

## Resumos de Dissertações de Mestrado e Teses de Doutorado apresentadas na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP de abril a junho de 2011

### Biologia Celular e Molecular

#### EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL NO CONTEXTO DA MORTE CELULAR PROGRAMADA NO DESENVOLVIMENTO DOS OVÁRIOS EM RAINHAS E OPERÁRIAS DE *Apis mellifera*

**Fernanda Carvalho Humann**

Orientador: Prof. Dr. Klaus Hartmann Hartfelder

Tese de Doutorado apresentada em 15/04/2011

O esclarecimento dos mecanismos de diferenciação de castas polifênicas em abelhas é de fundamental importância para a compreensão da evolução da eussocialidade. Os diferentes tipos de indivíduos de uma colônia de *Apis mellifera* exercem funções mútuas e complementares, e especial atenção tem sido dada aos eventos relacionados à divisão de trabalho reprodutivo. A divergência entre as castas é estabelecida durante o período larval e decorre da alimentação diferencial recebida pelas larvas destinadas a serem rainhas ou operárias, em última análise, resulta em morfologia, fisiologia e comportamento casta-específicos. Os estudos sobre a temática da diferenciação estão focados na diferenciação dos ovários larvais, onde se observa um intenso processo de morte celular programada nos ovaríolos de operárias, ao passo que os de rainhas se desenvolvem normalmente. Apesar da grande quantidade de informações à respeito da morfologia dos ovaríolos, os mecanismos moleculares da ativação e inibição da morte celular programada nestas unidades estruturais dos ovários não estão ainda descritos, e agora, com o sequenciamento completo do genoma de *Apis*, a elucidação de tais mecanismos torna-se possível. O fenótipo observado nos ovários das operárias gerado pelo processo de morte celular programada, é, provavelmente, resultante da expressão diferencial de genes, já que tanto as rainhas como as operárias produzidas em uma colméia possuem o mesmo genótipo.

Nesse contexto, e já tendo sido bem estabelecidas as diferenças no desenvolvimento dos órgãos reprodutivos entre rainhas e operárias, iniciamos a busca por genes diferencialmente expressos nessa fase. Rainhas e operárias foram coletadas no quinto estágio de desenvolvimento larval e o respectivo perfil de cDNA obtido foi utilizado para a construção de bibliotecas subtrativas através de *Representational Difference Analysis* (RDA). Os fragmentos de sequências expressas (ESTs) obtidos variavam de tamanho entre 0,2-0,5kb. As ESTs foram sequenciadas e uma extensa análise de bioinformática foi realizada. Aquelas sequências que apresentaram similaridade à sequências de *Drosophila* e miRNAs foram agrupados segundo as categorias *Gene Ontology*. Sequências contigs, relacionadas a genes de potencial interesse e com uma EST>300pb foram tiveram sua expressão validada por PCR em Tempo Real (qRT-PCR).

Quatro ESTs foram identificados por qRT-PCR como diferencialmente expressas nos ovários de *Apis* no quinto estágio de desenvolvimento larval. Nas rainhas, tais fragmentos correspondiam ao precursor de ornitina aminotransferase (Oat) e *Group* 11.35, e nas operárias, à desidrogenase/reductase de cadeia curta (SDR) e a do *Group* 11.31.

A duas ESTs identificadas como diferencialmente expressas sem similaridade significativa à nenhuma outra sequência disponível nos bancos de dados públicos, *Group* 11.31 em operárias, e *Group* 11.35 em rainhas, foram mais detalhadamente analisadas. Ambas foram completamente sequenciadas.

O transcrito do *Group* 11.35, apresentou uma sequência contínua única de 878pb. Nesta, a maior ORF predita possui 67 aminoácidos. No genoma essa sequência é localizada no quarto intron do gene predito *fringe* (fng), previamente denominado como GB17604-RA, que possui nove exons preditos e esta relacionado à formação da câmara do ovo derivada do germário, entre outras funções.

O transcrito do *Group* 11.31, mais expresso em operárias, apresentou uma sequência contínua única de 1368pb mapeados no genoma de *Apis mellifera* com sítio de poliadenilação e codon metionina. Sem ORF predita com mais de 58 aminoácidos, a sequência contém uma região repetitiva em tandem de 231pb na região 3' que não está presente no genoma, provavelmente excluída da montagem por ser repetitivo. A sequência localiza no quinto intron da proteína predita LOC726407,

também conhecida como GB19266-RA, que possui oito exons preditos e não tem função associada. O transcrito *Group11.31* é expresso em ovários, cabeça, corpo gorduroso e discos imaginiais de perna em operárias, entretanto não apresenta expressão em ovários de rainhas.

Análises através do software TestCode revelaram que eles apresentam uma alta frequência incomum de codons raros, sugerindo que sejam sequências não codificadoras de proteínas. A análise da estrutura secundária de ambas ESTs também apresentou estruturas consenso preditas para miRNAs.

## INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DA PROTEÍNA RIBOSSÔMICA L19 NO CONTROLE DA EXPRESSÃO DE GENES EM *Leishmania*

**Janayna Hammes de Almeida Bizzo**

Orientadora: Profa. Dra. Angela Kaysel Cruz

Tese de Doutorado apresentada em 18/04/2011

O gene da proteína ribossômica L19 (RPL19) foi identificado em nosso laboratório como um transcrito amastigota-preferencial. Visto que diversos estudos recentes demonstram uma série de funções extra-ribossômicas para estas proteínas, neste trabalho investigamos a função da RPL19 no controle da expressão de genes específicos em *Leishmania*. Inicialmente geramos o vetor pNEO-L19, o transfectamos em *L. major* e em *L. braziliensis* e constatamos que a sua superexpressão pelos clones levou a um retardo no crescimento, comparativamente às linhagens parentais. No transfectante de *L. major* os níveis de tradução detectados foram muito superiores ao da linhagem parental. A partir desses transfectantes foram obtidos clones curados do plasmídeo que apresentaram reversão parcial no crescimento. Por eletroforese bidimensional comparamos os perfis protéicos de *L. major* superexpressora de RPL19 com o controle e 33 proteínas diferencialmente expressas foram identificadas. Não identificamos elementos conservados nas regiões não traduzidas (UTRs) dos transcritos correspondentes que pudessem indicar mecanismos de regulação similar ou comum. Entretanto é coerente a detecção da expressão aumentada de proteínas envolvidas na tradução e no enovelamento de proteínas, visto que a superexpressão da RPL19 levou a um grande aumento nas taxas de tradução. Por *pull-down*, confirmamos a interação de uma das proteínas identificadas, a Enolase, com a RPL19. Para a produção de anticorpo anti-RPL19 clonamos a sequência do gene RPL19 no vetor pET28a de expressão em *E. coli*, inserindo 6-Histidinas na extremidade N-terminal. A proteína recombinante His-L19, superexpressa em *E. coli*, foi utilizada para a imunização de coelhos. Os anticorpos produzidos reconheceram as isoformas da RPL19 endógena de *L. major*. A variação da expressão do transcrito de L19 ocorre segundo um padrão espécie-específico. Por outro lado, a proteína obedece ao mesmo padrão de expressão em todas as espécies analisadas: no início da fase log é encontrada em altos níveis que decaem na fase estacionária. Ao contrário dos níveis de transcritos, a expressão da proteína L19 é menor nos amastigotas que nos promastigotas de *L. major*. A RPL19 apresentou-se largamente distribuída em grânulos por todo o citoplasma dos promastigotas e aparentemente ausente no núcleo e cinetoplasto. Por Racionamento subcelular identificamos que a RPL19 é predominantemente encontrada na fração ribossômica, mesmo a isoforma expressa a partir do plasmídeo. Aliado a outros indícios, acreditamos que este excesso de RPL19 nos transfectantes também se associe aos ribossomos, mantendo-o mais estável durante o processo de tradução. Em paralelo ao nosso objetivo central, verificamos a infecção experimental de melanócitos murinos com *L. braziliensis* e *L. donovani*. Estes resultados são inéditos e de provável relevância no processo de infecção natural. Caracterizamos a cinética de infecção, condições de infecção das células e coleta dos amastigotas e estão em progresso a caracterização dos amastigotas-símile.

## COMPARAÇÃO DO GENOMA EXPRESSO DE ISOLADOS DE *Leishmania braziliensis* RESPONSÁVEIS POR MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DISTINTAS

**Eliza Vanessa Carneiro Alves**

Orientadora: Profa. Dra. Angela Kaysel Cruz

Dissertação de Mestrado apresentada em 09/05/2011

*Leishmania (Viannia) braziliensis* está entre as espécies mais importantes no Brasil por sua ampla distribuição no território nacional como agente causador de leishmaniose cutânea e como a espécie associada ao aparecimento da

leishmaniose mucosa. Na maioria dos casos, as manifestações mucosas ocorrem (ou são diagnosticadas como leishmaniose) meses ou até anos depois das lesões cutâneas primárias terem sido diagnosticadas, mas não são claras as causas pelas quais em torno de 5% dos pacientes infectados por *L. V. braziliensis* desenvolvem a forma mucosa. É possível especular que existam diferenças no padrão de expressão gênica na população de *L. V. braziliensis* encontrada nos sítios cutâneo (LC) e mucoso (LM). Este trabalho visou investigar essa hipótese, para tanto foi analisado comparativamente o proteoma (por eletroforese bidimensional seguida de espectrometria de massas) de dois pares de isolados clínicos de *L. V. braziliensis* retirados dos sítios cutâneo e mucoso de dois pacientes que apresentaram concomitantemente às lesões cutâneas primárias, infecção da mucosa nasal. O perfil de crescimento de promastigotas em meio axênico e os cariótipos moleculares dos quatro isolados são indistinguíveis, no entanto eles apresentaram diferenças significativas no padrão de expressão do genoma e no de infecção e patogênese *in vivo*. Observou-se 48 proteínas diferencialmente expressas entre as amostras de LC e LM do mesmo paciente, e somente duas obtiveram um perfil de expressão diferencial coincidente nos dois pacientes: uma Prostaglandina F2-alfa sintase (PGF2S) e uma proteína de choque térmico HSP70, ambas mais abundantes nos isolados de LC. Paralelamente, a avaliação da carga parasitária nos sítios de infecção das referidas cepas em modelo animal por análise histopatológica sugerem que os isolados da lesão primária (LC) multiplicam-se com maior eficiência, resultando em uma carga parasitária mais alta do que os isolados LM. Assim, os resultados obtidos sugerem haver uma correlação entre nível de expressão de PGF2S e de HSP 70 e o comportamento do parasito no hospedeiro, acentuando a importância de investigar o papel destas proteínas. Estudos realizados por outros grupos revelaram que a PGF2S está presente no secretoma de diferentes espécies de *Leishmania* e análises *in silico* revelaram que a PGF2S tem alto potencial de "drogabilidade". Dessa forma, julgamos relevante estudar o papel da PGF2S na relação parasito-hospedeiro. Para iniciar essa investigação, foi realizada a clonagem e expressão deste gene em *Escherichia coli* para posterior produção do anticorpo policlonal contra a PGF2S de *L. braziliensis* (LbrPGF2S). O anticorpo anti-LbrPGF2S produzido por galinha ainda não foi analisado. Os resultados obtidos sugerem um potencial papel de LbrPGF2S e HSP70 no padrão de infecção de *L. V. braziliensis* no hospedeiro mamífero.

### IDENTIFICAÇÃO, CLONAGEM E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS-GPI DE *Paracoccidioides brasiliensis*

**Thaila Fernanda dos Reis**

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sergio Rodrigues Coelho

Tese de Doutorado apresentada em 27/05/2011

Em fungos, proteínas modificadas por GPI são proteínas abundantes da parede celular que compartilham características estruturais que permitem a sua identificação através de análise de bioinformática. Nós utilizamos sequências consenso para o sítio de inserção de GPI na porção C-terminal (sítio-w) de cada proteína para pesquisar o genoma de *P. brasiliensis*, um fungo termodimórfico que causa a paracoccidioidomicose (PCM). As proteínas identificadas foram analisadas quanto a ausência de domínio transmembrana e presença de peptídeo sinal para secreção. Utilizando esta abordagem nós identificamos 72 prováveis proteínas GPI. Algumas dessas proteínas apresentam alta homologia a proteínas GPI conhecidas de outras espécies de ascomycetos. Análise de PCR em tempo real de 43 genes que codificam proteínas GPI revelou que o nível dos transcritos de 13 deles foi maior na forma micelial e 4 genes foram mais expressos na forma patogênica leveduriforme. Nós clonamos 29 ORFs que codificam proteínas-GPI de *P. brasiliensis* em vetor de entrada do sistema Gateway. Destas, 28 foram transferidas para um vetor destino para expressão em levedura o qual contém uma cauda de GST N-terminal. Das ORFs clonadas, 26 proteínas de fusão foram altamente expressas em levedura e purificadas por cromatografia de afinidade. Esta coleção de clones móveis servirá como importante fonte para estudos adicionais de função e imunogenicidade de proteínas-GPI de *P. brasiliensis*.

### UMA NOVA PROTEÍNA RNA-LIGANTE DE 65 KDA NO TERMINAL PRÉ-SINÁPTICO DE LULA (*Loligo*)

**Diego Torrecillas Paula Lico**

Orientador: Prof. Dr. Roy Edward Larson

Tese de Doutorado apresentada em 02/06/2011

Identificou-se uma nova proteína RNA-ligante de 65 kDa (p65) nos terminais pré-sinápticos em frações de sinaptossomas de lóbulos ópticos e nos gânglios estrelados de lulas *Loligo plei* (espécie do Atlântico Sul). Esta proteína

foi, inicialmente, detectada em *western blots* por sua reação cruzada com um anticorpo policlonal (C4), gerado contra o domínio cabeça da miosina Va de galinha. Várias sequências peptídicas foram obtidas por espectrometria de massas do p65 purificado. Anticorpos policlonais, produzidos em coelhos e gerados contra peptídeos sintéticos, marcaram o p65 em *western blots*, confirmando que o anticorpo original (C4) e o novo marcaram a mesma proteína. As análises dos dados de espectrometria de massas, em conjunto com informações contidas em uma biblioteca de ESTs (*expressed sequence tag*) de *Loligo pealei* (espécie do Atlântico Norte), revelaram um *contig* (*contig 976*). O *contig* apresenta uma fase aberta de leitura (ORF) composta de 359 aminoácidos contendo quatro sequências de peptídeos obtidos por espectrometria de massas, cujo alinhamento com o *contig* demonstrou 94% de identidade e 100% de homologia. O *contig* codifica uma proteína de 37 kDa, sugerindo cerca de 57% de p65. Análises da ORF do *contig 976* no *GenBank* do NCBI pelo blastp (proteína-proteína) revelaram que esse *contig* pertence a uma grande família de proteínas RNA-ligantes, conhecidas como *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNP) subtipo A/B*. Estudos bioquímicos mostraram que p65 se associa a pequenas partículas em fração pós-mitocondrial, cuja sedimentação é sensível ao tratamento com RNase. Esse resultado sugere que p65 está associado a partículas de mRNA-RNPs. Estudos de imuno-histoquímica e imunofluorescência demonstraram uma colocalização parcial de p65 com sinaptotagmina dentro da camada plexiforme externa dos lóbulos ópticos e zonas pré-sinápticas do gânglio estrelado. Além disso, foram observadas marcações pontuais nos sinaptossomas isolados dos lóbulos ópticos de lula. Os dados indicam que p65 é uma nova proteína RNA-ligante, localizada nos terminais pré-sinápticos dos neurônios de lula e pode ter um papel na localização, tradução e processamento de RNAs em regiões sinápticas.

## Bioquímica

### A INFLUÊNCIA DE DIFERENTES DETERMINANTES GENÉTICOS MITOCONDRIAIS NA MORTE CELULAR EM *Aspergillus nidulans*

**Bárbara de Castro Pimentel Figueiredo**

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman

Dissertação de Mestrado apresentada em 15/04/2011

Farnesol (FOH) é um isoprenóide não esteróide produzido pela defosforilação do farnesil pirofosfato, um catabólito da via biossintética do colesterol. Esse isoprenóide inibe a proliferação celular e induz a apoptose. Demonstrou-se que FOH promove a ativação transcricional de vários genes relacionados com a função mitocondrial em *Aspergillus nidulans* (Savoldi et al., 2008) e, os resultados desse trabalho indicam que *aifA*, codificando o Fator de Indução da Apoptose tipo-AIF, uma oxidoredutase mitocondrial, está possivelmente envolvido na funcionalidade do complexo I mitocondrial. Nesse trabalho realizou-se também, a caracterização da composição de uma porção da via alternativa à cadeia transportadora de elétrons (CTE) de *A. nidulans*, formada pelas proteínas NADH ubiquinona desidrogenases externas e interna, NdeA-B e NdiA, respectivamente. A principal evidência de que os genes *ndeA-B* codificam NADH desidrogenases externas e *ndiA* codifica NADH desidrogenase interna foi obtida a partir dos estudos de consumo de oxigênio com os mutantes inativos de cada gene, nos quais observou-se, após a inibição dos complexos I e II, uma grande diminuição na atividade oxidativa frente ao estímulo com NADH ou com os substratos geradores de NADH. Esse dado ainda foi confirmado após o isolamento de um duplo mutante *ΔndeA ΔndeB* que não apresentou consumo de oxigênio quando estimulado com NADH. A exposição dos mutantes *ΔaifA* e *ΔndeA* ao FOH, essas linhagens apresentaram menor viabilidade e maior acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), enquanto os mutantes *ΔndeB*, *ΔndeAΔndeB* e *ΔndiA* demonstraram viabilidade um pouco maior e o mesmo estado oxidativo na presença e ausência de FOH. A super-expressão de *ndiA* proporcionou maior sobrevivência em relação à linhagem selvagem e nenhuma modificação no acúmulo de EROs após o tratamento com FOH. Nossos resultados sugerem que diversos mecanismos compensatórios são ativados na resposta ao FOH, afetando a sobrevivência dos mutantes estudados nesse trabalho. Além da produção da maior parte da energia nas células eucarióticas, a mitocôndria está envolvida também na regulação da morte celular programada, a partir da geração de EROs e liberação de proteínas pró-apoptóticas. Nesse trabalho, investigou-se ainda, o comportamento de outros dois fatores mitocondriais de *A. nidulans* após a indução da morte celular por FOH: a endonuclease G (EndoG) e a citocromo *c*. Frente a indução da apoptose, a translocação de EndoG da mitocôndria para o núcleo em mamíferos coincide com fragmentação massiva de DNA. Nesse estudo, o homólogo de EndoG no fungo filamentosos *A. nidulans*, nomeado *nucA*<sup>ENDO G</sup>, foi caracterizado e

seu envolvimento na morte celular por FOH foi avaliado. Os resultados sugerem que NucA não está envolvido na morte celular por FOH mas tem um papel na resposta ao dano ao DNA em *A. nidulans*, não sendo observada a sua translocação para o núcleo nas condições estudadas. Interessantemente, durante a morte celular por FOH a citocromo *c* está predominantemente localizada na mitocôndria de *A. nidulans* e também não é liberada para o citoplasma apesar de estudos anteriores demonstrarem a ativação de caspases nesse processo (Colabardini et al., 2010). De forma geral, os resultados do trabalho confirmam que FOH provoca o acúmulo de EROs e enfatiza a importância das vias respiratórias alternativas em *A. nidulans* quando a mitocôndria está extensivamente afetada por EROs. Além disso, não observamos a translocação dos homólogos de EndoG e citocromo *c* após o tratamento com FOH. Esse comportamento pode refletir uma característica particular da morte celular induzida por FOH ou uma observação geral relacionada com a morte celular em fungos filamentosos, sugerindo que a função vital dessas proteínas é filogeneticamente conservada e mais ancestral, de modo que a função letal, provavelmente, foi adquirida durante a evolução.

### **VIAS ALTERNATIVAS MITOCONDRIAIS: ESTUDOS MOLECULARES E BIOQUÍMICOS DE UMA UCP-like DE *Aspergillus fumigatus***

**Fernanda Gomes Cardoso**

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura

Dissertação de Mestrado apresentada em 27/04/2011

*A. fumigatus* é um patógeno oportunista que causa infecções invasivas em hospedeiros imunocomprometidos. Estudos de respiração mitocondrial sugeriram a presença de componentes alternativos em sua cadeia respiratória envolvidos com processos de adaptação a ambientes adversos, como a proteína desacopladora (UCP). UCPS são proteínas mitocondriais cuja atividade dissipa o potencial de membrana gerado durante o transporte de elétrons. Um gene contendo características das três assinaturas moleculares das Proteínas Transferidoras de Energia foi clonado e sequenciado. O alinhamento das sequências genômica e de cDNA mostrou a presença de dois íntrons que, após o *splicing*, codifica uma proteína contendo 341 aminoácidos, com uma massa molecular de 37 kDa e um pI de 10,02. A fim de se avaliar as propriedades bioenergéticas da UCP-like, essa sequência foi clonada no vetor pYES2 e leveduras *S. cerevisiae* foram transformadas. Esferoplastos foram preparados e o potencial elétrico transmembrana mitocondrial ( $\Delta\psi$ ) foi estimado. Os resultados mostraram que o  $\Delta\psi$  de esferoplastos de leveduras expressando a proteína UCP-like foi ligeiramente menor e que o decréscimo momentâneo do  $\Delta\psi$  associado com a fosforilação do ADP foi mais lento quando comparado com o controle, indicando desacoplamento da respiração. Além disso, esse comportamento dos esferoplastos recombinantes foi similar ao controle quando GDP foi adicionado ao meio de reação, sugerindo uma inibição da proteína por esse composto. Para sua caracterização funcional em sistemas reconstituídos, a sequência foi clonada no vetor pET SUMO. A expressão foi realizada em *E. coli* e a proteína recombinante, purificada por cromatografia em resina de níquel, foi analisada por Western blot com anticorpos anti-(His)6-tag e anti-UCP2 e por espectrometria de massas. A formação dos lipossomos foi confirmada através de medidas de distribuição de partícula por espalhamento de luz dinâmico, as quais sugeriram a formação de vesículas estáveis. Em adição, foi investigada a participação da UCP-like na proteção do *A. fumigatus* contra danos oxidativos. O nível de mRNA foi determinado por PCR em tempo real na presença de paraquat e menadiona. Em *A. fumigatus*, a presença dessas drogas pró-oxidantes resultou em um aumento no nível de mRNA desse gene, sugerindo que essa proteína possa também fazer parte de um sistema de defesa antioxidante do fungo.

### **ATIVIDADE TÓXICA DA PEÇONHA DE *Lachesis muta rhombeata* E PRODUÇÃO DE FRAGMENTOS DE ANTICORPOS HUMANOS (scFV) CONTRA A PEÇONHA BRUTA**

**Lucas Benício Campos**

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Coutinho Netto

Dissertação de Mestrado apresentada em 27/04/2011

O tratamento atual indicado para casos de envenenamentos por peçonhas é a administração intravenosa de antivenenos, produzidos através da hiperimunização de animais. Entretanto, os antivenenos disponíveis podem, algumas

vezes, não proteger os pacientes e causar reações de hipersensibilidade. Fosfolipases A2 (PLA<sub>2</sub>), L-aminoácido oxidases (LAAO), metalo e serinoproteases são os principais componentes de peçonhas ofídicas e contribuem para a neurotoxicidade, hemorragia, hemólise, miotoxicidade, cardiotoxicidade e formação de edemas. Foram empregados ensaios para avaliar as atividades das enzimas presentes na peçonha de serpentes da espécie *Lachesis muta rhombeata* e aquele para atividade de protease foi otimizado. A tecnologia de *Phage display* foi empregada para a seleção de fagos-anticorpos capazes de reconhecer a peçonha bruta. Os fagos foram amplificados em *Escherichia coli* TG1 e usados para infectar *E. coli* HB2151, a qual produz fragmentos de anticorpos humanos solúveis. Estes foram purificados e utilizados em testes de inibição de alguns dos componentes tóxicos da peçonha. Os testes de atividade para PLA<sub>2</sub>, protease e L-aminoácido oxidase foram padronizados com sucesso e as 3 proteínas mostraram elevada atividade enzimática. Após otimização, a quantidade de peçonha necessária para o ensaio de protease foi reduzida em 25 vezes. A massa molecular de PLA<sub>2</sub> foi estimada em 17 kDa e as massas moleculares de proteases foram estimadas em 40, 35 e 24 kDa, através de zimogramas. O método de bio panning foi eficiente para a seleção de fagos-anticorpos contra a peçonha bruta. Diversos fragmentos de anticorpos foram purificados e incubados com a peçonha bruta para testar suas capacidades de neutralização sobre cada enzima. Cinco clones demonstraram-se hábeis em inibir a PLA<sub>2</sub> através da inibição da hemólise. O clone 4E inibiu 100% da hemólise durante as duas horas de ensaio quando pré-incubado na proporção 2:1 (scFv:peçonha). Os clones 2C e 4E inibiram 100% durante uma hora quando pré-incubados na proporção 1:1 e os clones 2F e 9F inibiram a hemólise parcialmente. Outros testes serão conduzidos para a seleção de clones capazes de neutralizar as demais enzimas, os quais, juntamente com os clones já selecionados, serão analisados através de ensaios *in vivo*. Espera-se que eles possam contribuir para a construção de um novo antiveneno capaz de superar algumas das dificuldades associadas às técnicas de imunoterapia convencionais.

### **CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS PROVENIENTES DO LÁTEX DA SERINGUEIRA *Hevea brasiliensis*: PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DO PROCESSO CICATRICIAL E ANGIOGÊNICO**

**Heloisa da Silva Pitz**

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Coutinho Netto

Dissertação de Mestrado apresentada em 23/05/2011

A angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. Esse evento é de fundamental importância para o processo cicatricial, já que são os novos vasos os responsáveis pelo suprimento de nutrientes e oxigênio na região lesada. Estudos realizados previamente mostraram que o látex da seringueira *Hevea brasiliensis*, depois de coagulado e cromatografado em coluna DEAE-celulose, gerou uma fração (FrHb 1) com atividades de aumento da permeabilidade vascular, indutora de angiogênese, proliferadora de fibroblastos e cicatrizante. Para isolar a molécula responsável pelas atividades descritas, a fração FrHb 1 foi submetida a 3 passos cromatográficos (em coluna Sephadex G-50, coluna preparativa de troca aniônica Asahipak ES 502-NP e coluna Econosil C-18). As frações provenientes das diferentes etapas de purificação foram testadas quanto as suas atividades biológicas. No teste de permeabilidade vascular, a fração FrHb 1.2.3 se destacou por ser a única a apresentar aumento da permeabilidade significativo entre os grupos testados ( $p = 0,0005$ , ANOVA). No modelo de indução de angiogênese em membranas corioalantóides de ovos embrionados, a fração FrHb 1.2.2 diferiu significativamente dos outros grupos promovendo menor vascularização na área testada ( $p = 0,0003$ , ANOVA). Nenhuma fração foi capaz de aumentar de forma significativa a indução de vasos sanguíneos. A atividade cicatrizante foi avaliada através do modelo de úlceras cutâneas em orelhas de coelho durante os dias 3, 5, 7, 9, 12 e 14 após ferimento. Nenhum grupo testado foi capaz de diminuir o tempo de fechamento das úlceras de forma significativa. A contagem de células realizada através das lâminas histológicas das úlceras mostrou que a fração FrHb 1.2.3 duplicou o número de fibroblastos na borda da ferida quando comparada aos outros grupos testados ( $p < 0,0001$ , ANOVA). Devido aos resultados obtidos, a fração FrHb 1.2.3 mostrou-se como a mais purificada e ativa dentre todas as frações testadas. Além disso, as evidências nos levam a acreditar que ela possa apresentar similaridades com a molécula de FGF básico devido ao efeito proliferador de fibroblastos e aos epítomos em comum encontrados através de análise por *western blot* com esta molécula. Através das etapas de purificação, uma proteína de massa molecular igual a 19 kDa (FrHb 1.2.2.2) foi purificada e identificada por espectrometria de massas como sendo um isoalergênico de Hev b 6.02.

## Clínica Cirúrgica

### ESTUDO DOS EFEITOS DO AZUL DE METILENO SOBRE AS ALTERAÇÕES HEMODINÂMICAS, BIOQUÍMICAS E HISTOLÓGICAS DECORRENTES DO CHOQUE INDUZIDO POR CLAMPEAMENTO TOTAL DO PEDÍCULO HEPÁTICO EM COELHOS

**Rodrigo Gouvea Rosique**

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Barbosa Evora

Tese de Doutorado apresentada em 25/04/2011

**Introdução:** Não obstante o sucesso do transplante hepático nas últimas décadas, a repercussão sistêmica da síndrome de isquemia e reperfusão (SIR) hepática representa importante causa de mortalidade e morbidade nos pacientes submetidos a transplante hepático. Esta síndrome baseia-se na disfunção endotelial, na qual o óxido nítrico (NO) desempenha um papel chave.

**Objetivos:** Baseado na função de inibidor da guanilato ciclase do azul de metileno (AM) e sendo esta a via final de vasodilatação mediada pelo NO, em estudos clínicos prévios, procurou-se avaliar o papel do AM na prevenção e tratamento da SIR em coelhos.

**Material e métodos:** 30 coelhos foram divididos em cinco grupos: 1 - SHAM, Controle; 2 - AZUL, Controle com infusão de AM em bolus (3mg/Kg); 3 - IR, Isquemia hepática por 60 minutos seguida por 120 minutos de reperfusão; 4 - IAR, Isquemia com infusão de AM em bolus (3mg/Kg) antes de iniciar a reperfusão e 5 - IRA, Isquemia e infusão do AM após instabilidade hemodinâmica decorrente da reperfusão. Foram feitas análises contínuas dos sinais vitais (pressão arterial, venosa central e frequência cardíaca) e coleta das amostras para análise gasométrica e bioquímica da função hepática dos marcadores do NO, da lipoperoxidação e da atividade neutrofílica nos instantes 0, 60 e 180 minutos. No final, foram coletadas amostras do fígado para dosagem desses marcadores no parênquima. A análise estatística foi feita com o teste de ANOVA de duas vias, com significância para  $p < 0,05$ .

**Resultados:** Os dados vitais mostraram melhora significativa ( $p < 0,05$ ) com a infusão do AM, tanto quanto ao efeito profilático como terapêutico. Os dados gasométricos mostraram um padrão intermediário do uso do AM entre o grupo SHAM e IR, porém sem significância estatística, exceto para o menor lactato no grupo IRA ( $p < 0,01$ ). As dosagens bioquímicas não mostraram diferenças significativas entre os grupos. A análise histológica demonstrou leve atenuação da reação inflamatória e hemorrágica no fígado com o uso do AM na reperfusão hepática.

**Conclusão:** O AM manteve os sinais vitais maiores, assim como o lactato e a diferença de extração de oxigênio menores durante a reperfusão, com maior sobrevida dos animais. Porém a duração deste efeito foi maior quando o AM foi utilizado como tratamento do que como profilático. Baseado nos marcadores bioquímicos, não houve proteção nítida do fígado conferida pelo AM, sugerindo que a melhora hemodinâmica não se baseia na integridade hepática, mas, possivelmente, relaciona-se ao endotélio.

### PRÉ E PÓS-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO EM MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS

**José Alves Lintz**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eli Piccinato

Dissertação de Mestrado apresentada em 29/04/2011

**Introdução:** O pré-condicionamento isquêmico tem a capacidade de minimizar as lesões decorrentes do processo de isquemia e reperfusão. O pós-condicionamento isquêmico, descrito posteriormente, apresenta resultados semelhantes na proteção contra as lesões por isquemia e reperfusão em miocárdio, cérebro, rins, músculo esquelético e medula espinhal.

**Objetivo:** Avaliar o efeito do pré e do pós-condicionamentos isquêmicos bem como sua associação sobre a lesão tecidual em músculo esquelético de ratos submetidos ao processo de isquemia e reperfusão.

**Método:** Foram utilizados 50 ratos *Wistar*, distribuídos em cinco grupos de 10 animais: grupo Controle, em que se realizou isquemia parcial por clampeamento aórtico infra-renal (240 min) e reperfusão (60 min); Grupo *Sham*, fez-se o mesmo procedimento cirúrgico, porém sem o clampeamento da aorta abdominal; grupo Pós-condicionamento, onde precedendo o

início da reperfusão, foi realizado o pós-condicionamento isquêmico (três ciclos de um minuto de reperfusão intercalados por três ciclos de um minuto de isquemia); grupo Pré-condicionamento, precedendo ao período isquêmico procedeu-se ao pré-condicionamento isquêmico (três ciclos de 5 min de isquemia intercalados por três ciclos de 5 min de reperfusão); grupo Pré e Pós-condicionamento, neste grupo associaram-se os dois métodos. Avaliaram-se os resultados pela dosagem de enzimas tissulares (aspartato aminotransferase-AST, creatinofosfoquinase-CK e desidrogenase láctica-DHL), malondialdeído (MDA) e glicogênio tissular com tratamento estatístico.

**Resultado:** Houve elevação significativa dos níveis de CK em todos os grupos em relação ao grupo sham. A AST elevou-se no grupo pré+póscondicionamento em relação ao grupo controle. O comportamento da LDH foi semelhante entre os grupos. O marcador de lesão de membrana celular representado pelo MDA mostrou-se elevado em todos os grupos, exceto no grupo pós-condicionamento em relação ao grupo sham. Não ocorreu diferença entre os grupos isquêmicos e reperfundidos. Quanto à reserva energética ocorreu queda significativa do glicogênio no grupo controle em relação aos grupos sham, pré-condicionamento e pré+pós-condicionamento, exceto no grupo pós.

**Conclusão:** Concluiu-se que o pré-condicionamento bem como a associação do pré com o pós-condicionamento isquêmico foram capazes de minimizar a lesão tecidual em musculatura estriada de ratos submetidos à isquemia e reperfusão, porém a associação dos métodos não trouxe vantagens adicionais sobre os mesmos aplicados isoladamente.

### **O PAPEL DOS MICRORNAS: MIR-21, MIR-221 E MIR-222 EM MENINGIOMAS E SUA CORRELAÇÃO COM OS MECANISMOS DE ANGIOGÊNESE E APOPTOSE**

**Cristiane Iozzi Silva**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Junior

Dissertação de Mestrado apresentada em 16/05/2011

Os meningiomas correspondem, aproximadamente a cerca de 13-26% de todos os tumores primários, com uma incidência anual de 6 por 100.000 habitantes. Os meningiomas são originários da membrana aracnóide, sendo o segundo, tumor do sistema nervoso central mais comum, acometendo 22% de todos os tumores intracranianos. Considerando que os processos da angiogênese e apoptose são cruciais para o crescimento tumoral, desenvolver possibilidades terapêuticas para bloquear e interromper a angiogênese e/ou apoptose seriam uma estratégia promissora. Os microRNAs tem mostrado um papel na regulação do desenvolvimento tumoral, a elucidação do seu envolvimento com o mecanismo de angiogênese e apoptose em meningiomas pode trazer melhores subsídios para a elucidação das diversas alterações moleculares envolvidas nesse tipo de tumor. Objetivo desse estudo foi quantificar a expressão dos microRNAs miR-221, miR-222, e miR-21 em meningiomas graus I e II e correlacionar a expressão desses microRNAs com o mecanismo de angiogênese através da expressão gênica do VEGF-A e com o mecanismo de apoptose através da expressão gênica da SURVIVIN. Como controle foram utilizadas amostras de aracnóide de pacientes submetidos a cirurgia de aneurisma. As quantificações foram realizadas pelo método de PCR em tempo real. Os meningiomas grau I e II apresentam menor expressão do microRNA-21 e do microR-221 quando comparado com o grupo controle. A expressão do microRNA-222 foi maior nos meningiomas grau I em relação ao grupo controle. Os meningiomas grau I e grau II apresentaram maior expressão do gene VEGF-A e SURVIVIN em relação ao grupo controle. Estes resultados sugerem o envolvimento do mecanismo de angiogênese e apoptose pelos genes VEGF-A e SURVIVIN. Não houve correlação entre a expressão dos microRNAs e dos genes estudados com os parâmetros clínicos gênero, raça e localização tumoral.

### **PERFIL DE EXPRESSÃO DOS microRNAs: miR-21, miR-221 E miR-222 EM GLIOBLASTOMAS E OLIGODENDROGLIOMAS E A SUA CORRELAÇÃO COM OS MECANISMOS DE ANGIOGÊNESE E APOPTOSE**

**Ludmilla Costa Veloso de Aguiar**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Junior

Dissertação de Mestrado apresentada em 23/05/2011

O Glioblastoma multiforme (GBM) é o mais comum dos tumores cerebrais primários, acometendo cerca de 50-55% dos gliomas em adultos, e seu pico de incidência é de aproximadamente 65 anos de idade. Apesar de cirurgia, quimioterapia



e radioterapia, os GBMs são sempre fatais, com uma média de sobrevida menor que um ano e podendo chegar a 5 anos em 10% dos casos. O processo da angiogênese é a maior característica das células cancerosas, sendo os glioblastomas os maiores tumores angiogênicos. A cascata de angiogêneses ocorre provavelmente em resposta a hipóxia, iniciando a produção do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e de outros fatores pró-angiogênicos. O processo de apoptose também é grande importância nos tumores cerebrais, visto que sua ausência favorece a progressão e o crescimento tumoral. Os MicroRNAs (miRNA) são pequenos RNAs não codificadores de proteína, contendo aproximadamente de 18 a 24 nucleotídeos que regulam a expressão gênica em nível pós-transcricional, por degradação de RNA mensageiro (RNAm). Mais de 400 miRNAs foram identificados no genoma humano, mas a relevância da maior parte deles a processos fisiológicos e patológicos permanece incerta. A superexpressão de miRNA pode levar a uma regulação inibitória da função de genes supressores de tumor, bem como a diminuição da expressão de miRNA pode estimular a atividade da oncogênese. O objetivo deste estudo foi quantificar a expressão dos microRNAs MiR-221, miR-222, e miR-21 em glioblastomas e correlacionar a expressão desses microRNAs com o mecanismo de angiogênese através da expressão do VEGF-A e mecanismo de apoptose através da expressão da SURVIVIN. Os pacientes com diagnóstico de glioblastoma apresentam maior expressão do microRNA-21 e microRNA-222 quando comparado com o grupo controle. A expressão do microRNA-221 não foi diferente entre os grupos estudados. Os pacientes com diagnóstico de glioblastoma e oligodendroglioma apresentaram maior expressão do gene VEGF-A em relação ao grupo controle. O gene *SURVIVIN* apresentou menor expressão no grupo controle do que nos pacientes com diagnóstico glioblastoma. Estes resultados sugerem o envolvimento do mecanismo de angiogênese pelo gene *VEGF-A* em glioblastomas e oligodendrogliomas, e com o mecanismo de apoptose pelo gene *SURVIVIN* em glioblastomas. A possível relação com o mecanismo de angiogênese também pode ser constatada pelo aumento da expressão do miR-222 em glioblastomas. Assim como a hiperexpressão dos miR-21 e miR-222 reforçam a possível ligação do mecanismo de apoptose na formação dos glioblastomas. Não houve correlação entre a expressão dos microRNAs miR-21, miR-221 e miR-222 e os genes *VEGF-A* e *SURVIVIN* com os parâmetros clínicos gênero e raça.

## **ESTIMATIVA DA PERDA DA FUNÇÃO HEPATOCELULAR POR CINTILOGRAFIA NUCLEAR EM MODELO DE CIRROSE HEPÁTICA EXPERIMENTAL INDUZIDA POR CCL4**

**Zailton Bezerra de Lima Junior**

Orientador: Prof. Dr. Ajith Kumar Sankarankutty

Tese de Doutorado apresentada em 27/05/2011

A determinação pré-operatória da função hepatocelular em cirurgia hepática é crucial para o sucesso destes procedimentos, especialmente em portadores de cirrose hepática. A cintilografia nuclear é um método de diagnóstico disponível em nosso ambiente de estudo que permitiria fornecer uma estimativa da função hepatocelular. O objetivo deste estudo foi verificar se a cintilografia nuclear é capaz de estimar a redução/perda da função hepatocelular em ratos com cirrose experimental com CCl<sub>4</sub>, comparando o padrão de captação e excreção hepática do radiofármaco DISIDA obtidos neste grupo com os encontrados em ratos saudáveis de laboratório submetidos a graus progressivos de ressecção hepática. Foram utilizados 105 ratos divididos em dois grupos: no primeiro grupo, 25 animais foram divididos em cinco grupos e submetidos à ressecção hepática progressiva (controle, 30%, 50%, 70% e 90%) e no segundo grupo, 80 animais foram subdivididos em grupos de cinco animais e submetidos à indução de cirrose hepática pela administração semanal de CCl<sub>4</sub>. Foram medidos no soro de todos os grupos as bilirrubinas totais, desidrogenase láctica (DHL) e transaminases (ALT e AST). O fígado e o baço foram pesados e submetidos ao exame histológico em animais tratados com CCl<sub>4</sub>. Observamos níveis elevados de AST, ALT, LDH nos animais submetidos à hepatectomia de 70 e 90%, enquanto nos animais submetidos à cirrose, os níveis aumentaram nos animais a partir da 12ª semana. A cintilografia nuclear mostrou retardo da captação e excreção do radiofármaco nos animais submetidos à hepatectomia 90% e naqueles com cirrose histologicamente estabelecida (a partir da 12ª semana). A cintilografia nuclear em animais cirróticos permite a distinção entre os indivíduos com função hepática preservada daqueles com deterioração funcional grave, mas não ajuda no rastreamento de disfunções hepatocelulares iniciais, identificando apenas extremos de lesão hepática os extremos de danos no fígado, sugerindo possuir boa especificidade embora com baixa sensibilidade.

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM TECIDO HEPÁTICO REGENERADO

**Daniel Bonini**

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

Tese de Doutorado apresentada em 30/05/2011

Terapia fotodinâmica é uma opção terapêutica loco - regional no tratamento de doenças neoplásicas capaz de induzir a morte do tecido doente. O melhor entendimento dos mecanismos e das respostas celulares à terapia fotodinâmica (TFD) dá credibilidade à técnica e à sua difusão como opção confiável de tratamento. Atualmente aplicações seriadas fazem parte dos protocolos de tratamento por TFD, por assegurarem mais confiabilidade ao tratamento, mas também permitem a regeneração do tecido na área tratada entre as aplicações e nem sempre esse tecido regenera-se com as mesmas características do tecido inicial, como é o caso de aplicações em pele e tecido hepático. Através do modelo de regeneração hepática procurou-se caracterizar a aplicação de terapia fotodinâmica em tecido hepático regenerado de ratos, através da avaliação profundidade de necrose, do acompanhamento por fluorescência do processo regenerativo e da farmacocinética do fotossensibilizador (FS). Para os experimentos de profundidade de necrose e farmacocinética foram utilizados 60 ratos, subdivididos em 6 grupos (CO = controle e A, B, C, D e E com 1, 3, 7, 14 e 21 dias de hepatectomia parcial (HP)), para o acompanhamento da regeneração hepática por fluorescência foram utilizados 55 ratos subdivididos em 11 grupos (CO = controle e A, B, C, D, E, F, G, H, I e J com 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 144, 192 e 360 horas pós HP respectivamente). Nos experimentos de necrose houve diferença significativa, com diminuição da profundidade de necrose nos grupos B e C em comparação ao grupo controle. Nos experimentos de farmacocinética, houve um atraso no pico de concentração do FS e diminuição da concentração do FS no tecido regenerado em geral. E nos experimentos do acompanhamento por fluorescência da regeneração hepática obteve-se concordância com os eventos regenerativos, até o período de 200h, quando então a fluorescência sugere uma nova fase de atividade celular que estende-se até o período de 350h pós HP. Os resultados mostraram que o tecido hepático regenerado é diferente do tecido hepático normal principalmente nos dias que se seguem à HP, refletindo diretamente na diminuição da eficiência da TFD. Essa diminuição pode estar relacionada com fatores celulares de maior tolerância ao stress oxidativo induzido pela TFD, às alterações da arquitetura e vascularização do tecido regenerado, ou ainda uma combinação desses fatores. Uma vez caracterizada essa diferença sugere-se, em aplicações seriadas, a utilização de parâmetros dosimétricos compensatórios, sendo necessário outros estudos para definição desses parâmetros.

## SUPERÓXIDO DISMUTASE QUIMÉRICA HUMANA NA PREVENÇÃO DA LESÃO RENAL POR HIPÓXIA E REOXIGENAÇÃO. ESTUDO *in vitro*

**Eduardo Varella Gewehr**

Orientador: Prof. Dr. Silvio Tucci Junior

Tese de Doutorado apresentada em 30/06/2011

**Objetivos:** Validar o modelo de lesão por hipóxia e reoxigenação de células LLCKP1 e avaliar o efeito da superóxido dismutase quimérica humana (cSOD) na lesão provocada por estresse oxidativo. **Materiais e métodos:** Culturas da linhagem de células epiteliais tubulares renal LLC-PK1 foram incubadas em uma câmara selada e expostas à hipóxia por 8 horas e reoxigenação por 12 horas. Grupos pré tratados com cSOD e SOD (superóxido dismutase) bovina foram comparados com controles. A medição da dosagem de desidrogenase láctica foi usada como parâmetro de injúria celular. A morte celular foi avaliada com o ensaio de exclusão do azul de tripano e a viabilidade celular com o ensaio com cristal de violeta. Os marcadores imunofluorescentes anexina V e iodeto de propídio foram utilizados para determinar necrose ou apoptose celular. **Resultados.** O ensaio de toxicidade mostrou redução estatisticamente significativa da injúria celular no grupo cSOD 15U/ml quando comparado com o controle ( $0,650 \pm 0,170$  x  $0,927 \pm 0,20$  DP  $p < 0,05$ ). O teste de exclusão do azul de tripano mostrou efeito protetor da cSOD nas doses de 5 e 15U/ml ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ , respectivamente). Os marcadores fluorescentes determinaram um maior índice de necrose no grupo submetido à hipóxia e reoxigenação (HR) do que no grupo pré-tratado com cSOD. **Conclusões.** Os resultados demonstram que modelo de isquemia e reperfusão utilizado é válido para determinação da lesão renal *in vitro*. A superóxido dismutase quimérica humana previne injúria por estresse oxidativo no modelo proposto.

## Clínica Médica

### **AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL, ÓXIDO NÍTRICO E BIG ENDOTELINA-1 EM IDOSOS HIPERTENSOS COM E SEM A SÍNDROME DA APNÉIA E HIPOPNÉIA OBSTRUTIVA DO SONO**

**Iara Felício Anunciato**

Orientadora: Profa. Dra. Nereida Kilza da Costa Lima

Dissertação de Mestrado apresentada em 10/05/2011

O propósito deste estudo foi avaliar, em idosos hipertensos sem Síndrome da Apnéia Hipopnéia Obstrutiva do Sono (SAHOS) e com SAHOS moderada à grave, a pressão arterial (PA), a saturação de oxigênio (Sat O<sub>2</sub>), os níveis de Big endotelina-1 (Big ET-1) e óxido nítrico (NO), o número de despertares e microdespertares (NDM) na polissonografia (PSG), além do Questionário Clínico de Berlin (QB) e Escala de Sonolência de Epworth (ESE). Os voluntários permaneceram internados por 24 horas. Obteve-se o índice de massa corpórea (IMC), a monitorização ambulatorial da PA de 24h (MAPA), o QB, a ESE, e medicamentos em uso. Foi coletado sangue arterial para dosagem da concentração plasmática do NO (nitrito e nitrito) e da Big ET-1, às 19 horas e às 7 horas da manhã seguinte. A oximetria de pulso foi realizada durante o sono. Análise estatística: teste "t" de Student não pareado, Coeficientes de correlação de Pearson ou Spearman, teste exato de Fischer e análise de variância univariada. Foram estudados 25 hipertensos com SAHOS (grupo 1) e 12 sem SAHOS (grupo 2), com idade de  $67,0 \pm 6,5$  e  $67,8 \pm 6,8$ . Não houve diferença dos IMC, horas de sono, NO, PA sistólica (PAS) e diastólica de 24h, durante a vigília e sono, descenso da PA no sono e número de medicamentos para o controle da PA entre os grupos. Somente o QB discriminou os grupos ( $p=0,048$ ), no entanto com sensibilidade de 76% e especificidade de 58,3%. Na PSG, o número de apnéia e hipopnéia (NAH) foi de  $140,2 \pm 66,0$  (1) e  $17,3 \pm 11,0$  (2) ( $p<0,001$ ), o índice de apnéia e hipopnéia (IAH) foi de  $29,0 \pm 13,7$  (1) e  $3,1 \pm 1,6$  (2) e o NDM foi de  $259,7 \pm 133,9$  (1) e  $90,9 \pm 47,4$  (2) ( $p<0,001$ ). A Sat O<sub>2</sub> durante o sono diferiu entre grupos ( $p<0,001$ ). O NO plasmático às 19h e 7h e a Big ET-1 às 19h não foram diferentes, havendo maior Big ET-1 às 7h no grupo 1 ( $p = 0,03$ ). Analisando todos os indivíduos, observou-se correlação negativa entre o IMC e a Sat O<sub>2</sub> mínima e média ( $p=0,007$ ,  $r = -0,44$  e  $p=0,008$ ,  $r = -0,43$ , respectivamente). Maior IMC correlacionou-se com maior NDM ( $p=0,002$ ,  $r=0,51$ ). No grupo com SAHOS, observou-se correlação negativa entre a Sat O<sub>2</sub> média com a PAS de 24h ( $p=0,03$ ,  $r = -0,44$ ) e com a Big ET-1 ( $p=0,04$ ,  $r = -0,41$ ). Verificamos correlação entre Big ET-1 (19h) com a PAS média das 19h ( $p=0,04$ ,  $r=0,42$ ) e com o NAH ( $p=0,03$ ,  $r = 0,44$ ) e Big ET-1 (7h) com o NAH ( $p=0,04$ ,  $r=0,42$ ). Houve também correlação entre NDM e IMC ( $p=0,01$ ,  $r = 0,50$ ). Concluindo, quando comparamos idosos hipertensos com SAHOS e sem SAHOS com níveis de PA e IMC semelhantes, observou-se maior Big ET-1 após o sono no grupo com SAHOS. Somente neste grupo, menor Sat O<sub>2</sub> média correlacionou-se com maior PA de 24h e com maior Big ET-1. Além disso, a Big ET-1 correlacionou-se com o NAH. O QB discriminou os grupos, mas apresentou sensibilidade e especificidades inadequadas.

### **A ECOCARDIOGRAFIA BIDIMENSIONAL NA AVALIAÇÃO INICIAL DE PACIENTES COM DOR TORÁCICA E SUSPEITA DE SÍNDROMES CORONARIANAS AGUDAS NO SERVIÇO MÉDICO DE EMERGÊNCIA**

**Thiago Florentino Lascala**

Orientador: Prof. Dr. Benedito Carlo Maciel

Tese de Doutorado apresentada em 19/05/2011

Dor torácica é uma das principais queixas que levam pessoas aos Serviços Médicos de Emergência (SME). A estratificação tradicional de risco resulta em uma porcentagem de pacientes inadequadamente avaliados e liberados. O ecocardiograma é uma ferramenta potencialmente útil neste contexto. Este trabalho buscou avaliar o impacto da realização do ecocardiograma na admissão de pacientes referenciados ao SME de um hospital terciário, com suspeita de Síndromes Coronarianas Agudas (SCA), sua associação com a sobrevida e com a taxa de intervenções coronárias percutâneas (ICP). Também se buscou conhecer quais os fatores que levam o médico assistente a mais frequentemente solicitar o ecocardiograma.

**Métodos:** Foram analisados 735 pacientes com dor torácica como sintoma principal, encaminhados com suspeita clínica de SCA. Em 409 pacientes (Grupo I) o ecocardiograma foi realizado na admissão, com avaliação da função sistólica global e regional. Os pacientes que não realizaram o exame formaram o Grupo II. Os pacientes foram seguidos por 12 meses.

Dados clínicos, demográficos e laboratoriais referentes aos fatores de risco tradicionais compuseram um banco de dados.

**Resultados:** O ecocardiograma foi realizado em 55,7% dos pacientes. O Grupo I (2,9/10.000; IC95% 2,0;3,9) teve uma taxa de mortalidade não ajustada menor do que o Grupo II (4,9/10.000; IC95% 3,6;6,4) (*logrank test*  $p=0.01$ ). A diferença persistiu significativa mesmo após o ajuste para uma série de variáveis relativas ao risco cardiovascular (HR 0,50 - IC95% 0,31;0,82). O fato de ter realizado o ecocardiograma associou-se a uma maior chance de ser levado à ICP, naqueles pacientes com SCA sem supra de ST (2,57- IC95% 1,23;5,37). A fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) confirmou-se como preditor independente de mortalidade, mesmo após análise multivariada (HR 0.78 - IC95% 0,65;0,92) e teve valor incremental sobre a estratificação tradicional de risco (24,0 x 31,1 global *chi-square*;  $p<0.05$ ).

**Conclusões:** A realização do ecocardiograma na chegada de pacientes com dor torácica e suspeita de SCA, referenciados ao SME de um hospital terciário, associou-se significativamente a maior sobrevida aos 30 dias e aos 12 meses e também a maior taxa de ICP entre os pacientes com SCA sem supra de ST. A FEVE comprovou sua importância como preditor de risco, com valor incremental à estratificação tradicional. É possível que a informação da função sistólica global e regional, quando conhecida logo na chegada, direcione os médicos a uma conduta mais agressiva.

### USO DO LAVADO BRONCOALVEOLAR NO MANEJO DE PACIENTES COM SUSPEITA DE PNEUMONIA ASSOCIADA À VENTILAÇÃO MECÂNICA

**Gil Cezar Alkimim Teixeira**

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar Moriguti

Dissertação de Mestrado apresentada em 24/05/2011

A pneumonia associada à ventilação mecânica (PAVM) é definida por quadro infeccioso pulmonar desenvolvido em paciente submetido à ventilação mecânica invasiva (VMI) por no mínimo 48 horas, ou que foi extubado há menos de 48 horas. O principal objetivo deste estudo foi avaliar a influência do lavado broncoalveolar (LBA) no manejo de pacientes com suspeita de pneumonia associada à ventilação mecânica em pacientes internados no Centro de Terapia Intensiva. A variável primária de estudo foi o diagnóstico microbiológico de PAVM a partir do LBA no período avaliado. As variáveis secundárias foram: mudanças de condutas após a realização de LBA, microbiota encontrada nos LBAs de pacientes críticos < 60 anos com pacientes  $\geq$  60 anos e aspecto da secreção encontrada no LBA. Foram estudados 81 pacientes críticos que foram submetidos à LBA devido a suspeita de PAVM. Os pacientes foram divididos por faixa etária em 2 subgrupos de análise: grupo I (pacientes < 60 anos) e grupo II (pacientes  $\geq$  60 anos). Após a realização do LBA, observou-se a troca do antibiótico em 26 pacientes (32,09%), retirada de antibiótico em 14 pacientes (17,28%), tratamento de outro foco infeccioso em 7 pacientes (8,6%), associação de outro antibiótico em quatro pacientes (4,93%), e manutenção de conduta em 27 casos (33,7%). Os pacientes com LBA negativo obtiveram percentuais significativamente superiores de achados broncoscópicos normais (18,8% versus 2%), e pacientes com resultado de LBA positivo obtiveram percentuais significativamente superiores de achado com secreção purulenta (42,9% versus 15,6%). Conclui-se que o uso do LBA realizado por meio da broncoscopia consiste em ferramenta fundamental no manejo de pacientes com suspeita de PAVM demonstrando mudanças de condutas em até 63% dos pacientes estudados. A microbiota encontrada na população idosa ( $\geq$ 60 anos) foi semelhante à encontrada em pacientes mais jovens (<60 anos), com exceção para *Staphylococcus aureus*. Existe correlação significativa e positiva entre o aspecto da secreção encontrada e o crescimento de microorganismos.

### FENÓTIPO ÓSSEO NO HIPOPARATIREOIDISMO PRIMÁRIO: AVALIAÇÃO DENSITOMÉTRICA, MORFOMÉTRICA E BIOQUÍMICA

**Maira Lupateli Mendonça**

Francisco José Albuquerque de Paula

Dissertação de Mestrado apresentada em 25/05/2011

O paratormônio (PTH) é o principal hormônio regulador da homeostase do cálcio; sua ação no tecido ósseo é complexa podendo resultar tanto em efeito anabólico como catabólico. Por outro lado, estudos prévios mostram que no hipoparatiroidismo primário (hPTP) ocorre aumento ou manutenção de massa óssea, porém não existem dados sobre

qualidade óssea nem predisposição à fratura, nesta condição. Adicionalmente, não existem dados sobre o impacto do hPTP sobre o osso mandibular. Os objetivos deste estudo foram avaliar: a densidade mineral óssea (DMO) em sítios alvo clássicos de osteoporose, a ocorrência de fratura subclínica em coluna lombar, a estrutura mandibular por radiografia panorâmica, os níveis séricos de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina, albumina, PTH, osteocalcina, ligante do receptor ativador do fator nuclear kapa B (RANK-L), osteoprotegerina, fator 1 de crescimento insulina símile (IGF-1) e níveis urinários de deoxipiridinolina. Foram avaliadas 16 mulheres com hPTP (GhPTP) e 17 mulheres saudáveis (GC). Os dois grupos foram pareados quanto à idade, peso e altura. Entre os parâmetros bioquímicos houve diferença estatística apenas quanto aos níveis de cálcio total, cálcio corrigido por albumina (GhPTP =  $8,04 \pm 1,05$  / GC =  $9,55 \pm 0,82$  mg/dl;  $p < 0,002$ ), albumina (GhPTP =  $4,23 \pm 0,18$  / GC =  $4,41 \pm 0,24$  g/dl;  $p < 0,02$ ), fósforo inorgânico (GhPTP =  $4,85 \pm 0,98$  / GC =  $3,98 \pm 0,67$  mg/dl;  $p < 0,006$ ), osteocalcina (GhPTP =  $6,75 \pm 2,36$  ng/ml; GC =  $9,64 \pm 2,54$ ;  $p < 0,0005$ ) e PTH (GhPTP =  $5,9 \pm 4,63$  / GC =  $41,96 \pm 18,72$  pg/ml;  $p < 0,01$ ). Não houve diferença significativa entre os valores de DMO em L1-L4 (GhPTP =  $1,090 \pm 0,26$  / GC =  $0,970 \pm 0,15$  g/cm<sup>2</sup>;  $p = 0,2$ ), colo do fêmur (GhPTP =  $0,860 \pm 0,15$  / GC =  $0,820 \pm 0,10$  g/cm<sup>2</sup>;  $p = 0,6$ ), e quadril total (GhPTP =  $0,950 \pm 0,16$  / GC =  $0,960 \pm 0,14$  g/cm<sup>2</sup>;  $p = 0,8$ ). Porém, a DMO no 1/3 distal do antebraço foi significativamente menor nos pacientes com hPTP (GhPTP =  $0,570 \pm 0,09$  / GC =  $0,630 \pm 0,07$  g/cm<sup>2</sup>;  $p < 0,05$ ). Na análise de morfometria vertebral, apenas 02 indivíduos do GC apresentaram alterações compatíveis com fratura subclínica, enquanto que no GhPTP 10 pacientes apresentaram este padrão morfométrico. Em sintonia com os resultados de DMO, os dados obtidos no exame de morfometria mandibular mostraram que a espessura cortical da região do mento foi significativamente menor no GhPTP, enquanto que na região de predomínio trabecular o GhPTP apresentou maior massa óssea. Em conjunto, os resultados obtidos neste estudo mostram que o hPTP altera significativamente o tecido ósseo, ocorrendo diferença quanto ao impacto sobre o osso cortical e trabecular. Enquanto sítios que apresentam predomínio de osso cortical (1/3 distal de antebraço e cortical mandibular) exibem perda de massa óssea, o inverso ocorre nas regiões onde há predomínio de osso trabecular (coluna lombar e mandíbula). No entanto, a avaliação radiográfica de coluna dorsal/lombar revelou elevada frequência de fratura morfométrica em coluna vertebral. Outros estudos deverão ser realizados para avaliar determinantes de alterações de qualidade óssea no hipoparatiroidismo primário.

## FATORES DE RISCO NA TRANSMISSÃO DO VÍRUS DA HEPATITE C NO MUNICÍPIO DE CATANDUVA-SP: UM ESTUDO CASO-CONTROLE

**Ricardo Santaella Rosa**

Orientadora: Profa. Dra. Ana de Lourdes Candolo Martinelli  
Tese de Doutorado apresentada em 21/06/2011

O vírus da hepatite C é transmitido principalmente por contato com sangue de paciente infectado. Outras formas de transmissão como sexual e vertical podem ser possíveis, porém com risco menor e nem sempre bem definidos, além do que, há porcentagem significativa de portadores do vírus cuja forma de contato não é identificada. O presente estudo tem como objetivo avaliar os possíveis fatores de risco na transmissão do HCV em uma cidade de porte médio, na região noroeste do estado de São Paulo.

**Material e Método:** Desenvolvido estudo caso-controle, com o grupo caso constituído por 190 pacientes registrados no Programa Municipal, até dezembro de 2007, acima de 18 anos de idade, residentes no município de Catanduva e que apresentaram RNA-HCV detectado por PCR no sangue periférico. O grupo controle foi constituído por 190 pessoas que apresentaram sorologia negativa para infecção pelo vírus da hepatite C e pelo vírus de imunodeficiência humana no sangue periférico. Os grupos foram pareados (1:1) segundo gênero, faixa etária (mais ou menos cinco anos) e local de moradia. Dos 190 pacientes (grupo caso), 141 eram monoinfectados pelo HCV e 49 coinfectados por HCV-HIV. Todos os participantes foram submetidos ao mesmo questionário estruturado e assinaram termo de consentimento esclarecido. A análise estatística dos dados foi realizada por regressão logística condicionada bruta e ajustada, com resultados expressos em *odds ratio* com intervalo de confiança de 95%.

**Resultados e Discussão:** Entre todos os participantes houve predomínio do sexo masculino (68,9%) e a média de idade foi de 47,1 anos para o grupo de pacientes e 47,3 anos para o grupo controle. Mostraram associação com transmissão do HCV, na análise univariada, história de hepatite prévia, contato sexual com paciente com hepatite, antecedente de internação em instituição penal, antecedente de internação em hospital psiquiátrico, contato com sangue em atendimento de terceiros, transfusão de sangue até 1993, acidentes com seringas e/ou agulhas, tatuagens, contato domiciliar e/ou

sexual com usuário de drogas ilícitas, uso de drogas ilícitas não injetáveis, uso de cocaína não injetável e/ou crack, uso de maconha, uso de medicamentos injetáveis no passado, uso de preservativo com parceiros fixos e histórico de doenças sexualmente transmissíveis. Após regressão logística condicional ajustada mostraram-se fator de risco para infecção pelo HCV, para o total de participantes: transfusão de sangue até 1993 (OR=11,59 / IC95%=3,07-43,68); acidente com seringas e/ou agulhas (OR=8,56 / IC95%=1,05-69,47); tatuagens (OR=7,55 / IC95%=1,75-32,52); uso de drogas não injetáveis (OR=11,17 / IC95%=3,66-34,07) e uso de medicamentos injetáveis no passado (OR=2,06 / IC95%=1,11-3,84). Para os monoinfectados, mostraram associação com a infecção pelo HCV: transfusão de sangue até 1993 (OR=14,97 / IC95%=2,98-75,37); acidentes com seringas e/ou agulhas (OR=13,96 / IC95%=1,44-135,42); compartilhamento de objetos perfurocortantes (OR=2,50 / IC95%=1,12-5,61); tatuagens (OR=9,83 / IC95%=1,26-76,85) e uso de drogas não injetáveis (OR=20,31 / IC95%=4,71-87,51). Para os coinfetados HCV-HIV, as variáveis contato sexual com paciente com hepatite, antecedente de internação em instituição penal, antecedente de tatuagem, contato domiciliar com usuário de drogas ilícitas, relação sexual com usuários de drogas ilícitas, uso de drogas ilícitas não injetáveis, uso de cocaína e/ou crack e antecedente de doenças sexualmente transmissíveis, apresentaram associação com a infecção viral, na análise univariada. Porém, após a regressão logística ajustada as associações não foram confirmadas. Ressalta-se, entretanto que o número reduzido de participantes desse subgrupo dificultou a análise comparativa dos dados.

**Conclusões:** Conclui-se que, na casuística analisada, a transmissão do vírus da hepatite C pela via sanguínea está bem caracterizada, entretanto persistem dúvidas no modo de aquisição do vírus em parcela significativa de pacientes. Outras formas de contato com sangue e/ou secreções humanas são passíveis de transmissão do vírus, mas provavelmente ocorrem em menor frequência.

## Farmacologia

### EFEITO DUAL DA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE TOXINA PERTUSSIS NA NOCICEPÇÃO

**Rafael Poloni**

Orientador: Prof. Sérgio Henrique Ferreira

Dissertação de Mestrado apresentada em 04/05/2011

A toxina pertussis (PTX) é extremamente utilizada como ferramenta farmacológica de inibição das proteínas Gi e G<sub>0</sub>, por exemplo, em estudos de mecanismo de ação de drogas antinociceptivas. A injeção intratecal de PTX provoca sinais hipernociceptivos comparados aos de síndromes neuropáticas em ratos e em camundongos. Todavia, há um estudo em que a injeção intraplantar (i.pl.) de PTX previne a hipernocicepção mecânica provocada pela injeção i.pl. de PGE<sub>2</sub> em ratos. Mediante esta divergência na literatura, o presente trabalho investigou o efeito da injeção i.pl. de PTX (0,01 - 1 µg.pata<sup>-1</sup>) na nocicepção e na inflamação, assim como na hipernocicepção evocada pela injeção i.pl. de PGE<sub>2</sub> (100 ng.pata<sup>-1</sup>). A injeção i.pl. da PTX, em doses baixas (0,1 - 0,15 µg.pata<sup>-1</sup>), bloqueia a hipernocicepção evocada pela injeção i.pl. de PGE<sub>2</sub> em ratos, o que foi confirmado em camundongos (0,03-0,1 µg.pata<sup>-1</sup>). O pré-tratamento i.pl. com inibidores seletivos da óxido nítrico (NO) sintase (l-NOARG), guanilato ciclase (ODQ), proteína quinase G (KT5823) ou bloqueador de canais de potássio (K<sup>+</sup>) sensíveis ao ATP (glibenclamida) preveniu o efeito antinociceptivo desencadeado pela PTX sobre a hipernocicepção mecânica evocada pela injeção i.pl. de PGE<sub>2</sub>, confirmando dados previamente mostrados pelo nosso grupo. Entretanto, se a dose da injeção i.pl. de PTX é aumentada (0,3 - 1 µg.pata<sup>-1</sup>), os ratos apresentam hipernocicepção mecânica, confirmada em camundongos (0,6 - 1 µg.pata<sup>-1</sup>), e edema, que são dependentes da migração de neutrófilos e do aumento da síntese/liberação de citocinas pró-inflamatórias para o local da injeção. Estes efeitos foram parcialmente prevenidos pelo pré-tratamento com injeção intravenosa de fucoidina ou intraplantar de indometacina, atenolol ou dexametasona. O pós-tratamento com morfina i.pl. impediu a hipernocicepção mecânica evocada pela PTX. Além disso, o pré-tratamento com inibidores da adenilato ciclase, da proteína quinase (PK) A ou da PKC também preveniu a hipernocicepção mecânica provocada pela PTX. Camundongos mutantes para receptores toll-like-4 (TLR4) e deficientes para molécula adaptadora MyD88 não apresentaram hipernocicepção mecânica e migração de neutrófilos provocadas pela injeção i.pl. de PTX, quando comparados aos seus respectivos animais selvagens. O presente trabalho demonstrou que a injeção i.pl. de PTX em baixas doses, através da ativação da via Arginina/NO/PKG/canais de K<sup>+</sup> dependentes do ATP, impede a hipernocicepção mecânica induzida pela injeção i.pl. de PGE<sub>2</sub>. Entretanto, em doses maiores, a injeção i.pl. de PTX é capaz

de provocar uma resposta inflamatória, com indução de hipernociceção mecânica, edema, migração de neutrófilos e síntese/liberação de mediadores inflamatórios. A hipernociceção mecânica parece depender de via de sinalização que envolve a adenilato ciclase/ proteína quinase (PK) A e PKC. A hipernociceção mecânica e a migração de neutrófilos provocadas pela injeção i.pl. da PTX dependem dos receptores toll-like 4, bem como da molécula MyD88.

## **ESTUDO NEUROFARMACOLÓGICO DA INTERAÇÃO ENTRE CIRCUITOS CANABINOIDES E OPIOIDES DA SUBSTÂNCIA NEGRA, PARTE RETICULADA, SOBRE A ATIVIDADE DA VIA GABAÉRGICA NIGRO-TECTAL, E DE SEU PAPEL NA MODULAÇÃO DA ANALGESIA INDUZIDA PELO MEDO INATO**

**Juliana Almeida da Silva**

Orientador: Prof. Norberto Cysne Coimbra.

Dissertação de Mestrado apresentada em 20/05/2011

Existe um grande interesse científico voltado para a busca das bases neuropsicofarmacológicas dos comportamentos que têm sido associados ao medo e ao pânico. Muitos estudos sugerem o teto mesencefálico (TM) como responsável pelo controle de respostas defensivas elaboradas durante situações de perigo iminente. A substância cinzenta periaquedutal (SCP), as camadas profundas do colículo superior (cpCS) e o colículo inferior (CI) têm sido considerados importantes estruturas na elaboração do medo inato e do comportamento de defesa, assim como na organização da antinociceção induzida pelo medo inato. Contudo, muitos estudos têm implicado a via neostriado-nigro-TECTAL no controle de respostas defensivas elaboradas no mesencéfalo dorsal, permeadas pela interação entre vias opioides e GABAérgicas. O presente trabalho tem por objetivo o estudo neurofarmacológico da anatomia conectiva funcional entre a substância negra (SN) e estruturas do TM, como a SCP e as cpCS, ligadas à organização do comportamento relacionado ao medo e à elaboração de processos antinociceptivos, avaliando-se o envolvimento da interação entre os sistemas opioide e canabinoide e a via nigro-TECTAL GABAérgica na modulação do comportamento de defesa e da antinociceção induzida pelo medo evocado pela microinjeção de antagonista GABAérgico no *continuum* compreendido pela coluna dorsolateral da SCP e pelas cpCS. Com esse propósito, foram estudados os efeitos de microinjeções de agonistas e de antagonistas de receptores opioides ou canabinoides não-seletivos e seletivos na substância negra, parte reticulada (SNpr), sobre a antinociceção que segue as diversas respostas comportamentais evocadas por microinjeções de bicuculina na SCPdl/cpCS de *Rattus norvegicus* (*Rodentia, Muridae*). O presente trabalho mostrou que a microinjeção do antagonista de receptores GABAA, bicuculina no TM, induziu comportamentos defensivos, elaborados concomitantemente com processos antinociceptivos, a interação entre vias opioides e aquelas mediadas por endocanabinoides SNpr modula o comportamento de defesa organizado no mesencéfalo dorsal sem alteração na antinociceção induzida pelo medo. O pré-tratamento na substância negra, parte reticulada com agonistas opioides e canabinoides aumentou os limiares nociceptivos e a microinjeção de antagonistas opioides e canabinoides, causou redução dos limiares nociceptivos. Esses dados sugerem uma interação entre vias opioides e endocanabinoides da SNpr, na modulação do comportamento que tem sido relacionado ao medo inato e a ataques de pânico, sendo recrutados receptores endocanabinoides do tipo CB1 e CB2 do mesencéfalo ventral, ao lado de receptores opioides do tipo  $\mu$ 1 e na modulação de vias GABAérgicas de projeção nigro-TECTAL.

## **Fisiologia**

### **PARTICIPAÇÃO DO FATOR LIBERADOR DE CORTICOTROFINA E OCITOCINA NA HIPOFAGIA INDUZIDA PELA ADRENALECTOMIA**

**Ernane Torres Uchôa**

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

Tese de Doutorado apresentada em 11/04/2011

Os glicocorticóides possuem importantes efeitos na ingestão alimentar, como demonstrada pela redução da ingestão alimentar após a adrenalectomia (ADX). Os sinais de saciedade são transmitidos ao núcleo do trato solitário (NTS), que possui projeções recíprocas com os núcleos arquea do (ARC) e paraventricular (PVN) do hipotálamo. Dessa forma, o

objetivo do presente trabalho foi avaliar a participação dos neuropeptídeos hipotalâmicos na hipofagia induzida pela adrenalectomia. Assim, foram avaliados os efeitos da adrenalectomia e da reposição com glicocorticóide na ativação de neurônios e expressão de neuropeptídeos no PVN e ARC em resposta à realimentação. Também foram avaliados os efeitos do prétratamento com o antagonista do receptor do fator de liberação de corticotrofina (CRF) tipo 2 (Antisauvagine-30, AS30) e com o antagonista do receptor de ocitocina (OT) (Vasotocina, OVT) na ingestão alimentar em ratos adrenalectomizados (ADX). Além disso, também foi estudado o efeito da AS30 na ativação de neurônios do NTS em resposta à alimentação em animais ADX. Adicionalmente, foram avaliadas as projeções ocitocinérgicas do PVN para o NTS após adrenalectomia. Para tanto, a imunorreatividade para Fos, Fos-CRF e Fos-OT foi verificada no PVN e para Fos no ARC. A expressão do RNAm para CRF e OT foi avaliada no PVN e de proopiomelanocortina (POMC), neuropeptídeo Y (NPY) e proteína relacionada ao agouti (AgRP) no ARC. Houve uma redução na ingestão alimentar no grupo ADX, quando comparada aos animais *sham* e ADX+ corticosterona (B). O número de neurônios imunorreativos a Fos, Fos-CRF e Fos-OT no PVN e Fos no ARC estavam aumentados após a realimentação, com maior número no grupo ADX, comparado aos grupos *sham* e ADX+B. A ADX aumentou a expressão do RNAm de OT no PVN tanto na condição de jejum como de realimentação. Comparado ao grupo *sham*, a ADX aumentou a expressão do RNAm de CRF no PVN em animais jejuados, sendo este efeito potencializado pela realimentação. Houve um aumento do RNAm de POMC no ARC em animais ADX realimentados, quando comparados aos grupos ADX em jejum, *sham* e ADX+B realimentados. Além disso, houve uma redução na expressão do RNAm de NPY e AgRP no ARC do grupo ADX em jejum, quando comparado aos animais *sham* e ADX+B em jejum. A expressão do RNAm de NPY e AgRP no ARC foi reduzida pela realimentação nos grupos *sham* e ADX+B, comparados à condição de jejum, não havendo efeito nos animais ADX. Tanto o prétratamento com AS30 como com OVT não afetou a ingestão alimentar dos grupos *sham* e ADX+B; no entanto ambos reverteram a hipofagia no grupo ADX. Nos animais pré-tratados com veículo, a realimentação aumentou o número de neurônios imunorreativos a Fos e Fos-tirosina hidroxilase (TH) no NTS nos três grupos experimentais, com maior número de neurônios nos animais ADX. Tal como seus efeitos na ingestão alimentar, o prétratamento com AS30 no grupo ADX também reverteu a maior ativação de neurônios do NTS induzida pela realimentação, não tendo efeito nos animais *sham* e ADX+B. Tal como em animais *sham*, foram observadas projeções ocitocinérgicas do PVN para o NTS após adrenalectomia. Os presentes dados indicam que a adrenalectomia reduz a ingestão alimentar, associada à maior ativação de neurônios do ARC, neurônios CRF e OT do PVN em resposta à alimentação. A ADX também aumentou a expressão do RNAm de POMC no ARC, CRF e OT no PVN, e reduziu o RNAm de NPY e AgRP no ARC. Finalmente, o antagonista do receptor de CRF do tipo 2 aboliu o efeito anorexígeno e a maior ativação neuronal do NTS em resposta à alimentação em animais ADX, e o antagonista do receptor de OT também reverteu a hipofagia induzida pela ADX. Desta forma, estes dados sugerem que os neurônios do ARC e PVN contribuem para a hipofagia induzida pela ADX, modulando as respostas de saciedade no tronco cerebral, sendo estes efeitos mediados pelo CRF e OT.

## MECANISMOS INTRACELULARES ENVOLVIDOS NA AÇÃO DOS INIBIDORES SELETIVOS DA FOSFODIESTERASE DO AMPc NO METABOLISMO DE PROTEÍNAS EM MÚSCULOS ESQUELÉTICOS DE RATOS NORMAIS E SÉPTICOS

**Eduardo Carvalho Lira**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes

Tese de Doutorado apresentada em 15/04/2011

Embora estudos anteriores de nosso laboratório tenham demonstrado que o tratamento experimental *in vivo* com inibidores não seletivos da fosfodiesterase (PDE) do AMPc seja efetivo na atenuação do catabolismo protéico muscular, o mecanismo molecular envolvido com este efeito ainda permanece desconhecido. Portanto, o objetivo desse trabalho foi investigar o efeito *in situ* e *in vitro* dos inibidores seletivos da PDE do AMPc no metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos de ratos normais e sépticos.

Em estudos de microdialise, a perfusão *in situ* do músculo tibial anterior de ratos adultos normais com o rolipram (10-3M), um inibidor seletivo da PDE4, aumentou transitoriamente o fluxo sanguíneo muscular (40%) e reduziu o catabolismo protéico (70%).

Estes efeitos não foram observados em músculos perfundidos com anrinona (inibidor seletivo da PDE 3) ou dipiridamol (inibidor seletivo da PDE 5, 7 e 11). Em experimentos com músculos isolados de ratos jovens normais, o rolipram (10-3M) *in vitro* aumentou a concentração muscular de AMPc (90%) e reduziu a proteólise total nos músculos



extensor longo dos dedos (EDL, 50%) e soleus (30%). O dipiridamol (10-3M) reduziu a degradação total de proteínas em ambos os músculos (20%), enquanto que a anrirona não alterou a proteólise total. O efeito antiproteolítico exercido pelo rolipram não foi associado ao aumento da fosforização da Akt, mas foi parcialmente bloqueado pelo Rp-8-Br-cAMP, um inibidor da proteína quinase dependente do AMPc (PKA).

O rolipram *in vitro* reduziu a atividade proteolítica lisossomal (64%), dependente de cálcio (45%) e Ubiquitina-Proteassoma (UbP; 31%) em músculos soleus e apenas do sistema UbP (~50%) em músculos EDL de ratos normais. Para investigar os mecanismos moleculares envolvidos com a inibição do sistema UbP induzida pelo rolipram em condições basais e atroficas, a expressão do RNAm das Ub-ligases (E3s), atrogina-1 e MuRF-1, assim como de genes autofágicos (LC3 e GABARAP) foram analisados em músculos EDL de ratos alimentados e jejuados por 2 dias incubados na presença de rolipram (10-3M). O rolipram reduziu a expressão do gene da atrogina-1 (55%) e GABARAP (70%) em músculos de animais alimentados. O jejum aumentou a expressão gênica da atrogina-1 (4,5 vezes), MuRF-1 (6,5 vezes) e LC3 (3,5 vezes), mas não afetou GABARAP, enquanto o rolipram reduziu a hiperexpressão da atrogina-1, MuRF-1 e LC3 e bloqueou completamente a expressão da GABARAP induzida pelo jejum.

O presente trabalho também mostra que o rolipram *in vitro* foi capaz de reduzir a velocidade da síntese proteica basal em ambos os músculos estudados (~30%), enquanto que o dibutiril AMPc (DBAMPc), um análogo sintético do AMPc, foi capaz de aumentá-la em músculos soleus (~30%) e reduzi-la em EDL (~20%).

A sepse foi induzida pela manobra de ligadura e punção do ceco (CLP) e as alterações do metabolismo de proteínas foram estudadas após 3 e 16h. O estado séptico, após 3h, não alterou a síntese proteica, mas aumentou a atividade proteolítica do sistema lisossomal e dependente de Ca<sup>2+</sup> tanto em soleus como em EDL. Durante este período, tanto a atividade do sistema proteolítico UbP como a expressão gênica e o conteúdo da atrogina-1 não foram alterados pela sepse. Após 16h, foi observada atrofia muscular em EDL (12%), a qual foi acompanhada pela maior atividade dos sistemas lisossomal (120%), dependente de Ca<sup>2+</sup> (220%) e UbP (105%). O rolipram reduziu a hiperatividade dos sistemas proteolíticos lisossomal e UbP em músculos de animais sépticos e sham, mas não exerceu nenhum efeito sobre o sistema dependente de Ca<sup>2+</sup>. Além disso, o rolipram atenuou o aumento da expressão da MuRF-1 (60%) e LC3 (45%) e suprimiu completamente a expressão da GABARAP induzida pela sepse. Em músculos soleus, a sepse aumentou a proteólise lisossomal (~90%) e dependente de Ca<sup>2+</sup> (~60%), mas não induziu atrofia. O tratamento *in vitro* com rolipram reduziu a atividade proteolítica do sistema UbP em músculos soleus de animais sham (50%) e sépticos (30%).

Nossos resultados sugerem que o aumento do AMPc induzido pela inibição farmacológica da PDE4 no músculo esquelético e o mecanismo pelo qual a degradação de proteínas (vias autofágica/lisossomal e proteossomal) e a expressão de genes relacionados a atrofia são reduzidas em situações basais e catabólicas, sendo este efeito provavelmente mediado pela PKA. Portanto, a inibição da PDE4 pode representar uma alternativa terapêutica no combate a perda de massa muscular, durante a infecção sistêmica.

## O PAPEL DOS NUCLEOTÍDEOS CÍCLICOS GMP E AMP NAS RESPOSTAS HEMODINÂMICAS OBTIDAS APÓS ADMINISTRAÇÃO INTRATECAL DE SILDENAFIL CITRATO EM RATOS ACORDADOS”

**Gabriela Bombarda**

Orientador: Prof. Dr. Helio Cesar Salgado

Dissertação de Mestrado apresentada em 29/04/2011

Estudo prévio de nosso laboratório demonstrou que a administração intracerebroventricular (icv) de sildenafil citrato em ratos *Wistar* acordados promove um aumento na atividade simpática lombar e aumento na frequência cardíaca (FC) sem promover alterações significativas na pressão arterial (PA). Acredita-se que estas alterações hemodinâmicas observadas tenham sido provocadas por ação do sildenafil citrato em regiões supra-espinhais, como também, por ação na medula espinhal através da ativação dos neurônios pré-ganglionares simpáticos. Sabe-se que o sildenafil citrato aumenta os níveis de GMPc intracelulares pela inibição da fosfodiesterase do tipo 5 (PDE-5) e também pode aumentar os níveis intracelulares de AMPc por meio da inibição de outras fosfodiesterases (PDEs), específicas para AMPc, quando utilizadas doses diferentes da droga. Portanto, o objetivo deste estudo foi examinar, e comparar, em ratos acordados, as respostas hemodinâmicas após inibição da PDE5 espinhal por meio da administração intratecal de diferentes doses de sildenafil citrato, 8-bromo-GMPc (um análogo do GMPc), forskolina (um ativador direto da enzima adenilato ciclase) e dibutiril-AMPc (um análogo do AMPc). As respostas hemodinâmicas observadas após administração intratecal dos compostos anterior-

mente citados foram: 1) sildenafil citrato causou um aumento de PA e FC dose-dependente; 2) doses crescentes de 8-bromo-GMPc não alteraram PA e FC; 3) forskolina não promoveu alterações na PA, porém aumentou a FC; 4) dibutilil-AMPc produziu aumento de PA e FC similarmente à resposta de observada após a maior dose utilizada de sildenafil citrato. Assim, os achados deste estudo sugerem que as respostas cardiovasculares obtidas pela administração intratecal de sildenafil citrato em ratos acordados estão sendo mediadas pelo nucleotídeo cíclico AMP e não pelo nucleotídeo cíclico GMP.

## EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO FRIO NO METABOLISMO DE PROTEÍNAS EM MÚSCULOS ESQUELÉTICOS DE RATOS

**Leandro Henrique Manfredi**

Orientadora: Profa. Dra. Isis do Carmo Kettelhut

Dissertação de Mestrado apresentada em 16/05/2011

Trabalhos anteriores de nosso laboratório demonstraram que as catecolaminas exercem um tônus inibitório na degradação de proteínas no tecido muscular esquelético de roedores. Assim, este trabalho teve por objetivo estudar um modelo *in vivo* em que a atividade do SNS se encontra elevada e, por conseguinte, apresenta um aumento nas concentrações plasmáticas das catecolaminas, a fim de verificar o papel destas moléculas no metabolismo de proteínas em músculo esquelético de rato. A exposição de ratos machos *Wistar* (~80g) por 3, 6, 12 e 24 horas ao frio foi o modelo escolhido uma vez que é bem descrito na literatura a hiperativação simpática ocasionada pela exposição de animais homeotérmicos à baixas temperaturas. Além desta alteração, o frio promove no organismo outros ajustes fisiológicos que podem também interferir no metabolismo de proteínas musculares.

Ao analisar o perfil hormonal destes animais expostos ao frio, foi observado o aumento nas concentrações plasmáticas de catecolaminas após 3, 6 e 12 horas e, após 24 horas, as concentrações plasmáticas de insulina estavam diminuídas e as de corticosterona e hormônios tireoidianos claramente aumentadas.

O estudo da liberação de tirosina para o meio de incubação *in vitro* de músculos *soleus* e *extensor digitorum longus* (EDL) de animais expostos ao frio mostrou um aumento na degradação de proteínas após 6 horas no *soleus* e após 12 horas no EDL, sendo que este aumento perdurou em ambos os músculos até 24 horas. Neste último período de exposição, a via dependente de ubiquitina-proteassoma teve sua atividade aumentada tanto no *soleus* quanto no EDL, mas um aumento proeminente de 3x na atividade do sistema proteolítico dependente de cálcio foi apenas observado no EDL.

Este claro aumento da atividade do sistema dependente de cálcio no EDL pode ser atribuído, pelo menos em parte, a um aumento de 98% na expressão da forma autolisada da  $\gamma$ -calpaína após 24 horas de exposição à baixa temperatura. Por outro lado, no *soleus*, este sistema proteolítico ficou inalterado. O aumento observado de 37% no conteúdo da calpastatina neste músculo, a qual inibe a atividade da calpaína, poderia explicar a ausência de alteração na atividade da via proteolítica dependente de cálcio.

Após 24 horas de exposição ao frio, a fosforilação de Akt encontrou-se reduzida em 30% no *soleus* e 67% no EDL, como era esperado devido à queda dos níveis plasmáticos de insulina. A menor fosforilação de Akt neste período refletiu também em uma menor fosforilação de FOXO em ambos os músculos e isso provavelmente levou a um aumento no conteúdo proteico de MAFbx/Atrogina-1 e MuRF1 em torno de 2 a 3 vezes em ambos os músculos, podendo então explicar a atividade aumentada da via proteolítica dependente de ubiquitina-proteassoma.

Ainda cirurgia de adrenalectomia (ADM) e consequente exposição ao frio por 24 horas foi realizada para investigar o papel das catecolaminas neste modelo. Foi interessante o achado do aumento adicional da proteólise no *soleus* de animais expostos ao frio e submetidos à ADM. A atividade da via dependente de cálcio, que em animais normais expostos ao frio não teve nenhuma alteração, foi a principal responsável pelo aumento adicional na proteólise nos animais ADM e expostos à 4°C. Estes dados reforçam a ideia de que as catecolaminas exercem um tônus inibitório na musculatura esquelética, especialmente em músculos oxidativos, principalmente por inibir a atividade do processo proteolítico dependente de cálcio.

A exposição à baixa temperatura por um curto período promoveu ajustes fisiológicos que culminaram no aumento da degradação de proteínas em músculos esqueléticos de ratos, provavelmente decorrente da ação preponderante dos hormônios catabólicos, como corticosterona e hormônios tireoidianos, embora as catecolaminas pareçam ter um papel importante impedindo a perda de proteínas principalmente em músculos oxidativos de ratos submetidos ao frio.

## **PARTICIPAÇÃO DO FATOR LIBERADOR DE CORTICOTROFINA NOS EFEITOS DO ESTRADIOL NO CONTROLE DA HOMEOSTASE ENERGÉTICA**

**Paula Beatriz Marangon**

Orientadora: Profa. Dra. Lucila Leico K. Elias

Dissertação de Mestrado apresentada em 16/05/2011

A homeostase energética é controlada por fatores neurais, endócrinos, adipocitários e intestinais. O sistema nervoso central (SNC) recebe sinalização de fatores periféricos e exerce uma função fundamental no controle da homeostase energética, estando bem estabelecido que existem populações neuronais hipotalâmicas que expressam neuropeptídeos que medeiam efeitos específicos na ingestão e/ou gasto energético. O fator liberador de corticotrofina (CRF), além de seus efeitos no controle da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, tem sido descrito como potente neuropeptídeo anorexígeno, modulando a ingestão alimentar e o gasto energético. Foi observado que a síntese de CRF é influenciada pela leptina, que atuaria aumentando a ativação de neurônios produtores de CRF no núcleo paraventricular (PVN). Os hormônios gonadais também participam na regulação da ingestão alimentar, do peso e da composição corporal. O efeito anorexígeno do estradiol é mediado pela ativação de receptores presentes nas áreas envolvidas no controle da homeostase energética. Em trabalho prévio de nosso laboratório foi observado que o menor ganho de peso e ingestão alimentar com o tratamento com estradiol em ratas ovariectomizadas está associado à maior expressão de RNAm de CRF no PVN. Dessa forma, este trabalho visa esclarecer a participação do CRF nos efeitos do estradiol no controle da homeostase energética. Para tanto, foram utilizadas ratas *Wistar* adultas, pesando entre 200-230g, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto – USP. Todos os animais foram submetidos à cirurgia de ovariectomia bilateral. Em todos os experimentos, houve três grupos de animais: ratas ovariectomizadas (OVX), ratas ovariectomizadas com reposição de estradiol (OVX+E) e ratas ovariectomizadas com dieta pareada ao grupo OVX+E (OVX+DP). Durante os oito dias de cada experimento, estes animais receberam injeção subcutânea de cipionato de estradiol (10µg/Kg peso corporal, Grupo OVX+E) ou veículo (óleo de milho: 0,2 mL/rata, Grupos OVX e OVX+DP) entre 8h e 10h. Para avaliarmos a participação do CRF nos efeitos da leptina nos animais castrados com e sem reposição de estradiol, foi realizado o tratamento com injeção central de leptina (10µg/5µL) com e sem injeção central prévia de antagonista de CRF (antisauvagina-30). Observamos que o tratamento com cipionato de estradiol causou a redução na ingestão alimentar e no ganho de peso corporal. Ainda, quando realizamos a administração central de leptina houve hipofagia, perda de peso corporal, aumento na expressão da proteína desacopladora do tipo 1 (UCP-1) no tecido adiposo marrom (BAT) e na ativação neuronal no núcleo arqueado (ARQ). Esses efeitos foram revertidos quando realizamos administração central prévia do antagonista de CRF-R2. Os dados obtidos sugerem que o estradiol aumenta a sensibilidade à leptina, sendo este efeito mediado, pelo menos em parte, pelo receptor tipo 2 do CRF.

## **PARTICIPAÇÃO DO MONÓXIDO DE CARBONO CENTRAL NA LIBERAÇÃO DE VASOPRESSINA, OCITOCINA E DO PEPTÍDEO NATRIURÉTICO ATRIAL EM RESPOSTA A EXPANSÃO DO VOLUME EXTRACELULAR**

**Luis Fernando Matos Bastianini**

Orientador: Prof. Dr. José Antunes-Rodrigues

Dissertação de Mestrado apresentada em 20/05/2011

Diversas evidências apontam para a participação do óxido nítrico (NO) como um importante neuromodulador central em diferentes mecanismos celulares e moleculares.

Dados da literatura mostram que a enzima sintase de óxido nítrico (NOS), responsável pela síntese de NO, está presente em várias regiões no sistema nervoso central (SNC), inclusive nos núcleos paraventricular (PVN) e supra-óptico (SON), responsáveis pela síntese de vasopressina (AVP) e ocitocina (OT). A presença da enzima heme oxigenase (HO), responsável pela síntese de monóxido de carbono (CO), também foi caracterizada em neurônios dos núcleos PVN e SON, sendo que a coexistência das enzimas NOS e HO numa mesma população neuronal dos núcleos PVN e SON sugere uma relação entre os dois sistemas na modulação de eventos neuroendócrinos, como a síntese e secreção hormonal. Neste estudo, verificamos a participação do monóxido de carbono central no controle da secreção dos hormônios neuro-hipofisários AVP e OT, bem como do peptídeo natriurético atrial (ANP), em resposta a expansão isotônica (I-EVE) ou hipertônica (H-EVE) do volume do líquido extracelular, bem como sua correlação com a excreção urinária de água e

eletrólitos. Para tanto, utilizamos ratos *Wistar* portadores de cânula no ventrículo lateral direito, pela qual foi administrado o inibidor da HO-1 (ZnDPBG) ou seu veículo e, trinta minutos após, por meio de cânulas colocadas previamente na veia jugular externa, foi induzida a I-EVE ou H-EVE, seguida da coleta sanguínea ou urinária. Nossos resultados demonstram que, em animais pré-tratados com veículo, ambos os tipos de EVE determinaram aumento na concentração plasmática de AVP, OT e ANP, bem como no volume e excreção urinária de sódio. Por outro lado, a inibição da HO com ZnDPBG determinou uma diminuição significativa da secreção de ANP e OT, bem como no volume e na natriurese de animais submetidos tanto à I4 quanto à H-EVE. Também foi verificado neste estudo que os animais previamente tratados com veículo e submetidos à H-EVE apresentaram uma diminuição significativa na concentração plasmática de nitrato, um metabólito do NO, quando comparados aos valores encontrados para o grupo não submetido à EVE. Os animais previamente tratados com o inibidor da HO-1 e submetidos a H-EVE, por outro lado, apresentaram uma elevação na concentração plasmática de nitrato, quando comparados ao seu respectivo grupo veículo. Entretanto, não observamos alterações significativas na concentração plasmática de nitrato entre os animais tratados com veículo e ZnDPBG no grupo sem EVE, bem como em resposta à I-EVE. A análise qualitativa dos dados imunistoquímicos sugere ainda que a prévia administração de ZnDPBG diminui o sinal fluorescente para NOS neuronal (NOSn) no SON de todos os grupos tratados com o inibidor da HO-1, sugerindo que os sistemas nitrérgico e do CO possam estar interagindo na modulação da atividade de neurônios OTérgicos e AVPérgicos. Assim, nossos resultados demonstram que a administração *in vivo* de um inibidor da HO-1 pode reduzir a produção endógena de CO, sendo este um importante neuromodulador responsável pela estimulação da liberação de OT e ANP em resposta à H-EVE. A queda da concentração de CO pode elevar a atividade da NOSn, induzindo maior formação de NO, que, por sua vez, inibe a produção/secreção de AVP e OT, relacionadas com a redução da diurese e aumento da natriurese induzidos pelo mesmo estímulo.

## PAPEL DO NÚCLEO OSCURO DA RAFE E DA REGIÃO VENTROLATERAL CAUDAL DO BULBO NA QUIMIORRECEPÇÃO CENTRAL AO CO<sub>2</sub>/PH

**Glauber dos Santos Ferreira da Silva**

Orientador: Prof. Dr. Mogens Lesner Glass

Tese de Doutorado apresentada em 22/06/2011

### **Estudo nº 1: Núcleo obscuro da rafe e respostas ventilatórias e térmicas durante hipercapnia e hipóxia.**

Várias regiões do tronco encefálico tem sido reconhecidas como quimiorreceptores centrais, incluindo a região da rafe bulbar. No entanto, o papel específico do núcleo obscuro da rafe (ROb), sobre as respostas ventilatórias e de térmicas induzidas pela hipercapnia e hipóxia ainda não são bem conhecidas, assim como o possível envolvimento dos neurônios serotoninérgicos (5-HT) do ROB na interação entre quimiorrecepção central e periférica.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar o papel do ROB e seus neurônios 5-HT na resposta ventilatória e térmica durante a hipercapnia e hipóxia, assim como estudar seu envolvimento na interação entre quimiorrecepção central e periférica, em ratos não anestesiados. Foi realizado o procedimento de lesão química não-específica utilizando ácido ibotênico (IBO). Para lesão química específica dos neurônios 5-HT foi utilizada a droga anti-SERT-SAP, em animais com corpúsculo carotídeo (CB) intacto e animais com remoção do CB (CBR). Para o grupo controle foi utilizado PBS (controle do IBO) e IgG-SAP (controle do anti-SERT-SAP). Ventilação pulmonar (VE), a temperatura corporal (Tc) e gasometria arterial foram avaliados antes, durante e após à exposição à hipercapnia (30 min, 7% CO<sub>2</sub>) e hipóxia (1 h, 7% O<sub>2</sub>). A lesão química do ROb com IBO ou anti-SERT-SAP não alterou a VE e a Tc basal. Por outro lado, a resposta ventilatória a hipercapnia foi atenuada. A sensibilidade ao CO<sub>2</sub> também foi reduzida após os procedimentos de lesão no ROb. A lesão específica para 5-HT combinada com a CBR causou uma redução da VE à hipercapnia (- 31,2%) maior do que a soma de ambos tratamentos isolados (somente lesão central: - 12,3% ou somente CBR: - 5,5%). Em todos os grupos experimentais houve queda da Tc induzida pela hipercapnia ou hipóxia, porém não houveram diferenças entre os grupos com ou sem lesão. Durante a hipóxia, não houveram alterações das respostas ventilatórias em nenhum dos grupos estudados. Os dados do presente estudo indicam que os neurônios 5-HT do Rob desempenham um papel na quimiorrecepção central, e pode ser uma região importante na interação (atuação interdependente) entre quimiorreceptores centrais e periféricos.

### **Estudo nº 2: Papel da área de Loeschcke na quimiorrecepção central ao CO<sub>2</sub>/pH.**

A quimiorrecepção central, o processo de detecção do CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> no sistema nervoso central (SNC) com efeitos sobre a ventilação, foi inicialmente localizada em duas áreas na região ventrolateral do bulbo (VLM), uma rostral (rVLM), conhecida como área de Mitchell (área M), e outra caudal (cVLM) conhecida como área de Loeschcke (área L). Estudos

que descreveram estas regiões foram realizados por meio de aplicação superficial de soluções ácidas em animais anestesiados. Recentemente, grande ênfase tem sido dada às regiões rostrais, com destaque para o núcleo retrotrapezoide (RTN), que corresponde a área M, e pouco se conhece a respeito da região caudal, a área L, em termos de quimiorrecepção central.

O procedimento de acidificação em regiões do tronco encefálico, tem sido utilizado para estudar regiões rostrais quimiorreceptoras como o RTN e a rafe bulbar e que operam de maneira dependente do estado de alerta do animal (vigília e sono). A técnica de microdiálise reversa com líquido artificial (aCSF) equilibrado com CO<sub>2</sub> (25%CO<sub>2</sub>) tem sido utilizada para induzir acidificação da região de interesse (com a acidose comparável àquela induzida pelo aumento de 6, 6 mmHg na PCO<sub>2</sub> arterial). O presente estudo teve como objetivo testar se a acidificação da região caudal do bulbo, que corresponde a área L, induz aumentos na VE, e em caso positivo, se este ocorre de maneira dependente do estado de alerta do animal, como observado anteriormente em outras regiões testadas. Foram implantadas sondas de microdiálise na região de interesse (cVLM), e os animais foram divididos de acordo com sua resposta ventilatória à acidificação. Nos animais responsivos, os quais a maioria das sondas estavam localizadas na região sobreposta à área Loeschcke, a VE aumentou em média 17% apenas no estado de vigília, mas não durante.

#### **Estudo nº 1: Núcleo obscuro da rafe e respostas ventilatórias e térmicas durante hipercapnia e hipóxia.**

Várias regiões do tronco encefálico tem sido reconhecidas como quimiorreceptores centrais, incluindo a região da rafe bulbar. No entanto, o papel específico do núcleo obscuro da rafe (ROb), sobre as respostas ventilatórias e de térmicas induzidas pela hipercapnia e hipóxia ainda não são bem conhecidas, assim como o possível envolvimento dos neurônios serotoninérgicos (5-HT) do ROB na interação entre quimiorrecepção central e periférica.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar o papel do ROB e seus neurônios 5-HT na resposta ventilatória e térmica durante a hipercapnia e hipóxia, assim como estudar seu envolvimento na interação entre quimiorrecepção central e periférica, em ratos não anestesiados. Foi realizado o procedimento de lesão química não-específica utilizando ácido ibotênico (IBO). Para lesão química específica dos neurônios 5-HT foi utilizada a droga anti-SERT-SAP, em animais com corpúsculo carotídeo (CB) intacto e animais com remoção do CB (CBR). Para o grupo controle foi utilizado PBS (controle do IBO) e IgG-SAP (controle do anti-SERT-SAP). Ventilação pulmonar (VE), a temperatura corporal (Tc) e gasometria arterial foram avaliados antes, durante e após à exposição à hipercapnia (30 min, 7% CO<sub>2</sub>) e hipóxia (1 h, 7% O<sub>2</sub>). A lesão química do ROB com IBO ou anti-SERT-SAP não alterou a VE e a Tc basal. Por outro lado, a resposta ventilatória a hipercapnia foi atenuada. A sensibilidade ao CO<sub>2</sub> também foi reduzida após os procedimentos de lesão no ROB. A lesão específica para 5-HT combinada com a CBR causou uma redução da VE à hipercapnia (- 31,2%) maior do que asoma de ambos tratamentos isolados (somente lesão central: - 12,3% ou somente CBR: - 5,5%). Em todos os grupos experimentais houve queda da Tc induzida pela hipercapnia ou hipóxia, porém não houveram diferenças entre os grupos com ou sem lesão. Durante a hipóxia, não houveram alterações das respostas ventilatórias em nenhum dos grupos estudados. Os dados do presente estudo indicam que os neurônios 5-HT do Rob desempenham um papel na quimiorrecepção central, e pode ser uma região importante na interação (atuação interdependente) entre quimiorreceptores centrais e periféricos.

#### **Estudo nº 2: Papel da área de Loeschcke na quimiorrecepção central ao CO<sub>2</sub>/pH.**

A quimiorrecepção central, o processo de detecção do CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> no sistema nervoso central (SNC) com efeitos sobre a ventilação, foi inicialmente localizada em duas áreas na região ventrolateral do bulbo (VLM), uma rostral (rVLM), conhecida como área de Mitchell (área M), e outra caudal (cVLM) conhecida como área de Loeschcke (área L). Estudos que descreveram estas regiões foram realizados por meio de aplicação superficial de soluções ácidas em animais anestesiados. Recentemente, grande ênfase tem sido dada às regiões rostrais, com destaque para o núcleo retrotrapezoide (RTN), que corresponde a área M, e pouco se conhece a respeito da região caudal, a área L, em termos de quimiorrecepção central.

O procedimento de acidificação em regiões do tronco encefálico, tem sido utilizado para estudar regiões rostrais quimiorreceptoras como o RTN e a rafe bulbar e que operam de maneira dependente do estado de alerta do animal (vigília e sono). A técnica de microdiálise reversa com líquido artificial (aCSF) equilibrado com CO<sub>2</sub> (25%CO<sub>2</sub>) tem sido utilizada para induzir acidificação da região de interesse (com a acidose comparável àquela induzida pelo aumento de 6, 6 mmHg na PCO<sub>2</sub> arterial). O presente estudo teve como objetivo testar se a acidificação da região caudal do bulbo, que corresponde a área L, induz aumentos na VE, e em caso positivo, se este ocorre de maneira dependente do estado de alerta do animal, como observado anteriormente em outras regiões testadas. Foram implantadas sondas de microdiálise na região de interesse (cVLM), e os animais foram divididos de acordo com sua resposta ventilatória à acidificação. Nos animais responsivos, os quais a maioria das sondas estavam localizadas na região sobreposta à área Loeschcke, a VE aumentou em média 17% apenas no estado de vigília, mas não durante o período de sono. Esses dados apóiam a hipótese de que quimiorrecepção central pode ser uma propriedade distribuída, com algumas regiões funcionando durante a vigília e outras durante o sono. o período de sono. Esses dados apóiam a hipótese de que quimiorrecepção central pode ser uma propriedade distribuída, com algumas regiões funcionando durante a vigília e outras durante o sono.

## Genética

### **PAPEL DE NOTCH E NF-KB NA REGULAÇÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO DURANTE A DIFERENCIAÇÃO *IN VITRO* DE CÉLULAS T A PARTIR DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOÉTICAS CD34+**

**Josiane Lilian dos Santos Schiavinato**

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci

Dissertação de Mestrado apresentada em 01/04/2011

Em estudos anteriores desenvolvidos por este grupo de pesquisa uma expressão mais elevada de alvos transcricionais e componentes da via NF-kB, bem como altos níveis de NOTCH1, foi identificada em células-tronco hematopoéticas (CTH) CD34+ de sangue de cordão umbilical (SCU) quando comparadas às CTH CD34+ de medula óssea (MO). Este grupo verificou ainda, por comparação das células CD34+ com as CD133+ (mais primitivas) que diversos fatores de transcrição (FT) envolvidos com o potencial de hemangioblasto, com a autorenovação das CTH, e com a diferenciação linfóide; como: RUNX1/AML1, GATA3, USF1, TAL1/SCL, HOXA9 e HOXB4 apresentaram-se mais expressos em células mais primitivas. A potencial participação das vias Notch e NF-kB na regulação destes FT tem importância conceitual e prática no entendimento da biologia das CTH, e dos processos envolvidos na diferenciação destas células. Com isto em vista, este projeto teve como objetivo, estudar o papel da via NF-kB e da via Notch na regulação destes FT. Para isso, um modelo experimental *in vitro*, de diferenciação de CTH CD34+ em linfócitos T, foi utilizado e a influência de fatores agonistas e inibidores farmacológicos destas vias, foram avaliados por citometria de fluxo e PCR em tempo real. Nossos resultados evidenciam o papel da via Notch na regulação transcricional de HOXB4 e GATA3 em células-tronco hematopoéticas CD34+ humanas, o que foi confirmado com base na expressão dos alvos diretos de Notch (HEY1 e HES1). Notamos ainda, que a expressão dos transcritos HES1, GATA3 e HOXB4 é prejudicada pela síntese protéica das CTH, uma vez que quando empregamos o prétratamento com a droga CHX há aumento da transcrição dos mesmos. Também podemos inferir que a ação do TNF- $\alpha$  é positiva sobre esses transcritos, já que quando o utilizamos há elevação do nível de expressão desses transcritos, com exceção a HES1. Em relação ao cocultivo das CTH com as células estromais de camundongos, verificamos que apenas a linhagem OP9-DL1 detém a capacidade de promover a diferenciação celular T, e isso foi comprovado pelo surgimento de células comprometidas com a linhagem linfocítica T, através da presença dos marcadores de superfície específico CD7+ e CD1a+. Esses resultados auxiliarão na compreensão dos mecanismos moleculares de regulação transcricional envolvidos não apenas na diferenciação de linfócitos T, mas também na manutenção de um estado mais primitivo das CTH. Este conhecimento pode vir a contribuir com o desenvolvimento ou otimização de protocolos laboratoriais visando à expansão de CTH ou geração de células T para usos terapêuticos.

### **AS ROTAS DE DISPERSÃO DA *Drosophila buzzatii* NA AMÉRICA DO SUL**

**Mateus Henrique Santos**

Orientadora: Profa. Dra. Maura Helena Manfrim

Tese de Doutorado apresentada em 01/04/2011

*Drosophila buzzatii* é uma espécie cactófila associada a diferentes espécies de cactos e distribuída nos diferentes Domínios fitogeográficos da América do Sul. Baseado na diversidade de inversões cromossômicas e densidade populacional, o Chaco foi considerado por alguns autores como o "centro de origem" da espécie. Entretanto, trabalhos recentes, utilizando aloenzimas e DNA mitocondrial, apontaram para uma possível origem na Caatinga. Os objetivos deste trabalho foram delinear rotas de dispersão da espécie para explicar sua distribuição atual e possível distribuição durante o último período glacial, na América do Sul. Foram obtidas sequências de 714 pb da COI do mtDNA de 132 indivíduos em 44 localidades, gerando 36 haplótipos. Foram calculados os índices de diversidade nucleotídica, o teste "AMOVA", testes de neutralidade, a "Mismatch Distribution", "Baesian Skyline Plot", "NCPA" e o sentido dos movimentos migratórios (Migrate N) a fim de determinar parte da história evolutiva da espécie. As diversidades nucleotídicas encontradas por Domínio foram de 0,0030 - Caatinga; 0,0019 - Mata Atlântica; 0,0020 - Cerrado; 0,0011 - Pampas e 0,0004 - Chaco. A AMOVA mostrou que 68,33% da variação é intra-populacional e que uma porção significativa da variação é devido a diferenças inter-regionais ( $\chi^2 = 0,07124$   $p = 0,00196$ ). Os testes de Neutralidade ( $D$  de Tajima = -2,4150,  $p = 0,0317$  e  $F_s$  de Fu = -28,6719,  $p = 0,00001$ ), a forma em estrela da rede e haplótipos, e a "Mismatch Distribution" confirmam um evento de expansão

populacional estimado em aproximadamente 494.257,3 anos atrás, segundo modelo de Rogers e Harpending (1992). Entretanto, a "Baesian Skiline Plot" demonstrou que esse movimento de expansão parece ser mais antigo, cerca de 550.000 - 650.000 anos atrás. A NCPA demonstrou que há fluxo gênico restrito com isolamento por distância, confirmado pelo teste de Mantel e alguma dispersão a longa distância em alguns dos clados analisados. O resultado do programa "Migrate N" indicou um padrão complexo migratório entre os domínios, porém um padrão norte/sul pôde ser verificado. A estruturação genética pode ser explicada devido à grande área de distribuição da espécie, gerando isolamento por distância e pela presença de barreiras geográficas e climáticas (entre o Cerrado e a Caatinga) e no estado do Rio de Janeiro e Espírito Santo (ao longo da Mata Atlântica) onde há pouco ou nenhum indivíduo da espécie. Os eventos de expansão ocorreram no Quaternário durante o período glacial conhecido como Illinoian e suas subdivisões. A partir dos resultados deste trabalho foi possível traçar diversas rotas de migração possíveis entre os domínios utilizados, sendo que o movimento mais antigo partiu da Caatinga o que vai contra a hipótese de que o "Centro de Origem" seja o Chaco.

### QUANTIFICAÇÃO DE CÓPIAS DO GENE AR POR PCR EM TEMPO REAL EM PACIENTES COM SÍNDROME DE TURNER

**Flávia Gaona de Oliveira Gennaro**

Orientadora: Profa. Dra. Ester Silveira Ramos

Dissertação de Mestrado apresentada em 08/04/2011

A síndrome de Turner (ST) é uma doença multissistêmica com grande variabilidade de expressão fenotípica e está associada à monossomia total ou parcial do cromossomo X. Apesar do cariótipo 45,X ser o mais prevalente, há uma hipótese de que as pacientes com este cariótipo apresentem mosaicismos cromossômicos. A detecção do cromossomo Y em pacientes com disgenesia gonadal está relacionada com o desenvolvimento de gonadoblastoma. O diagnóstico laboratorial da ST é realizado por análise citogenética, mas técnicas moleculares se mostraram eficazes na detecção de mosaicismos crípticos e na determinação da origem de cromossomos com alterações estruturais. Neste trabalho, foi analisado o DNA extraído a partir de amostras de sangue periférico de 43 pacientes com estigmas de ST com diferentes cariótipos (45,X[100]; com cromossomos marcadores, em anel e isocromossomos; e mosaicos) para exclusão de sequências específicas (genes *SRY*, *TSPY* e *DAZ*), por meio de PCR convencional; avaliação da presença de um segundo cromossomo X e de inativação do cromossomo X ao acaso ou preferencial pelo teste de HUMARA, e detecção do número de cópias do cromossomo X por meio de quantificação por PCR em tempo real utilizando uma sequência do éxon 5 do gene *AR*. Também foram avaliados 23 indivíduos (12 homens e 11 mulheres) como grupo controle. Todas as pacientes foram negativas para a presença de cromossomo Y. Pelo teste de HUMARA, em 17,9% das pacientes 45,X foi detectado um segundo cromossomo X, por essa técnica também foram identificados três pacientes com inativação preferencial do cromossomo X (duas com isocromossomo e uma com cromossomo em anel). A PCR em tempo real para o gene *AR* foi informativa para 60,4% das pacientes. A sequência do gene *AR* foi útil principalmente nos casos onde a linhagem 45,X encontrava-se em grande número. Nos casos de isocromossomo, a adição de um marcador molecular de Xp, como sequências do gene *SHOX*, podem completar a análise para resultados mais fidedignos. Testes moleculares, como a detecção de sequências Y-específicas por PCR, o teste de HUMARA e a PCR em tempo real pode ser utilizada na triagem e na complementação da análise citogenética para a detecção precoce da ST auxiliando a equipe médica a iniciar tratamento adequado e prevenção de alterações associadas à síndrome.

### CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO PACC DO DERMATÓFITO *Trichophyton rubrum*: REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM RESPOSTA AO pH AMBIENTE E NA INTERAÇÃO COM MOLÉCULAS DO HOSPEDEIRO

**Rodrigo Anselmo Cazzaniga**

Orientadora: Profa. Dra. Nilce Maria Martinez Rossi

Tese de Doutorado apresentada em 08/04/2011

Os dermatófitos são patógenos que se desenvolvem em substratos queratinizados, causando dermatofitoses ou tineas. A infecção se deve, entre outros fatores, à capacidade dos conídios aderirem e invadirem o tecido hospedeiro, utilizando os nutrientes presentes neste ambiente, os quais são degradados pela ação de enzimas proteolíticas secretadas. A regulação desta maquinaria metabólica é governada pelo sensoriamento do pH ambiente e neste contexto, o fator de transcrição PacC media uma via transdutora de sinal composta pelos produtos dos genes *pal*, já descrita em fungos. O

objetivo deste trabalho foi investigar o papel funcional de PacC na expressão de genes de *Trichophyton rubrum* envolvidos na degradação de queratina e na resposta adaptativa ao pH ambiente, analisando o perfil de expressão gênica em linhagens selvagem H6 e mutante *pacC-1*. O cultivo em pH 5,0 e 8,0 por 1 hora, seguido de hibridação subtrativa supressiva, permitiu a identificação de genes possivelmente envolvidos no início e na manutenção da infecção. Em pH alcalino, no qual muitas enzimas secretadas pelo fungo têm atividade ótima, foram identificados 164 genes diferencialmente expressos. Os níveis de expressão de alguns destes genes foram avaliados por *Northern blot*, como: histona H3, Rho-GTPase e aminoácido permease, que estão envolvidos em processos importantes na manutenção do crescimento de *T. rubrum* em ambiente alcalino. Em seguida, para uma melhor compreensão do papel de PacC neste dermatófito, foram selecionados 1791 clones para avaliar, por microarranjos, o perfil de expressão gênica das linhagens H6 e mutante *pacC-1*, cultivadas nos tempos de 24, 36, 48 e 60 horas em meio contendo apenas queratina como nutriente, pH inicial 5,0. Os resultados mostraram que a alcalinização do meio de cultivo ocorre normalmente para ambas as linhagens, indicando que PacC não participa deste processo. A comparação do perfil de expressão gênica entre as linhagens H6 e mutante *pacC-1* revelou genes diferencialmente expressos em cada um dos tempos, sendo que alguns deles foram validados por PCR em tempo real. Estas análises revelaram que os genes *pala* e o que codifica uma fosfatase ácida são especialmente requeridos no início do crescimento em queratina, quando o meio está ácido, e são positivamente regulados por PacC, nesta condição. Entretanto, os genes *palB* e o que codifica uma fosfatase alcalina apresentaram níveis de expressão mais elevados nos estágios mais tardios, em pH alcalino, e não foram modulados por PacC. O fator de transcrição APSES, responsável pela morfogênese em outros fungos, apresentou níveis crescentes de expressão do seu transcrito em *T. rubrum*, sugerindo sua participação no desenvolvimento deste dermatófito, porém sua regulação não é realizada via PacC. Os genes da calcineurina e calmodulina, importantes componentes de vias de sinalização, apresentaram expressão modulada durante o crescimento em queratina, entretanto, estudos mais aprofundados devem ser realizados para demonstrar seu papel em *T. rubrum*. Nossos resultados demonstraram ainda que a expressão do gene que codifica para Hsp88 é regulada via PacC, sendo este fato corroborado pela presença da sequência consenso para ligação de PacC na sua região promotora. Os resultados deste trabalho demonstram que o fator de transcrição PacC regula a expressão de um amplo espectro de genes, envolvidos em diferentes processos celulares, cuja expressão em *T. rubrum* é requerida durante o desenvolvimento deste dermatófito em substratos presentes no tecido hospedeiro e na resposta adaptativa ao pH ambiente.

## CONTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA NA CONSTITUIÇÃO DO ESTROMA E ANGIOGÊNESE TUMORAL EM UM MODELO MURINO QUIMÉRICO DE MEDULA ÓSSEA GFP+

**Ricardo Bonfim Silva**

Orientadora: Profa. Dra. Aparecida Maria Fontes

Dissertação de Mestrado apresentada em 20/04/2011

Apesar de alterações genéticas iniciais ocorrerem nas células normais dando origem à células cancerígenas, a percepção do câncer como um microambiente tumoral, tem se mostrado muito mais satisfatória na compreensão do desenvolvimento do câncer. Nas últimas três décadas, esforços vêm se concentrando no sentido de elucidar a complexidade das interações e mecanismos moleculares entre as células tumorais e o estroma tumoral, os quais conduzem à progressão do tumor. Entre as células recrutadas pelo microambiente tumoral, as células da medula óssea (CDMO) têm uma grande relevância no desenvolvimento e progressão tumoral. Por isso, o objetivo deste estudo foi quantificar células de origem mielóide e linfócitos T no microambiente tumoral de melanoma, bem como, avaliar a presença de células endoteliais oriundas da medula óssea (MO) na parede dos vasos sanguíneos tumorais em um modelo de camundongo quimérico de medula óssea GFP+. Camundongos C57BL/6 foram irradiados com uma dose de 10Gy e resgatados com o transplante de  $4 \times 10^6$  células da MO de C57BL/6-GFP. Trinta dias pós-transplante de MO os camundongos foram submetidos à infusão subcutânea de  $6 \times 10^5$  células de melanoma B16F10/luciferase. Vinte dias após a infusão, os camundongos foram escaneados no sistema IVIS para detecção baseada em bioluminescência das células tumorais infundidas, e posteriormente, a MO e os nódulos tumorais foram coletados para análise. Para avaliação da eficiência do quimerismo medular, foi analisado a MO dos camundongos transplantados foi analisada tanto por citometria de fluxo (CF) para quantificação de células GFP quanto pela avaliação da intensidade do sinal fluorescente utilizando o aparelho IVIS. Para analisar a presença de CDMO nos nódulos tumorais, estes foram investigados tanto por CF quanto por microscopia confocal (MC). A MO dos camundongos transplantados após 30 dias, mostrou uma % de células GFP semelhante ( $90.87 \pm 0,87\%$ ) à dos camundongos GFP+ ( $90,66 \pm 2,1\%$ ), demonstrando uma eficiência no quimerismo medular. Entretanto, as tíbias e fêmures dos camundongos transplantados apresentaram uma intensidade de sinal fluorescente em média 14 vezes menor ( $3,96 \times 10^{-5} \pm 5,77 \times 10^{-6}$ )



quando comparada ao animal GFP ( $5,63 \times 10^{-4} \pm 3 \times 10^{-5}$ ). Isso pode ser explicado devido à emissão de fluorescência pela estrutura óssea dos camundongos GFP, aumentando assim a taxa de eficiência do sinal. Os nódulos tumorais apresentaram cerca de  $3,5 \pm 1,7\%$  de células GFP+. Do total de células GFP+,  $80 \pm 21\%$  eram CD11b+,  $13,31 \pm 0,2\%$  eram CD3+/CD4+,  $2,1 \pm 1,2\%$  eram CD3+/CD8+ e  $11,5 \pm 6,85\%$  eram CD31+. Dentre alguns vasos sanguíneos analisados foi observada a presença de algumas células GFP+ na parede dos vasos sanguíneos tumorais CD31+, e por apresentar esta localização e constituir a parede dos vasos sanguíneos, estas células foram identificadas como células endoteliais, e por serem GFP+, como células endoteliais oriundas da medula óssea. Este trabalho mostrou que o modelo experimental desenvolvido foi eficaz para o estudo da contribuição de CDMO na formação dos tumores, sendo que células mielóides CD11b+, linfócitos T e células endoteliais da medula óssea constituem parte do estroma do tumor. Além do mais, as células endoteliais oriundas da medula óssea parecem participar do processo angiogênico tumoral.

### AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES POLO-LIKE QUINASES EM LINHAGENS E AMOSTRAS DE GLIOBLASTOMA

**Julia Alejandra Pezuk**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone

Dissertação de Mestrado apresentada em 27/05/2011

O Glioblastoma (GBM) é um dos tumores mais agressivos do sistema nervoso central (SNC) e entre as diversas neoplasias possui um dos piores prognósticos. Caracteriza-se por um crescimento celular descontrolado, uma elevada heterogeneidade celular e alterações genéticas complexas que refletem uma alta instabilidade genômica. Apesar dos atuais avanços no entendimento da biologia do GBM e das novas estratégias de tratamento, este tumor continua tendo uma sobrevida média menor que um ano. Existem vários alvos terapêuticos potenciais para melhorar o tratamento do GBM, dentre eles as *Polo-like* quinases (PLKs). A família das PLKs é composta por cinco membros de quinases serina/treonina (PLK1, 2, 3, 4 e 5) as quais desempenham papéis fundamentais no controle do ciclo celular. Vários estudos demonstraram que o gene *PLK1* está hiperexpresso em diferentes tipos de neoplasias sendo também correlacionado com o prognóstico e o grau de malignidade. Ainda não há relatos na literatura sobre alterações na expressão do *PLK2* e *PLK5* em tumores, no entanto os genes *PLK3* e *PLK4* apresentam-se hipoexpressos em alguns tipos de cânceres. O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão dos *PLKs* e analisar os efeitos do seu inibidor específico BI 2536 em glioblastoma. O *PLK1* foi encontrado hiperexpresso tanto em amostras quanto em linhagens de GBM e os *PLK2*, *3* e *4* apresentaram uma expressão variada nos dois grupos. O tratamento com BI 2536 nas linhagens de GBM SF188 e T98G causou uma diminuição na proliferação, na capacidade clonogênica e na viabilidade celular e provocou um aumento na apoptose e no índice mitótico após 24h de tratamento. Na combinação de BI 2536 com Temozolomida obteve-se um aumento no efeito observado, mas nem sempre com significância estatística. Na análise do ciclo celular observou-se uma parada em G2 quando as células foram tratadas com BI 2536. Estes resultados sugerem que as *Polo-like* quinases podem ser alvos interessantes para o tratamento de glioblastoma, porém mais estudos são necessários para confirmar este potencial.

## Ginecologia e Obstetrícia

### INFLUÊNCIA DA FISIOTERAPIA NA RESPOSTA FUNCIONAL E EMOCIONAL DE PACIENTES TRATADAS COM CIRURGIA POR CÂNCER DE MAMA

**Lígia Moulin Menzel**

Orientador: Prof. Dr. Hélio Humberto Angotti Carrara

Dissertação de Mestrado apresentada em 12/4/2011

**Objetivo:** avaliar a eficácia de um programa de exercícios protocolados supervisionados em mulheres que passaram por linfadenectomia axilar (LA) por câncer de mama e o impacto emocional desta prática nestas mulheres.

**Metodologia:** mulheres em tratamento por câncer de mama no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP- USP) foram convidadas a participar do estudo. Essas mulheres

foram randomizadas em dois grupos: o Grupo de Estudo (GE), que participou de um protocolo de exercícios supervisionados por uma fisioterapeuta, e avaliação do risco de depressão através do Inventário de Depressão de Beck (IDB), e o Grupo Controle (GC), que não participou do protocolo de exercícios supervisionados, mas também foi submetido ao IDB. Ambos os grupos foram submetidos ao mesmo protocolo de avaliação. Esta avaliação constou da medida da amplitude de movimento (ADM) da articulação escápulo-umeral e da perimetria dos membros superiores. As avaliações da ADM foram feitas em oito ocasiões (pré-operatório, PO1 e do primeiro ao sexto retorno). O GE realizou exercícios supervisionados duas vezes por semana, mas com orientação para realizá-los diariamente. Uma vez por semana os sujeitos de ambos os grupos eram avaliados quanto a ADM, cicatrização e presença de seroma. Ao final do estudo ambos os grupos preencheram novamente o BDI.

**Resultados:** Ambos os grupos foram homogêneos quanto à idade, índice de massa corporal (IMC) e formas de tratamento. Na análise da ADM da articulação escápulo-umeral, observou-se que não houve diferença significativa entre os grupos na avaliação pré-operatória e também na primeira avaliação após a cirurgia (PO1). O GE apresentou aumento significativo em todas as avaliações a partir do PO1 com relação ao movimento de flexão, fato não observado no GC. Na avaliação da abdução o GE apresentou sempre maiores medidas que o GC, porém em algumas avaliações a diferença das medidas entre os dois grupos não foi significativa. O exercício supervisionado não influenciou o tempo de permanência do dreno e a formação de seroma. Da mesma forma, a intervenção fisioterápica não diminuiu o risco de depressão das pacientes deste trabalho.

**Conclusão:** a ADM da articulação escápulo-umeral apresentou recuperação mais rápida quando mulheres submetidas à LA por câncer de mama participaram de um protocolo de exercício supervisionado com início precoce. A prática do exercício supervisionado precoce não se associou ao desenvolvimento do seroma ou aumento do tempo de permanência do dreno. Não se observou diminuição do risco de depressão nas mulheres do GE, porém essas mulheres apresentaram tendência à diminuição do risco de depressão, enquanto que as mulheres do GC apresentaram tendência ao aumento do risco de depressão.

## EXPRESSÃO DA SURVIVINA EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA SUBMETIDAS À QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE

**Alexandre Henrique Macchetti**

Orientador: Prof. Dr. Heitor Ricardo Cosiski Marana

Tese de Doutorado apresentada em 13/06/2011

**Objetivo:** avaliar o valor da expressão da proteína Survivina como fator prognóstico e preditivo de resposta à quimioterapia neoadjuvante com Docetaxel e Epirrubicina, além de avaliar a sua expressão após a quimioterapia neoadjuvante, em pacientes com câncer de mama estadios II e III.

**Pacientes e métodos:** 72 pacientes receberam quimioterapia neoadjuvante com docetaxel (75 mg/m<sup>2</sup>) e epirrubicina (50 mg/m<sup>2</sup>) em infusão endovenosa no dia 1 a cada 3 semanas após terem sido submetidas a biópsia incisional. Instituído o tratamento cirúrgico, procedeu-se o tratamento quimioterápico adjuvante com CMF ou FEC de acordo com o comprometimento axilar por metástases e/ou hormonioterapia de acordo com a avaliação dos receptores hormonais. A associação entre a resposta à quimioterapia neoadjuvante e a expressão da Survivina, o seu impacto na sobrevida global e livre de doença destas pacientes, e a alteração na expressão após a quimioterapia foram avaliados.

**Resultados:** a expressão da Survivina não apresentou associação com as taxas de resposta ou sobrevida das pacientes, ou com os parâmetros clínicos, mas em 19 de 22 (86%) pacientes com expressão negativa na biópsia incisional ocorreu alteração da sua expressão após a quimioterapia (p=0,0002).

**Conclusão:** a expressão da Survivina não demonstrou em nosso estudo ser fator preditivo de resposta ou prognóstico nas pacientes submetidas a quimioterapia neoadjuvante com docetaxel e epirrubicina, mas a indução da expressão da Survivina após a quimioterapia pôde ser observada.

## Imunologia Básica e Aplicada

### POLIMORFISMOS DO GENE *HLA-G* EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS DO TIPO 1

**Rafael Sales de Albuquerque**

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Antonio Donadi

Dissertação de Mestrado apresentada em 19/04/2011

O diabetes mellitus do tipo 1 (DM-1) é doença multifatorial, causada pela destruição de células produtoras de insulina, mediada principalmente pela ação de linfócitos T, em indivíduos geneticamente susceptíveis, na presença de diversos fatores ambientais. Os alelos *HLA-DRB1*\*03, \*04 e *DQB1*\*0302 e \*0201 estão fortemente associados com susceptibilidade ao DM-1 em diversas populações. Recentemente, em estudo de ligação, foi descrita região de susceptibilidade genética, independente dos alelos *HLA* de classe II, localizada próxima ao gene não clássico de classe I, *HLA-G*. A molécula *HLA-G* foi inicialmente identificada na interface materno-fetal, em especial no citotrofoblasto da placenta, local onde a tolerância imunológica contribui para a falta de rejeição do feto pela mãe. Além do contexto da gravidez, *HLA-G* também tem sido considerada como “molécula de tolerância”, quando a expressão ectópica da molécula é observada em situações patológicas, podendo trazer consequências benéficas, ou ainda, deletérias. Comparado aos genes clássicos de classe I, o gene *HLA-G* apresenta limitado polimorfismo em sua região codificadora, mas acentuado polimorfismo na região controladora e 3' não-traduzida (3' *untranslated region*- 3'UTR). Uma vez que essas regiões sejam controladoras da expressão de *HLA-G* e considerando que o pâncreas seja um dos poucos tecidos que expressa constitutivamente *HLA-G*, neste estudo foram avaliados os oito polimorfismos já descritos para 3'UTR do *HLA-G* (14pb Del/Ins, +3003 T/C, +3010 C/G, +3027 C/A, +3035C/T, +3142 C/G + 3187 A/G e + 3196 C/G), em 110 pacientes com DM-1 e 110 indivíduos saudáveis. O genótipo +3010 C-C (p=0.0461, OR= 0.5139, IC= 0.2781 - 0.9496) apresentou frequência mais baixa em pacientes em relação aos controles. As demais frequências genotípicas e alélicas desse e dos outros sete sítios polimórficos não apresentaram diferenças significantes em relação aos indivíduos saudáveis. Para inferir os haplótipos da 3'UTR do *HLA-G*, foram estudados 108 pacientes e 108 controles, sendo detectado aumento na frequência do haplótipo UTR-6 (p= 0.0034, OR= 0.3068, IC= 1.451 - 6.487) e diminuição do haplótipo UTR-3 (p= 0.0082, OR= 0.3547, IC= 0.1666 - 0.7553), e ainda, aumento da frequência de haplótipos contendo o alelo +3010G nos pacientes. Os achados deste estudo indicam que o sítio polimórfico +3010 C/G está associado ao DM-1, seja pela diminuição das frequências do genótipo +3010 C-C ou aumento de haplótipos contendo o alelo +3010 G. Uma vez que o papel desse sítio na magnitude de produção de *HLA-G* não seja conhecido, estudos posteriores necessitam ser realizados para identificar a possível influência desse sítio na susceptibilidade ao DM-1.

### MODULAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS COM A PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO DE 65 KDA

**Patrícia Rodrigues Marques de Souza**

Orientador: Prof. Dr. Celio Lopes Silva

Tese de Doutorado apresentada em 23/05/2011

Dentre as estratégias mais modernas em desenvolvimento para o tratamento de doenças infecciosas e câncer está a utilização do conceito de imunoterapia usando proteínas de choque térmico (HSPs). No interior das células tumorais ou das células infectadas com patógenos intracelulares são formados complexos entre as HSPs e os respectivos peptídeos imunogênicos. Os complexos formados interagem com receptores de células dendríticas (CDs), induzindo: maturação e diferenciação celular com liberação de citocinas e quimiocinas; aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias; ativação da imunidade peptídeo-específica mediada principalmente por linfócitos T citotóxicos (CD8+). Dados iniciais do nosso grupo, mostraram em modelo animal que uma vacina de DNA carreando o gene da proteína Hsp65 de *M. leprae*, tinha atividades terapêuticas em casos crônicos de tuberculose (TB), a TB disseminada, TB latente bem como TB-MDR (resistente a múltiplas drogas). Essa vacina de DNA também mostrou redução da reativação da doença em animais de laboratório imunossuprimidos, e, quando associado com a quimioterapia, reduz significativamente o tempo de tratamento para TB. Esses dados nos levaram a hipótese de que muitas das ações acima mencionadas poderiam ser decorrentes da

ativação de CDs pela proteína Hsp65, produto da expressão do DNA vacinal. Portanto, o objetivo desse trabalho foi a avaliação dos mecanismos envolvidos na interação entre rHsp65 e CDs, estudando a ativação, a diferenciação, a liberação de mediadores imunológicos pelas CDs e a estimulação de linfócitos CD4+ e CD8+ peptídeo-específicos. Os resultados mostraram que a Hsp65 interage com o receptor do tipo Toll 4 e utiliza as moléculas adaptadoras TRIF e MyD88 para a sinalização e indução de: maturação e diferenciação celular com liberação de citocinas; aumento da expressão de moléculas co-estimuladoras e ativação da imunidade peptídeo-específica mediada por linfócitos TCD4+ e TCD8+. Os resultados obtidos mostraram o potencial imunomodulador da Hsp65 em CDs e essa capacidade não foi aumentada na presença de outros adjuvantes particulados (liposomas) ou adjuvantes não particulados (KLK, DMT, DBT, MLA). Demonstramos ainda que a rHsp65 foi capaz de induzir ativação de macrófagos diferenciados de medula óssea, outro subtipo de célula apresentadora de antígenos. Nossos resultados mostram a capacidade da proteína rHsp65 em ativar de forma eficiente CDs e macrófagos e, conseqüentemente, melhorando a resposta de células CD4+ e CD8+ específicas. Esses achados abrem perspectivas para o desenvolvimento de novas estratégias vacinais contra doenças infecciosas e câncer.

## CARACTERIZAÇÃO DE ANORMALIDADES CITOGENÉTICAS E MOLECULARES EM 221 PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA *DE NOVO*

**Mariana Tereza de Lira Benício**

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Magalhães Rego

Dissertação de Mestrado apresentada em 22/06/2011

Resultados atuais referentes ao tratamento da LMA em países desenvolvidos revelam que a estimativa de sobrevida global (SG) em cinco anos é em torno de 40-50%. Em contraste, os escassos trabalhos relacionados ao desfecho de pacientes com LMA em países em desenvolvimento relatam que a SG gira em torno de 17-20%, apesar do excesso relativo de casos de leucemia promielocítica aguda, que está associada a prognóstico favorável. Além disso, os estudos elaborados em países em desenvolvimento não têm levado em consideração os marcadores moleculares recentemente descritos, tais como mutações nos genes *NPM1* e *MLL*, além dos níveis de expressão do gene *BAALC*, considerados relevantes para o prognóstico. O presente estudo objetivou avaliar a prevalência de achados citogenéticos, mutações no gene *NPM1*, *FLT3-ITD*, *MLL-PTD* e níveis de expressão do gene *BAALC*, bem como seu impacto sobre o desfecho de pacientes diagnosticados com LMA *de novo*. Duzentos e vinte e um pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP ou no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. A idade mediana foi 42 anos (15-65) e 101 indivíduos eram do sexo masculino (45%). Os pacientes foram tratados com quimioterapia convencional, consistindo em daunorrubicina (60mg/m<sup>2</sup>/d por 3 dias) e citarabina (200mg/m<sup>2</sup>/d por 7 dias) como indução, seguida por dois ou três ciclos de consolidação (superiores a 1g/m<sup>2</sup>/d). As seguintes variáveis foram analisadas: idade, sexo, contagens de leucócitos, cariótipo, mutações no *NPM1*, *FLT3-ITD*, *MLL-PTD* e os níveis de expressão do gene *BAALC*. Amostras de medula óssea ao diagnóstico foram cariotipadas por bandamento-G, entre as quais 196 foram bem-sucedidas e, juntamente com os achados moleculares, possibilitaram a estratificação dos pacientes em grupos de acordo com o prognóstico, como proposto pelo *European LeukemiaNet*: favorável (n=82), intermediário (n=97) e adverso (n=20). Mutações no *NPM1* foram detectadas por sequenciamento direto de produtos de PCR. *FLT3-ITD* e *MLL-PTD* foram detectadas por PCR e RQ-PCR, respectivamente. Os níveis de expressão do gene *BAALC* foram avaliados por RQ-PCR, de acordo com o método Ct comparativo, e os pacientes foram dicotomizados em grupos de hipo- e hiperexpressão do *BAALC* em função da mediana. A estimativa de SG em cinco anos para todos os pacientes foi de 18% (S.D.: ± 3.0%). A SG relativa aos grupos genéticos foi de 40,6; 15,6 e 13,2 meses para os grupos favorável, intermediário e adverso, respectivamente (p=0,009). Segundo a análise univariada, as seguintes variáveis foram significativas: idade (p=0,01), grupo de risco genético (p=0,009) e a presença das mutações *FLT3-ITD* (p=0,04) e *MLL-PTD* (p=0,002). Pacientes diagnosticados com idade>45 anos apresentaram menor SG quando comparados aos diagnosticados com idade≤45 anos: 18,4 meses (IC95%: 11 – 25,7) versus 30,6 meses (IC95%: 22,3 – 38,8); p=0,01. Pacientes *FLT3-ITD*<sup>+</sup> apresentaram SG média de apenas 12,4 meses (IC95%: 7,1 – 17,7) em comparação com 27 meses (IC95%: 20,2 – 33,8) para os pacientes *FLT3-ITD*<sup>-</sup>. *FLT3-ITD* foram associadas com *NPM1* mut (duas vezes mais frequentes em *NPM1* mut do que em *NPM1* wt, p=0,02) e maior percentual de blastos na medula óssea. Pacientes *MLL-PTD*<sup>+</sup>, por sua vez, apresentaram SG média de 3,8 meses (IC95%: 0,4 – 7,3) em comparação com 31,4 meses (IC95%: 23,8 – 39) dos pacientes *MLL-PTD*<sup>-</sup>. Na análise multivariada, grupo genético, idade ao diagnóstico e mutações *MLL-PTD* foram associadas à SG, sendo esta última variável um fator prognóstico independente. Considerando-

se apenas os pacientes de cariótipo normal (n=77), FLT3-ITD foram associadas com maior percentual de blastos na medula óssea (p=0,02) e hiperexpressão do *BAALC* (p=0,05). Ainda nesse grupo, mutações no *NPM1* foram significativamente associadas com maior SG (média: 34 meses, IC95%: 17,4 – 50,7 vs. 10,8 meses, IC95%: 7,3 – 14,3; p=0,03). A hiperexpressão do *BAALC* não foi preditiva de menor SG, contrariando achados prévios. Esses resultados provêm uma importante caracterização de pacientes brasileiros com LMA, sugerindo que a frequência de alterações citogenéticas e mutações FLT3-ITD e MLL-PTD são semelhantes às encontradas em países desenvolvidos, enquanto mutações no gene *NPM1* (16,6%) são menos frequentes. De especial relevância foi o pior desfecho desses pacientes em relação aos relatados nos Estados Unidos e na Europa, chamando a atenção para a necessidade urgente de iniciativas colaborativas multicêntricas.

## **AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS DE VACINAÇÃO “PRIME-BOOST” NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *SCHISTOSOMA MANSONI* EMPREGANDO VACINAS DE DNA**

**Milena Sobral Espíndola**

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli

Dissertação de Mestrado apresentada em 20/06/2011

A esquistossomose é uma das mais relevantes doenças induzidas por helmintos, acometendo cerca de 207 milhões de pessoas em todo o mundo. O Praziquantel e o Oxamniquine são os fármacos empregados no tratamento, mas além de não impedirem re-infecções, não atuam nos estágios imaturos do verme. Portanto, o desenvolvimento de uma estratégia de vacinação eficaz representa um componente essencial para o controle e erradicação desta doença. Neste sentido, tivemos como objetivo estudar a resposta imunológica induzida pela imunização com a vacina DNA-Sm14 em associação com a DNA-Hsp65 utilizando protocolos de imunização “*prime-boost*”, sendo eles heterólogo ou homólogo. A utilização das vacinas em “*prime-boost*” heterólogo não alterou a produção de IgG2a, mas diminuiu a produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 dos animais quando comparados aos que receberam apenas DNA-Sm14. Após infecção, a estratégia “*prime-boost*” heterólogo não foi eficaz em reduzir a carga parasitária dos animais, enquanto a vacinação com DNA-Sm14 reduziu parcialmente o número de vermes. Na vacinação “*prime-boost*” homóloga utilizando as duas vacinas, observamos que a modificação da estratégia também não alterou a produção de IgG2a, mas reduziu a produção de IFN- $\gamma$  pelas células recuperadas do espaço bronco-alveolar, quando comparada com os animais que receberam DNA-Sm14. Após infecção, a imunização com DNA-Sm14/DNA-Hsp65 não alterou a carga parasitária dos animais, mas sistemicamente reduziu o número de eosinófilos. Quando avaliado o perfil de células de memória dos animais vacinados, verificamos aumento do número de células T CD8+ e menor número de células T CD4+ no baço dos animais imunizados com as duas vacinas simultaneamente. Em suma, a utilização das vacinas DNA-Sm14 e DNA-Hsp65 nas estratégias “*prime-boost*” heterólogo ou homólogo não foi capaz de gerar proteção contra infecção experimental por *S. mansoni*, e sugerimos que em parte, a diminuição de IFN- $\gamma$ , IL-10, aumento da razão IgG1/IgG2a e a estimulação de células T CD8+ ao invés de CD4+, podem ter contribuído para baixa eficácia dos protocolos vacinais testados.

## **Neurologia**

### **CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO MODELO DE EPILEPSIA INDUZIDO POR ESTIMULAÇÃO CONTÍNUA E DE BAIXA INTENSIDADE NA VIDA PERFORANTE DE RATOS *Wistar***

**Ana Clara Silveira Brogini**

Orientador: Prof. Dr. João Pereira Leite

Dissertação de Mestrado apresentada em 05/04/2011

A epilepsia do lobo temporal (ELT) é a forma mais frequente de epilepsia em adultos, caracterizada clinicamente por um desenvolvimento progressivo de crises epiléticas com foco no lobo temporal, sendo associada à esclerose hipocam-pal (EH). O uso de modelos animais para estudo de desordens humanas é importante para o entendimento dos mecanismos

fisiopatológicos destas doenças. Estudos recentes indicam que a estimulação elétrica moderada e contínua na via perfurante (VP) de ratos gera características muito próximas ao padrão da ELT humana: atrofia hipocampal com perda de neurônios piramidais nos sub-campos CA1 e CA3 (Corno de Amon; CA), assim como limitada perda neuronal em regiões extrahipocampais (Sloviter et al., 2007). Assim, realizamos nesse estudo a caracterização comportamental, eletrográfica e fisiopatológica de um novo modelo de epilepsia focal induzido por estimulação elétrica contínua e de baixa intensidade da VP. Ratos *Wistar* acordados receberam trens de estímulos elétricos na VP a 20 Hz, com duração de 10 s, durante 8 h, verificando-se os parâmetros: presença de pós-descargas (PDs) e alterações comportamentais. Nesses animais, foram analisados a ocorrência de crises recorrentes espontâneas (CREs), os padrões oscilatórios do registro de eletrencefalograma (EEG) (por meio do espectro de frequências durante as 8 h), o perfil e a frequência das PDs e, por fim, a densidade neuronal em sub-áreas do hipocampo através de imunohistoquímica para NeuN. A avaliação neuropatológica foi estimada por meio de uma escala de 0-3 (0, sem perda neuronal; 1, EH leve; 2, EH moderada e 3, EH intensa). Durante a estimulação, os animais apresentaram PDs intermitentes, associadas a alterações comportamentais e não apresentaram crises generalizadas. Durante 2 meses de monitoramento (5 dias por semana, 6 h por dia), os animais estimulados apresentaram em média 2 CREs, enquanto nos controle essas foram ausentes. O padrão neuropatológico do grupo controle apresentou nível 0 e os animais estimulados os níveis 1 e 2 da escala estabelecida. Nenhum dos animais apresentou nível 3. Os animais submetidos ao protocolo proposto no modelo deste trabalho apresentaram aspectos eletrográficos, comportamentais e histológicos característicos da ELT focal, evidenciados por: (1) ocorrência de PDs associadas às alterações comportamentais, (2) padrões eletrográficos característicos de atividade epileptiforme (*fast ripples, periodic epileptiform discharges* (PEDs), aumento de oscilações lentas, ondas agudas rítmicas, atividades rítmicas do tipo ponta e onda e descargas com *poli-spikes*), (3) presença de CREs e (4) perda neuronal em CA1 e hilo hipocampal. Dessa forma, a caracterização deste modelo para estudo da ELT focal e de SE parcial complexo pode oferecer contribuições importantes no entendimento da fisiopatologia da ELT e para o desenvolvimento futuro da pesquisa translacional em epilepsia.

## ESTUDOS DOS GRÂNULOS DA LIPODUSCINA E DAS SINAPSES DO CÓRTEX TEMPORAL DURANTE O ENVELHECIMENTO

**Suelen Merlo**

Orientador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Moreira

Dissertação de Mestrado apresentada em 14/04/2011

Alterações morfológicas e funcionais ocorrem durante o envelhecimento, período da vida com maior incidência de doenças neurodegenerativas. No presente trabalho acompanhou-se a evolução dos grânulos de lipofuscina durante o envelhecimento para investigar alterações sinápticas, assim como proteínas associadas com doenças neurodegenerativas (alfa-sinucleína) e com o sistema ubiquitina-proteossoma em indivíduos de diferentes idades. No córtex temporal humano e de ratos determinou-se, nos diferentes grupos etários, seguindo a área, o número e as características dos grânulos de lipofuscina, o número de sinapses excitatórias, inibitórias e elétricas, os locais de contatos pós-sinápticos, o número de vesículas sinápticas por terminal e a expressão das proteínas alfa-sinucleína e ubiquitina. Amostras de córtex temporal humano de indivíduos com diferentes idades (20 - 28, 37 - 41 e 50 - 55 anos) foram coletadas de pacientes com epilepsia submetidos à lobectomia do lobo temporal. Amostras de ratos de 2, 6, 10 e 12 meses também foram coletadas. Foram utilizadas técnicas de microscopia de luz, eletrônica, confocal e western blots. Os dados obtidos de grânulos de lipofuscina são consistentes com outros estudos que observaram aumento dessa estrutura em mamíferos de maior idade. No entanto, os grânulos parecem crescer em volume, mas não em número, com aumento considerável da fração elétron lúcida (lipídica). Não houve diferença na expressão das proteínas alfa-sinucleína e ubiquitina entre os grupos das idades estudadas. A densidade sináptica foi similar entre os grupos experimentais, assim como o local de contato pós-sináptico. O aumento de vesículas elétron densas em sinapses inibitórias deve estar associado à demanda de neurotransmissores catecolaminérgicos. Estes resultados não expressam totalmente o processo de envelhecimento, pois as faixas etárias de humanos e ratos correspondem a uma idade ainda jovem. A coleta de material humano mais idoso foi impossibilitada pela faixa etária dos doentes submetidos à lobectomia. Os ratos do biotério da FMRP, não sobrevivem mais do que 12 meses em no nosso ambiente, incluindo manutenção dos animais isolados em *racks*.

## **ORIENTAÇÕES FONOAUDIOLÓGICAS PARA CUIDADORES E/OU FAMILIARES DE PACIENTES ADULTOS COM DEMÊNCIA**

**Isabel Cristina Sabatini Perez**

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Massaiti Takayanagui

Dissertação de Mestrado apresentada em 18/04/2011

A demência é uma síndrome caracterizada pelo declínio de memória e déficit cognitivo que influenciam no desempenho social do indivíduo. É uma junção de sinais e sintomas que culminam em uma deterioração crônica, e em geral progressiva do funcionamento do intelecto, da personalidade e da comunicação.

Entre os principais tipos de demência encontra-se a demência do tipo Alzheimer, a demência vascular, a demência com corpos de Lewy e a demência frontotemporal.

Independentemente do tipo de demência, um dos seus primeiros indícios é o comprometimento da memória, maior dificuldade de atenção e concentração, perda de habilidades intelectivas, desorientação espaço-temporal, mudanças no comportamento, no humor e na personalidade. Além destas alterações, conforme a doença evolui, o paciente pode apresentar dificuldades para se alimentar e deglutir, e é função do fonoaudiólogo intervir nos distúrbios de memória, fala e deglutição.

O presente trabalho teve por objetivo confeccionar uma cartilha de orientações fonoaudiológicas, relacionadas à linguagem e à deglutição, aos cuidadores e/ou familiares de pacientes com demência. Teve como base as dúvidas mais frequentemente encontradas sobre as manifestações fonoaudiológicas apresentadas no questionário que foi aplicado aos cuidadores e/ou familiares dos pacientes com problemas neurológicos, assim como a contribuição de achados teóricos.

## **ALTERAÇÕES ANÁTOMO-FUNCIONAIS EM SUJEITOS COM DEFICIÊNCIA AUDITIVA PELO USO DE APARELHOS DE AMPLIFICAÇÃO SONORA INDIVIDUAL OBSERVADA POR IMAGEM POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA**

**Mara Rita Pereira Jorge**

Orientador: Prof. Dr. Draulio Barros de Araujo

Tese de Doutorado apresentada em 19/04/2011

Indivíduos com deficiência auditiva periférica poderão vir a ter prejuízo no processamento da informação pelo sistema nervoso central. Atualmente, a imensa maioria dos estudos envolvendo esse grupo de pacientes tem estado restrito ao sistema auditivo em si, prestado pouca atenção sobre o reflexo da redução das vias eferentes do córtex auditivo para sistemas cognitivos mais complexos, como é o caso, por exemplo, da linguagem. Portanto, o objetivo do trabalho foi buscar por alterações neuroanatômicas e funcionais em pacientes com perda auditiva neurosensorial, bem como acompanhar eventuais mudanças da representação cortical pelo uso de aparelhos de amplificação sonora individual (AASI). Para tanto, acompanhamos 14 pacientes e um grupo controle composto por 11 voluntários assintomáticos. As avaliações audiológicas foram feitas por meio de audiometria tonal limiar e SRT, acompanhados por exames de imagem por ressonância magnética, tanto estrutural como funcional, em duas etapas: antes da adaptação do AASI e após um ano de seu uso contínuo. Os resultados demonstram alterações funcionais significativas, em especial no que diz respeito ao sistema auditivo se estendendo até centros que compõem os campos receptivos de fala (área de Wernicke). Interessantemente, os achados das alterações funcionais foram correlacionados à melhora clínica dos pacientes avaliados pelos exames de audiometria. Foram encontrados, ainda, algumas poucas alterações estruturais. De forma resumida, é possível concluir que a estimulação auditiva tem impacto importante sobre o sistema auditivo e de linguagem verbal. Este trabalho reforça a importância da compreensão dos mecanismos neurofisiológicos envolvidos na reabilitação audiológica. Os dados ajudam a compreender o reflexo da perda auditiva sobre processos cognitivos mais complexos, o que auxiliaria na compreensão do motivo pelo qual indivíduos com audiogramas semelhantes muitas vezes apresentam benefícios bastante diferentes pela reabilitação.

## ANÁLISE MUTACIONAL DOS GENES MFN2 E NEFL EM PACIENTES COM A DOENÇA DE CHARCOT-MARIE-TOOTH TIPO 2

**Adriana Borges Genari**

Orientador: Prof. Dr. Wilson Marques Junior

Tese de Doutorado apresentada em 29/04/2011

*Charcot-Marie-Tooth* tipo 2 (CMT2) é uma neuropatia hereditária axonal com grande variabilidade genética e clínica. A maior incidência de mutações para o tipo 2 se encontra no gene MFN2, tendo sido descritas, até o presente momento, aproximadamente 60 mutações. O fenótipo desta doença autossômica sensitivo-motora é típico para CMT2A podendo ocorrer manifestações adicionais como atrofia óptica, sinais piramidais, fraqueza proximal, dor, anormalidades na ressonância magnética do paciente e distúrbios de aprendizagem. O gene NEFL também foi analisado por estar entre os causadores do subtipo CMT2E. O objetivo deste estudo foi descrever e caracterizar os fenótipos associados às mutações do gene MFN2 e NEFL. Foram avaliados 53 pacientes clinicamente diagnosticados com CMT2 e realizado o rastreamento mutacional para ambos os genes. Também foram realizados estudos clínicos e neurofisiológicos, bem como análise psicológica e ressonância magnética cerebral para um dos pacientes mutados. Três mutações foram encontradas no gene MFN2, incluindo R104W, previamente descrita em três indivíduos de uma família e cinco casos isolados. Esta mutação causa um complexo fenótipo e grave neuropatia. Duas novas mutações, ainda não descritas, também foram encontradas em MFN2, C217F e F240L, o que corresponde a 6% do total do grupo que foi analisado, e mais dois polimorfismos oriundos deste gene. Para o gene NEFL nenhuma mutação em 33 desses pacientes foi encontrada, apenas um polimorfismo já anteriormente descrito.

## RNO É MAIS ATIVA PARA INDUZIR A REGENERAÇÃO DO NERVO ISQUIÁTICO DE RATOS *Wistar* QUANDO COMPARADA A CÉLULAS MONONUCLEARES ESTROMAIS DA MEDULA ÓSSEA

**Natalia Fernanda Gaspar de Almeida**

Orientador: Prof. Dr. Amilton Antunes Barreira

Dissertação de Mestrado apresentada em 13/05/2011

Lesões com lacunas de 10 mm ou mais no nervo isquiático de ratos, mesmo com o uso de tubulização, não se associam à regeneração espontânea de fibras nervosas suficiente para alcançar a porção distal do nervo. O uso de fatores tróficos no interior do tubo pode em princípio promover ou ativar a regeneração de fibras de maneira suficiente para que o coto distal possa alcançado. O objetivo do presente estudo foi verificar se o efeito regenerativo da RN029 é comparável, superior ou inferior ao do *Dulbeco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) e ao de células- mononucleares estromais da medula óssea (incluindo células-tronco). Para tanto o nervo isquiático de ratos *Wistar* foi seccionado, retirando-se um segmento de 10 mm e entre os cotos foi interposto um tubo de silicone, mantendo-se uma lacuna de 10 mm de comprimento. Setenta dias após, o cabo de regeneração do grupo RN029 apresentou maior diâmetro, quando comparado ao de ambos os outros grupos, assemelhando-se macroscopicamente ao de nervos normais. A morfometria evidenciou diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) a favor da RN029 relativas à área fascicular interna, ao número de capilares e de fibras mielínicas e à densidade desse tipo de fibras. O estudo eletrofisiológico evidenciou: velocidades de condução nervosa dos nervos regenerados do grupo RN029 significativamente superiores às dos outros grupos, o mesmo ocorrendo com a amplitude do potencial de ação muscular composto de músculo reinervado pelas fibras regeneradas. Os resultados indicam que RN029 é mais eficaz do que células mononucleares estromais da medula óssea e DMEM para promover a regeneração de nervos isquiáticos de ratos *Wistar*.

## ESTUDO DA CONSCIÊNCIA FONOLÓGICA E DO DESEMPENHO ESCOLAR EM LEITURA E ESCRITA DE CRIANÇAS SOROPOSITIVAS PARA O HIV: UM ACOMPANHAMENTO LONGITUDINAL

**Raphaela Barroso Guedes Granzotti**

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Massaiti Takayanagui

Tese de Doutorado apresentada em 20/05/2011

O objetivo desse trabalho foi caracterizar as habilidades em consciência fonológica e o desempenho escolar em leitura e escrita de crianças soropositivas para o HIV, a fim de observar o desenvolvimento dessas habilidades de lingua-



gem com a evolução do quadro clínico da Aids. A amostra estudada foi composta por vinte e sete crianças com idades variando entre sete e treze anos, de ambos os sexos, portadoras do HIV adquirido por transmissão vertical. Todas as crianças já haviam sido avaliadas em relação aos aspectos fonológicos da linguagem oral utilizando o ABFW - Teste de Linguagem Infantil, no ano de 2005. Em 2010 foi realizada avaliação da consciência fonológica, por meio do Teste CONFAS - Consciência Fonológica: Instrumento de avaliação sequencial, do nível de leitura e escrita utilizando o TDE: Teste de desempenho escolar e, novamente, dos aspectos fonológicos utilizando o ABFW. Os dados obtidos foram associados com o estadiamento clínico e os marcadores imunoviológicos da Aids e com o a avaliação fonológica realizada a cinco anos. Com base nos resultados dessa pesquisa pôde-se confirmar a relação entre a linguagem oral e o posterior desenvolvimento das habilidades linguísticas, pois, as crianças que apresentaram desvio fonológico, mesmo após sua superação, também apresentaram dificuldade no aprendizado da leitura e da escrita, corroborando com a hipótese do déficit fonológico como causa dos problemas de leitura e escrita. Além disso, é possível afirmar que crianças infectadas pelo HIV constituem um grupo de alto risco para alterações de linguagem escrita, leitura e consciência fonológica, e que estas alterações independem da gravidade do quadro clínico e do perfil imunoviológico da Aids.

### **AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO SISTEMA OCITOCINÉRGICO NOS MODELOS EXPERIMENTAIS DE EPILEPSIA E COMPULSÃO**

**Simone Saldanha Marroni**

Orientador: Prof. Dr. Norberto Garcia Cairasco  
Tese de Doutorado apresentada em 23/05/2011

A cepa *Wistar Audiogenic Rat* (WAR) é um modelo genético de crises tônico-clônicas generalizadas. Injeção de ocitocina (OT) na amígdala central (CeA) induz autolimpeza exacerbada em ratos *Wistar*, um modelo de compulsão. Através deste estudo analisamos o índice de autolimpeza após injeção de OT ou salina (SAL) na CeA e investigamos a associação entre os circuitos de um modelo genético de crise generalizada e compulsão ativados e detectados pela marcação de c-Fos nos núcleos do córtex orbitofrontal, estriado, núcleo paraventricular do hipotálamo, substância negra compacta e reticulada. Disfunções na expressão deste sistema podem explicar algumas das alterações comportamentais apresentadas pelos WAR. O comportamento de autolimpeza exacerbada induzido em WAR pela microinjeção de SAL foi equivalente ao comportamento de autolimpeza exacerbada induzido em ratos *Wistar* pela microinjeção de OT. Estes dados demonstram que os WAR apresentam uma exacerbção da autolimpeza (um modelo de compulsão) como comorbidade, em concordância com a atividade neuronal pela expressão de c-Fos em núcleos que fazem parte do circuito cortico-estriado-tálamo-cortical.

### **ANASTOMOSE TÉRMINO-LATERAL COM INTERPOSIÇÃO DE TUBO DE SILICONE: EFEITO DA "Artin M" NA REGENERAÇÃO DO NERVO PERIFÉRICO**

**Tâmara Siqueira Mota**

Orientador: Prof. Dr. Amilton Antunes Barreira  
Dissertação de Mestrado apresentada em 24/05/2011

Na dependência da distância entre cotos de um nervo seccionado, as fibras nervosas e o tecido de sustentação do nervo (fibras colágenas e perineuro, por exemplo) do segmento proximal não são capazes de crescer o suficiente para alcançar o segmento distal. A ablação de 10 mm de segmento do nervo ciático de ratos mesmo quando inserido entre os cotos um tubo de material neutro (polietileno), conectando o segmento proximal ao distal é sucedida por crescimento de poucos axônios ou nenhum axônio capazes de chegar ao coto distal. O mesmo ocorre, quando o tubo é preenchido por substância inerte (que não tenha propriedades indutivas do crescimento do tecido nervoso). Além da técnica de tubulização oferecer espaço fechado, no qual fatores neurotróficos normalmente sintetizados pelo nervo lesado se acumulam e facilitam o crescimento axonal, ela permite que fatores facilitadores da regeneração axonal sejam introduzidos dentro de tubos-guias. São exemplos desses fatores: matrizes celulares de fibrina, colágeno, laminina, células de Schwann, células da medula óssea e outros. Avaliações preliminares em nervos ciáticos de ratos *Wistar* evidenciaram que, efetuado o procedimento de tubulização acima descrito, se Artin M é misturada ao colágeno e a mistura é colocada no interior do tubo condutor, há profuso crescimento das fibras nervosas e, tecido de sustentação do nervo que atingem o segmento distal do

nervo. Tais achados são de grande importância pelo fato da tecnologia de obtenção da Artin M não ser dispendiosa e não se tratar de tecido animal, potencialmente sujeito à rejeição. Tem sido demonstrado que a anastomose término-lateral, quando se utiliza o coto distal de um nervo suturado à porção lateral de outro pode resultar em reinervação viável anatômica e funcionalmente. Tal tipo de anastomose aparentemente, não resulta em recuperação funcional tão viável quanto a que ocorre na anastomose término-terminal porque nesta a regeneração resulta dos cotos terminais dos axônios seccionados que têm grande potencial para crescimento. Na neurografia término-lateral, o crescimento resulta de brotamentos a partir de axônios íntegros que constituem o nervo normal, que passa a ser doador de brotamentos laterais que chegam ao músculo desnervado através do coto do nervo seccionado e suturado lateralmente no nervo doador. Os nervos que geraram os brotamentos laterais continuam o seu trajeto normal até o músculo. Neste modelo a potencialidade para a regeneração é menor. Com base em tais observações, utilizamos o método da anastomose término-lateral entre o nervo tibial de ratos *Wistar* e o nervo fibular previamente seccionado com o objetivo de verificar quantitativamente o crescimento dos axônios, células de Schwann e dos outros componentes de suporte e estruturais do nervo periférico até o coto distal, interpondo um tubo de silicone com "gap" de 5 mm entre o nervo tibial e o coto distal do fibular. Cada experimento durou 70 dias. Os controles negativos (tubo vazio) não se associaram ao crescimento axonal. Comparamos a efetividade da regeneração obtida com Artin M misturada ao colágeno e colágeno puro (agregado comercializado de fatores tróficos que estimula o crescimento do nervo). Ambas as preparações foram efetivas para promover o crescimento axonal, não havendo diferenças estatísticas, a não ser quando comparadas com o controle negativo. É possível que interação de componentes do colágeno com ArtinM (laminina por exemplo) interfiram na sua atividade. Experimentos futuros deverão comparar ArtinM em outro veículo (PBS?) e colágeno. Os nossos achados indicam também que quando se interpõe tubo de silicone entre a porção lateral de um nervo e o coto distal de outro (cuja conexão com o músculo foi preservada) - anastomose término-lateral - com um "gap" de 5 mm, há inefetividade de crescimento das fibras que não alcançam o coto distal.

## EPILEPSIA NA CRIANÇA COM TUMOR CEREBRAL: PERFIL CLÍNICO E EVOLUÇÃO DOS PACIENTES TRATADOS CIRURGICAMENTE

**Kylvia Gisele Fernandes Dantas Pinto**

Orientador: Prof. Dr. Américo Ceiki Sakamoto

Dissertação de Mestrado apresentada em 26/05/2011

**Introdução:** A associação entre epilepsia e tumor cerebral é comum e pode afetar substancialmente a rotina dos pacientes, mesmo quando o tumor já foi tratado (VAN BREEMEN et al 2007). Vários fatores podem interferir no mecanismo gerador de crises associadas aos tumores cerebrais, incluindo o tipo de tumor, sua localização, modificações genéticas tumorais e perilesionais (VAN BREEMEN et al 2007). Poucos estudos correlacionam crises epiléticas e tumores cerebrais na infância, especialmente com casuística nacional. A taxa de sobrevivência de crianças com tumor cerebral é maior que a de adultos (LEGLER et al 1999), assim, torna-se importante a identificação dos fatores prognósticos para o controle de crises desses pacientes.

Neste trabalho foram analisados os pacientes pediátricos atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP com diagnóstico de tumor cerebral associados à epilepsia, investigados e tratados cirurgicamente. Foram avaliados: variáveis clínicas, localização, exames anatomo-patológicos, exames complementares.

**Resultados:** O Video-eletrencefalograma (VEEG) identificou a zona epileptogênica em 95% dos casos, sendo que o lobo temporal esteve envolvido em 46,8% deles. A lesionectomia foi o tipo de cirurgia mais realizado (62,2%). Quanto à etiologia o tumor neuroepitelial disemбриoplástico - DNT (40,1%) e o ganglioglioma (17,8%) foram os tumores mais frequentes. A ressecção completa ocorreu em 70,7 % dos casos e a evolução do controle de crises no período pós-operatório foi favorável (Engel I) em 75,6% dos casos. Não ocorreu nenhum óbito relacionado ao procedimento cirúrgico ou suas complicações.

**Conclusões:** O tumor neuroepitelial disemбриoplástico (DNT) e o ganglioglioma foram as lesões mais frequentes, acometendo o lobo temporal na maioria das vezes. As lesões extra-temporais estiveram correlacionadas com maior número de crises no pré-operatório. As crianças com crises diárias pré-operatórias tiveram pior prognóstico do controle de crises. Já a duração da epilepsia exerceu influência sobre o desenvolvimento cognitivo. Um maior número de DAEs no período pré-operatório esteve correlacionado a difícil controle de crises no pós-operatório. Não houve correlação direta entre lesão residual e o controle de crises pós-operatório, indicando que a abordagem em mais de um tempo cirúrgico pode ser uma possibilidade a ser considerada, principalmente quando a lesão tumoral está localizada em área eloquente.

## MACROESTRUTURA DO SONO EM PACIENTES COM FIBROMIALGIA, ANTES E APÓS TRATAMENTO

**Alexandre Henrique Martori**

Orientadora: Profa. Dra. Regina Maria França Fernandes

Dissertação de Mestrado apresentada em 27/05/2011

Os objetivos do presente estudo foram: - avaliar a macroestrutura do sono de pacientes com Fibromialgia sem tratamento medicamentoso; - avaliar se há modificações na macroestrutura do sono, após a instituição de tratamento medicamentoso da síndrome com Amitriptilina ou Fluoxetina + Ciclobenzaprina; - avaliar a queixa de dor, através da Escala Analógica Visual (EVA), e de comprometimento do sono, utilizando escala semelhante adaptada para o sono (Escala de Qualidade do Sono - EQS), antes e após o tratamento. Vinte pacientes (19 mulheres e 1 homem) foram selecionados do ambulatório de Reumatologia do HCFMRPUSP, entre aqueles com diagnóstico clínico definido de fibromialgia, sem tratamento medicamentoso atual para a síndrome. Os pacientes preencheram a EVA e a EQS, antes e após a introdução do medicamento de escolha, ao mesmo tempo em que foram submetidos a polissonografia (PSG), antes e após tratamento. As alterações da macroestrutura do sono na primeira PSG foram aumento de N1, redução de N3 e aumento do número de microdespertares, o que pode ser, em parte, atribuído a efeito de primeira noite. Após o tratamento, houve aumento significativo na latência de sono REM e na porcentagem de N1, com tendência a aumento na eficiência de sono. Observou-se expressiva frequência de padrão alfa-delta, antes do tratamento (9 de 20 pacientes = 45%), mantendo-se inalterada após o mesmo. Apesar disto, após o tratamento, houve melhora significativa das queixas de dor e da qualidade do sono, segundo os dados das respectivas escalas analógicas. Três pacientes exibiram movimentos periódicos durante o sono a partir do segundo exame, o que foi atribuído ao efeito da medicação, não se repercutindo em redução na qualidade do sono, segundo auto-avaliação do paciente. O distúrbio respiratório não se mostrou como um fator relacionado aos transtornos do sono em fibromiálgicos, tendo sido observada síndrome da apnéia e hipopnéia obstrutivas do sono (SAHOS) em 3 dos 20 pacientes estudados (grau leve, em 2, e moderado em 1) Na segunda PSG, apenas 1 paciente se manteve com diagnóstico de SAOS. Em conclusão, observamos que o paciente com fibromialgia não exibe alterações significativas na macroestrutura do sono, antes de iniciar o tratamento, apesar de sua qualidade comprometida segundo a auto-avaliação do mesmo. A imposição do tratamento não modifica significativamente a macroestrutura do sono, porém, melhora as queixas dolorosas e a auto-avaliação da qualidade do sono. Entretanto, o padrão alfa-delta, sugestivo de sono não-reparador, ocorre em quase metade dos pacientes com fibromialgia, de forma independente do tratamento, e da referida melhora nos sintomas dolorosos e na qualidade subjetiva do sono, sugerindo a possibilidade deste ser um marcador cortical independente, cuja provável relação com a fisiopatologia da doença carece de maiores estudos.

## AÇÃO DO VÍRUS HSV-1 SOBRE A EXPRESSÃO DE FATORES NEUROTRÓFICOS NO GÂNGLIO DA RAIZ DORSAL DE CAMUNDONGOS: UMA ANÁLISE DOS MECANISMOS DE DOR CRÔNICA EM MODELO EXPERIMENTAL DE NEURALGIA PÓS-HERPÉTICA

**Paula Cristina dos Santos**

Orientador: Prof. Dr. Guilherme de Araujo Lucas

Dissertação de Mestrado apresentada em 30/05/2011

**Introdução:** A dor pós-herpética é uma síndrome dolorosa, que apresenta como sintomas a alodinia, hiperalgesia, dor espontânea e expansão da área sensibilizada. Neste trabalho investigamos o efeito da inoculação do vírus HSV-1 sobre a expressão de NGF, BDNF e GDNF no GRD, além disso, monitoramos a hipersensibilidade mecânica.

**Objetivos:** (1) Validar o modelo experimental de neuralgia pós-herpética através da análise do desenvolvimento de alodinia mecânica após a inoculação intradérmica do vírus VHS-1; (2) Investigar o efeito da inoculação do vírus VHS-1 sobre a expressão dos fatores neurotróficos NGF, BDNF e GDNF; (3) Investigar o efeito do tratamento crônico com o inibidor de recaptção de serotonina e noradrenalina, tanto sobre o efeito de alodínia mecânica, quanto sobre a expressão de NGF, BDNF e GDNF.

**Material e método:** Utilizamos camundongos da linhagem Balb/C machos com 20-25g. O vírus VHS-1 foi inoculado, intradérmica, unilateral na região da coxa esquerda. Os grupos experimentais foram divididos em; no grupo durante a replicação do vírus: 3, 5, 10 e 15 dias após a inoculação do vírus. E no grupo monitorado pelo tratamento com imipramina em 4 divisões: 1 - imipramina / vírus ativo; 2 - imipramina / vírus inativo; 3 - salina / vírus ativo; 4 - salina / vírus inativo, n= 22-26. O desenvolvimento de hipersensibilidade foi monitorado por filamentos de *Von Frey*. Para ver o efeito da imipramina

(30mg/kg) i.p., foi injetado 10 µl, diariamente por 28 dias a partir do 15º dia após a inoculação. Para a análise da expressão de BDNF, NGF e GDNF utilizamos o ensaio de ELISA e o tecido retirado desses animais foi o GRD esquerdo de L4 - L5.

**Resultados:** O ensaio de ELISA demonstrou que a expressão de NGF, BDNF e GDNF aumenta durante a replicação do vírus, principalmente no 15º dia após inoculação. O tratamento crônico com imipramina tem ação antialodínica em 3 semanas de tratamento, após a inoculação do VHS-1. Além disso no grupo com tratamento, o ensaio de Elisa demonstrou que há uma diminuição na expressão de GDNF, diferentemente dos grupos de NGF e BDNF que não apresentaram diferença significativa.

**Conclusão:** (1) A inoculação do vírus VHS-1 em animais, pode ser usado como modelo experimental de neuropatia pós-herpética. (2) O aumento da expressão de NGF, BDNF e GDNF, durante o período de replicação do vírus, é consequente da inoculação intradérmica do vírus (3) O efeito antinociceptivo do IRSN pode ser devido a atividade de GDNF e não de NGF e BDNF.

## **AValiação Estrutural, Qualitativa e Quantitativa do Nervo Frênico no Diabetes Experimental Agudo e Crônico: Efeito do Tratamento com Insulina**

**Adriana Cristina Licursi de Alcântara**

Orientadora: Profa. Dra. Valeria Paula Sassoli Fazan

Tese de Doutorado apresentada em 30/05/2011

Existem relatos na literatura sobre a paralisia do nervo frênico em pacientes diabéticos, mas a etiologia destas paralisias ainda é controversa. Não há descrições da literatura sobre a morfologia do nervo frênico em pacientes diabéticos. No entanto, há poucos relatos apontando que a morfologia do nervo frênico e sua função estejam prejudicadas em modelos experimentais de diabetes. O objetivo do presente estudo foi investigar os parâmetros morfométricos do nervo frênico no diabetes experimental agudo e crônico e os efeitos do tratamento com insulina sobre a morfologia e a morfometria das fibras e dos fascículos desse nervo. Ratos *Wistar* machos receberam uma única injeção intravenosa de estreptozotocina (40mg/kg) 15 dias (N = 6) ou 12 semanas (N = 6) antes dos experimentos. Ratos controles (N = 6 para cada grupo) receberam igual volume de solução tampão citrato. Ratos tratados com insulina (N = 6 para cada grupo) receberam, três dias após a injeção de STZ, uma dose diária subcutânea de insulina, até o dia do experimento. No dia do experimento, os ratos foram submetidos à anestesia e perfusão cardíaca com solução fixadora (glutaraldeído 2,5%). Em seguida, os nervos frênicos direito e esquerdo, foram dissecados e os segmentos proximal e distal, preparados para o estudo em microscopia de luz. A morfometria foi realizada com o auxílio de um sistema de análise de imagens e levou em consideração área e diâmetro fasciculares, número de fibras mielínicas e sua densidade, e número de núcleos de células de Schwann e sua densidade. Área e diâmetro das fibras mielínicas e seus respectivos axônios também foram investigados. A comparação foi feita entre os segmentos, lados e grupos e as diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Nossos resultados mostram que existem alterações na morfologia e morfometria dos fascículos e dos axônios mielinizados do nervo frênico em animais diabéticos, especialmente nos segmentos distais, nos animais do grupo agudo. Essas alterações se intensificaram nos animais do grupo crônico, atingindo os segmentos proximais. O tratamento com insulina impediu essas alterações. Estes resultados indicam a presença de uma neuropatia diabética do nervo frênico nesse modelo experimental que é progressivo de distal para proximal.

## **Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço**

### **EXPRESSÃO GÊNICA DAS METALOPROTEINASES MMP-1, MMP-2 E MMP-9 E SEU INIBIDOR TIMP-1 NA POLIPOSE NASOSSINUSAL E SUA CORRELAÇÃO COM A EXTENSÃO DA DOENÇA**

**Rafael Rossell Malinsky**

Orientadora: Profa. Dra. Wilma T. Anselmo-Lima

Tese de Doutorado apresentada em 19/04/2011

**Introdução:** A polipose nasossinusal (PNS) é uma doença, não neoplásica, inflamatória crônica da mucosa nasossinusal, que acomete entre 0,4 e 5% da população geral, sendo mais prevalente entre homens acima dos 40 anos de

idade. As características estruturais da PNS sugerem etiologia inflamatória, mediada por fatores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas, fatores de apoptose e metaloproteinases. As metaloproteinases (MMP), endopeptidases dependentes de cálcio e zinco, formam um grupo de enzimas que podem coletivamente degradar quase todos os componentes da matriz extracelular (MEC).

**Objetivos:** Avaliar a diferença de expressão gênica das metaloproteinases MMP-1, MMP-2, MMP-9 e seu inibidor TIMP-1 entre pacientes com pólipos nasais e controles, e a relação entre essa expressão e o estadiamento tomográfico dos pacientes. Casuística e Métodos: Foram estudadas 26 amostras de pólipos nasais de pacientes portadores de PNS; para o grupo controle foram selecionados 19 pacientes. Elaborou-se um protocolo clínico, sendo realizada endoscopia nasal e estadiamento radiológico pela escala de Lund-Mackay no pré-operatório. Foi estudada a expressão gênica dos RNAm, por meio de RTq-PCR, dos seguintes mediadores inflamatórios: MMP-1, MMP-2 e MMP-9 e TIMP-1 dos pólipos nasais e das amostras controles.

**Resultados:** Foram estudados 12 pacientes (46,7%) do sexo masculino e 14 (53,3%) do feminino. A idade desses pacientes variou de 16 a 71 anos, com média de 43,7 anos. A expressão gênica para MMP-1, MMP-2 e MMP-9 esteve aumentada nos pacientes quando comparados com o grupo controle, sendo estatisticamente significativa em todos os casos. Não foi encontrada a expressão do RNAm da TIMP-1, tanto nos pacientes como no grupo controle. Não houve significância estatística na correlação quando comparadas a extensão da doença e a expressão das MMP estudadas.

**Conclusões:** o aumento de expressão das MMP na polipose nasossinusal confirma o seu papel chave no remodelamento tecidual. Drogas que atuem na diminuição da sua expressão podem ter ação fundamental no impacto do tratamento dessa doença.

## ESTUDO DA MEMÓRIA FONOLÓGICA EM CRIANÇAS COM DESVIO FONOLÓGICO E DISTÚRBITO ARTICULATÓRIO

**Ana Carolina de Carvalho Felippini**

Orientadora: Profa. Dra. Marisa Tomoe Hebihara Fukuda

Dissertação de Mestrado apresentada em 27/04/2011

O presente estudo avaliou o desempenho de crianças portadoras de Desvio fonológico (GF) e de Distúrbio Articulatório (GA) em tarefas envolvendo a Memória de Trabalho Fonológica (MTF) comparando-as a crianças sem dificuldades fonológicas (GC). Os grupos foram compostos por pré-escolares, ambos os sexos, idade entre 5-6 anos, após avaliação audiológica, avaliação da linguagem (aspectos fonético/fonológico, semântico, sintático, pragmático) e das estruturas e funções do Sistema Estomatognático. A avaliação fonético/fonológica utilizou o instrumento de Avaliação Fonológica da Criança, (Yavas et al., 1991) e a avaliação da MTF a prova de Repetição de Palavras sem significado (Kessler, 1997). Os dados foram analisados estatisticamente pelo *Kruskal-Wallis-test* e para comparações múltiplas o *Dunn's Test*. O GC obteve melhor desempenho em MTF, nas categorias de uma a quatro sílabas ( $p < 0,5$ ) apesar de haver diminuição de acerto nos três grupos conforme se aumentava o número de sílabas. Constatou-se, também, melhor desempenho do GA em relação ao GF nas mesmas categorias ( $p < 0,5$ ) e igual desempenho na categoria uma sílaba. Nas palavras de cinco e seis sílabas, não houve acertos nos três grupos. Os resultados sugerem que crianças com distúrbios de fala podem apresentar prejuízos nas habilidades de MTF. Crianças com Desvio Fonológico, uma desordem que afeta a organização e planejamento da fala apresentaram prejuízos mais severos de MTF do que crianças com alterações apenas na produção da fala. Salienta-se a importância da memória fonológica no desenvolvimento fonético e fonológico da criança.

## EFEITO DA PLACA OCLUSAL MIORRELAXANTE E ACUPUNTURA COMO TRATAMENTO ADJUVANTE PARA PACIENTES PORTADORES DE TONTURA, ZUMBIDO E CEFALÉIA RELACIONADOS À DESORDEM TEMPOROMANDIBULAR

**Eduardo Affonso dos Reis**

Orientador: Prof. Dr. Miguel Angelo Hyppolito

Dissertação de Mestrado apresentada em 29/04/2011

A tríade Tontura, Zumbido, Cefaleia relacionados à disfunção temporomandibular (TZC/dtm) vem despertando interesse em investigações que tentam correlacionar estes sintomas. Suas interações anatômicas e neurofisiológicas são

importantes porque TZC/dtm, independentemente do subtipo que possa acometer um indivíduo, constituem um conjunto de sintomas muitas vezes concomitantes. Nos últimos anos, a acupuntura vem, cada vez mais, ampliando sua participação no arsenal terapêutico para o portador de TZC/dtm. Assim, a proposta deste estudo foi a de diagnosticar, avaliar e tratar a TZC/dtm numa abordagem multidisciplinar - otorrinolaringológica, odontológica e acupuntural. Foi elaborado um estudo clínico prospectivo em portadores crônicos de TZC/dtm com mais de seis meses de evolução. Três grupos foram selecionados - gral = grupo experimental; grle = grupo controle; grle/al = grupo controle/experimental. Todos pacientes foram tratados com acupuntura e placa oclusal miorelaxante. O grupo controle (grle), após 12 consultas de acupuntura placebo sem o uso da placa miorelaxante (placebo - placa), recebeu o tratamento efetivo, acupuntura "verdadeira" com o uso da placa miorelaxante (acupuntura + placa). Houve melhora dos sintomas em todos os grupos. O resultado do tratamento acupuntura + placa foi superior ao tratamento placebo - placa. As respostas obtidas no grle evidenciaram o efeito placebo da acupuntura. Porém, quando o grle recebeu o tratamento acupuntura + placa, apresentou uma melhora significativa ( $p < 0,05$ ). O tratamento acupuntura + placa evidenciou uma melhora precoce para a cefaleia e para a tontura. O sintoma zumbido necessitou de um maior número de consultas acupunturais para que sua melhora fosse evidente. O resultado do tratamento acupuntura + placa é efetivo para a melhora dos sintomas TZC/dtm e superior ao tratamento placebo - placa.

### **OTOTOXICIDADE VESTIBULAR PROVOCADA PELO USO SISTÊMICO DE AMINOGLICOSÍDEOS EM COBAIAS**

**Regina Maria da Silva Marquezini**

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Aparecido de Oliveira

Dissertação de Mestrado apresentada em 29/04/2011

A ototoxicidade continua sendo um desafio nos dias atuais. Apesar do desenvolvimento tecnológico na produção de antibióticos, os aminoglicosídeos continuam sendo os medicamentos de escolha no tratamento de algumas infecções, pela sua eficácia e baixo custo. Esta classe de antibióticos causa efeitos colaterais importantes nos sistemas auditivo e vestibular como, por exemplo, a tontura, o zumbido e a hipoacusia; muitas vezes irreversíveis e incapacitantes. Vários esforços têm sido feitos com o intuito de minimizar esses efeitos colaterais sem diminuir a eficácia destas drogas. O presente estudo foi desenvolvido com o intuito de pesquisar uma forma de proteção às células ciliadas dos órgãos vestibulares de cobaias por meio da análise do efeito da injeção intramuscular de dois aminoglicosídeos: a amicacina e a gentamicina, isoladamente, para verificar seus efeitos nestas células. E, após injeção prévia da amicacina em dose de habituação seguida de injeção da gentamicina em dose tóxica, há ocorrência do fenômeno da otoproteção cruzada, ou seja, se subdoses de amicacina protegem as células contra as lesões provocadas pela gentamicina em dose tóxica. Para tal, foram selecionadas 55 cobaias albinas com reflexo de Preyer positivo e otoemissões acústicas presentes. Os animais foram divididos em quatro grupos. No Grupo 1 foi administrada solução fisiológica 0,09%; Grupo 2, gentamicina 160 mg/kg/dia por 10 dias; Grupo 3, amicacina 20 mg/kg/dia por 30 dias e no Grupo 4, amicacina 20 mg/kg/dia por 30 dias, seguida de gentamicina 160 mg/kg/dia por 10 dias. Os animais foram sacrificados e os canais semicirculares, sáculo e utrículo de cada orelha, dissecados e preparados para serem analisados estruturalmente por microscopia eletrônica de varredura (MEV). O critério de avaliação utilizado foi o número de tufo de cílios presentes por campo no aumento de 3500x. Os resultados revelaram que a dose de amicacina utilizada não foi lesiva para as células ciliadas vestibulares dos canais semicirculares (laterais, superiores e posteriores), e que, quando utilizada em dose de habituação as protegeu contra a lesão provocada pela gentamicina. Já para o sáculo e o utrículo, os resultados foram inconclusivos. Estes resultados inéditos abrem caminho para futuras pesquisas na área da otoproteção para melhor entendimento dos mecanismos envolvidos neste processo e é um importante passo na luta contra a vestibulotoxicidade causada pelos aminoglicosídeos.

### **ESTREPTOMICINA - OTOTOXICIDADE E AUTOPROTEÇÃO**

**Sebastião Carlos Rodrigues da Silveira**

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Aparecido de Oliveira

Tese de Doutorado apresentada em 03/05/2011

Os aminoglicosídeos são as drogas com ototoxicidade conhecida, mais estudados, sendo a estreptomicina o primeiro a ter a ototoxicidade estudada e comprovada. O conhecimento dos mecanismos de lesões dos aminoglicosídeos

continua sendo um grande desafio, seja pela frequente irreversibilidade, como também pelo uso não descontinuado destes antibióticos, em decorrência da sua alta eficácia e ao seu baixo custo no tratamento de infecções. A descoberta dos mecanismos endógenos de autoproteção das células ciliadas externas cocleares (CCE) associadas a métodos de avaliações funcionais e histopatológicas das mesmas, em experimentação animal, abriu novas perspectivas de entendimento e controle destes mecanismos. Este estudo foi desenvolvido com os objetivos de avaliar os efeitos ototóxicos da estreptomicina nas cócleas e estruturas vestibulares de cobaias albinas e avaliar se existe autoproteção aos efeitos ototóxicos desta, quando se aplica a dose de 100 mg/kg/dia por 30 dias, antes da aplicação da dose de 700 mg/kg/dia por 10 dias. Foram utilizadas 23 cobaias albinas machos, divididas em quatro grupos: No Grupo 1 foi administrada água destilada; no Grupo 2, estreptomicina 100 mg/kg/dia por 30 dias; no Grupo 3, estreptomicina 700 mg/kg/dia por 10 dias e no Grupo 4, estreptomicina 100 mg/kg/dia por 30 dias seguida de estreptomicina 700 mg/kg/dia por 10 dias, por via intramuscular. Alterações histopatológicas e funcionais nas cócleas e estruturas vestibulares das cobaias foram avaliadas ao fim do experimento. A avaliação funcional foi realizada por meio de pesquisa de emissões otoacústicas por produto de distorção (EOAPD), do limiar auditivo pelos potenciais evocados auditivos de tronco encefálico (PEATE), e de eletro-nistagmografia (ENG). A avaliação da integridade das células ciliadas foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados revelaram que a estreptomicina aplicada na dose de 700 mg/kg/dia por 10 dias não causa lesões histopatológicas e funcionais às cócleas de cobaias albinas, mas provoca lesões anatômicas e funcionais importantes às estruturas vestibulares. O estudo também mostrou que a dose de estreptomicina de 100 mg/kg/dia por 30 dias, aplicada antes da dose de 700 mg/kg/dia por 10 dias, desencadeia o mecanismo de autodefesa das células ciladas das cristas dos canais semicirculares, demonstrado pela MEV e ENG. Nas avaliações histopatológicas e funcionais das estruturas vestibulares, sáculo e utrículo, o fenômeno da autoproteção não estava presente. Estes resultados são discutidos no âmbito do entendimento dos mecanismos de ototoxicidade e otoproteção da orelha interna em cobaias, bem como da necessidade de mais estudos com a associação de parâmetros histopatológicos, funcionais, eletrofisiológicos, bioquímicos e histoquímicos para melhor monitoramento e compreensão da ototoxicidade por drogas em humanos e dos mecanismos de autodefesa.

## **Ortopedia, Traumatologia e Reabilitação**

### **DESENVOLVIMENTO EX VIVO DE UM IMPLANTE INTRAMEDULAR PARA FIXAÇÃO DE OSTEOTOMIAS ROTADORAS DO FÊMUR, EM PACIENTES COM SEQUELA DE PARALISIA CEREBRAL**

**Rodrigo Gonçalves Pagnano**

Orientador: Prof. Dr. José B. Volpon

Tese de Doutorado apresentada em 15/04/2011

A osteopenia de rotação do fêmur, para correção da anteversão femoral aumentada, é procedimento realizado frequentemente em pacientes com sequela de paralisia cerebral (PC) e, eventualmente, também pode ser realizada em pacientes sem outras alterações associadas. Em ambos os casos, a placa de ângulo fixo é atualmente o método mais comumente usado para estabilização. Este implante provê fixação interna rígida de maneira satisfatória, porém requer abordagem cirúrgica de todo o segmento ósseo no qual ficará apoiado. Como nos pacientes com sequela de PC é comum que esta cirurgia seja realizada em conjunto com outros procedimentos em um mesmo ato operatório, o uso de um implante que promova fixação estável e que utilize técnica minimamente invasiva pode resultar em menor morbidade cirúrgica. O objetivo deste estudo foi desenvolver um implante composto de haste intramedular com bloqueio do fêmur infantil por meio de técnica percutânea. O trabalho foi realizado em quatro etapas. Na primeira, foi desenvolvido um protótipo com desenho e dimensões adequados para aplicação em crianças na faixa etária de 10 anos. Na segunda etapa foram obtidos modelos de osso sintético a partir de pacientes com alterações típicas da paralisia cerebral, por meio da técnica de prototipagem, com a finalidade de se realizar ajustes finos no implante. Na terceira etapa o protótipo foi implantado em modelos de osso sintético com morfologia normal e com alterações morfológicas típicas da paralisia cerebral, com simulações de osteotomias de rotação. O conjunto modelo ósseo e implante foi, então, submetido a testes mecânicos de flexocompressão e torção que foram comparados com os do implante de referência para este tipo de osteotomia, a placa AO de ângulo fixo. Foi observado que houve adaptação adequada da haste tanto nos modelos de fêmur normal, quanto nos modelos com alterações morfológicas, e nas simulações de osteotomia. Na comparação com a placa, a estabilidade obtida foi menor, porém isto pode ser atribuído ao princípio de fixação flexível próprio dos dispositivos intramedulares.

## **EFEITO DA NIFEDIPINA POR VIA SISTÊMICA NA ANALGESIA PÓS-OPERATÓRIA INDUZIDA PELO SUFENTANIL INTRATECAL EM PACIENTES SUBMETIDAS À LIPOABDOMINOPLASTIA EM CARÁTER AMBULATORIAL**

**Breno Jose Santiago Bezerra de Lima**

Orientador: Prof. Dr. Luis Vicente Garcia

Tese de Doutorado apresentada em 16/05/2011

Canais de cálcio dependentes da voltagem têm um importante papel na transmissão de impulsos nociceptivos e alterações das concentrações extracelulares de íons cálcio podem modificar a analgesia opioide. No entanto, a utilização de bloqueadores de canais de cálcio produziu resultados conflitantes no tocante à potencialização ou prolongamento da analgesia opioide. O sufentanil, pela alta lipossolubilidade e consequente baixo potencial para depressão respiratória tardia, pode ser utilizado pela via subaracnoidea em pacientes ambulatoriais. Para ser considerado o opioide ideal para uso subaracnoideo falta-lhe a capacidade de produzir analgesia prolongada. O objetivo deste trabalho foi testar se a nifedipina oral pode aumentar a sua duração e potência. Trinte e seis pacientes do sexo feminino, ASA I ou II e idade entre 20 e 60 anos, submetidas à lipoabdominoplastia sob regime ambulatorial foram casualizada em 3 grupos, de acordo com a quantidade de nifedipina recebida no pré-operatório. Foram confeccionadas 13 cápsulas semelhantes que continham amido ou 10 mg de nifedipina e entregues para cada uma das pacientes durante a avaliação pré-anestésica que aconteceu com a antecedência mínima de cinco dias do procedimento cirúrgico. As pacientes foram orientadas a ingerir 3 (três) cápsulas por dia, com intervalo de 8 horas entre cada ingestão, durante 4 (quatro) dias, totalizando 12 cápsulas. A 13ª cápsula foi ingerida 60 minutos antes do procedimento anestésico. As pacientes do Grupo A ingeriram 13 cápsulas de amido, as do Grupo B ingeriram 12 cápsulas contendo amido e a 13ª contendo 10 mg de nifedipina e as do Grupo C ingeriram 13 cápsulas contendo 10 mg de nifedipina. A PA e a FC foram aferidas em seis momentos: imediatamente antes do procedimento anestésico (M1), 5 (cinco) minutos após a realização da punção subaracnoidea (M2), 60 (sessenta) minutos após a realização da punção subaracnoidea (M3), ao término do procedimento cirúrgico (M4), no momento da primeira queixa dolorosa (M5) e no momento da alta hospitalar (M6). A técnica anestésica foi semelhante em todos os grupos e constou de raquianestesia e administração de solução contendo 20 mg de bupivacaína pesada e 5 microgramas de sufentanil. Após a punção e administração das medicações, o nível do bloqueio pretendido (T4) foi controlado pelo posicionamento da mesa cirúrgica. As pacientes foram orientadas a informar o momento em que sentissem dor pela primeira vez. Considerou-se como tempo de analgesia, o tempo (minutos) decorrido entre a punção subaracnoidea e esta primeira queixa. Neste momento, foi realizada a mensuração da intensidade da dor por meio da escala analógica visual. A intensidade da dor foi novamente avaliada no momento da alta hospitalar, da mesma forma que no momento da primeira queixa. Não houve diferença no comportamento hemodinâmico entre os grupos. O grupo C apresentou maior tempo de analgesia e menor escore de dor no momento da primeira queixa. Não houve diferença entre os grupos quanto ao escore de dor no momento da alta hospitalar. A nifedipina administrada durante 4 dias no pré-operatório prolongou o tempo e a intensidade da analgesia induzida pelo fentanil.

## **ANÁLISE DE FATORES PREDITIVOS PARA A MANUTENÇÃO E PERDA DA MARCHA - ACOMPANHAMENTO DE CRIANÇAS COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE**

**Tatiana Maciel Pizzato**

Orientadora: Profª Drª Ana Cláudia Matiello-Sverzut

Dissertação de Mestrado apresentada em 18/05/2011

O objetivo deste estudo foi avaliar a progressão da perda da força muscular (FM) associada ao comprometimento da marcha de crianças com Distrofia Muscular de Duchenne (DMD). O estudo visou verificar se as variáveis testadas refletem as perdas funcionais em curso. Participaram do estudo 18 crianças com DMD do Ambulatório de Doenças Neuromusculares do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) que formaram dois grupos: GnC, crianças deambuladoras (n=11) e GC, crianças que se tornaram cadeirantes ao longo dos 33 meses do estudo (n=7). Os participantes foram acompanhados por um período mínimo de 6 meses e



máximo de 33 meses e foram avaliados em encontros trimestrais. Avaliação fisioterapêutica contemplou a classificação da força muscular manual (FM - MRC de 0 a 5), dinamometria de preensão palmar e escalas funcionais (Vignos e Archibaldi - VA, Vignos e Archibaldi modificada - VAm e Physician Rating Scale de membro inferior - PRS). O teste dos 10 metros (T10) foi selecionado para quantificar o tempo de marcha em percurso determinado. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Clínica do HCFMRP-USP, processo 6990/2007 e os responsáveis pelos participantes assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os dados foram analisados de duas formas: perfil médio dos participantes (GnC e GC para as variáveis T10, PRS e dinamometria) e o perfil individual (GnC e GC para as variáveis T10, PRS, dinamometria e força muscular). Análise descritiva foi realizada para todas as variáveis. Posteriormente, considerando dados de T10, foi realizada uma regressão logística para calcular a probabilidade da criança com DMD tornar-se cadeirante. O teste t de Student foi utilizado para confirmar a diferença entre os grupos GC e GnC na dinamometria. O software utilizado foi o Statistical Analysis System (SAS), Versão 9.1. Para o perfil médio, a PRS e a dinamometria mostraram desempenho diminuído para o GC comparado ao GnC e não apresentaram diferenças significativas entre os grupos na 3ª avaliação. O T10 mostrou diferença significativa na 3ª avaliação e aumento no tempo de execução do teste no GC. No perfil individual, a dinamometria mostrou oscilação na força durante o período analisado, porém, o GC apresentou menor magnitude de força comparado ao GnC. Na PRS, ambos os grupos obtiveram desempenho similar no período analisado. Não houve diferenças quanto à lateralidade para ambos os grupos na PRS e na dinamometria. Para o T10, o GC mostrou aumento no tempo de execução do teste comparado ao GnC ( $p < 0,05$ ). No momento de agravamento no desempenho do T10, observou-se que a FM de membro inferior obtida assemelhou-se àquela encontrada na avaliação que precedeu a perda da marcha. Força muscular reduzida foi observada em todos os grupos musculares de membro inferior, com especial diminuição nos músculos extensores de quadril e de joelho (graus 2 e 3, respectivamente). As escalas funcionais VA e VAB mostraram similaridade nas suas respectivas pontuações, apesar do grupo GnC indicar escores superiores ao GC. O T10 mostrou-se sensível para detectar a probabilidade da criança com DMD tornar-se cadeirante. A partir desses resultados pode-se compor um score de categorização, utilizando-se níveis temporais (em seg), de forma a descrever a susceptibilidade das crianças para a perda da marcha. As escalas de VA e VAB, classicamente utilizadas pelos terapeutas na prática clínica junto aos pacientes com DMD, não parecem ser bons preditores para perda da marcha.

## **AValiação BIOMECÂNICA DO MEMBRO INFERIOR DE INDIVÍDUOS COM DOR ANTERIOR NO JOELHO DURANTE ATIVIDADE DE SUBIDA E DESCIDA DE ESCADA**

**Lilian Ramiro Felício**

Orientadora: Profª Drª Débora Bevilaqua Grossi

Tese de Doutorado apresentada em 25/05/2011

Alterações na biomecânica do membro inferior são frequentemente relacionadas com a dor anterior no joelho (DAJ). Recentemente, tem sido abordado que os fatores de risco proximais ao joelho poderiam ocasionar a DAJ. Principalmente alterações na inclinação lateral pélvica parecem estar associadas ao aumento da rotação interna e adução do quadril e ao aumento do valgo no joelho, tais fatores podem ocasionar o aumento da força de reação femoropatelar. Foram avaliados no presente trabalho a cinemática e cinética das articulações do quadril, joelho e tornozelo nos planos frontal, sagital e transversal em 20 mulheres saudáveis com média de idade de 21,1m com massa corporal de 57,1 e 22 mulheres com DAJ com média de idade de 21,9, com massa corporal de 59,2. A avaliação biomecânica foi realizada durante a fase de apoio nas atividades de subida e descida da escada. Os dados cinemáticos foram analisados usando a sequência de ângulos Euler - Z X' Y" (flexão/extensão, abdução/adução, rotação externa/interna) e os momentos determinados por meio de dinâmica inversa. Foi avaliado o membro dominante para o grupo controle e o membro doloroso para o grupo DAJ. A avaliação fisioterapêutica revelou que o grupo DAJ apresentou um decréscimo de 20% na força dos abdutores do quadril em relação do grupo controle. Na comparação entre os grupos, os dados revelaram que durante a atividade de subida da escada o grupo DAJ apresentou um aumento na inclinação lateral da pelve, maior adução e rotação externa do quadril. Em relação ao joelho foi observado um aumento no valgo a partir de 50% da fase de apoio no grupo controle. A articulação do tornozelo demonstra no final da fase de apoio para o grupo DAJ uma leve eversão, sendo observado também um aumento do momento inversor para este grupo a partir de 30% da fase de apoio. Durante a atividade de descida apesar de exigir um

maior controle motor, foi observado diferença entre grupos em poucas variáveis. O quadril apresentou uma menor flexão e um aumento da abdução do membro de apoio e um aumento da adução do membro em balanço para o grupo DAJ. Em relação ao joelho foi observado um aumento do momento varo para o grupo DAJ. Em relação ao joelho foi observado um aumento do momento varo para o grupo DAJ, o que está relacionado com o aumento estresse femoropatelar. A articulação do tornozelo demonstra um comportamento maior de dorsiflexão para o grupo DAJ quando comparado ao grupo controle. Em relação aos dados de cinética, apenas o momento inversor mostrou-se inferior para o grupo DAJ durante 10-40% da fase de apoio. Estes dados apontam uma fraqueza dos músculos abdutores do quadril que poderia estar relacionada ao aumento da inclinação lateral da pelve, e associada ao aumento da eversão e do momento articular de DAJ observado pelo aumento do momento varo durante a descida da escala.

### **AVALIAÇÃO DOS MÚSCULOS DO ASSOALHO PÉLVICO E RELATOS DE PERDA URINÁRIA EM MULHERES COM SÍNDROME DO OVÁRIO POLICÍSTICO, OBESAS E NÃO OBESAS, E CORRELAÇÕES COM OS NÍVEIS HORMONAIS**

**Flávia Ignácio Antônio**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristine Homsy Jorge Ferreira

Dissertação de Mestrado apresentada em 27/05/2011

A Síndrome do Ovário Policístico (SOP) é a endocrinopatia mais frequente nas mulheres em idade reprodutiva. Caracteriza-se por hiperandrogenismo clínica e/ou bioquímico e irregularidades menstruais, e, provavelmente, é a causa mais comum de hirsutismo e infertilidade. Androgênios e esteróides anabólicos têm sido usados para aumentar a massa muscular e força. Devido à alta prevalência de hiperandrogenismo em SOP, é plausível que mulheres com SOP possam ter aumento da massa muscular e da função dos músculos do assoalho pélvico (MAP) quando comparadas com controles. Objetivo: Avaliar a força indireta dos MAP e os relatos de perda urinária de mulheres com SOP, obesa e não obesa e correlacionar com níveis hormonais.

**Métodos:** Foram incluídas no estudo 131 mulheres no total, e divididas em quatro grupos: 1) SOP O - mulheres com diagnóstico de SOP, não obesa, 2) C NO - mulheres controle (com ciclos menstruais regulares) não obesas, 3) SOP O - mulheres com diagnóstico de SOP obesas; 4) C O - mulheres obesas controle. Os MAP foram avaliados por meio do exame digital do Free Androgen Index (FAI). Todas as mulheres responderam a um questionário sobre qualidade de vida em saúde e as que relataram queixa de perda urinária responderam ao questionário International Consultation on Incontinence ?Questionnaire.

**Resultados:** Não houve diferença estatística com relação à força indireta dos MAP entre os grupos com SOP e em relação às obesas. Os relatos de perda urinária foram maiores no grupo C NO, em relação ao grupo SOP NO, porém não houve diferença quanto à severidade da IU entre grupos. Através do SF46 pôde-se observar que o grupo C NO apresentou escore maior no domínio estado geral em saúde do que o grupo SOP NO.

**Conclusão:** A força indireta dos MAP de mulheres com SOP não apresentou diferença quando comparadas a controles.

### **ESTUDO EXPERIMENTAL "IN VIVO" DA COMPARAÇÃO BIOMECÂNICA E HISTOMORFOMÉTRICA DE PARAFUSOS CERVICAIS ANTERIORES AUTOMACHEANTES E AUTOPERFURANTES NAS FASES AGUDA E CRÔNICA DA INSERÇÃO**

**Maximiliano Aguiar Porto**

Orientador: Prof. Dr. Helton Luis Aparecido Defino

Tese de Doutorado apresentada em 28/06/2011

Estudo experimental "in vivo" destinado a comparar o torque de inserção, a resistência ao arrancamento e a interface osso-implante de parafusos cervicais anteriores automacheantes e autoperfurantes imediatamente e oito semanas após inserção na coluna cervical (C2-C6). Foram utilizadas 30 vértebras cervicais (C2-C6) provenientes de seis carneiros deslançados da raça Santa Inês (massa corporal média: 35.7 ± 4,8kg) (n=30 vértebras). Uma de cada modalidade de parafuso (automachante e autoperfurante) foi destinada para cada um dos cinco níveis espinhais (C2-C6) aos pares. O torque de inserção dos parafusos foi mensurado por meio de um torquímetro. Três animais foram sacrificados imediata-

mente depois da inserção dos parafusos (fase aguda) e três animais após oito semanas (fase crônica). As vértebras foram aleatoriamente destinadas para testes biomecânicos de resistência ao arrancamento e análise histomorfométrica para avaliar a interface osso-implante (porcentagem de contato ósseo à região rosqueada do implante, área óssea dentro dos passos de rosca e fora dos passos de rosca). Os parâmetros biomecânicos e histomorfométricos foram analisados estatisticamente pelo modelo linear de efeitos mistos. Resultados: O torque de inserção necessário para parafusos autoperfurantes foi maior que o requerido para implantes automacheantes. A resistência ao arrancamento dos parafusos autoperfurantes foi significativamente superior que a observada nos parafusos automacheantes na fase aguda e crônica. A porcentagem de contato ósseo à região rosqueada e a área óssea dentro do passo de rosca foram significativamente maiores nos testes de parafusos autoperfurantes nas fases aguda e crônica. Não foi observada diferença estatística na área óssea mensurada na região fora dos passos de rosca de parafusos autoperfurantes e automachantes nas fases aguda e crônica da inserção dos implantes. Conclusão: O desenho de parafuso autoperfurante utilizado neste estudo apresentou maior torque de inserção e promove melhor ancoragem que o implante automacheante nas fases aguda (mediata) e crônica (oito semanas) após inserção. A porcentagem de contato ósseo ao implante e a densidade óssea dentro do passo de rosca foram maiores nos parafusos autoperfurantes nas fases aguda e crônica.

## Patologia Experimental

### **EFEITOS DO METIL-JASMONATO NANOCARREADO (A14) NA REDUÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR, INIBIÇÃO DA ANGIOGÊNESE E INDUÇÃO DE APOPTOSE EM CÉLULAS DE MELANOMA (B16/F10) IMPLANTADAS EM CAMUNDONGOS**

**Jean Gonzales Menezes**

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Zucoloto

Dissertação de Mestrado apresentada em 10/05/2011

O melanoma é um dos cânceres mais agressivos e letais, cuja progressão e desenvolvimento depende de diversos fatores, tais como a exposição a radiação ultravioleta, fenótipo e genótipo celular. Em condições normais, os queratinócitos controlam o crescimento e o comportamento dos melanócitos através do complexo sistema dos fatores de crescimento parácrino e de moléculas de adesão. A perda deste controle acarreta em progressão tumoral. No entanto, o prognóstico e a profunda toxicidade nos tratamentos disponíveis demonstram claramente a necessidade da busca de novos fármacos, que combinem alta eficácia e baixa toxicidade. O metil jasmonato A14 é um composto nanocarreado em uma base de açúcar hidrofílico que apresenta um efeito antitumoral. O objetivo do nosso estudo foi determinar o efeito do A14 no processo de apoptose, angiogênese e regressão tumoral em camundongo com melanoma (induzido por implantação de células B16F10). O A14 não teve toxicidade direta sobre o hospedeiro e reduziu significativamente o volume tumoral, a angiogênese, bem como induziu a apoptose no modelo animal por implantação de células B16F10 subcutânea. O efeito do A14 sobre a neovascularização foi observado em análise histológica e por imunistoquímica. Esse efeito é mediado, em parte pelo bloqueio da expressão do HIF-1, portanto prevenindo a neovascularização tumoral. Concluímos que os efeitos do A14 sobre a neovascularização são compatíveis com a sua ação antitumoral. Novas pesquisas utilizando o A14 podem elucidar o seu uso clínico em humanos.

### **A ATIVAÇÃO DO FATOR NUCLEAR KAPPA-B *VERSUS* A INIBIÇÃO DA PROIBITINA NO DESENVOLVIMENTO O CÂNCER HEPÁTICO EM HUMANOS**

**Lívia Maria Della Porta**

Orientadora: Profa. Dra. Leandra Nária Zambelli Ramalho

Dissertação de Mestrado apresentada em 08/06/2011

O fator nuclear kappa B (NFkB) tem sido implicado em vários fenômenos biológicos, incluindo a carcinogênese hepática, associada principalmente a eventos inflamatórios. A proteína proibitina pode agir como um supressor tumoral e inibir a ativação do NFkB. O objetivo deste estudo foi investigar a relação do NFkB e a expressão da proibitina em colangiocarcinomas (CC) e carcinoma hepatocelular (HCC). A expressão do NFkB foi aumentada na hepatite e no HCC, e

com uma discreta marcação em CC. Os outros marcadores como o TNFR1, TRAIL e p65 seguiram o mesmo perfil de marcação do CC. A apoptose foi aumentada em CC, mas foi reduzida na hepatite e no HCC. A expressão da proibitina foi aumentada na hepatite, cirrose e CC, enquanto no HCC foi reduzida. Estes resultados sugerem que, apesar da sequência de eventos pró-inflamatórios a ativação do NFkB induzida por TNFR, bem como a apoptose mediada por via NFkB/TRAIL, e o desenvolvimento do câncer hepático humano também é submetido à regulação pela proibitina, que tem função de supressor do tumoral. De tal forma, outros estudos serão necessários para explicar os mecanismos contraditórios do microambiente tumoral observado em HCC e CC.

## **PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NA LESÃO MIOCÁRDICA INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE PELA ADMINISTRAÇÃO DE ISOPROTERENOL EM BAIXAS DOSES**

**Valdecir Blefari**

Orientador: Prof. Dr. Marcos A. Rossi

Dissertação de Mestrado apresentada em 21/06/2011

A administração de catecolaminas exógenas tem sido frequentemente usada para a indução de lesão cardíaca semelhante ao infarto agudo do miocárdio. O uso de isoproterenol, catecolamina sintética que atua exclusivamente em receptores  $\beta$ -adrenérgicos, induz necrose miocárdica aguda em animais de maneira similar à doença humana (*infarct-like lesion*). Essa lesão está relacionada aos efeitos cronotrópico e inotrópico positivos com aumento na demanda de oxigênio pelo músculo cardíaco causando complexas alterações bioquímicas e estruturais nos cardiomiócitos. Acredita-se que as espécies reativas de oxigênio (EROs) sejam importantes mediadores de lesão celular contribuindo para o desenvolvimento da lesão miocárdica através da geração de adutos de 4-hidróxido-2-nonenal (4-HNE) e malondialdeído (MDA) derivados da peroxidação lipídica (LPO). Resultados anteriores obtidos em nosso laboratório demonstraram aumento da permeabilidade sarcolemal em cardiomiócitos de animais tratados com isoproterenol. O presente estudo teve como objetivo avaliar o papel da LPO na lesão miocárdica induzida pela administração de baixas doses de isoproterenol em ratos *Wistar*. Os animais foram divididos em dois grupos: grupo controle (CTRL), submetido à injeção intraperitoneal de salina e grupo tratado (ISO), submetido à injeção intraperitoneal de 2mg/Kg/dia de cloridrato de DL-Isoproterenol diluído em salina. Foram avaliados a morfologia cardíaca, os níveis de 4-HNE, MDA, glutatona reduzida (GSH) e a permeabilidade da membrana sarcolemal, após 24 horas, 3 dias e 7 dias da administração de isoproterenol. Nossos resultados demonstraram que o aumento da permeabilidade da membrana está associado ao aumento dos níveis de 4-HNE e MDA e redução dos níveis de GSH, o que sugere um papel importante da peroxidação lipídica da membrana sarcolemal no desenvolvimento primário da lesão miocárdica induzida pelo isoproterenol.

## **Saúde da Criança e do Adolescente**

### **ANÁLISE VETORIAL DE IMPEDÂNCIA BIOELÉTRICA E ÂNGULO DE FASE EM LACTENTES DE 30 A 90 DIAS DE IDADE A TERMO, ADEQUADOS PARA A IDADE GESTACIONAL**

**Roseli Borges donegá Toffano**

Orientadora: Profa. Dra. Jacqueline Pontes Monteiro

Dissertação de Mestrado apresentada em 30/05/2011

Devido às dificuldades encontradas excessiva variabilidades de água no organismo do lactente, considera-se a análise vetorial de impedância bioelétrica (BIVA) um método propício para avaliação da composição corporal. Trata-se de um método que não faz nenhuma suposição sobre valores da composição corporal, podendo ser controlado por seus próprios valores, independente de equações ou modelos. Os objetivos deste estudo foram descrever valores de referência e criar curvas de BIVA para lactentes saudáveis de 30 a 90 dias de vida e descrever valores de normalidade de ângulo de fase em lactentes a termo, sadios e adequados para a idade gestacional de 30 a 90 dias de idade, além de comparar os dados de BIVA entre os sexos e entre os existentes na literatura para neonatos e lactentes jovens, com os obtidos neste estudo. Este estudo descritivo transversal avaliou 150 lactentes do Centro Médico Social Comunitário Vila Lobato de Ribeirão Preto – SP - Brasil. Foram coletados dos lactentes os dados antropométricos e a impedância bioelétrica (aparelho de monofrequência RJL System ® modelo Quantum II – 800 iA e 50 KHz). Usando distribuição bivariável normal de resistência e reactância por

comprimento (R/H e Xc/H) do lactente, respectivamente, foram calculados e assim confeccionados os gráficos RXc com os intervalos de tolerância de 95, 75, 50% do valor vetorial da impedância por meio do BIVA Software 2002. Foram avaliados 150 lactentes (48,6% do sexo feminino), nascidos a termo, adequados para idade gestacional e em aleitamento materno exclusivo. A idade média foi 56,4 ( $\pm 23,1$ ) dias. O peso médio encontrado foi de 5038,5g ( $\pm 902,4$ ), sendo maior no sexo masculino ( $p = 0,001$ ). Quanto ao comprimento corporal, a média foi 56,0 cm ( $\pm 0,03$ ), sendo maior no sexo masculino ( $p = 0,001$ ). As médias de R ( $\pm DP$ ) foram 521,2 ( $\pm 52,1$ ); 519,4 ( $\pm 53,4$ ) e 523,0 ( $\pm 51,1$ )  $\bar{U}$ , e para Xc foram 39,2 ( $\pm 5,3$ ); 38,6 ( $\pm 5,5$ ) e 39,7 ( $\pm 4,9$ )  $\bar{U}$ , respectivamente para todos os lactentes, e separados por sexo (meninos e meninas), não havendo diferença entre os sexos ( $p = 0,6$ ) e ( $p = 0,1$ ). Em relação ao ângulo de fase, encontrou-se o valor de normalidade de 4,3° ( $\pm 0,7^\circ$ ) para todos os lactentes, 4,3° ( $\pm 0,6^\circ$ ) para os do sexo masculino e 4,4° ( $\pm 0,5^\circ$ ) para os do sexo feminino, não havendo diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,3$ ). Para a análise vetorial de lactentes de 30 a 90 dias de idade, devem ser utilizados os valores de referência específicos para esta faixa etária e sexo, pois estes se apresentaram diferentes dos descritos na literatura. Com o modelo de estudo BIVA torna-se possível a comparação direta do vetor medido na criança pequena ou com necessidade de cuidados especiais com os intervalos de tolerância de referência de lactentes saudáveis, permitindo uma avaliação qualitativa da composição corporal e sem erro de predição das fórmulas. Com os valores de ângulo de fase caracterizados no presente estudo para lactentes brasileiros saudáveis, de 30 a 90 dias de idade, dados de pacientes críticos podem ser comparados, sendo útil durante a internação e acompanhamento de pacientes graves.

## ANÁLISE VETORIAL DE IMPEDÂNCIA BIOELÉTRICA E ÂNGULO DE FASE EM ADOLESCENTES

**Mariana Giaretta Mathias**

Orientadora: Profa. Dra. Jacqueline Pontes Monteiro  
Dissertação de Mestrado apresentada em 20/06/2011

Uma nova maneira de aplicação da impedância bioelétrica é a análise vetorial (BIVA), que permite a avaliação do paciente por meio de medidas diretas do vetor da impedância, sem conhecimento anterior do peso corporal. Nesse método, medidas de impedância, padronizadas para altura, são ponteadas no plano resistência- reactância. Sendo assim, ao coletar essas informações e observar a migração do ângulo de fase, é possível classificar o estado nutricional do indivíduo. Os objetivos do presente estudo foram descrever valores de normalidade para resistência, reactância e ângulo de fase e criar curvas de BIVA para adolescentes saudáveis de 10 a 20 anos incompletos. Foram avaliados 573 adolescentes de uma unidade básica de saúde e de uma escola estadual da cidade de Ribeirão Preto, São Paulo. Foram coletados dados de antropometria e de impedância bioelétrica, o que permitiu a confecção dos gráficos RXc com os intervalos de tolerância de 50, 75 e 95% do valor vetorial da impedância. Os valores antropométricos avaliados indicaram diferenças significativas na maioria das variáveis entre as faixas etárias de 10 a 16 anos. Dos 17 aos 19 anos, nenhuma variável foi estatisticamente diferente. A comparação entre os intervalos de tolerância não indicou diferenças entre os vetores das faixas etárias de 10 e 11 anos e de 14 a 19 anos. A comparação entre os sexos indicou diferença entre os vetores para todas as faixas etárias, exceto aos 12 anos. A comparação com a literatura indicou que aos 12 anos o vetor foi diferente e aos 13 anos não foi possível encontrar diferença estatística. Com o modelo de BIVA apresentado, torna-se possível a comparação direta do vetor de um adolescente com os intervalos de adolescentes saudáveis, permitindo a avaliação nutricional sem conhecimento de medidas antropométricas prévias, sendo, portanto, uma importante ferramenta para profissionais de saúde na avaliação nutricional desses pacientes.

## Saúde Mental

### PADRÕES BIOCUMPORTAMENTAIS DE REATIVIDADE À DOR E AUTORREGULAÇÃO EM NEONATOS PRÉ-TERMO

**Beatriz Oliveira Valeri**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Beatriz Martins Linhares

Dissertação de Mestrado apresentada em 06/05/2011

A dor encontra-se inerente ao contexto dos recém-nascidos pré-termo internados em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN). As experiências precoces e repetidas de dor podem ter efeitos em longo prazo para os neonatos vulneráveis. As respostas de dor podem ser afetadas por variáveis do organismo e variáveis do contexto clínico neonatal. O presente estudo teve por objetivo avaliar os padrões biocomportamentais de reatividade à dor e autorregulação em neonatos pré-termo, observados em procedimento punção para coleta de sangue e comparar a reatividade e a recuperação de acordo com o sexo e com o estado clínico de saúde neonatal. Cinquenta e três bebês nascidos pré-termo (<37 semanas de idade gestacional), de muito baixo peso (<1.500 gramas) foram observados durante procedimento prescrito de coleta de sangue. Nesta observação foram estabelecidas as seguintes cinco fases: *Linha de Base* (LB), *Antissepsia* (A), *Punção* (P), *Recuperação-Curativo* (RC) e *Recuperação-Repouso* (RR). O indicador de dor foi avaliado pela atividade facial e medido pelo *Neonatal Facial Coding System* (NFCS), por um observador em condição "cega" em relação às características do bebê. Além disso foi avaliado o estado de vigília e sono e a frequência cardíaca. Para cada parâmetro foram utilizadas as seguintes medidas: escores, magnitude das respostas (*change*), porcentagem de duração do choro e FC acima de 160bpm. A história clínica neonatal dos bebês foi analisada com base nos registros dos prontuários dos pacientes. Os resultados mostraram que as meninas e os meninos apresentaram um padrão semelhante de reatividade, com aumento das respostas fisiológicas e comportamentais de dor frente ao estímulo doloroso e com recuperação aos padrões observados na fase inicial de LB. A análise da magnitude da frequência cardíaca mostrou que houve diferença significativa entre os grupos apenas na FC máxima; os meninos apresentaram uma mudança maior (*change*) da frequência cardíaca máxima entre as fases de LB e P do que as meninas. Os neonatos com maior risco clínico neonatal exibiram maior ativação basal do estado de vigília e sono e da frequência cardíaca, mesmo sem estímulo doloroso, que os neonatos em condições clínicas de menor risco. Os neonatos com alto risco clínico neonatal apresentaram maior frequência cardíaca do que os neonatos com baixo risco clínico na fase de recuperação. Tanto a frequência cardíaca média, quanto a magnitude das respostas (*change*) da frequência cardíaca mínima mostraram que os neonatos em piores condições clínicas apresentaram, respectivamente, maior FC média na RR e maior mudança da FC mínima entre as fases de LB e P do que os neonatos em condições clínicas melhores. Observou-se que os neonatos com maior risco clínico nas 12 primeiras horas de idade pós-natal mostraram maior dificuldade para se recuperar e retornar ao padrão de LB, uma vez que a frequência cardíaca foi maior na RR do que nos neonatos com menor risco. Os neonatos caracterizados pela maior gravidade clínica, menor idade gestacional e menor idade pós-natal apresentaram menor capacidade de regulação fisiológica à dor. Conclui-se que o sexo é uma variável que teve pouca influência nas respostas de dor. A variável de risco clínico neonatal das 12 primeiras horas de idade pós-natal teve influência nas respostas de dor dos neonatos pré-termo, especialmente no processo de autorregulação. O conhecimento acerca da influência destas variáveis pode contribuir para minimizar os danos aos neonatos vulneráveis, provocados pela experiência estressante, dolorosa e repetida presente na rotina de cuidados da UTIN.

## Saúde na Comunidade

### ACOMPANHAMENTO DO PACTO PELA SAÚDE NO MUNICÍPIO DE BEBEDOURO-SP, ENTRE OS ANOS DE 2007 E 2009

**João Marcelo Caetano José Floridi Porcionato**

Orientador: Prof. Dr. Juan Stuardo Yazlle Rocha

Dissertação de Mestrado apresentada em 18/04/2011

**Introdução:** O Pacto pela Saúde é um conjunto de diretrizes elaboradas e pactuadas de forma tripartite (estado, município e União), na perspectiva de superar as dificuldades apontadas para a consolidação do Sistema Único de Saúde. Aprovado e regulamentado pelas Portarias GM 399 em Fevereiro de 2006 e GM 699 em março de 2006, o Pacto pela Saúde representa um avanço na consolidação do SUS.

**Objetivos:** Avaliar o grau de cumprimento do Pacto pela Saúde no município de Bebedouro, com base no Termo de Compromisso de Gestão, observando e acompanhando as metas cumpridas, as metas em desenvolvimento, as metas não cumpridas e os processos iniciados, acelerados e abandonados.

**Metodologia:** Serão avaliadas as metas assinadas no Termo de Compromisso de Gestão do município de Bebedouro no ano de 2007 e acompanhadas até 2009, isto é, observaremos, no decorrer do período, os processos a que foram submetidas tais metas. Os dados serão obtidos junto ao Departamento Municipal de Saúde de Bebedouro, mais especificamente por meio do Termo de Compromisso de Gestão, propriamente dito, dos Relatórios de Gestão Anual e do Plano Municipal de Saúde.

**Resultados:** Dentre as metas avaliadas, podem ser observados cumprimento, não cumprimento e manutenção de metas, atividades e processos. Como destaque, pode-se citar o grande desenvolvimento da regionalização, visto que o Colegiado de Gestão Regional foi implantado no ano do início do estudo. Dessa forma houve um maior desenvolvimento da região para cumprimento das reais necessidades locais. Quanto ao fortalecimento da Atenção Básica por meio da Estratégia Saúde da Família, a meta de cobertura não foi atingida, ficando abaixo do pactuado em 2007.

**Conclusão:** O Pacto pela Saúde é uma política de saúde para inovação do SUS. Inovações do ponto de vista do financiamento, passando para cinco grandes blocos financeiros, na gestão com maior ênfase na regionalização e maior autonomia para os municípios, e buscando valorizar o Sistema Único de Saúde. O Termo de Compromisso de Gestão Municipal não deve ser visto como mais um papel burocrático do SUS, mas sim como um avanço nas políticas públicas de saúde. Ele não é apenas para ser assinado e sim para ser estudado, avaliado, e o gestor deve retirar inúmeras lições dos avanços e aprender com as dificuldades encontradas no decorrer do período das assinaturas.

### HÁBITOS DE ATIVIDADE FÍSICA EM ESCOLARES, INDICADORES SOCIOECONÔMICOS E A PRÁTICA DE ATIVIDADE FÍSICA DOS PAIS NO MUNICÍPIO DE RIBEIRÃO PRETO-SP

**Ricardo Luiz dos Reis Santos**

Orientador: Prof. Dr. Amaury Lelis Dal Fabbro

Dissertação de Mestrado apresentada em 26/04/2011

A prática de atividade física de crianças tem diminuído, devido à disponibilidade de tecnologia, aumento da violência e redução de oportunidades de lazer fisicamente ativo. A atividade física na criança promove benefícios para o seu estado de saúde. A prática de atividade física pode ser influenciada por múltiplos fatores, como a prática de atividade física dos pais, suporte social e aspectos socioeconômicos. Esta pesquisa tem como objetivo investigar os hábitos de atividade física de escolares de 7 a 12 anos de idade, matriculados nas escolas públicas e particulares de Ribeirão Preto - SP, verificando a associação com indicadores socioeconômicos e a prática de atividade física dos pais. Trata-se de estudo transversal com amostra de 380 escolares de 7 a 12 anos de idade, de 13 escolas municipais, estaduais e particulares do município de Ribeirão Preto - SP. Para o cálculo da amostra utilizou-se software Epi<sup>TM</sup> Info 6 para DOS. Para o estudo foi considerado intervalo de confiança (IC) de 95%, frequência esperada de 50% e erro amostral de 5%. A investigação dos hábitos de atividade física dos escolares e dos pais foi a partir de questionários disponíveis: IPAQ, PAQ-C, DAFA. A investigação dos indicadores socioeconômicos também será feita a partir de questionários, CCEB-ABEP, dados sociodemográficos e socioeconômicos. A análise e apresentação dos resultados foram realizadas com auxílio de estatística descritiva, testes de associação (Exato de Fisher) e comparação entre as variáveis, e discussão com base na literatura. Para

tanto, utilizou-se Excel® e Stata®10. Ocorreu associação entre o nível de atividade física de escolares e de suas mães. Não houve associação entre o nível de atividade física dos escolares e os indicadores socioeconômicos da família. Houve associação do nível de atividade física dos escolares com o incentivo e o suporte logístico, dado pelos familiares. O tempo gasto pelos escolares assistindo televisão foi de 1 a 2 horas (29%). Quanto ao hábito de dormir durante o dia, 72% (n = 140) dos escolares não possui esse hábito. Fora do horário escolar, as crianças (n = 141) tendem a brincar mais no quintal de casa (45%), seguido de brincar dentro de casa (28%) e na rua (18%). A prática de algum esporte além das aulas de educação física foi de 44% (n = 140). Nos momentos de lazer, os escolares (n = 122) gostam mais de assistir TV e jogar vídeo game (29%), jogar bola (24%) e andar de bicicleta ou patins (14%). A prática de atividade física e seus benefícios estão bem documentadas na literatura, mas ainda, estudos sobre o comportamento de crianças e adolescentes em relação a ela estão sendo estudo e documentado. Além disso, a influência de pais, de fatores socioeconômicos e do próprio ambiente em que a criança vive e se relaciona, está presente nos hábitos desses escolares, de uma forma ou outra. O suporte social, estudado nesta pesquisa, foi relevante no nível da prática de atividade física dos escolares, denotando o papel fundamental de pais, outros familiares e professores. Justificam-se políticas públicas de incentivo à prática de atividade física nos bairros e nos grandes centros, aproveitando os espaços para realizar atividade física em família ou em grupos, o que se acredita fortalecer e aumentar a prática.

## FATORES DE REDUÇÃO DA MORTALIDADE INFANTIL EM FRANCA - SP EM 2006: A CONTRIBUIÇÃO DO AMBULATÓRIO DE CRIANÇAS DE ALTO-RISCO E DA PASTORAL DA CRIANÇA

**Valdomiro José de Souza**

Orientador: Prof. Dr. Edson Zangiacomi Martinez

Dissertação de Mestrado apresentada em 20/05/2011

A mortalidade infantil no mundo, desde tempos remotos, foi sempre um grave problema para os povos. Durante muitos séculos a humanidade assistiu impotente, em decorrência dos poucos recursos de que dispunha a medicina, ao elevado número de mortes. Com o avanço da técnica persistiu em várias partes do mundo o altíssimo número de mortes, levando-nos à constatação de que o problema não diz respeito somente à tecnologia médica, mas está imbuído de outros componentes, como o político, o social, o educacional, o saneamento básico, o nutricional, entre vários outros possíveis. Em termos de Franca houve um considerável recuo na taxa da mortalidade infantil, variando de 35,29 para 11,5 por mil nascidos vivos, no período de 1980 a 2006. Neste município a principal causa da mortalidade infantil está associada ao baixo-peso ao nascer e à prematuridade. Em 1998 foi criado o Ambulatório de Crianças de Alto-Risco (ACAR), com o objetivo de concentrar os casos de risco em um único núcleo de atendimento, proporcionando atenção diferenciado e acompanhamento do desenvolvimento da criança, através de recursos públicos. O referido serviço celebrou parceria com a Pastoral da Criança, em 2006, com o fim de implementar ações conjuntas que favorecessem os pacientes de difícil recuperação. O objetivo deste estudo foi descrever os indicadores de crianças atendidas no Ambulatório de Crianças de Alto-Risco e crianças acompanhadas na Pastoral da Criança, analisando como esses dois serviços podem ter contribuído, junto às políticas públicas, para a redução da mortalidade infantil no município de Franca. Utilizou-se da metodologia descritiva e modelos não lineares de regressão para a modelagem dos dados. Foram levantados no ACAR prontuários de crianças nascidas em 2006 e residentes em Franca. Montou-se, após, um banco de dados contendo informações sobre sexo, peso, índice de *Apgar* de 1º e 5º minutos, idade gestacional, diagnóstico e hospital de procedência de n = 75 crianças acompanhadas no serviço. O peso foi a principal variável a ser mensurada. Empregando as curvas de Jeness-Bayley, sobrepostos aos percentis 1%, 5% e 50% de referência, de acordo com os padrões da WHO, os resultados mostraram que, de maneira geral, o peso das crianças pré-termo e de baixo-peso, se aproxima do referencial "ideal" de 50%, por volta dos 15 meses. O *catch up* de crescimento das crianças, tende a ser atingido em menos de dois anos e fortemente nos 12 primeiros meses. Na amostra estudada observou-se o número de sobrevivência de 97,3%, com apenas duas mortes. Na Pastoral, buscou-se informações em 550 fichas, sendo selecionada uma amostra de n = 13 crianças. Estudou-se as variáveis peso, sexo e o número de visitas às crianças. Também as crianças acompanhadas pela Pastoral tiveram ganho significativo de peso. Outros elementos estudados, como empenho, amor, missão e comprometimento, embora não possam ser mensurados por modelos estatísticos, representou um ganho para os pacientes do Ambulatório de Crianças de Alto-Risco.



## **AVALIAÇÃO DA COBERTURA VACINAL EM MENORES DE CINCO ANOS EM BOM JESUS, PROVÍNCIA DO BONGO ANGOLA, 2010**

**Manoel Falcão Saturnino de Oliveira**

Orientador: Prof. Dr. Jun Stuardo Yazlle Rocha

Dissertação de Mestrado apresentada em 02/06/2011

Este estudo tem como objetivo avaliar a cobertura vacinal em crianças menores de cinco anos na comuna de Bom Jesus, Bengo, Angola e descrever as relações entre esse indicador com algumas características do contexto sócio econômico e demográfico local, do saneamento do meio, dos agregados familiares, das crianças e das mães ou responsáveis das mesmas.

**Material e Métodos:** trata-se de uma pesquisa descritiva, transversal e censitária, com 1205 crianças menores de cinco anos residentes em Bom Jesus no 1º semestre de 2010, razão pela qual não estabelecemos relações de associação entre as variáveis em estudo. As fontes de dados foram: 1) O inquérito domiciliar por entrevistas as mães ou responsáveis das crianças e aos chefes de família. 2) Cartão de saúde infantil e de saúde materna para os dados referentes ao estado vacinal das crianças e a vacinação antitetânica das mães ou responsáveis, respectivamente. 3) Registros sobre vacinações dos serviços de saúde de Bom Jesus e da província do Bengo. Para o processamento, análise e tratamento dos dados foi utilizado o software Epi-Info, versão 3.5.2.

**Resultados:** Das 1205 crianças, 67,5 não possuíam cartão de vacina; a cobertura vacinal de Bom Jesus foi de 36,6%, sendo mais elevadas nos bairros Coxe e Matabuleiro com 65,2% e 65%, respectivamente e sem diferença entre os sexos; para a VOP, DTP e Hep B, 72,4%, 69,9% e 67,1% das crianças fizeram as doses com intervalos corretos; a maior cobertura vacinal ocorreu nos menores de 30 dias, com 67,9%, sendo esses valores muito menores que a meta de 90%, do PAV/ Angola. A cobertura vacinal específica para a BCG, DTP, VOP, contra Hep B, Sarampo, Febre Amarela e antitetânica foi de 90,8%, 47,2 %, 51%, 14,2 %, 43%, 41,5% e 59%%, respectivamente e podem ser consideradas muito baixas com exceção para a BCG; a taxa de abandono para a DTP, VOP e Hep B foi de 32,2%, 32,8% e 25,4% respectivamente, valores muito superiores a meta que OMS/África recomenda é de até 10%; se constatou que aparentemente a cobertura vacinal aumentava conforme houvesse um incremento da escolaridade do chefe de família da e da mãe ou responsável pela criança, quando o chefe de família fosse o pai, mãe doméstica, com a presença da avó, os pais fossem de etnia kimbundo, melhores condições habitacionais, usuários dos serviços públicos de abastecimento de água e de coleta de lixo; os dados sugerem o decréscimo desse indicador conforme aumenta a idade da mãe ou responsável, o tamanho da família, o número de filhos vivos, a ordem de nascimento e a idade da criança.

**Conclusões:** Os resultados indicam a importância dos inquéritos domiciliares como ferramentas indispensáveis na avaliação da cobertura vacinal real e a probabilidade de alguns fatores contextuais, individuais e familiares influenciarem a variabilidade desse indicador, para além de puderem subsidiar a decisão sobre o aperfeiçoamento de programas locais de imunização.

## **TABAGISMO, ALCOOLISMO EM PACIENTES QUE FREQUENTAM FISIOTERAPIA DO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE, ITAPIRA/SP - 2010**

**Dalila Bertanha**

Orientador: Prof. Dr. Antônio Ruffino Netto

Dissertação de Mestrado apresentada em 10/06/2010

O uso indevido de drogas tem sido objeto de diversos estudos no Brasil, devido à crescente preocupação com os hábitos de consumo de drogas lícitas e ilícitas e seus impactos sociais, econômicos e, sobretudo, suas implicações na saúde da população. O objetivo desta pesquisa é estimar a prevalência do tabagismo e o uso de outras drogas e descrever o perfil epidemiológico, dos pacientes que frequentam o Centro de Fisioterapia Oscar Pires de Andrade do SUS de Itapira-SP. Trata-se de um estudo epidemiológico, descritivo, modelo inquérito, com uma abordagem metodológica quantitativa. Dos 399 pacientes agendados, foram entrevistados 217 (54,38%) pacientes, nos meses de julho e agosto de 2010. Os pacientes foram entrevistados pelo pesquisador deste trabalho conforme o Questionário Sócio - Demográfico e sobre Prevalência do Tabagismo no Centro de Fisioterapia de Itapira - SP (SUS) e Teste de Fagerstrom para a Dependência a Nicotina (FTND) e Questionário ASSIST V. 3.0. A média de idade, dos pacientes entrevistados foi 50 anos, maioria é do

sexo feminino (63, 13%), a moda de anos de escolaridade foi 11 anos e a mediana foi cinco. Lombalgia, cervicalgia e tendinite representaram juntos 50% dos encaminhamentos para fisioterapia com diagnóstico médico por explicitos. Mais da metade dos pacientes relataram ter outras doenças além daquela que foi motivo do encaminhamento para a fisioterapia, as doenças mais citadas pelos pacientes foi hipertensão e diabetes. Mais da metade dos pacientes relataram apenas uma queixa principal sendo a dor a queixa mais frequente. A prevalência de fumantes foi 17%, a média de idade dos pacientes fumantes foi 48 anos e 51% eram do sexo feminino, a maioria (89%) relatou fumar apenas cigarros comercializados, a mediana do número de cigarros fumados por dia foi 10 e a mediana de tempo que o indivíduo usou o tabaco foi 30 anos. A metade dos tabagistas foram classificados, de acordo com o FTND, como muito baixa e baixa dependência à nicotina, a média do escore de Fagerström foi de 4,1. Sobre o uso de substâncias psicoativas na vida, 70% dos pacientes relataram ter usado tabaco na vida; 91% bebidas alcoólicas; 14% maconha; 6% cocaína, crack; 11% inalantes; 10% hipnóticos, sedativos; somente um indivíduo relatou ter usado em sua vida inalante, e nenhum experimentou alucinógenos, opióides e outras drogas a especificar. Em relação à classificação do Questionário ASSIST, o tabaco (31%) e o álcool (31%) foram as drogas mais citadas para receber intervenção breve, seguido da maconha (3%), cocaína, crack (1%), anfetaminas (1%). As drogas legais como o álcool e o tabaco são os problemas de saúde pública mais proeminente no Brasil. Essa é uma situação preocupante e aponta a importância de trabalhar a prevenção de drogas psicoativas, nos serviços de atenção primária.

### **ESTADO NUTRICIONAL DE MENORES DE CINCO ANOS NA COMUNA DE BOM JESUS, ANGOLA: CARACTERIZAÇÃO DAS PREVALÊNCIAS DE DÉFICITS NUTRICIONAIS**

**Ema Cândida Branco Fernandes**

Orientadora: Profa. Dra. Daniella Saes Sartorelli

Dissertação de Mestrado apresentada em 10/06/2011

A desnutrição infantil tem origem multifatorial complexa com raízes na pobreza. A compreensão de sua distribuição é importante para apreciar a dimensão e profundidade do problema e propor ações para o seu controle. O objetivo do presente estudo foi caracterizar a prevalência dos déficits nutricionais entre menores de cinco anos na Comuna de Bom Jesus, Angola. Desenvolveu-se um estudo do tipo transversal de base populacional com 744 crianças. As prevalências dos déficits de Peso/Idade (P/I), Peso/Estatura (P/E) e Estatura/Idade (E/I) foram calculadas utilizando-se o padrão de crescimento infantil da Organização Mundial da Saúde, 2006. Variáveis demográficas, socioeconômicas, alimentação, presença de morbidade e estado nutricional das crianças foram obtidas utilizando-se inquérito por entrevista. Para comparação das prevalências dos déficits, segundo características, o teste qui-quadrado de Pearson para heterogeneidade foi empregado, considerando-se  $p < 0,05$  como significativo. Foram entrevistadas 498 famílias e a média de indivíduos por domicílio foi de 5,6. Não havia um sistema de coleta de lixo, cerca de 60% dos domicílios eram construídos com material não apropriado, em 48% o piso era de terra, 72% possuíam apenas um cômodo, em 37% não havia eletricidade e 73% das famílias não possuíam vaso sanitário/esgoto. As prevalências de déficits para os índices P/I, P/E e E/I foram de 13%, 7%, e 22%, respectivamente. Déficit de E/I grave foi identificado em 7% das crianças. A prevalência dos déficits de E/I e P/E foram maiores em crianças que haviam sido desmamadas antes dos seis meses de idade. A prevalência do déficit de E/I mostrou-se maior em famílias que referiram cuidados com a água no domicílio, quando o pai tinha entre 5 a 9 anos de escolaridade e era professor e entre crianças dos 6 aos 23 meses que continuavam sendo amamentadas. Também foi maior entre crianças que tiveram febre, vômitos, diarreia com muco/sangue e expulsão de parasitas. Observou-se maior prevalência do déficit de P/E em crianças cujos pais tinham idade inferior a 25 anos, nas que viviam com o pai e quando o pai tinha entre 1 a 2 filhos. Maior déficit também foi observado em crianças menores de 24 meses, nas que tinham entre 6 a 23 meses mas continuaram recebendo aleitamento materno exclusivo e naquelas dos 24 aos 59 meses que continuavam sendo amamentadas. A prevalência do déficit de P/I foi maior em crianças cuja mãe trabalhava fora de casa, quando a família não tinha eletricidade nem abastecimento de água, não possuíam ferro elétrico, viviam à 4 Km ou mais da unidade de saúde local e naquelas que tiveram vômitos, abatimento ou tristeza, expulsão de parasitas e prurido anal. A desnutrição infantil mostrou-se sério problema de saúde pública com alta prevalência do déficit de E/I. Outros estudos são necessários para a identificação dos determinantes associados a desnutrição infantil que permitam a implementação de intervenções direcionadas para reverter a situação.

## VALIDAÇÃO RELATIVA DE UM QUESTIONÁRIO QUANTITATIVO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR PARA GESTANTES

**Patrícia Barbieri**

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

Dissertação de Mestrado apresentada em 29/06/2011

**Objetivo:** Verificar a validade relativa de um questionário quantitativo de frequência alimentar (QQFA) para avaliação do consumo alimentar habitual de gestantes para utilização em estudo caso-controle sobre dieta e diabetes mellitus gestacional.

**Metodologia:** Estudo metodológico de validação de instrumento para avaliação do consumo alimentar, conduzido entre 103 gestantes saudáveis, idade entre 18 e 35 anos, eutróficas, atendidas em Unidades Básicas de Saúde do município de Ribeirão Preto, SP. Em média três inquéritos recordatórios de 24 horas (IR 24h) foram obtidos no primeiro e segundo trimestres gestacionais. O QQFA foi aplicado ao final do segundo trimestre gestacional e as mulheres relataram a frequência e porção média de consumo usual de cada item alimentar durante a gestação. Os nutrientes foram transformados em log e corrigidos pela energia pelo método residual. A razão entre a estimativa de energia e nutrientes do QQFA pela estimativa dos IR 24h foi obtida. Para investigação da validade relativa do QQFA o coeficiente de correlação Pearson (bruto, ajustado pela energia e deatenuado) foi empregado. A concordância entre os métodos foi verificada pela análise de Bland Altman, concordância na classificação em quartos de estimativa de nutrientes da dieta e Kappa quadrático ponderado.

**Resultados:** Verificou-se que o QQFA superestimou a estimativa de nutrientes em relação aos IR24h, apresentando razão média de 1,7. Em média, o valor do coeficiente de Pearson do nutriente bruto foi de 0,30, variando de -0,005 para ácido graxo eicosapentanóico a 0,51 para cálcio, após ajuste pela energia a correlação média foi de 0,20, variando de -0,1 para tiamina a 0,52 para fibra dietética e, após deatenuado e ajustado pela energia foi de 0,25, variando de -0,1 para tiamina a 0,57 para cálcio. Em média, 70% das mulheres foram classificadas no mesmo quarto ou quarto adjacente de estimativa de nutrientes e 8,8% das gestantes foram classificadas em quartos opostos entre os dois métodos. O valor médio de Kappa quadrático foi de 0,20, variando de 0,009 para tiamina a 0,49 fibra dietética. Limites de concordância mais adequados foram encontrados para: cobre, colesterol e ácidos graxos poliinsaturado, eicosapentanóico, araquidônico, linolênico, linoléico e docosahexanóico. A reta de regressão da diferença indicou uma tendência linear ( $p < 0,01$ ) para: proteína, lipídio, cálcio, ferro, vitaminas A, tiamina, B12, E e C, cobre, e ácidos graxos monoinsaturado, poliinsaturado e linoléico.

**Conclusão:** Os resultados indicam uma baixa correlação para a estimativa de nutrientes entre o QQFA e os IR24h. Entretanto, o QQFA é um método adequado para a categorização da estimativa de nutrientes da dieta das gestantes avaliadas.