e homens da amostra brasileira avaliaram as dimensões diferentemente em alguns cenários do QCD. A avaliação sistemática das ameaças do *Defensive Behavior* como mais intensas pelas mulheres havaianas, comparativamente aos homens, não foi encontrada neste

estudo. Quando as respostas mais freqüentemente escolhidas pelas mulheres brasileiras e havaianas foram comparadas, houve concordância em nove dos 12 cenários. Esta concordância foi de oito em 12 cenários na comparação entre os homens. Quando se considerou as estratégias de defesa preferenciais comparadas entre os gêneros, observou-se que os homens escolheram, quando houve diferença, respostas que sugerem menor defensividade ou maior agressividade do que as mulheres. Esta diferença pode refletir o dimorfismo da espécie, com os homens geralmente mais fortes. E ainda pode refletir prescrições culturais. Se for verdadeira a hipótese de que as estratégias sejam níveis de defesa da menos urgente – investigar, à mais urgente e dramática – atacar defensivamente, como parece ser o caso, as respostas de ameaça vocal e de ameaça de ataque devem ser consideradas como legítimos elementos deste escalonamento defensivo e não apenas respostas inclusas no questionário por terem probabilidade alta de ocorrência entre humanos. A resposta de procurar algo para ser usado como arma pode não ter uma correspondência topográfica em roedores, mas é observada em primatas. O mesmo pode ser dito quanto à resposta vocal de pedir desculpas, que é uma forma humana para a estratégia de reconciliação. As semelhanças observadas entre os estudos e a concordância dos achados com o predito na literatura sobre animais não-humanos sugerem que a adaptação do questionário foi adequada e que este instrumento é válido, realmente investigando as estratégias defensivas e a sua relação com características das situações de ameaça.

ESTUDO DOS EFEITOS DO CANABIDIOL EM SINTOMAS PSICÓTICOS INDUZIDOS POR DOSES SUBANESTÉSICAS DE (S-) KETAMINA

Daniel Carneiro da Cunha Bosi

Orientador: Prof. Dr. Antonio Waldo Zuardi

Dissertação de Mestrado apresentada em 25/11/ 2005

Estudos prévios sugerem que um dos componentes da Cannabis sativa, o canabidiol (CBD), poderia ter efeito antipsicótico. Este possível efeito antipsicótico do CBD pode estar relacionado a uma interação com o sistema glutamatérgico, uma vez que o CBD reduz a neurotoxicidade induzida pelo glutamato. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do CBD no modelo de psicose induzida em voluntários sadios pela ketamina, um antagonista dos receptores glutamatérgicos.

Participaram do estudo 10 voluntários do sexo masculino, com idades entre 18 e 40 anos, sem antecedentes de patologia psiquiátrica, o que foi verificado pela aplicação de entrevista diagnóstica estruturada para população de não-pacientes (SCID-NP). Cada um foi submetido a duas ses-

sões: uma em que recebeu placebo e outra CBD (600mg), em ordem aleatória, de maneira duplo-cega. Em seguida foi administrado ketamina (0,26 mg/kg, em bolus, e 0,25mg/kg nos próximos 30 minutos.

Os efeitos psicopatológicos foram medidos através da utilização da Escala de Avaliação Psiquiátrica Breve (BPRS) e Escala Clínica de Avaliação de Estados Dissociativos (CADSS). Observou-se que o CBD foi capaz de atenuar os sintomas negativos da ketamina, porem intensificou os sintomas positivos, de ativação e de ansiedade, medidos pela BPRS. Este efeito duplo do CBD poderia ser explicado pela diminuição na atividade glutamatérgica, que no lobo frontal levaria a uma redução dos sintomas negativos, enquanto no lobo temporal poderia intensificar os sintomas positivos. O CBD também reduziu a manifestação dos sintomas dissociativos medidos pelo fator despersonalização da CADSS. Estas observações sugerem que o CBD interfere em sintomas psicóticos, possivelmente, devido a sua interação com o sistema glutamatérgico.

TESES 1º SEMESTRE DE 2005**BIOQUIMICA****CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DAS ENZIMAS FORMADORAS DE ANGIOTENSINA II DO LEITO ARTERIAL MESENTÉRICO DE RATO****Milene Kyoto Moysés**Orientador: Prof. Dr. Eduardo Brandt de Oliveira
TESE de Doutorado apresentada em 29/06/2005

O leito arterial mesentérico (LAM) isolado de rato é capaz de liberar, aparentemente sem estímulo externo, endo e exopeptidases para a solução de perfusão. Entre essas enzimas uma elastase-2 foi descrita como a principal enzima formadora de Angiotensina (Ang) II nesse leito. No presente trabalho verificamos a existência de outra serino protease conversora de Ang I, que é responsável por aproximadamente 25% da Ang II formada pelo perfusato do LAM de rato. Propriedades bioquímicas e enzimológicas dessa enzima indicam que ela possui alguns aspectos em comum com quimases e elastases-2, como por exemplo, a inibição por quimostatina, Ac-AAPL-CK e CH5450. Até o momento é difícil separar as contribuições das enzimas como elastase-2 e quimase nas vias de geração de Ang II independentes da ECA. Isso ocorre pelo fato de que substratos e inibidores considerados específicos e seletivos para quimase, [‘Pro EXP. 11’-D.’Ala EXP. 12’]-Ang I e CH-5450, respectivamente, interagem produtivamente também com a elastase-2 do LAM de rato. A síntese de substratos e inibidores específicos para a elastase-2 é importante para o estudo da participação específica dessa enzima e de outras na conversão de Ang I no LAM de rato e em outros leitos vasculares. No presente trabalho foram sintetizados diversos substratos peptídicos, estruturalmente relacionados com a Ang I, incluindo análogos truncados na porção aminoterminal com

a extremidade carboxiterminal livre ou amidada; peptídeos fluorescentes apagados; e substratos fluorogênicos. Utilizando-se os substratos sintéticos verificamos que a enzima elastase-2 do LAM de rato, apesar de apresentar uma especificidade ampla por diferentes substratos, não hidrolisou qualquer peptídeo que contivesse a ligação Phe- His, como aquela hidrolisada na Ang I. O estudo da ação da elastase-2 sobre as duas séries de peptídeos contendo a estrutura da Ang I truncada revelou a importância da sequência Ile-His-Pro-Phe na interação enzima- substrato, além de indicar ausência de interações eletrostáticas importantes do resíduo carboxiterminal do substrato com a elastase-2. O substrato Ang I- amidado, um análogo isoeztérico da Ang I desprovido da carga negativa terminal, foi hidrolisado pela enzima elastase-2 do LAM de rato com um ‘KIND. m’ de 111 ‘micro’ M e ‘KIND. cat’ de 1724 ‘min EXP. 1’, indicando uma eficiência catalítica de 15,5 ‘micro’ M EXP. 1’ ‘min EXP. 1’. Além disso, esse peptídeo também apresentou atividade contrátil em preparação de anéis de carótida isolada de rato. Para estudos funcionais e enzimológicos tentamos produzir a elastase-2 do LAM de rato recombinante, através da sua expressão como pré-pró-enzima, pró-enzima ou na forma madura, em bactérias E. coli BL21(DE3) Codon Plus ou na linhagem de células HEK293T de mamíferos. Apesar de trabalhos anteriores terem relatado a expressão da enzima elastase-2 pancreática de rato, no presente trabalho não verificamos a presença da proteína elastase-2 do LAM de rato recombinante, nos meios de cultura ou extratos celulares, através de medidas da atividade ou SDS-PAGE e imunotransferência.

FARMACOLOGIA**EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA ESTATINA, ATORVASTATINA, NA HIPERNOCICEPÇÃO MECÂNICA INFLAMATÓRIA EM CAMUNDONGOS****Tania Santodomingo Garzón**Orientador: Prof. Dr. Sérgio H. Ferreira.
Dissertação de Mestrado apresentada em 29/06/2005

As estatinas inibem competitivamente a enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase. Esta enzima catalisa o passo limitante da síntese de coles-

terol pela via da HMG-CoA no fígado e outros tecidos, e induz a síntese de ácido L-mevalônico (mevalonato), um importante produto intermediário da síntese do colesterol. As estatinas também inibem a síntese de derivados do ácido L-mevalônico, isoprenóides, os quais são importantes para o deslocamento de pequenas proteínas G para a membrana.

Atualmente, as estatinas são as drogas mais prescritas no mundo, sendo que 200 milhões de pessoas apresentam critério para tratamento e somente 25 milhões usam estatinas. Além de seu efeito sobre a redução dos níveis de colesterol, as estatinas apresentam efeitos pleiotrópicos, dentre tais, destacam-se as ações antiinflamatórias, imunomodulatórias e aumento da expressão da sintase de óxido nítrico endotelial (NOSe). Porque tem sido descrito o efeito antiinflamatório das estatinas, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da atorvastatina (ATV, Pfizer Inc) na hipernocicepção mecânica inflamatória.

Os experimentos foram feitos em camundongos swiss e a hipernocicepção mecânica foi quantificada com uma versão eletrônica do teste de filamentos de von Frey.

Nossos resultados indicam que o pré-tratamento por via oral com ATV (3, 10, 30 mg.Kg⁻¹, uma vez ao dia), inibiu dose e tempo dependentes, a hipernocicepção mecânica inflamatória induzida por administração intraplantar (i.pl.) de LPS (100 ng / pata) ou albumina bovina metilada (mBSA, 90 µg / pata). Para avaliar o mecanismo pelo qual ATV induz anti-hipernocicepção, foi avaliada o efeito desta sobre a hipernocicepção induzida pela cascata de mediadores inflamatórios liberados pelo LPS. A ATV (30 mg.Kg⁻¹) inibiu

significativamente a hipernocicepção mecânica induzida por bradicinina (500 ng / pata), fator de necrose tumoral- α (50 pg / pata), interleucina-1 β (1 ng / pata), quimiocina derivada do queratinócito (KC, 20 ng / pata) e prostaglandina E₂ (PGE₂) (100 ng / pata). O pré-tratamento com L-NAME ou L-NMMA (ambos, 90 mg.Kg⁻¹), mas não 1400W, inibidor seletivo da óxido nítrico sintase induzível, (1.5 mg.Kg⁻¹) ou animais deficientes para iNOS, reverteram o efeito anti-hipernociceptivo da ATV em camundongos estimulados com PGE₂ ou LPS. Por outro lado, foi avaliado o efeito da ATV sobre a produção de IL-1 β e PGE₂ no tecido subcutâneo plantar dos animais injetados com LPS. O pré-tratamento com ATV (30 mg.Kg⁻¹, uma vez/dia) reduziu a liberação de IL-1 β e PGE₂ (50% e 85%, respectivamente). Em contraste, demonstramos que o efeito anti-hipernociceptivo da ATV é independente da redução da síntese de colesterol ou de intermediários isoprenóides. Além disso, observamos que não há diferença na migração de neutrófilos para o foco inflamatório entre camundongos pré-tratados com ATV e o grupo controle. Embora tem-se descrito que as estatinas bloqueiam a ligação LFA1-ICAM e estimula a liberação da citocina anti-inflamatória IL-10, nenhuma diferença foi encontrada no efeito anti-hipernociceptivo da ATV, quando administrada em camundongos deficientes para ICAM -/ ou IL-10 -/- estimulados com LPS.

Em conclusão, os nossos dados demonstram que o efeito antinociceptivo da ATV deve-se a inibição da produção de IL-1 β e PGE₂, bem como a ativação da via L-arginina/cNOS/NO, atuando assim, tanto na prevenção quanto antagonizando diretamente a sensibilização do nociceptor.

NEUROLOGIA

O DESEMPENHO FUNCIONAL DO IDOSO COM DEMÊNCIA

Lúcia Aparecida Bressan

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo Speciali

Tese de Doutorado apresentada em 09/06/2005

A avaliação constitui uma etapa importante no processo de tratamento em terapia ocupacional. O seu resultado, com base nos recursos e potencialidade remanescentes, oferece subsídios para o plano e estratégias do tratamento. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo é comparar as informações fornecidas pelo cuidador a um avaliador com o desempenho do paciente, observado por outro examinador, frente a um mesmo protocolo de avaliação. Participaram do estudo todos os pacientes com diagnósti-

co confirmado de demência, atendidos pela Terapia Ocupacional do Ambulatório de Neurologia Comportamental do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto- USP, no período de 1999 a 2001. Um número de 26 pacientes e 26 cuidadores participaram do estudo, podendo-se observar na amostra um equilíbrio de sujeitos do sexo feminino (54%) e masculino (46%), escolaridade até 4 anos (73%), a maioria casada (54%), e idade acima de 71 anos (54%). O cuidador em geral é o cônjuge (58%), na maioria a mulher (81%), com idade entre 51 e 70 anos (46%) e escolaridade entre 4 e 8 anos (54%), dedicando a maior parte do seu tempo ao cuidado (64%). O questionário de Atividades Funcionais de Pfeffer foi aplicado simultaneamente ao paciente, que reali-

zava as tarefas de atividades de vida diária, e ao cuidador que informava sobre o desempenho funcional do paciente. Uma análise estatística realizada, utilizando-se o coeficiente Kappa e o teste não-paramétrico de Wilcoxon. Os resultados mostraram diferenças significativas entre o desempenho do paciente e as informações do cuidador. Pode-se concluir que as informações fornecidas pelos cuidadores na avaliação não são fidedignas. Os cuidadores mostra-

ram-se mais pessimistas e avaliaram mais negativamente o desempenho do paciente. A comparação entre os resultados da aplicação do Questionário de Atividades Funcionais de Pfeffer e os resultados obtidos no Mini Exame do Estado Mental (MEEM), Escala Clínica de Demência (CDR), Escala de Deterioração Global (GD) e Instrumental de Atividades de Vida Diária (Lawton e Brody)) não revelaram correlação contraditória.

SAÚDE MENTAL

COMPORTAMENTO, AUTO-PERCEPÇÕES E AMBIENTE FAMILIAR DE CRIANÇAS QUE CONVIVEM COM MÃES COM HISTÓRIA RECENTE DE DEPRESSÃO

Luciana Mian

Orientadora: Profa. Dra. Sonia Regina Loureiro

Dissertação de Mestrado apresentada em 07/01/2005

A infância se constitui no período de desenvolvimento em que ocorrem as principais aquisições e que determinados eventos têm maior impacto, dentre estes se destaca a doença psiquiátrica dos pais, em especial a depressão materna. Objetiva-se compreender o significado de vulnerabilidade para crianças em idade escolar do convívio com a depressão materna, em comparação com crianças que convivem com mães sem história psiquiátrica. Foram avaliadas 40 crianças, de ambos os sexos, com idade entre 7 e 12 anos, com nível intelectual pelo menos médio, sem doenças orgânicas crônicas e sem deficiências sensoriais aparentes, divididas em dois grupos: G1- 20 crianças, cujas mães têm história recente de Depressão e G2- 20 crianças sem história psiquiátrica recente ou pregressa. As crianças foram selecionadas através do Teste das Matrizes Coloridas de Raven e as mães através da Entrevista Clínica Estruturada para o DSM-IV (SCID), com o objetivo de avaliar sistematicamente a presença ou ausência de sintomas psiquiátricos. As crianças foram avaliadas em sessões individuais, por meio dos instrumentos: Escala Infantil Piers-Harris de Autoconceito e Roteiro de Avaliação do Senso de Auto-eficácia. As mães responderam à Escala Comportamental A2 de Rutter, ao Inventário de Recursos do Ambiente Familiar e a Escala de Eventos Adversos. Os dados foram codificados e quantificados de acordo com as recomendações de cada técnica.

Procedeu-se as análises de comparação dos grupos, através dos testes não paramétricos de Mann-Whitney, Exato de Fisher e Qui-quadrado e a integração dos dados, pelas correlações univariadas e análise fatorial, considerando um $p < 0,05$. Observou-se diferenças significativas entre os grupos tanto para as variáveis das crianças como para o ambiente familiar. Com relação às variáveis pessoais das crianças, as de G1 foram referidas pelas mães como apresentando maior dificuldade de comportamento e maior necessidade de cuidados especializados do que as de G2. As crianças de G1 se auto perceberam com um autoconceito comportamento mais negativo e fizeram uma avaliação mais negativa quanto à auto-eficácia acadêmica. Quanto às características do ambiente familiar, foi observada a presença de menos recursos e uma menor organização das rotinas para as crianças de G1. Não foi observada diferença significativa entre os grupos na avaliação geral de ocorrência de eventos adversos. Com base nas análises de integração dos dados relativos as variáveis pessoais das crianças e do ambiente familiar caracterizou-se a depressão materna como uma condição adversa ao desenvolvimento destas crianças. Tal dado chama a atenção para a necessidade de promover mecanismos de proteção que possam ser efetivados em práticas de saúde mental que focalizem as crianças que experimentam tal condição, que dêem suporte às suas mães e orientem suas famílias no sentido de prevenir dificuldades futuras, proporcionando condições favoráveis à superação do impacto negativo da depressão materna para o desenvolvimento de crianças em idade escolar.