

**RESUMOS DE DISSERTAÇÕES DE MESTRADO (M) E TESES DE DOUTORADO (D)  
APRESENTADAS NA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - USP  
DE JANEIRO A JUNHO DE 2003**

**BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**ESTUDO NEUROANATÔMICO E PSICOFARMACOLÓGICO DAS CONEXÕES RECÍPROCAS  
ENTRE A SUBSTÂNCIA NEGRA E O MESENCÉFALO DORSAL, NÍVEL CRANIAL**

**Sandro José Ribeiro**

Orientador: Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra  
Tese de Doutorado apresentada em 10/03/2003

O objetivo do presente trabalho foi investigar a conexão anatômica entre a substância negra, parte reticulada (SNpr) e o mesencéfalo dorsal, nível cranial.

Para tanto, foram realizadas técnicas de traçamento neuronal anterógrado e retrógrado, em ratos, que permitiram a identificação da conexão anatômica entre essas duas regiões encefálicas. Em seguida, tratamentos farmacológicos foram realizados para investigar a influência do sistema opioide sobre as reações aversivas induzidas pela estimulação elétrica das camadas profundas do colículo superior (CPCS) ou da região dorsal da substância cinzenta periaquedutal (SCPd). Para a realização desses experimentos foram implantados eletrodos e cânulas-guias ou quimiotrodos em determinados sítios encefálicos.

Microinjeções do traçador neuronal retrógrado *fast blue*, nas CPCS, revelaram a existência de numerosos pericários na substância negra, parte reticulada. Por outro lado, microinjeções iontoforéticas do traçador neuronal anterógrado e retrógrado amina de dextrana biotinizada (BDA), na SNpr, confirmaram a existência de uma via nigro-tectal, conectando a SNpr às CPCS. Além disso, pericários e plexos varicosos foram encontrados nas camadas intermediárias do colículo superior e nas colunas dorsomedial e dorsolateral substância cinzenta periaquedutal. A injeção de BDA nas CPCS revelou a existência de uma conexão

tecto-nigral, entre o mesencéfalo dorsal e a SNpr.

A estimulação elétrica das CPCS ou da SCPd desencadearam uma reação aversiva nos animais. O estudo neuropsicofarmacológico demonstrou que microinjeções de naltrexona, antagonista opioide inespecífico, na SNpr, aumentaram, de forma estatisticamente significativa, os valores dos limiares aversivos decorrentes do estímulo elétrico nas CPCS. Microinjeções de naloxonazina, antagonista opioide específico para o receptor  $\mu_1$ , na SCPd, elevaram de maneira significativa os limiares aversivos produzidos pela estimulação elétrica desse mesmo sítio.

Em conjunto, os dados mostram a existência de projeções recíprocas entre a SNpr e o mesencéfalo dorsal, que podem ser moduladas por microcircuitos opióides situados na SNpr e no mesencéfalo dorsal, nível cranial. É possível que as projeções opióides se destinem aos corpos celulares de neurônios GABAérgicos nigro-tectais e/ou a seus terminais axônicos, que se espalham no substrato neuronal do teto mesencefálico, que organiza parte das reações de defesa. Essa hipótese foi corroborada pelos achados neurofarmacológicos, que demonstraram que as reações aversivas desencadeadas pela estimulação elétrica das CPCS podem ser influenciadas pelo antagonismo opioide inespecífico na SNpr, e que a mesma reação de defesa, produzida pelo estímulo elétrico na SCPd, pode ser modulada pelo bloqueio específico do receptor opioide  $\mu_1$ , na própria SCPd, o que sugere o envolvimento desse subtipo de receptor opioide no controle do comportamento defensivo elaborado pela SCPd.

**ESTUDO DA ORIGEM, CINÉTICA E DISTRIBUIÇÃO DE MASTÓCITOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE RATOS**

**Michel Farchi Guiraldelli**

Orientadora: Profa. Dra. Constance Oliver  
Dissertação de Mestrado apresentada em 19/03/2003

Os mastócitos são células relacionadas com mecanismos de defesa do organismo, participando principalmente de reações imunes e inflamatórias, da eli-

minação de parasitas e também das infecções bacterianas e virais. Os mastócitos se caracterizam pela presença de grânulos metacromáticos em seu citoplasma e são amplamente encontrados nos tecidos conjuntivos. Em organismos adultos, os mastócitos têm sua origem em células precursoras presentes na medula óssea, de onde migram para os tecidos onde proliferam e sofrem maturação. Em embriões, estudos indiretos têm demonstrado que as células do saco vitelínico e do fígado fetal têm a capacidade de originar mastócitos e sugerem que os precursores de mastócitos possam estar presentes nestes órgãos. A identificação de precursores de mastócitos nos tecidos embrionários tem sido dificultada pela falta de marcadores específicos. Este estudo teve por objetivo identificar os precursores de mastócitos em embriões de ratos através dos anticorpos monoclonais BGD6 e AA4 específicos para mastócitos, bem como demonstrar a sua distribuição e cinética durante o desenvolvimento. Os anticorpos utilizados marcam mastócitos maduros, imaturos e bem imaturos, desprovidos de grânulos metacromáticos. O mAb BGD6 marca, ainda, uma célula indiferenciada, pobre em organelas e completamente desprovida de grânulos (precursor comprometido com a linhagem de mastócitos). Nossos resultados mostram a presença de células precursoras de mastócitos, positivas somente com o mAb BGD6, nas

regiões da AGM de embriões com 11,5 dias de gestação. Aos 12,5 dias de gestação já foi possível identificar mastócitos BGD6<sup>+</sup> e também AA4<sup>+</sup>, no fígado fetal destes embriões. Mastócitos com poucos grânulos metacromáticos, foram identificados após 15,5 dias de gestação e eram restritos ao mesênquima caudal e regiões da pele próximas aos folículos das vibrissas. Os mastócitos começam a povoar a medula óssea dos embriões com 18,5 dias de gestação e são identificados somente com o uso dos dois anticorpos. Mastócitos maduros foram observados somente aos 19,5 dias de gestação. Com o isolamento magnético sequencial utilizando o mAb AA4 seguido do mAb BGD6 foi possível isolar de embriões a partir de 13,5 dias de gestação, o precursor comprometido com a linhagem de mastócitos. A análise quantitativa das populações AA4<sup>+</sup> (mastócitos maduros e imaturos) e AA4<sup>+</sup>/BGD6<sup>+</sup> (precursores comprometidos de mastócitos) demonstrou que, com o avanço da idade gestacional dos embriões, ocorre uma diminuição no número de precursores comprometidos de mastócitos e um aumento no número de mastócitos imaturos e maduros. O conhecimento da origem dos precursores comprometidos de mastócitos em embriões possibilitará novos estudos, que esclarecerão melhor seu papel biológico no organismo e conseqüentemente, seu envolvimento em algumas patologias.

## CLONAGEM E EXPRESSÃO DE VP1 RECOMBINANTE DO VÍRUS COXSACKIE B5

**Humberto Freire Boncristiani Junior**

Orientador: Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto

Dissertação de Mestrado apresentada em 21/03/2003

Os enterovírus são picornavírus freqüentemente associados com infecções humanas sérias, tais como meningites, meningoencefalites e miocardites. Na proteína de capsídeo VP1 se encontram os sítios imunogênicos mais importantes e a resposta immune de proteção depende principalmente de anticorpos neutralizantes direcionados para os epítomos de VP1. Nós descrevemos tentativas de clonagem e expressão da proteína VP1 do vírus coxsackie B5 em três diferentes sistemas. A região do RNA genômico que codifica a proteína VP1 de vírus coxsackie B5 foi amplificada por transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), com iniciadores contendo sítios de

restrição para as enzimas *Not* I e *Eco*R I. O produto desta RT-PCR foi clonado no vetor e transfectados em *E.coli*, e então sub-clonados nos plasmídeos pPIC 9, para expressão em *Pichia pastoris* e pQE-31 para expressão em *E.coli*. O sistema de expressão em *Pichia pastoris* foi usado na intenção de obtenção de grandes quantidades de proteínas secretadas modificadas pós-traducionalmente. *Pichia pastoris* foi transformada e inserção genômica foi confirmada por PCR. Após indução de expressão, SDS PAGE mostrou uma banda com peso molecular apropriado, que não reagiu em "western blot" com anticorpos monoclonal e policlonal anti-VP1 de vírus coxsackie B5. Utilizamos então o sistema de expressão e *E.coli* com indução de expressão com IPTG. Após rompimento da bactéria transformada, o extrato foi analisado por SDS-PAGE e novamente não houve reação em "western blot" com anticorpos anti-VP1 de vírus coxsackie B5 nativa. Nós

então clonamos o gene de VP1 no vetor pEG(KG) para inserir o gene em *Saccharomyces cerevisiae*. Após indução de expressão com galactose, uma proteína de fusão com GST foi detectada, em pequena quantidade, em “western blot” com antiporpo anti-GST, com peso molecular correspondente à soma de VP1 e GST (50-55KD). Em conclusão, VP1 de coxsackie

B5 foi expressa em *Saccharomyces cerevisiae* transformada por recombinação homóloga. Esta construção permite subclonagem em outros sistemas de expressão, úteis para produção em larga escala, para estudos posteriores, tais como caracterização da função metabólica e imunogenicidade da proteína VP1 recombinante.

## EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE SUBUNIDADES DE INTEGRINAS EM MASTÓCITOS E PRECURSORES DERIVADOS DA MEDULA ÓSSEA

**Ana Cristina Gonçalves Grodzki**

Orientadora: Profa. Dra. Maria Célia Jamur

Tese de Doutorado apresentada em 24/03/2003

Os mastócitos são células do tecido conjuntivo que colaboram com o sistema imune e desempenham um importante papel nas reações alérgicas, processos inflamatórios e expulsão de parasitas. A origem na medula óssea e o fenótipo maduro encontrado nos tecidos sugerem que os mastócitos tenham a capacidade de migrar através da corrente sanguínea para povoar os tecidos. No entanto, os mastócitos imaturos, que atingem a corrente sanguínea, não apresentam grânulos citoplasmáticos típicos de mastócitos e possuem características morfológicas semelhantes a outros tipos celulares exigindo, portanto, a utilização de marcadores específicos para a sua identificação. Utilizando métodos imunquímicos, foram identificados, caracterizados e isolados os mastócitos derivados da medula óssea, bem como uma pequena população de precursores comprometidos com a linhagem dos mastócitos. No presente trabalho foi possível demonstrar que estas células precursoras de mastócitos são capazes de se diferenciar em mastócitos *in vitro* e de reconstituir a população de mastócitos *in vivo*, comprovando o comprometimento destes precursores com a linhagem de mastócitos. Com o isolamento de popu-

lações puras de mastócitos da medula óssea e as indicações da migração destas células para alcançar os tecidos, foi analisada a expressão de subunidades de integrinas nos precursores de mastócitos e mastócitos, identificando algumas das moléculas responsáveis pela adesão célula-célula e célula-matriz, presentes na superfície destas células. As subunidades  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$  e  $\beta 7$  de integrinas foram identificadas em mastócitos e seus precursores, no entanto, os precursores apresentaram maior expressão destas subunidades. Esta modulação observada na expressão das subunidades de integrinas, durante o processo de maturação, pode representar os fenômenos de retenção de precursores na medula óssea e liberação de mastócitos imaturos da medula óssea para sítios periféricos. Após cultivadas, as populações de mastócitos obtidas de precursores indiferenciados e de mastócitos imaturos sofrem uma modulação na expressão de integrinas, diferente do que se observa *ex vivo*, apresentando uma diminuição na expressão das subunidades  $\alpha 4$  e  $\alpha 5$  de integrinas e uma maior adesão aos componentes da matriz extracelular. Estes resultados contribuem para o entendimento da dinâmica dos processos nos quais os mastócitos estão envolvidos e possibilitam estudos de mecanismos regulatórios e de migração destas células durante situações de recrutamento, como ocorre nos processos alérgicos, inflamatórios, infecciosos e nas infestações parasitárias.

## ESTUDOS FUNCIONAIS DO MECANISMO DE REGULAÇÃO DO GENE *BhC4-1*

**Luiz Roberto Basso Junior**

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luisa Paçó-Larson

Tese de Doutorado apresentada em 25/04/2003

O gene *BhC4-1* do pufe de DNA C4 é amplificado e abundantemente expresso na glândula salivar de *Bradysia hygida*, no final do último estágio larval. Com o objetivo de investigar a correlação entre varia-

ções nos títulos endógenos de ecdisteróides e a indução da expressão de *BhC4-1* na glândula salivar, os títulos hormonais foram quantificados em diferentes tempos do último estágio larval, usando um radioimunoensaio altamente sensível. Dois picos de ecdisona foram detectados; um pequeno pico no estágio E1, o qual deve corresponder ao *commitment peak*, e um segundo pico mais amplo no estágio E7, o qual corresponde aos

maiores títulos medidos ( $2,34 \times 10^{-7}$  M). A expansão máxima do pufe de DNA C4 correlaciona-se com o segundo pico de ecdisona e a regressão do pufe acompanha a diminuição dos títulos hormonais. Estudos em *Drosophila* transgênica mostraram que a regulação de *BhC4-1* é conservada em *Drosophila* e que sua ativação é uma resposta tardia ao pico de ecdisona que induz a formação do pupário. Com o objetivo de entender a caracterização do promotor de *BhC4-1*, nós analisamos o padrão de transcrição dirigido por diferentes fragmentos da região 5' de *BhC4-1* em linhagens transgênicas de *Drosophila*, utilizando ensaios de proteção à RNase. Os resultados confirmam observações prévias baseadas em ensaios histoquímicos de que um fragmento de 226 pb (-186 a +40) do promotor é suficiente para regular a expressão de *BhC4-1* na glândula salivar, na transição larva-pré-pupa. Neste trabalho também investigamos o papel de reguladores-chaves na transmissão do sinal hormonal no controle de *BhC4-1*, utilizando linhagens carregando alelos mutantes representativos de *BR-C*, *E74* e *E75*, as quais foram cruzadas com linhagens transgênicas carregando genes quiméricos *BhC4-1-lacZ*. Os resultados indicam que a isoforma A de *E75* e a isoforma Z3 de *BR-C* exercem papel essencial na indução de *BhC4-1* na glândula salivar. A expressão de *BhC4-1-lacZ* é re-

duzida severamente no mutante *E75A*<sup>72</sup> e é quase completamente abolida em *background 2Bc*<sup>2</sup>. A correta indução de *BhC4-1-lacZ* em mutante *2Bc*<sup>2</sup> é resgatada pela expressão ectópica da isoforma Z3 de *BR-C*, mas não pela expressão ectópica da isoforma Z2. Nos genótipos mutantes *br*<sup>5</sup> e *rbp*<sup>5</sup> de *BR-C* ou *E74A* e *E74B* a indução de *BhC4-lacZ* na glândula salivar é bem menos afetada. A expressão ectópica de Z1 ou Z4 no mutante *rbp*<sup>5</sup> resgata o efeito da perda da função *rbp*<sup>+</sup>. Considerando a falta de mutante específico para Z4, não é possível definir se Z1 e Z4, ou somente uma destas isoformas de *BR-C* participa na regulação de *BhC4-1*. Juntos estes resultados indicam que os produtos dos três genes iniciais *BR-C*, *E74* e *E75A* participam da ativação de *BhC4-1*, mas não estão envolvidos na restrição da expressão ao período pré-pupal, nem na determinação da especificidade tecidual da expressão de *BhC4-1*. O efeito de mutações em *BR-C* na indução ectópica de *BhC4-1-lacZ* na glândula anelar de *Drosophila* nas linhagens transformadas com a construção *BhC4-1-lacZ* (-3314 a +40) também foi analisado. Os resultados mostram que *BR-C* não é necessário para a ativação de *BhC4-1-lacZ* na glândula anelar de pré-pupa indicando que diferentemente do que ocorre na glândula salivar a expressão na glândula anelar não deve ser induzida por ecdisona.

## ESTUDO DA EXPRESSÃO DAS PARÁLOGAS DA MIOSINA V EM SISTEMA NERVOSO DE CAMUNDONGOS SELVAGEM E *DILUTE LETAL* DURANTE O DESENVOLVIMENTO

**Iêda Maria Louzada Guedes**

Orientador: Prof. Dr. Roy Edward Larson

Tese de Doutorado apresentada em 30/05/2003

Em mamíferos existem três parálogas da miosina V conhecidos como miosinas Va, Vb e Vc. Mutations no gene da miosina Va humana causa a síndrome de Griscelli type II (SG-II), uma doença autossômica recessiva rara. Camundongos homocigotos *dilute lethal* (*d<sup>l</sup>/d<sup>l</sup>*), mutante nulo funcional recessivo e modelo experimental da SG-II apresentam clareamento na cor da pelagem e desordens neurológicas caracterizadas por convulsão, opistótonus, ataxia e morte em três semanas após o nascimento. Apesar de estar presente durante o desenvolvimento embrionário e fetal do sistema nervoso central de camundongos selvagens, a falta da miosina Va no *dilute lethal* parece não acarretar desvios na histogênese e na morfogênese. Neste estudo realizamos uma análise comparativa da expressão das parálogas da miosina V (RNA e proteína) no sistema nervoso de camundongo selvagem, durante o

desenvolvimento embrionário e uma análise intercomparativa da expressão destas parálogas em cerebelo de camundongos selvagem e *dilute lethal*, quando os distúrbios neurológicos estão instalados nos mutantes. Nossos estudos mostraram que ocorre a expressão temporal diferencial das três parálogas da miosina V (RNAm e proteína) durante o desenvolvimento embrionário (DE) do sistema nervoso de camundongo selvagem. No estágio que ocorre sobreposição de expressão dos RNAs mensageiros das três parálogas, a distribuição tecidual da expressão é semelhante. O padrão de expressão do RNA mensageiro durante o DE mostrou mais de uma isoforma para cada paróloga. Os tamanhos dos transcritos dos genes da miosina Va, Vb e da Vc, em estágios embrionário e fetal, são compatíveis com RNAs mensageiros capazes de serem traduzidos nas respectivas proteínas. O resultado mais surpreendente foi ausência do RNA mensageiro da miosina Va no estágio fetal E25. Em conjunto, estes resultados sugerem uma sobreposição de expressão que pode estar relacionada ou não com sobreposição

de função, além da existência de um controle temporal de expressão durante a embriogênese. A análise comparativa das parálogas da miosina V em sistema nervoso selvagem e *dilute*, no período pós-natal, mostrou uma inversão na expressão do RNA mensageiro das miosinas Va e Vc nos dois cerebelos e nenhuma alteração na expressão do RNAm da miosina Vb. Este dados são reforçados pela marcação em cerebelo mostrando um aumento na expressão da miosina Vc (RNAm e proteína) em *dilute* em relação ao selvagem. Inclusive, em neurônios de Purkinje de cerebelo *dilute*, uma forte expressão da miosina Vc (RNA e proteína) foi detectada, tanto no corpo celular como nos dendritos, em contraste com uma detecção muito fraca no corpo celular e ausência nos dendritos da célula de Purkinje. Estes dados, falam a favor de uma reposição de função por *up-regulation* da miosina Vc na ausência da miosina Va funcional em *dilute*. É possível que algum mecanismo de regulação gênica esteja ocorrendo entre estes genes, localizados no mesmo

cromossomo (9) e com fase de leitura aberta invertida. Deste modo, a sobrevivência dos embriões de camundongo *dilute* pode estar relacionada com esta *up-regulation* de miosina Vc. Contudo, nossos resultados comparativos (selvagem/*dilute*) foram realizados em cerebelo, apenas no período pós-natal, onde podemos experimentalmente reconhecer os camundongos *dilute lethal*, pela ocorrência de convulsões. Podemos entender a *up-regulation* da expressão da miosina Vc observada em cerebelo *dilute*, no período pós-natal, como indicação de uma “des-repressão” de sua transcrição e/ou tradução durante o período embrionário, repondo adequadamente as funções da miosina Va e garantindo a sobrevivência. Contudo, é possível que a expressão acentuada da miosina Vc nestes mutantes, não reponha certas funções de miosina Va, no período pós-natal, como o transporte do REL para as espículas dendríticas, levando ao quadro de convulsões, opistótonus, ataxia e morte nos mutantes *dilute*, pela falta de  $Ca^{++}$  intracelular para a transdução de sinais.

### **CARACTERIZAÇÃO DO ALELO ROUGHEST DOMINANT (*RST<sup>D</sup>*) DO GENE ROUGHEST DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* E SEUS REVERTANTES**

**Shirlei Octacílio da Silva**

Orientador: Prof.Dr. Ricardo G. Pinheiro Ramos

Dissertação de Mestrado apresentada em 17/06/2003

A correta padronização do olho composto de *Drosophila melanogaster* é resultado da diferenciação seqüencial de tipos celulares específicos dentro do disco imaginal de olho-antena e da eliminação de células intermatidiais em excesso por um processo de morte celular programada que ocorre durante a primeira metade do desenvolvimento pupal.

O gene *roughest* (*rst*) é um *locus* pleiotrópico envolvido neste último processo e a perda de sua função produz indivíduos adultos com olhos compostos apresentando excesso de células pigmentares secundárias e terciárias extras e uma aparência “rugosa”.

No presente nós investigamos inicialmente a função de *rst* na retina em desenvolvimento através da caracterização genética e molecular de *rst<sup>D</sup>*, o único alelo dominant de *rst* isolado até o momento. Nós melhoramos as tentativas anteriores de definir molecularmente esta mutação, mostrando que ela é associada a um rearranjo genômico localizado dentro de 550 pb aproximadamente 18-19 kb a montante do putativo sítio de início da transcrição do *locus*. Nós também demonstramos que a proteína Rst está present em em-

brões *rst<sup>D</sup>* e seu comportamento eletroforético é indistinguível do selvagem, então confirmando nossa hipótese de que este alelo de *rst* afeta sua regulação ao invés do produto protéico.

*rst<sup>D</sup>* mostra uma taxa de reversão relativamente alta, produzindo revertantes com olhos praticamente selvagens e com olhos similares aos mutantes de perda-de-função. Nós isolamos e caracterizamos 9 linhagens independentes de revertantes para os dois fenótipos mencionados acima. Sua análise molecular mostrou diferenças nos padrões de restrição em “Southern blots”. Também apresentam comportamento genético distinto e complexo quando em heterozigose com outros alelos recessivos de *rst*, assim como *rst<sup>D</sup>* e eles são capazes de suprimir dominantemente estes fenótipos em diferentes extensões.

Finalmente, nós também caracterizamos dois fenótipos previamente desconhecidos de *rst<sup>D</sup>*. Os mutantes apresentam defeitos na musculatura somática durante o desenvolvimento embrionário e em aproximadamente 35% das pupas mutantes *rst<sup>D</sup>*, glândulas salivares podem ser vistas até 24 horas após formação do pupário (APF). Este fenótipo de glândulas salivares persistentes parece ser causado por um atraso na morte celular programada que normalmente ocorre 12-14 horas AFP. Este fenótipo não é consequência

de um atraso geral no desenvolvimento pupal, já que a eversão da cabeça ocorre no tempo normal. Estes resultados mostram o papel até então desconhecido na histólise das glândulas salivares.

Em conjunto, estes resultados contribuem para a compreensão dos mecanismos relacionados à regulação e à função do gene *roughest* durante o desenvolvimento de *Drosophila*.

## IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS À MIOSINA-VA EM CÉLULAS DE MELANOMA

**Rosângela Bruno Lopes**

Orientadora: Profa. Dra. Enilza Maria Espreafico  
Tese de Doutorado apresentada em 30/06/2003

As miosinas da classe V são motores moleculares, dependentes de F-actina, envolvidos em um vasto número de funções celulares, tais como tráfego de organelas e vesículas, sinalização dependente de cálcio, transporte de mRNA, bem como na dinâmica do centróssomo e fuso mitótico, de leveduras às células de mamíferos. Entretanto, os mecanismos moleculares de muitas dessas funções não são compreendidos. O objetivo principal desse trabalho foi identificar proteínas que interagem com a miosina Va em células de melanoma, e dessa forma contribuir para a identificação de novas vias funcionais ou mecanismos celulares que envolvam esse motor molecular. Para tanto, foram utilizadas três abordagens experimentais: (1) Ensaio de *pull down* com os subdomínios da cauda medial, globular e terminal da miosina Va de cérebro de galinha em fusão com GST; (2) Transfecção de células do melanoma B16-F10 com as construções codificadoras da cauda das isoformas neuronal e melanocítica da miosina-Va em fusão com a GFP, seguida da imunoprecipitação das respectivas proteínas expressas com um anticorpo policlonal contra GFP; (3) Imunoprecipitação da miosina-Va endógena utilizando um anticorpo policlonal contra a cauda da miosina-Va de cérebro de *Gallus gallus*. As duas primei-

ras abordagens permitiram detectar vários polipeptídeos que copurificam com as proteínas recombinantes da cauda, mostrando-se promissoras para a futura identificação de novos polipeptídeos que interagem com regiões específicas da cauda. Através da terceira abordagem, demonstramos que a miosina-Va endógena coimunoprecipita com polipeptídeos de 21 e 45 kDa, os quais foram identificados como calmodulina e actina, por ensaio de efeito do cálcio sobre a migração em gel e imunodeteção, respectivamente. Demonstramos também que a miosina-Va coimunoprecipita consistentemente com um polipeptídeo de 97 kDa, identificado por espectrometria de massa e confirmado por imunodeteção como sendo a proteína p97/VCP, um membro da família das AAA-ATPases. A p97/VCP é uma enzima ubíqua que participa de eventos de fusão vesicular homotípica necessários à reestruturação e manutenção dos compartimentos do retículo endoplasmático e aparelho de Golgi, assim como do tráfego de proteínas ubiquitinadas para degradação em proteassomos. Além disso, demonstramos que, assim como a p97/VCP, a miosina Va está presente nas frações subcelulares de microssomos ou proteassomos obtidas de linhagens celulares de melanoma murino ou humano. Estes resultados ajudam a elucidar os mecanismos pelos quais a miosina Va poderia cooperar com as funções de fusão de membranas ou importação de proteínas ubiquitinadas para degradação em proteassomos, as quais constituem funções centrais à fisiologia celular.

## BIOQUÍMICA

### EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DA TREALASE NEUTRA RECOMBINANTE DE *NEUROSPORA CRASSA*

**Fabiana Maria de Almeida**

Orientador: Prof. Dr. Héctor Francisco Terenzi  
Tese de Doutorado apresentada em 22/04/2003

A porção codificadora do gene da trealase neutra de *Neurospora crassa* (*Genbank* AF 044218) foi clonada no vetor de expressão pET21b em uma fusão

carboxiterminal com uma seqüência que codifica para seis resíduos de histidina (cauda de histidina ou His tag). A construção resultante pET21b-NcTreB foi utilizada para transformação de *Escherichia coli* BL21(DE3) para obtenção da proteína recombinante pela indução das culturas com IPTG (isopropil  $\beta$ -D-galactopiranosídeo) 1mM a 25°C. Após 3 horas, observamos significativo acúmulo de um polipeptídeo de ~84kDa, tamanho esperado para a trealase neutra de *N. crassa*. As bactérias de culturas induzidas com IPTG foram lisadas e os extratos separados em fração solúvel e insolúvel por centrifugação. A proteína recombinante distribui-se em ambas as frações, sendo que a fração solúvel foi utilizada na determinação da atividade. A trealase recombinante exibiu comportamento distinto da trealase endógena de *E. coli*, sendo estimulada por cálcio 10mM e inibida por EDTA. A proteína recombinante foi também utilizada na imunização de coelhos para obtenção de anticorpos policlonais. Os anticorpos produzidos foram utilizados para análise dos níveis de trealase em extratos de micélio em crescimento de *N. crassa* através de *immunoblotting*. Observamos que ocorre um acúmulo da proteína na fase exponencial e um decréscimo na fase estacionária, sugerindo que a mobilização da trealose, verificada no início da germinação, se deve a ativação de uma enzima pré-existente. A trealase recombinante purificada através de cromatografia de afinidade em Ni-NTA agarose exibiu atividade específica de 80-140mU/mg de proteína, sendo que a má-

xima atividade foi obtida em pH 7,0 a 30°C. A massa molecular da enzima recombinante, determinada por filtração em gel, foi estimada em ~81kDa. A enzima recombinante é específica para a degradação de trealose. A sua meia-vida, a 40°C, foi de 2 min e 30 s, sendo que a adição de cálcio ao ensaio protegeu parcialmente a enzima da inativação térmica. A enzima recombinante foi ativada por cálcio e manganês e inibida por ATP, cobre, prata, zinco, alumínio e cobalto. A  $K_{M_i}$  determinado para a trealose, foi de 42mM e a  $V_{max}$  foi de 30,6nmol de glicose liberada por minuto. O efeito da fosforilação sobre a atividade da trealase recombinante foi testado por incubação com proteína quinase dependente de AMP cíclico (PKAc). Nas condições de ensaio utilizadas, apenas 0,13% das moléculas foram fosforiladas, resultando em uma ativação de 30%. Os resultados desse trabalho demonstram que a trealase neutra de *N. crassa*, expressa em *E. coli*, exibe parâmetros cinéticos e bioquímicos semelhantes às outras trealases neutras descritas em fungos. A análise da expressão da trealase em *N. crassa* sugere que, provavelmente, a enzima seja regulada por modificação pós-traducional, onde a via do AMP cíclico parece estar envolvida. Nossos resultados, aliados com os dados descritos na literatura, sugerem que a ativação *in vivo* da trealase neutra de *N. crassa* é um fenômeno complexo, onde uma provável interação entre a trealase e outros componentes protéicos, bem como a fosforilação por outras quinases, possam ser necessárias para a sua completa ativação.

## CLÍNICA CIRÚRGICA

### DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA PRÓTESE VASCULAR DERIVADA DO LÁTEX NATURAL E SUA UTILIZAÇÃO NA SUBSTITUIÇÃO DE UM SEGMENTO DA ARTÉRIA FEMORAL DE CÃO

**Paulo César Grisotto**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eli Piccinato

Tese de Doutorado apresentada em 07/03/2003

**Introdução:** A revascularização arterial, em continuidade ou em derivação no tratamento do trauma vascular, doenças inflamatórias obstrutivas, doença aterosclerótica e aneurismas tornaram a cirurgia vascular reparadora um grande desafio para o cirurgião vascular. As próteses sintéticas são os substitui-

tos arteriais mais utilizados nestas revascularizações, sobretudo os enxertos de Dacron e PTFE. Apesar de serem amplamente utilizados, os enxertos protéticos sofreram inúmeras modificações para otimização do seu uso, mas ainda continuam longe de serem substitutos arteriais ideais.

**Objetivo:** Desenvolver um novo modelo de prótese vascular tubular derivada do látex natural e estudar a biocompatibilidade e sua aplicabilidade na implantação em continuidade na artéria femoral de cães.

**Métodos:** Doze cães foram submetidos ao implante de próteses tubulares preparadas com o látex natural. Os enxertos foram implantados com anastomose término-terminal nas artérias femorais esquerdas e, após 4 semanas, os animais foram submetidos às avaliações: clínica, ultra-sonográfica, arteriográfica e morfológica. Para esta última análise, os animais foram sacrificados e os enxertos foram avaliados macroscopicamente e, após removidos, analisados por meio de macroscopia, mesoscopia, microscopia de luz e eletrônica de varredura.

**Resultados:** Após 4 semanas do implante, as próteses de látex mantiveram-se pérvias em 9 dos 12 enxertos implantados (75%). O estudo macroscópico

evidenciou excelente integração aos tecidos circunvizinhos, ausência de linfocitos, infecção ou granulomas. A superfície externa foi revestida com tecido conjuntivo similar à adventícia da artéria nativa e a superfície interna da prótese foi recoberta por um tecido delicado e translúcido que a revestia inteiramente, continuando-se com o endotélio da artéria nativa. O estudo por microscopia eletrônica de varredura deste tecido mostrou ser similar ao endotélio da artéria.

**Conclusão:** O composto derivado do látex natural integrou-se inteiramente com os tecidos circunvizinhos, produzindo uma prótese vascular tubular biocompatível quando implantada no sistema arterial de cães.

### ESTUDO DA VIABILIDADE DO SEGMENTO TRAQUEAL COMPLETO DE DOZE ANÉIS TRANSFERIDO NA FORMA DE RETALHO COMPOSTO PRÉ-FABRICADO. ESTUDO EXPERIMENTAL EM CÃES

#### Jubert Sanches Cibantos Filho

Orientador: Prof. Dr. Francisco Veríssimo de Mello Filho  
Dissertação de Mestrado apresentada em 23/04/2003

Devido a inexistência até o momento atual de um substituto ideal para a traquéia, seja tecido autólogo, heterólogo ou prótese, neste trabalho foi proposto, testar em cães, a viabilidade funcional e as condições anatômicas de um segmento traqueal completo (STC) previamente neovascularizado pelo músculo esternohiúdo (MEH).

Foram utilizados 16 cães mestiços, de ambos os sexos, divididos em 2 grupos. No grupo I, um STC de 12 anéis foi utilizado como auto-enxerto (grupo controle). No grupo II, era criado um STCNV de 12 anéis. Eram previamente envolvidos quatro anéis do STC com o retalho do MEH, 21 dias após esta primeira cirurgia era feita a secção da traquéia quatro anéis superiores e quatro anéis inferiores ao retalho, crian-

do um STCNV de 12 anéis, 8 destes anéis não tinham cobertura muscular, então era realizada a mobilização completa da traquéia com o pedículo muscular.

Os resultados foram avaliados por observação clínica, estudo macroscópico e microscópico das peças cirúrgicas.

No grupo I (controle) os animais morriam ou eram sacrificados na maioria das vezes na primeira semana. Porém os animais do grupo II morriam ou eram sacrificados sempre após 77 dias de seguimento.

Neste experimento foi impossível utilizar um STC de 12 anéis como auto-enxerto, porém o STC quando previamente envolvido pelo MEH por um período de 21 dias, pôde ser completamente mobilizado, sem necrose.

Concluimos que o MEH é suficiente para garantir a neovascularização de um STCNV de pelo menos 12 anéis.

### ESTUDO DA UTILIZAÇÃO DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA EM PACIENTES COM SUSPEITA DE TROMBOSE VENOSA PROFUNDA DE MEMBRO INFERIOR

#### Márcio de Castro e Silva

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eli Piccinato  
Dissertação de Mestrado Apresentada em 24/04/2003

**Introdução:** A trombose venosa profunda (TVP) é um problema clínico comum que está associado a muitas condições médicas e cirúrgicas. Além

das manifestações clínicas de dor e edema do membro afetado na fase aguda, pode complicar-se com embolia pulmonar, danos estruturais às válvulas das veias profundas e, tardiamente, cursar com hipertensão venosa crônica (síndrome pós-trombótica). A terapia com anticoagulantes e/ou trombolíticos reduz a morbidade desta doença e o risco de embolia pulmo-

nar. Entretanto como os sinais e sintomas de TVP não são específicos, é importante a rápida realização de exames para confirmar o diagnóstico e permitir a instituição da terapia. Existem vários exames disponíveis, porém nenhum consegue ainda reunir todas as características ideais para um diagnóstico preciso da trombose venosa. Na atualidade, o mais sensível é a flebografia e o mais usado é a ultra-sonografia com Doppler (US), mas a ressonância magnética (RM) vem, na última década, ganhando importância como um método no diagnóstico da TVP. Objetivos: Os objetivos deste trabalho são: estudar a inclusão da RM na avaliação da TVP, com ênfase na elaboração de um protocolo de estudos simples e rápido, e realizar um estudo custo/efetividade para que se possa avaliar se o protocolo permite a redução dos custos relacionados ao método comparando-se com a US associada ao Doppler.

Métodos: Foram estudados 26 pacientes encaminhados aos serviços de radiologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e do Hospital São Francisco de Ribeirão Preto com sintomas de dor e/ou edema em um dos membros inferiores. Todos foram submetidos à RM e à US com Doppler.

Resultados: A RM detectou TVP em 7 dos 8 pacientes com TVP e a descartou nos 16 pacientes

não acometidos (sensibilidade 87,5%, especificidade 100%). A US também diagnosticou 7 das 8 trombozes venosas e descartou este diagnóstico em 13 dos 16 casos sem TVP (sensibilidade 87,5%, especificidade 83,3%). Considerando-se, porém, o diagnóstico final independente do paciente ter ou não trombose venosa a RM conseguiu chegar ao diagnóstico correto em 25 dos 26 casos (96,2%) e a US em 18 (69,2%). O estudo custo-efetividade estabeleceu um custo por paciente de R\$ 47,65 para a RM e de R\$ 26,07 para a US.

Conclusões: A RM é um método eficaz no diagnóstico da TVP, porém não se encontrou vantagem estatisticamente significativa na sua adoção como método inicial para este diagnóstico. A abordagem simplificada da RM, com apenas uma seqüência por segmento estudado, possui alta sensibilidade e principalmente especificidade para o estabelecimento do diagnóstico de TVP. A RM apresenta vantagens significativas sobre a US no estabelecimento do diagnóstico de outras afecções que possam simular a TVP. Devido ao seu custo mais alto a RM parece ser mais adequada para o estudo daqueles pacientes em que outros diagnósticos forem mais prováveis que o de trombose venosa ou para pacientes em que a avaliação inicial com a US for inconclusiva.

## **MENINGIOMAS E HEMANGIOPERICITOMAS MENÍNGEOS INTRACRANIANOS: ESTUDO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR ATRAVÉS DO MIB-1 E DA ANGIOGÊNESE ATRAVÉS DO VEGF-1**

**Marcus Benigno Marques dos Santos**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Jr.

Dissertação de Mestrado apresentada em 24/04/2003

A compreensão dos mecanismos fisiopatogênicos que transformam uma célula não-neoplásica em uma célula neoplásica, e que permitem a progressão da neoplasia, é de fundamental importância para o tratamento das neoplasias do Sistema Nervoso. Basicamente, esses mecanismos são a proliferação celular descontrolada, a angiogênese e a capacidade de invasão de estruturas adjacentes ou de promover metástases à distância, os quais também podem distinguir neoplasias benignas das malignas. A proliferação celular descontrolada é dependente da falha dos pontos de controle do ciclo celular, principalmente o gene TP53, em promover a apoptose ou morte celular, interrompendo o ciclo do clone mutante. A angiogênese é o processo de brotamento de células endoteliais a partir de capilares pré-existentes no cérebro normal.

Esse processo está quiescente no cérebro humano adulto. O principal regulador da angiogênese é o VEGF e sua ação é especificamente sobre o endotélio vascular induzido por hipóxia da célula neoplásica. Os receptores do VEGF não são expressos no endotélio quiescente, mas o são nos vasos em proliferação para o tumor. O presente estudo dedicou-se à proliferação celular e à angiogênese em meningiomas e hemangiopericitomas meníngios intracranianos. Foram selecionados 43 pacientes, submetidos a tratamento cirúrgico pela Disciplina de Neurocirurgia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, entre 1992 e 2000, totalizando 48 blocos de parafina, previamente arquivados pelo Serviço de Patologia do mesmo hospital. Os diagnósticos por exame anátomo-patológico foram revisados e classificados de acordo com a terceira edição da Classificação dos Tumores do Sistema Nervoso da Organização Mundial da Saúde, e separados em 5 grupos: meningiomas grau I da convexidade (n=14), meningiomas grau I da base (n=19), menin-

giomas grau II (7), meningiomas grau III (n= 5) e hemangiopericitomas (n=3). A imunistoquímica foi a base para a quantificação dos índices de proliferação celular e de angiogênese, através da imunorreatividade para o anticorpo anti-Ki-67, MIB-1, e para o anticorpo anti-VEGF, respectivamente. A análise estatística constituiu-se da utilização do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, com intervalo de confiança de 95%, e pós-teste de Dunn, por meio do programa GraphPad Prism 3.03. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os índices de angiogênese entre os 5 grupos estudados ( $p=0,6495$ , Kruskal-Wallis statistic, ou valor H, igual a 2,473,  $p>0,05$ ). O índice de proliferação celular/MIB-1 de meningiomas grau I da base foi estatisticamente maior que o dos meningiomas da convexidade ( $p < 0.0001$ , valor H = 25.77,  $p < 0.05$ ).

Houve diferença estatisticamente significativa entre meningiomas grau I da convexidade e meningiomas grau III ( $p < 0,001$ ) e entre meningiomas grau I da convexidade e hemangiopericitomas ( $p < 0,01$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa, do índice de proliferação celular/MIB-01, entre meningiomas grau I da convexidade e meningiomas grau II ( $p > 0,05$ ); entre meningiomas grau I da base e meningiomas grau II ( $p > 0,05$ ); entre meningiomas grau I da base e meningiomas grau III ( $p > 0,05$ ); entre meningiomas grau I da base e hemangiopericitomas ( $p > 0,05$ ); entre meningiomas grau II e meningiomas grau III ( $p > 0,05$ ); entre meningiomas grau II e hemangiopericitomas ( $p > 0,05$ ) e entre meningiomas grau III e hemangiopericitomas ( $p > 0,05$ ). O real significado clínico destes dados ainda é desconhecido.

### **ESTUDO COMPARATIVO DA HEMODILUIÇÃO ISOVOLÊMICA MODERADA COM ALBUMINA A 3%, DEXTRAN-40 E ENOXAPARINA NA PREVENÇÃO DA TROMBOSE VENOSA MICROCIRURGICA EM RATOS**

**Jayme Adriano Farina Júnior**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eli Piccinato

Tese de Doutorado apresentada em 25/04/2003

Este estudo foi realizado em ratos submetidos a um modelo trombogênico para investigar a prevenção da trombose venosa de microanastomoses da veia femoral, empregando a hemodiluição isovolêmica moderada, dextran e enoxaparina. Foram utilizados 40 ratos, machos, da raça wistar, pesando entre 350 - 450 g, divididos em quatro grupos de 10: Grupo 1 - modelo trombogênico sem tratamento prévio; Grupo 2 - modelo trombogênico com hemodiluição prévia (hematócrito de  $\pm 30\%$ ); Grupo 3 - modelo trombogênico tratado previamente com dextran e Grupo 4 - modelo trombogênico tratado com enoxaparina. A hemodiluição foi realizada por sangria e infusão simultânea de volume idêntico de solução de albumina a 3%. Após secção e anastomose com pontos separados da veia femoral, passou-se um ponto, proximal à anastomose, para reduzir à metade a luz da veia, produzindo-se assim um modelo trombogênico nos quatro grupos. Foram avaliadas a agregação plaquetária, a concentração de fibrinogênio plasmático, a concentração plasmática de complexo trombina-antitrombina (TAT) e a contagem global das células sanguíneas. Também foram avaliados os índices de perviedade venosa aos 20 minutos e 48 horas, e realizado estudo histopatológico após 48 horas. A microscopia evidenciou que o ponto

transfixante do modelo trombogênico reduziu a luz da veia entre 45 - 50%, nos quatro grupos. Vinte minutos após a anastomose, observou-se obstrução em 100% (10/10) dos ratos do grupo 1, em 30% (3/10) dos ratos com hemodiluição prévia ( $p=0.0015$ ), em 20% (2/10) do grupo do dextran ( $p=0.0004$ ) e em 60% (6/10) do grupo da enoxaparina ( $p=0.0433$ ). Após 48 horas, foram reavaliadas as anastomoses nos quatro grupos, e observou-se ainda obstrução em 100% (10/10) do grupo 1, em 50% (5/10) do grupo 2 ( $p=0.0163$ ), em 80% (8/10) do grupo 3 ( $p=0.2368$ ) e em 100% (10/10) do grupo 4. O estudo histopatológico mostrou que o grupo hemodiluído apresentou o menor índice de trombose mural, 12.5% (1/8), em relação ao grupo-controle, 90% (9/10) ( $p=0.0019$ ). Os grupos da enoxaparina e do dextran tiveram índice de trombose de 50% (5/10) ( $p=0.0704$ ) e 70% (7/10) ( $p=0.2910$ ), respectivamente. A avaliação da hemostasia por agregação plaquetária e concentração de fibrinogênio plasmático foi semelhante nos quatro grupos. O grupo da enoxaparina apresentou redução significativa no número de plaquetas e na concentração média do complexo trombina-antitrombina (TAT), em relação ao grupo-controle. Conclui-se, com base no estudo de perviedade e histopatológico, que a hemodiluição isovolêmica com albumina a 3% é o método mais eficaz na redução da incidência de obstrução venosa após 20 minutos e 48 horas, e de trombose após 48 horas, quando comparada ao tratamento com dextran e enoxaparina.

## TRATAMENTO AMBULATORIAL DO PNEUMOTÓRAX NÃO COMPLICADO, UTILIZANDO DRENAGEM PLEURAL COM VÁLVULA UNIDIRECIONAL DE FABRICAÇÃO PRÓPRIA

**Hugo Ortega**

Orientador: Prof. Dr. João José Carneiro

Dissertação de Mestrado apresentada em 28/04/2003

O pneumotórax é entidade clínica com incidência em franca ascensão nas últimas décadas. A drenagem pleural clássica é o método mais indicado para o seu tratamento que, apesar de sua baixa complexidade, exige a internação dos pacientes. Válvulas foram produzidas para substituírem, com vantagens, os sistemas clássicos e permitirem o tratamento ambulatorial do pneumotórax.

No presente estudo, uma válvula unidirecional, de fabricação própria, foi usada no tratamento do primeiro episódio de pneumotórax não complicado, em substituição aos sistemas convencionais selados a água.

Ela foi empregada no tratamento de 60 casos, ocorridos em 59 pacientes. Todos foram tratados em regime ambulatorial. Os pacientes foram submetidos à drenagem pleural sob anestesia local. Após um curto período de tempo (média de  $10,9 \pm 3,8$  horas) de observação hospitalar, o dreno do tórax foi conectado à válvula unidirecional substituindo o sistema convencional e os pacientes receberam alta. Eles foram seguidos ambulatorialmente em média, a cada 2 dias. Após reexpansão completa do pulmão, o dreno, com a

válvula, foi retirado. A partir de então foram seguidos mensalmente por um período de seis meses.

Este tratamento permitiu a cura de 90% dos casos (53 pacientes). Em 10% (6 pacientes) houve complicações menores por falha do método: a) 5 pacientes apresentaram fuga aérea prolongada pôr 7 dias ou mais; b) 1 paciente além da fuga aérea prolongada, permaneceu com colapso do pulmão. Todos foram reinternados para o tratamento destas ocorrências. Quatro pacientes melhoraram com redrenagem pleural utilizando sistema convencional e aspiração contínua. Os dois restantes foram submetidos à toracotomia com ressecção das vesículas apicais e abrasão pleural, obtendo reexpansão completa do pulmão.

Um caso de pneumotórax por recidiva tardia (após nove meses) também foi tratado ambulatorialmente com a válvula (por solicitação do próprio paciente) com sucesso. Não houve óbito nesta série.

Os resultados obtidos permitem concluir que o tratamento ambulatorial do pneumotórax não complicado é possível e de baixa morbidade. A válvula aqui utilizada e testada, de fabricação própria, é menos dispendiosa que as similares, é segura e de fácil manuseio. Além das vantagens econômicas o método oferece vantagens psicossociais que auxiliam na evolução do tratamento.

## ADMINISTRAÇÃO CONJUNTA DE MORFINA E OXICODONA EM DOR CRÔNICA DO TIPO NEOPLÁSICA

**Gisele Mattioli de Oliveira**

Orientadora: Profa. Dra. Gabriela Rocha Lauretti

Dissertação de Mestrado apresentada em 29/04/2003

O efeito antinocepcivo da Morfina e da Oxicodeona é mediado através de ligação em  $\mu$  e  $\kappa$  receptores opióides, respectivamente. O estudo visou avaliar o efeito antinocepcivo da combinação dos opióides Morfina e Oxicodeona em Dor Neoplásica, comparada com a analgesia proporcionada pela Morfina isoladamente. Vinte e seis pacientes participaram do estudo prospectivo, onde os pacientes foram tratados como Morfina de liberação imediata, seguida por uma etapa duplamente encoberta e aleatória. Metade dos pacientes receberam formulação de Morfina de liberação controlada (MLC) durante 14 dias, seguidos de outros 14 dias com Oxicodeona de liberação controlada (OLC). A outra metade dos pacientes iniciou o tratamento com

OLC, seguido por MLC. Deixou-se Morfina de liberação imediata (MLI) de 10 mg como droga de resgate, a fim de manter a dor com um EAV < 4cm.

Foram avaliados 22 pacientes e a relação de potência analgésica Morfina/Oxicodeona foi 1: 1,8 (1,80; 1,83; 1,76; 1,84). O consumo diário de MLI foi 38% maior em pacientes recebendo apenas Morfina, com a razão Morfina/Oxicodeona de: 1,6; 1,6; 1,6; 1,7; para  $p < 0,05$ . Os pacientes que receberam OLC e MLI queixaram-se menos freqüentemente de náuseas e vômitos. A utilização concomitante dos dois tipos de opióides (Morfina e Oxicodeona), resultou em menor consumo de medicação de resgate (38% menos), comparado aos pacientes que receberam apenas Morfina, sugerindo que a combinação de Morfina e Oxicodeona (opióides com ações preferenciais em sítios diferentes) resulta em melhor perfil analgésico, e menor incidência de êmese.

## EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA S(+)- CETAMINA ADMINISTRADA POR VIA EPIDURAL, ASSOCIADA AO ADESIVO TRANSDÉRMICO DE NITROGLICERINA EM PROCEDIMENTOS ORTOPÉDICOS

**Ana Paula Miranda de Oliveira**

Orientadora: Profa. Dra. Gabriela Rocha Lauretti  
Tese de Doutorado apresentada em 25/06/2003

**Objetivos:** Os objetivos do estudo foram determinar se a administração de S(+)-cetamina por via epidural resultaria em analgesia em pacientes submetidos a procedimentos ortopédicos de pequeno e médio porte sob anestesia espinhal, e se este efeito analgésico seria exacerbado pela administração conjunta de nitroglicerina por via transdérmica (doador de óxido nítrico).

**Estudo:** prospectivo, aleatório, duplamente encoberto.

**Local:** Hospital das Clínicas- FMRP-USP, aprovação pelo Comitê de Ética Médica do HC- FMRP-USP.

**Metodologia:** Após consentimento, 60 pacientes foram divididos em 5 grupos (n=12). Para receber a técnica anestésica combinada epidural/intratecal. Inicialmente, 10 ml da droga teste epidural, diluída com solução fisiológica, foram administradas. A seguir foi administrado 15 mg de bupivacaína por via intratecal no espaço lombar abaixo. Após 20 a 30 minutos, o adesivo transdérmico contendo 5 mg/24 horas de nitroglicerina ou placebo foi aderido no braço do paciente. O grupo Controle recebeu salina epidural e placebo transdérmico. O grupo Nitroglicerina recebeu salina epidural e nitroglicerina transdérmica. O grupo 1 Cet

recebeu 0,1 mg/kg de S (+)-cetamina por via epidural, e placebo transdérmico. O grupo 2 Cet recebeu 0,2 mg/kg de S (+)-cetamina por via epidural, e placebo transdérmico. O grupo Nitro/1 Cet recebeu 0,1 mg/kg de S (+)-cetamina por via epidural, e nitroglicerina transdérmica. Foram avaliados o efeito analgésico (Escala Analógica de 10 cm- EAV), e a incidência dos efeitos adversos.

**Resultados:** Os grupos foram demograficamente semelhantes. O nível sensorial e o valor numérico da EAV para dor durante a requisição do primeiro analgésico foram semelhantes entre os grupos. O tempo para requisição do primeiro analgésico (min) foi menor para o grupo Controle, comparado aos demais, e semelhante ao G Nitroglicerina. A administração de S(+)-cetamina por via epidural resultou em analgesia dependente da dose na população avaliada, sendo que este efeito analgésico foi exacerbado pela aplicação transdérmica do adesivo de nitroglicerina ( $p<0.05$ ). Os pacientes do G Controle requisitaram maior quantidade de analgésicos durante o período pós-operatório, comparado aos pacientes que receberam S(+)-cetamina epidural ( $p<0,02$ ).

**Conclusões:** A administração de 0,1 a 0,2 mg/kg de S(+)-cetamina por via epidural resultou em antinocicepção, a qual foi exacerbada pela aplicação transdérmica do doador de óxido nítrico, nitroglicerina.

## EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA MORFINA E INTERAÇÃO COM A NITROGLICERINA TRANSDÉRMICA NO CONTROLE DA DOR CRÔNICA NEOPLÁSICA

**Marcelo Vaz Perez**

Orientadora: Profa. Dra. Gabriela Rocha Lauretti  
Tese de Doutorado apresentada em 25/06/2003

**Objetivos do estudo:** Examinar analgesia e efeitos adversos após a aplicação do doador de óxido nítrico, nitroglicerina, por via transdérmica, associado à morfina administrada por via oral em pacientes com dor oncológica.

**Características do estudo:** Aleatório, duplamente-encoberto, aprovado pelo Comitê de Ética Médica do Hospital das Clínicas- FMRP-USP, consentimento do paciente.

**Local:** Hospital das Clínicas- FMRP-USP.

**Metodologia:** Pacientes com dor oncológica foram divididos em dois grupos (n=15). Todos pacien-

tes fizeram uso regular diário de 50 mg de amitriptilina, antes de dormir. A dor foi classificada pela Escala Analógica Visual de 10 cm (EAV). Inicialmente, a administração de morfina por via oral foi realizada individualmente, com a finalidade de manter valores numéricos da EAV inferiores que 4 cm. A dose diária de morfina foi ajustada até a dose máxima de 80-90 mg/dia. Quando os pacientes se queixaram de dor, apesar da dose diária de morfina, a droga teste por via transdérmica foi adicionada ao tratamento, sendo o estudo composto de dois grupos: O grupo Controle recebeu um adesivo diário de placebo, administrado por via transdérmica. O grupo Nitroglicerina recebeu diariamente um adesivo transdérmico de 5 mg/24 horas de nitroglicerina. Os pacientes tinham livre acesso à utilização de morfina (10 mg) de liberação imediata como

medicação analgésica de resgate, a fim de manter a dor classificada como EAV < 4/10 cm. Após a introdução da droga teste transdérmica, os pacientes foram avaliados, em retornos semanais, durante 4 semanas consecutivas.

**Resultados:** Os grupos foram semelhantes em relação aos dados demográficos, e a classificação numérica da dor antes do início do tratamento inespecífico, e anteriormente à administração das drogas testes. O consumo diário de morfina resgate por via oral foi menor no G Nitroglicerina, comparado ao G Controle após o 14º. dia de avaliação ( $p < 0,002$ ). Em geral,

os pacientes do G Controle queixaram-se de sonolência, comparados ao G Controle.

**Conclusões:** A aplicação de 5 mg/24 horas de nitroglicerina por via transdérmica atuou como um efetivo analgésico quando administrado conjuntamente com a morfina, diminuindo o consumo diário de morfina na população estudada. A administração conjunta de doadores de óxido nítrico pode ser benéfica para o controle da dor e tolerância aos opióides, em pacientes portadores de dor crônica neoplásica, resultando em analgesia e menor incidência dos efeitos adversos conseqüente às altas doses de opióides.

## CLÍNICA MÉDICA

### EFEITO TARDIO DO RUÍDO NA AUDIÇÃO E NA QUALIDADE DO SONO EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS A NÍVEIS ELEVADOS

**Ana Lúcia Rios**

Orientadora: Profa. Dra. Geruza Alves da Silva

Dissertação de Mestrado apresentada em 24/02/2003

Nos últimos vinte anos, os estudos sobre os efeitos do ruído na audição e conseqüente qualidade de vida do ser humano ganharam grande impulso, evidenciando sua importância.

O propósito do presente estudo foi verificar o efeito do ruído persistente, decorrente das condições de trabalho, sobre a qualidade de vida, relativamente às repercussões sobre a audição e a qualidade do sono. Neste sentido visou contribuir para a valorização dos prejuízos do ruído excessivo e sistemático sobre a saúde.

Foram estudados 20 trabalhadores do sexo masculino, da Seção de Engenharia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP), com idade entre 33 e 50 anos, expostos a ruído ambiental maior ou igual a 85 dB, em jornada de oito horas de trabalho diário, há pelo menos oito anos; sem alterações anatômicas de orelha externa/média e de vias aéreas superiores. Outros 20 trabalhadores da Seção de Atividades Complementares do mesmo hospital na mesma faixa etária e mesmas características físicas, sócio-econômico-culturais, expostos ao ruído ambiental habitual inferior a 85 dB na jornada de trabalho de 8 horas diárias, compuseram um grupo controle. Os dados de audiometria tonal limiar e imitanciometria foram correlacionados com a qualidade do sono observada através da polissonografia

e com parâmetros clínicos gerais de saúde.

Com os resultados dos testes de comparação aplicados a idade, estatura, peso, índice de massa corporal, circunferência do pescoço, cintura e quadril e indicadores do estado sócio-econômico-cultural obtidos em entrevista, verificamos que as amostras foram semelhantes nestes aspectos. A análise estatística da audiometria e imitanciometria, nos dois grupos, feita pelo teste exato de Fischer revelou perda auditiva leve e moderada, do tipo PAIR, significativa ( $p < 0,001$ ) no G1. O sono dos indivíduos dos dois grupos apresentou anormalidades nas medidas de continuidade do sono revelando sono de má qualidade. Dos 40 indivíduos, treze (32,5 %) apresentaram distúrbio respiratório do sono, dez dos quais tinham sonolência pela Escala de Epworth; doze outros (30 %) tinham sonolência sem distúrbio respiratório do sono. Os indicadores da quantidade de sono revelaram-se normais. As comparações mostraram que o sono dos dois grupos é igual, quando analisado pelo teste de Mann – Whitney para dados independentes. Análise de contingência entre sono alterado e perda auditiva revelou ausência de interrelação ( $p = 0,4316$ ).

Concluimos que a permanência prolongada sob ruído ambiental superior aos níveis considerados seguros foi suficiente para produzir danos auditivos detectáveis laboratorialmente através dos testes usuais e que não há razão para crer que a má qualidade do sono do cidadão comum guarde relação com a convivência diurna em ambientes ruidosos.

## ÚLCERA DE PERNA: CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E PERFIL IMUNOHISTOPATOLÓGICO DA CICATRIZAÇÃO NA PRESENÇA DA BIOMEMBRANA DE LÁTEX NATURAL DA SERINGUEIRA *HEVEA BRASILIENSIS*

**Marco Andrey Cipriani Frade**

Orientadora: Profa. Dra. Norma Tiraboschi Foss  
Tese de Doutorado apresentada em 27/02/2003

Úlcera de perna é uma doença muito freqüente na população idosa. Inúmeros são os tipos de curativos atualmente usados para tratamento das úlceras de perna, com diferentes indicações, vantagens e desvantagens, cuja eficácia não está bem esclarecida devido à descontinuidade dos tratamentos e os custos envolvidos em algumas situações. Para avaliar a ação da biomembrana de látex (BML) no tratamento de úlceras de perna, que se comportou como eficiente indutora do tecido de cicatrização, foram realizadas avaliações clínicas e imunohistopatológicas em 21 doentes, casualmente selecionados, submetidos a aplicação da biomembrana (14 pacientes), comparando com o tratamento clássico (07 pacientes) constituído de pomada com cloranfenicol e enzimas proteolíticas (Fibrase®) com o objetivo de analisar e comparar as alterações histopatológicas e imunohistoquímicas relacionadas aos diferentes tratamentos. Foram coletadas

biópsias da lesão antes e 30 dias após os tratamentos. As biópsias foram divididas em dois fragmentos, um deles para o estudo histopatológico e outro congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$  para análise imunohistoquímica. Os resultados mostram que o uso da biomembrana de látex facilitou os cuidados à lesão aliada ao baixo custo e praticidade de sua aplicação. Adicionalmente, foi observado que a BML induz a uma diferenciação clínica e histopatológica do tecido de cicatrização, com aumento da detecção de fatores de crescimento como “vascular endothelial growth factor” (VEGF) e “transforming growth factor  $\beta 1$ ” (TGF $\beta 1$ ), associada à redução da expressão da enzima NO-sintase induzida (iNOS), quando comparado ao tratamento controle. A análise global dos dados sugere que o tratamento com a biomembrana conduz a organização do tecido cicatricial conseqüente à maior produção de fatores de crescimento celular. Dessa forma, a biomembrana se caracteriza como uma boa opção terapêutica para úlcera de perna, devido à praticidade de sua aplicação, baixo custo e alta potencialidade na indução da cicatrização.

## ESTUDO COMPARATIVO ENTRE O GENÓTIPO E O FENÓTIPO DO SISTEMA SANGÜÍNEO DUFFY EM POPULAÇÕES DE BRANCOS, NEGROS E ASIÁTICOS

**Eugênia Maria Amorim Ubiali**

Orientador: Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas  
Dissertação de Mestrado apresentada em 28/02/2003

Os antígenos polimórficos do Sistema Sangüíneo Duffy, Fy<sup>a</sup> e Fy<sup>b</sup>, encontram-se em proteínas produzidas pelos genes codominantes *FY A* e *FY B*. O alelo *FY B* silencioso foi descrito em negros, associado à mutação T-33C que ocorre no “box” GATA-1, na região promotora do gene *Duffy*. Esta mutação não foi descrita em brancos. Enfraquecimento do antígeno Fy<sup>b</sup> na raça branca foi associado à mutação C265T.

A literatura registra vários casos de aparente discrepância entre o fenótipo e o genótipo Duffy. Parte destes casos são atribuídos ao alelo *FY B* silencioso que é responsável pela maioria dos fenótipos Fy(a-b-) de negros africanos. Entre os brancos, por outro lado, o antígeno Fy<sup>b</sup> enfraquecido pode muitas vezes não ser detectado na avaliação sorológica e ser responsável também por casos de discrepância genótipo/fenótipo Duffy.

Com a finalidade de realizar um estudo comparativo entre o genótipo Duffy determinado por biologia molecular e o fenótipo sorológico Duffy e para determinar eventos moleculares novos e também aqueles já descritos, este estudo analisou amostras de três populações etnicamente diferentes, incluindo 43 brancos, 50 negros e 43 asiáticos.

Todas as amostras foram sorologicamente testadas para o fenótipo Duffy. Elas tiveram o seu DNA extraído e a região codificadora Duffy amplificada e seqüenciada. O “box” GATA-1 da região promotora das amostras de todos os indivíduos com fenótipo Fy(b-) e dos negros com fenótipo Fy(b+) foi também amplificado e seqüenciado. Uma concordância genótipo/fenótipo de 100% foi encontrada nos asiáticos, 97,74% nos brancos e 18,00% na amostra dos negros.

Todos os negros com fenótipo Fy(b-) se deveram ao alelo *FY B* silencioso caracterizado pela mutação T-33C. Não pudemos caracterizar fenotipicamente o antígeno Fy<sup>b</sup> fraco porque o único caso encontrado era heterozigoto para a mutação C265T, tendo sido

este caso também estudado e confirmado por PCR-RFLP.

Encontramos em um indivíduo branco, a mutação G145T já anteriormente descrita e pudemos descrever uma nova mutação silenciosa na amostra asiá-

tica, no exon 2 do gene *Duffy*, caracterizada pela troca C199T.

Descrevemos ainda uma mutação nova no intron 1 do gene *Duffy*, definida pela substituição A422G em indivíduos brancos e negros.

## EFEITO DE MODIFICAÇÕES DIETÉTICAS NA TOXICIDADE INDUZIDA PELO METOTREXATO

**Adriana Bruno Teixeira**

Orientador: Prof. Dr. Lewis Joel Greene

Dissertação de Mestrado apresentada em 09/04/2003

O metotrexato é um análogo do ácido fólico utilizado, entre outras situações clínicas, como quimioterápico antineoplásico de tumores tais como leucemia, coriocarcinoma e sarcoma osteogênico e como imunossupressor no transplante de medula óssea. O metotrexato produz efeito não apenas nas células cancerosas, mas também em células saudáveis, que apresentam rápida proliferação como por exemplo, as células da mucosa do epitélio intestinal e da medula óssea. No nosso trabalho avaliamos o efeito de modificações dietéticas sobre a toxicidade induzida pelo metotrexato (20mg/kg IP, dose única) em ratos, evidenciada por alterações do consumo de dieta, perda de peso, incidência de diarreia, alterações funcionais e histomorfométricas do intestino delgado e pela taxa de mortalidade dos animais. Para tanto, utilizamos dois tipos de dieta, uma elaborada à base de aminoácidos livres tendo como referência a composição da caseína e a outra preparada com a própria caseína (representando a proteína intacta), as quais foram posteriormente suplementadas com 2% de glutamina ou 2% de glicina

(dieta controle). A forma de apresentação da fonte protéica foi importante para propiciar a recuperação dos animais após a administração de metotrexato, visto que os animais que foram alimentados com dieta elaborada com caseína apresentaram uma taxa de mortalidade de 18% em até 156h pós-aplicação da droga contra 100% de mortalidade dos animais alimentados com dieta formulada com aminoácidos. O metotrexato causou modificações significativas na histomorfometria dos animais em comparação aos controles, independentemente da dieta ofertada (fonte protéica e suplementação). O aumento da sobrevivência dos animais alimentados com dieta à base de caseína em comparação aos animais alimentados com dieta à base de aminoácidos pode ser atribuída em parte, ao maior efeito trófico e funcional induzido pela caseína no jejuno e no íleo, que não foi alterado significativamente pela suplementação com glutamina. Em adição, o clearance plasmático do metotrexato dos animais alimentados com dieta preparada com caseína sem suplementação foi mais rápido do que o dos animais alimentados com dieta à base de aminoácidos livres sem suplementação, justificando também em parte, o melhor desempenho em relação à sobrevivência verificada nestes animais.

## FARMACOLOGIA

### RECEPTORES DE GLUTAMATO DE TIPO NMDA LOCALIZADOS NO HIPOCAMPO DORSAL DE RATOS SUBMETIDOS A DIFERENTES MODELOS DE ESTRESSE: ESTUDOS COMPORTAMENTAIS E DE BIOLOGIA MOLECULAR

**Cláudia Maria Padovan**

Orientador: Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães

Tese de Doutorado apresentada em 14/02/2003

Dados da literatura mostram que o tratamento crônico com antagonistas de receptores de glutamato de tipo NMDA (NMDAr) é capaz de prevenir o apa-

recimento de alterações comportamentais induzidas por estresses incontroláveis. O hipocampo é um estrutura muito rica em receptores NMDA e tem sido implicado na mediação das respostas a diferentes estressores. Nessa estrutura, o tratamento com antagonistas desses receptores é capaz de atenuar as alterações induzidas pelo estresse e esses efeitos são dependentes do

momento em que a droga é administrada em relação ao estresse. Além disso, alterações na expressão do RNAm das diferentes subunidades que compõem o receptor NMDA foram observadas no hipocampo de ratos submetidos ao estresse de imobilização. Baseados nessas evidências, os objetivos de nosso trabalho foram: **1.** Investigar os efeitos da administração intra-hipocampal de AP-7 (um antagonista de receptores NMDA) imediatamente antes, depois ou vinte e quatro horas após a exposição de ratos a quinze minutos de nado forçado; **2.** Investigar os efeitos do tratamento crônico com o MK-801 sobre o desempenho de ratos previamente expostos a choques elétricos inescapáveis e submetidos a choques escapáveis sinalizados; **3.** Investigar os efeitos da administração intra-hipocampal de AP-7 imediatamente antes, depois ou vinte e quatro horas depois da exposição aos choques inescapáveis; **4.** Investigar a expressão do RNAm da subunidade NR1 do receptor NMDA na formação hipocampal de ratos submetidos a diferentes estressos.

Os resultados obtidos mostram que a administração intra-hipocampal de AP-7 imediatamente após o pré-teste foi capaz de diminuir o tempo de imobilidade no teste do nado forçado, enquanto que preveniu (quando administrada antes do pré-teste) e reverteu (quando administrado antes do teste em animais previamente estressados) os efeitos induzidos pelos choques inescapáveis. A administração crônica periférica de MK-801 também preveniu os efeitos da exposição aos choques elétricos inescapáveis. A expressão do RNAm da subunidade NR1 diminuiu após a exposição ao nado forçado, enquanto que o isolamento social e a imobilização forçada aumentaram essa expressão. Os resultados sugerem que os NMDAr do hipocampo estão envolvidos na mediação de respostas comportamentais ao estresse e que o momento em que a intervenção farmacológica é realizada é determinante para seus efeitos em cada modelo. Além disso, os resultados sugerem que estresses de natureza diferentes induzem alterações plásticas diferentes sobre o NMDAr no hipocampo.

### **AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE RECEPTORES MUSCARÍNICOS E $\alpha$ -ADRENÉRGICOS DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL NA ATIVIDADE BARORREFLEXA EM RESPOSTA AO AUMENTO DA PRESSÃO ARTERIAL EM RATOS**

**Leonardo Resstel Barbosa Moraes**

Orientador: Prof.Dr. Fernando M. de Aguiar Corrêa  
Dissertação de Mestrado apresentada em 21/02/2003

Existem muitos estudos sugerindo que o córtex pré-frontal medial (CPFM), especialmente sua porção ventral (córtex pré-limbico e infralimbico), estaria envolvido com a regulação do sistema cardiovascular. Em adição, há evidências que implicam o CPFM na modulação da atividade do barorreflexo. Todavia essas evidências são baseadas em estudos que utilizaram lesão completa do CPFM. Foi descrito também que tanto o sistema colinérgico quanto o sistema adrenérgico, envolvendo a porção ventral dessa área cortical (vCPFM), causariam alterações na atividade cardiovascular. Dessa forma, no presente trabalho nós verificamos os efeitos do bloqueio agudo do vCPFM por lidocaína sobre a atividade do barorreflexo; se esses efeitos são mediados por sinapses, utilizando  $\text{CoCl}_2$  e se existe a participação do sistema colinérgico, bloqueando receptores muscarínicos ou do sistema adrenérgico, bloqueando receptores  $\alpha$ -adrenérgicos do vCPFM.

Realizando infusões i.v. de fenilefrina foram produzidas respostas pressoras e conseqüente bradicardia reflexa. Correlacionando-se os valores obtidos com

o aumento da pressão arterial e os valores da bradicardia reflexa era então avaliada a atividade do barorreflexo.

A microinjeção bilateral de lidocaína no vCPFM causou uma redução da resposta bradicárdica ao aumento da pressão arterial em ratos não anestesiados, porém não foi observada nenhuma mudança no ganho do barorreflexo. A microinjeção bilateral de  $\text{CoCl}_2$  no vCPFM, de forma similar ao que foi observado com a lidocaína, também provocou redução na resposta bradicárdica durante o aumento da pressão arterial sem alterar o ganho do barorreflexo.

A microinjeção bilateral tanto de atropina quanto de antagonistas  $\alpha$ -adrenérgico (WB4101,  $\alpha_1$  e RX821002,  $\alpha_2$ ) não provocou qualquer alteração na atividade do barorreflexo em ratos não anestesiados.

Em conclusão nossos resultados confirmam que o CPFM (mais especificamente sua porção ventral), está envolvido com a modulação da atividade parasimpática do barorreflexo e sugerem que essa modulação depende de sinapses presentes nessa área cortical. Foi também observado que apesar do sistema colinérgico e adrenérgico terem participação na ação do vCPFM sobre o sistema cardiovascular, esses neurotransmissores não participam da modulação da atividade do barorreflexo promovida pelo vCPFM.

## **EFEITO HIPERNOCICEPTIVO PERIFÉRICO INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO INTRATECAL DE INTERLEUCINA-1 $\beta$ (M)**

**Djane Braz da Silva**

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira

Dissertação de Mestrado apresentada em 24/02/2003

A interleucina(IL)-1 vem sendo extensivamente estudada por suas diversas ações fisiológicas, dentre elas, sua ação pró-inflamatória e hipernociceptiva. Periféricamente, a IL-1 $\beta$  induz hipernocicepção através da ativação da COX e conseqüente produção de prostaglandinas (PGs). Além da IL-1 $\beta$ , outros estímulos inflamatórios como a carragenina e o lipopolissacarídeo de *E.coli* (LPS) induzem hipernocicepção mecânica através da liberação de diferentes mediadores, dentre eles a IL-1 $\beta$  e outras citocinas (IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ ).

Com o intuito de avaliar se a administração central (intratecal – i.t.) de IL-1 $\beta$  induz hipernocicepção inflamatória mecânica e se esse mecanismo é semelhante ao que ocorre na periferia, utilizamos os testes de pressão constante e crescente na pata de rato. Nossos resultados indicam que a administração i.t. de IL-1 $\beta$  induz hipernocicepção mecânica bilateral e que esta é mediada por PGs, uma vez que o pré-tratamento com indometacina (inibidor não-seletivo da COX) (i.t. e i.p.) inibiu esse processo. A administração periférica de indometacina (i.pl.) inibiu, na pata ipsilateral, a hipernocicepção mecânica induzida pela administração i.t. de IL-1 $\beta$ , sugerindo que as PGs liberadas na medula espinal podem sensibilizar retrogradamente o

neurônio aferente primário (NAP). O tratamento periférico com morfina também bloqueou, na pata ipsilateral, a hipernocicepção induzida pela IL-1 $\beta$  i.t., ratificando o resultado supracitado. Para descartar a hipótese de efeito inespecífico da indometacina, avaliamos o efeito dessa na hipernocicepção mecânica induzida pela administração intratecal de PGE<sub>2</sub> e os resultados indicam que a indometacina não é capaz de inibir a hipernocicepção induzida por esse mediador final.

A administração sistêmica de LPS também induz hipernocicepção mecânica bilateral que, assim como na hipernocicepção induzida pela IL-1 $\beta$ , é inibida pelo pré-tratamento com indometacina (i.p. e i.t.), indicando que as PGs medeiam esse processo. Além disso, o tratamento periférico (i.pl.) com indometacina e morfina inibiu parcialmente a hipernocicepção induzida pelo LPS somente na pata tratada, o que nos permite propor que a hipernocicepção induzida pela administração i.p. de LPS é decorrente, pelo menos em parte, da sensibilização do neurônio aferente primário pelas PGs.

Em conclusão, embora a sensibilização concomitante do neurônio aferente secundário não possa ser excluída, a diminuição do limiar de excitabilidade do NAP parece ser uma condição necessária para a indução de hipernocicepção mecânica por estímulos inflamatórios como a IL-1 $\beta$  e o LPS em nosso modelo de avaliação e essa redução no limiar de excitabilidade do NAP é mediada por prostaglandinas.

## **EFEITOS CARDIOVASCULARES DA MICROINJEÇÃO DE NORADRENALINA NA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DE RATOS**

**Gislaine Garcia Pelosi**

Orientador: Prof. Dr. Fernando M. de Aguiar Corrêa

Dissertação de Mestrado apresentada em 24/02/2003

O SNC desempenha papel fundamental no controle da pressão arterial, sendo os centros bulbares os responsáveis pela manutenção do tônus pressório geral e controle instantâneo da pressão arterial. Entretanto, estruturas suprabulbares tais como o córtex cerebral, o hipotálamo e a substância cinzenta periaqueductal (SCP) modulam a atividade dos neurônios do núcleo rostroventrolateral do bulbo (RVLN), nas diferentes situações comportamentais.

Há evidências de que estimulação elétrica ou química (com aminoácidos excitatórios ou acetilcolina) da SCP desencadeou alterações cardiovasculares.

Dentro os inúmeros neurotransmissores presentes na SCP, destaca-se a noradrenalina (NA), visto a existência de uma intensa projeção noradrenérgica para esta área. A SCP desempenha importante papel na efetuação de respostas comportamentais sendo necessária uma integração dos sistemas sensoriais e autonômicos para uma resposta mais adequada. Desta forma, o estudo dos correlatos neurovegetativos associados à estimulação da SCP é importante para uma melhor compreensão do papel funcional desta área. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo evidenciar o efeito sobre a pressão arterial da microinjeção de NA em diferentes regiões da SCP de ratos não anestesiados. Além de caracterizar as alterações cardiovasculares observadas decorrentes da microinjeção de NA na região dorsal da SCP.

A microinjeção de NA nas regiões dorsal, dorsolateral, medial e ventrolateral da SCP de ratos não anestesiados resultou em respostas pressoras de magnitudes similares, porém de padrões diferentes. Assim, nossos estudos evidenciaram uma certa homogeneidade da área, em relação à variação da pressão arterial, frente ao estímulo da NA. No entanto, a alteração na pressão arterial observada após a microinjeção de NA na região medial foi precedida de alterações comportamentais do animal, tais como, o aumento da atividade locomotora, a tentativa de fuga do animal, assim como elevação do trem anterior. Ao contrário, o estímulo da região ventrolateral ocasionou um comportamento de imobilidade no animal. Embora a microinjeção de NA nas regiões dorsal e dorsolateral da SCP não tivesse desencadeado respostas comportamentais aparentes, a alteração na pressão arterial

dos animais foi melhor evidenciada com a estimulação da região dorsal, além dessa área ter apresentado um menor tempo na latência da resposta quando comparada com as demais.

A microinjeção de NA na região dorsal da SCP desencadeou resposta pressora em todo o eixo rostrocaudal da região. Entretanto, as coordenadas mais caudais apresentaram uma resposta pressora de menor magnitude.

A estimulação química da SCP dorsal com NA desencadeou alterações na pressão arterial dos animais de maneira dose-dependente concomitante com bradicardia.

Em suma, os resultados do presente trabalho demonstram a existência de uma via noradrenérgica na SCP capaz de ocasionar diferentes padrões de respostas pressoras e bradicárdicas quando ativada.

## HIPERNOCICEPÇÃO MECÂNICA INDUZIDA PELA IL-18: PARTICIPAÇÃO DE ENDOTELINAS E DA MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA

**Waldiceu Aparecido Verri Junior**

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira

Dissertação de Mestrado apresentada em 24/02/2003

Nos modelos utilizados para o estudo da nocicepção inflamatória têm-se demonstrado a participação de prostaglandinas, aminas simpatomiméticas, leucotrienos e citocinas pró-nociceptivas (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e quimiocinas), além das endotelinas, que induzem hipernocicepção por uma via independente das prostaglandinas e aminas simpatomiméticas em ratos. A IL-18 além de ser fundamental em patologias como a artrite reumatóide, participa na regulação da resposta imune, cujos mecanismos de regulação da resposta celular convergem para um efeito pró-nociceptivo. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar se a IL-18 possui atividade nociceptiva, bem como a participação de prostaglandinas, aminas simpatomiméticas, leucotrienos, citocinas pró-nociceptivas e endotelinas nesse efeito e a relação entre a migração leucocitária e hipernocicepção mecânica induzida pela IL-18. Foram utilizados dois métodos nociceptivos de pressão na pata, um avaliando o tempo de reação do animal à pressão constante e outro a pressão necessária à reação. A IL-18 induziu hipernocicepção significativa dose- e tempo-dependentes, com pico hipernociceptivo entre a 3<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup>h. Com intuito de investigar quais mediadores estariam participando desse processo, foram realizados alguns tratamentos, dentre eles, a dexametasona

(glucocorticóide), mas não a indometacina (inibidor da ciclooxigenase), atenolol (antagonista  $\beta$ -adrenérgico), MK 886 (inibidor da síntese de leucotrienos), anticorpo anti-TNF- $\alpha$  ou antagonista do receptor da IL-1 (IL-1ra) inibiu a hipernocicepção mecânica induzida pela IL-18. Esses resultados excluem uma participação significativa de prostaglandinas, aminas simpatomiméticas, leucotrienos e citocinas pró-nociceptivas na hipernocicepção mecânica induzida pela IL-18, o efeito do tratamento com dexametasona pode ser explicado pelo mecanismo de ação da IL-18, que envolve a ativação de fatores de transcrição como o NF $\kappa$ B, inibido pelos glucocorticóides. Dessa forma, foi avaliada a participação de endotelinas na indução hipernociceptiva pela IL-18 utilizando-se antagonistas seletivos para os receptores ET<sub>A</sub> (BQ123) e ET<sub>B</sub> (BQ 788) para endotelinas, apenas este inibiu a hipernocicepção mecânica induzida pela IL-18 e ET-1. Para avaliar a participação da IL-18/ETs em modelos nociceptivos utilizados em nosso laboratório, Cg, LPS e desafio com mBSA (animais previamente imunizados), realizou-se o tratamento com anticorpo anti-IL-18 ou BQ 788. O tratamento com anticorpo anti-IL-18 não inibiu a hipernocicepção mecânica induzida pela Cg ou desafio mBSA e o tratamento com BQ 788 foi ineficaz na hipernocicepção mecânica induzida pela Cg, LPS ou desafio mBSA nas doses utilizadas, demonstrando que IL-18/ETs não participam nesses modelos nociceptivos. Por outro lado, como a migração leucocitária em ani-

mais deficientes para o receptor  $ET_B$  é diminuída e a presença de polimorfonucleares tem sido relacionada à hipernocicepção e além disso, o tratamento com anticorpo anti-IL-18 diminui as lesões articulares no modelo de artrite induzida por colágeno tipo II e uma das características da artrite reumatóide é o infiltrado celular, foi avaliada a relação entre a migração leucocitária e a hipernocicepção mecânica induzida pela IL-18/ET-1. O tratamento com fucoidina, uma droga que previne a migração celular, inibiu a hipernocicepção mecânica induzida pela IL-18 ou ET-1, sugerindo a participação da migração leucocitária ao tecido subcutâneo plantar no efeito da IL-18/ETs. A migração leucocitária também foi avaliada pelo método da mieloperoxidase, que permite inferir indiretamente o número de neutrófilos. O tratamento com fucoidina, mas não com BQ 788 ou BQ 123 inibiu a migração de leucócitos ao tecido subcutâneo plantar induzida pela IL-18, sugerindo que a migração

leucocitária tem participação essencial, mas não exclusiva na indução de hipernocicepção mecânica pela IL-18. A migração leucocitária ao tecido subcutâneo plantar induzida pela ET-1 foi sensível ao tratamento com fucoidina e BQ 788 da mesma maneira que a IL-18. Assim, os resultados apresentados são compatíveis com a hipótese de que a IL-18 é uma citocina pró-nociceptiva que induz hipernocicepção mecânica dose- e tempo-dependentes, com mecanismo de hipernocicepção mecânica diferente de outras citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ ) e quimiocinas pró-nociceptivas, pois independe de prostaglandinas, aminas simpatomiméticas, leucotrienos ou outras citocinas pró-nociceptivas nas doses utilizadas. Seu efeito hipernociceptivo ocorre pela produção e/ou liberação de ETs, que exercem seus efeitos via receptores  $ET_B$ , com participação essencial, mas não exclusiva da migração leucocitária na indução de hipernocicepção mecânica pela IL-18/ET-1.

### **PARTICIPAÇÃO DO FASCÍCULO PROSENCEFÁLICO MEDIAL NA VIA HIPOTENSORA ATIVADA PELA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL DE RATOS ANESTESIADOS**

**América Scopinho Augusto**

Orientador Prof. Dr. Fernando M. de Aguiar Corrêa  
Dissertação de Mestrado apresentada em 27/02/2003

O córtex prefrontal medial (CPFM) é uma região do córtex cerebral do rato que está envolvida no controle da pressão arterial. A estimulação elétrica do CPFM ou a aplicação local de ACh causam respostas hipotensoras em ratos anestesiados. Estudos de marcação neuronal demonstraram a existência de conexões entre o CPFM e o hipotálamo lateral (HL) e relataram que o efeito hipotensor causado pela ACh no córtex cíngulo área 3 (Cg3) era significativamente reduzido após lesão química do HL bilateral.

A injeção de lidocaína no HL bloqueou a hipotensão causada pela estimulação elétrica do córtex prefrontal lateral (CPFL).

Para estudar a participação do HL na via hipotensora envolvendo o Cg3, no presente trabalho nos propusemos a verificar o efeito de secções coronais do HL com lâminas de aço de diferentes larguras (1 a 4 mm), sobre a resposta hipotensora causada pela estimulação elétrica do CPFM.

Os resultados deste trabalho sugerem que 1) a resposta hipotensora provocada pelo estímulo elétrico do Cg3 de ratos anestesiados descende via feixe prosencefálico medial para o hipotálamo lateral e 2) que a via hipotensora apresenta uma decussação, provavelmente a nível rostral à banda diagonal de Broca.

## **FISIOLOGIA**

### **ESTRESSE ALTERA A NOCICEPÇÃO APÓS BLOQUEIO DO ÓXIDO NÍTRICO NO GIRO DENTEADO E INDUZ MODIFICAÇÕES NA EXPRESSÃO GÊNICA**

**Marcela Bermudez Echeverry**

Orientadora: Profa. Dra. Elaine A. Del Bel B. Guimarães  
Tese de Doutorado apresentada em 20/01/2002

**Introdução:** Vias da medula espinal com informação nociceptiva podem fazer conexões com estruturas do sistema límbico e cortico-límbico, relacio-

nadas com o componente afetivo da dor, permitindo uma integração da informação nociceptiva com a informação contextual e a memória do evento aversivo. Estimulação da formação hipocampal pode modular mecanismos nociceptivos, sendo que, um estímulo doloroso pode ativar esta estrutura. Sabe-se que, vários modelos de estresse podem produzir modificações plásticas e funcionais no hipocampo. Além disso, a neurotransmissão glutamatérgica pode participar tanto da percepção da dor, assim como das mudanças induzidas pelo estresse na formação hipocampal. A neurotransmissão mediada pelo receptor NMDA é a principal via para a formação de óxido nítrico pós-sináptico, que por sua vez, pode participar da resposta ao estresse e à nocicepção. **Objetivo:** O presente estudo teve como objetivo investigar se a inibição da NO sintase, com a presença de L-NAME ( $N^w$ -nitro-L-arginina methyl éster hidrocloreto) no hipocampo dorsal pode modular a informação nociceptiva. Também foi analisada a influência do estresse por contenção sobre o efeito do L-NAME. Foram observadas as estruturas encefálicas que foram ativadas após do estresse por contenção, durante 2 horas. **Método:** Ratos machos Wistar ( $n=6-11$ , estressados e não estressados) receberam uma microinjeção unilateral de L-NAME (50-

300 nmol/0,2 $\mu$ l) ou salina, no giro denteado do hipocampo dorsal. Foi analisada a expressão das proteínas Fos e nNOS por imunocitoquímica, a atividade NADPH-diaforase e a marcação para Neo-Timm. **Resultados:** o L-NAME não modificou a nocicepção dos animais não estressados. Entretanto, 5 dias após do episódio de estresse, o L-NAME produziu um efeito antinociceptivo (ANOVA,  $p < 0.05$ ). A curva dose-efeito foi em U invertido. A dose efetiva de L-NAME (150 nmol) foi antagonizada pela presença prévia de L-Arginina (150 nmol/0,2 $\mu$ L;  $p < 0.05$ ). Após o episódio agudo de estresse, foi observado um aumento significativo na expressão das proteínas Fos, nNOS, da atividade NADPH-diaforase e da marcação para Neo-Timm, na amígdala, núcleos hipotalâmicos, hipocampo, córtex piriforme e entorrinal (Teste  $t$ ,  $p < 0,05$ ). Este último, prediz a intensidade da ansiedade relacionada com a dor ou com o estresse, participando da parte afetiva dos eventos aversivos. **Conclusão:** Os resultados sugerem que a modulação pelo NO, do processo nociceptivo no hipocampo dorsal, depende da exposição prévia ao estresse por contenção e do intervalo pós-estresse. O presente estudo mostrou que a amígdala, hipotálamo, hipocampo, córtex piriforme e entorrinal responderam ao estímulo de estresse prévio.

## VARIAÇÃO DO NÚMERO DE NEURÔNIOS IMUNORREATIVOS AO RECEPTOR PARA ESTRADIOL DO LOCUS COERULEUS E DA ÁREA PRÉ-ÓPTICA EM RATAS

**Maristela de Oliveira Poletini**

Orientadora: Profa. Dra. Janete A. Anselmo Franci  
Tese de Doutorado apresentada em 24/02/2003

A ocorrência dos picos pré-ovulatórios de gonadotrofinas (Gn) depende da liberação de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), produzido principalmente na área pré-óptica (APO), que por sua vez depende da ação dos estrógenos no sistema nervoso central (SNC). Além de atuar na APO, tem sido proposto que este hormônio atue em outros neurônios modulando indiretamente a secreção de GnRH. Desde que, a lesão eletrolítica do locus coeruleus (LC) bloqueia estes picos e que há um aumento de atividade destes neurônios no momento do pico pré-ovulatório, o objetivo deste trabalho foi determinar se estes neurônios são imunorreativos ao receptor de estradiol do tipo alfa ( $ER\alpha+$ ) e se há variação no número de neurônios  $ER\alpha+$  nestes neurônios bem como relacionar com o número de neurônios  $ER\alpha+$  da APO. Ratas nas diferentes fases do ciclo estral bem como ratas ovariectomizadas tratadas (OVE) ou não (OVX) com

benzoato de estradiol foram perfundidas às 11:00, 14:00 e 16:00 h quando amostras de 1 mL de sangue foram retiradas do ventrículo cardíaco direito para dosagem de LH e estradiol plasmático por radioimunoensaio (RIE). Secções coronais do LC e da APO foram feitas em criostato; seis cortes da APO e oito do LC foram incubados com anti- $ER\alpha$  (AS-409, 1:10000) e o número de neurônios  $ER\alpha+$  foi contado. A omissão do anticorpo primário foi o controle negativo. As concentrações plasmáticas mais altas de estradiol foram observadas no proestro e no grupo OVE, quando o número de neurônios  $ER\alpha+$  da APO foram os menores. A ovariectomia induziu um aumento no número de neurônios  $ER\alpha+$  desta área, quando comparadas ao metaestro. Às 16:00 h do proestro, estro e do grupo OVE houve um aumento no número de neurônios  $ER\alpha+$  da APO quando comparado com outros horários estudados dentro do mesmo grupo. No LC, às 14:00 e 16:00 h do estro e às 16:00 h do diestro foram observados os maiores números de  $ER\alpha+$  do ciclo estral. O número de neurônios  $ER\alpha+$  do LC não variou nos diferentes horários estudados do grupo OVX, sendo simi-

lar àquele do grupo OVE às 11:00 h. Entretanto, no grupo OVE, houve um aumento no número de neurônios ER $\alpha$ + às 14:00 e 16:00 h. Os dados demonstram que os neurônios da APO e do LC apresentam ER $\alpha$ + cuja expressão varia em resposta às alterações das concentrações deste hormônio e sugerem que os ER $\alpha$ +

possam sinalizar o momento de deflagração destes picos que podem ocorrer independente de variações estrogênicas. Além disso, uma vez que o aumento no número de neurônios ER $\alpha$ + do LC precede àquele que ocorre na APO, parece que o LC funciona como um sinalizador temporal

### **EFEITO DA VARIAÇÃO DA OSMOLALIDADE SOBRE A LIBERAÇÃO DO PEPTÍDEO NATRIURÉTICO ATRIAL (ANP) HIPOTÁLAMO BASAL INCUBADO IN VITRO: MODULAÇÃO NITRÉRGICA (M)**

**Dayane Aparecida Gomes**

Orientador: Prof. Dr. José Antunes Rodrigues

Dissertação de Mestrado apresentada em 28/02/2003

Com a preparação do hipotálamo basal (HB), *in vitro*, estudamos os efeitos da variação osmótica sobre a secreção do ANP e a participação do sistema nitrérgico na modulação destas respostas. Nesta preparação, a elevação da osmolalidade do meio de incubação determinou aumento da liberação do ANP para o meio com diminuição da atividade da sintase de óxido nítrico (NOS) e na produção do óxido nítrico (NO), evidenciado pela diminuição da produção de nitrato liberado para o meio de incubação. Adicionalmente, o uso de doadores de NO, tais como nitroprussiato de sódio (SNP), S-nitroso-N-acetyl-penicillamine (SNAP) e 3-morpholino-sydnominine (SIN-1), induziram dimi-

nuição significativa da liberação do ANP para o meio de incubação em resposta a elevação da sua osmolalidade. Experimentos semelhantes, empregando inibidor da NOS (L-NAME) não determinou alterações significativas na liberação do ANP induzido pela estimulação osmótica hipertônica. Estas respostas não ocorreram por modificações da viabilidade tissular como demonstrado pelos experimentos nos quais foram estudados os efeitos do KCl (56 mM) e da superóxido dismutase na liberação do ANP. Os dados em conjunto indicam que o aumento da osmolalidade do meio de incubação determina aumento da liberação do ANP com concomitante redução da atividade do sistema nitrérgico. Os mecanismos pelos quais estes efeitos são induzidos, como por exemplo a participação do cálcio e do sistema glutamatérgico, estão sendo investigados em nosso laboratório.

### **PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA COLINÉRGICO DO NÚCLEO MAGNO DA RAFA NA MODULAÇÃO DAS RESPOSTAS DE IMOBILIDADE TÔNICA, NOCICEPÇÃO E ATIVIDADE LOCOMOTORA EM COBAIAS**

**Luis Felipe Souza da Silva**

Orientadora: Profa. Dra. Lêda Menescal de Oliveira

Dissertação de Mestrado apresentada em 26/03/2003

A imobilidade tônica (IT) é uma resposta defensiva inata, caracterizada por um estado de profunda inatividade física e relativa falta de responsividade ao meio ambiente. O núcleo magno da rafe (NMR) está intimamente relacionado à modulação de respostas nociceptivas, produzindo tanto antinocicepção, quanto pró-nocicepção. Alguns trabalhos, onde foram realizadas estimulações elétricas ou microinjeções de substâncias, descrevem a participação do NMR na produção de respostas comportamentais. No presente trabalho, investigamos a participação do sistema coli-

nérgico do NMR na modulação de respostas comportamentais de IT, na nocicepção e na atividade locomotora, em cobaias. A microinjeção do agonista colinérgico, carbacol, no NMR promoveu, a redução do tempo em que os animais permaneciam em IT, aumento na atividade locomotora e antinocicepção, avaliada pelo teste de vocalização. Todas as respostas obtidas pela estimulação colinérgica do NMR foram bloqueadas pela microinjeção prévia de atropina (antagonista colinérgico), evidenciando a participação de receptores muscarínicos na modulação dessas respostas. A microinjeção de atropina isoladamente não interferiu na duração das respostas de IT, indicando que o sistema colinérgico não possui atividade tônica no NMR. Em suma, os resultados do presente trabalho indicam que a estimulação colinérgica do NMR estaria produzindo

respostas facilitatórias, via funículo ventrolateral, que causariam a despolarização de motoneurônios presentes no corno ventral da medula espinhal, o que provocaria a redução da duração dos episódios de IT e aumento da atividade locomotora. Já, a antinocicepção,

seria decorrente da ativação de vias rafe-espinhais que trafegando pelo funículo dorsolateral, atuariam sobre neurônios de segunda ordem no corno dorsal da medula espinhal interrompendo assim, a entrada de estímulos nociceptivos.

### **MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS CO-CULTIVADOS COM CÉLULAS DA GRANULOSA PRODUTORAS DE ESTRADIOL EM MEIO QUIMICAMENTE DEFINIDO**

**Alessandra Aparecida Vireque**

Orientadora: Profa. Dra. Alzira Amélia M. Rosa e Silva  
Dissertação de Mestrado apresentada em 31/03/2003

A comunicação bidirecional entre o oócito e as células da granulosa (CG) é um fator controlador, *in vivo*, da progressão do desenvolvimento folicular e maturação oocitária. Diversos sistemas de cultura *in vitro* demonstram que a presença de CG no meio de maturação resulta em aumento na competência para o desenvolvimento. Este trabalho foi voltado para testar a influência do sistema de cultura de CG produtoras de 17 $\beta$ -estradiol, em meio definido, sobre a cinética da maturação nuclear de oócitos bovinos durante a MIV e a sinalização do oócito para a produção de esteróides (E2 e P4) por estas células. O delineamento experimental consistiu em dois experimentos. No experimento 1 (E1), as CG foram isoladas de folículos antrais (3-5mm de diâmetro). Após centrifugação e contagem, as células foram semeadas em placas de 4 fossas na densidade de 10<sup>6</sup> células viáveis/fossa/ml de meio completo, contendo: PVA, androstenediona, insulina, IGF-I, aminoácidos não-essenciais, transferrina, selênio, bicarbonato de sódio, hepes e antibióticos. CG foram cultivadas até 96 horas em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 38,5°C. COCs imaturos foram aspirados de folículos de 2-8 mm e maturados na presença ou ausência de CG durante 8, 16 e 24 horas, nos seguintes tratamentos: T1:  $\alpha$ -MEM + PVA + CG; T2:  $\alpha$ -MEM + PVA (controle negativo); T3: TCM-199 + CG ( $\alpha$ -MEM substituído por TCM-199 na cultura de

CG após 96h de cultivo prévio); T4: TCM-199 (controle positivo suplementado com 10% FCS + E2 + FSH + LH). As configurações cromossômicas foram classificadas de acordo com seguintes estágios da meiose: GV, CCI, CCII, MI, AI e MII. No experimento 2 (E2), para analisar a atividade esteroidogênica da CG, E2 e P4 foram dosados nos meios coletados e estocados a -20°C após os tempos de MIV. Os dados referentes à concentração de E2 e P4 foram analisados pelo teste de regressão polinomial. Os dados da MIV foram analisados pelo teste de Qui-quadrado. Os resultados mostram que a morfologia das CG e produção de E2 foram mantidos até o final dos períodos de co-cultura. Não foram detectadas diferenças na produção de E2 entre os tratamentos. A secreção de P4 foi maior nos tratamentos que incluem as CG, porém os níveis de P4 não aumentaram com o tempo de co-cultura. Oócitos maturados em co-cultura com as CG em meio definido, mostraram maiores percentuais de CCI e CCII e baixas taxas de MI, após 8h de MIV. Entretanto, o retardo inicial da maturação foi compensado com 24h de MIV. Entre os grupos T1, T2 e T4 não foram verificadas diferenças estatísticas significativas nos percentuais de oócitos que completaram a maturação nuclear, após 24h de cultivo. Estes achados sugerem efeito inibitório das CG sobre a retomada da meiose e uma evolução mais lenta da maturação nuclear no sistema de MIV padronizado. Este método de MIV, desde que realizado em condições definidas, pode ser usado para estudar competência oocitária e o cross-talk oócito-CG.

### **INDUÇÃO DO COMPORTAMENTO DE AUTOLIMPEZA EXACERBADA (HYPERGROOMING) PELA INJEÇÃO INTRAMIGDALIANA DE OCITOCINA EM RATOS WISTAR E SEU EFEITO NA EXPRESSÃO DE CRISES AUDIOGÊNICAS EM ANIMAIS DA CEPA WISTAR AUDIOGENIC RAT (WATC)**

**Christiano Del Cantoni Gati**

Orientador Prof. Dr. Norberto Garcia Cairasco  
Dissertação de Mestrado apresentada em 28/05/2003

Trabalhos vêm sugerindo a capacidade de alguns hormônios de modular crises epiléticas. Dentre eles a ocitocina (OT) tem o efeito menos explorado.

Dados da literatura nos fazem supor que a ocitocina teria ação anticonvulsiva. Logo, o principal objetivo deste trabalho foi testar esta hipótese.

Administramos OT em animais da cepa *Wistar Audiogenic Rat* (WAR), um modelo genético de epilepsia, para constatar sua influência sobre a crise audiogênica (CA). O peptídeo foi injetado bilateralmente na amígdala central (CeA). Antes disso, estudamos a possibilidade da ocitocina na CeA exacerbar o comportamento de autolimpeza, considerado um sintoma do transtorno obsessivo-compulsivo (TOC).

Inicialmente injetamos OT em ratos Wistar resistentes à CA. Estes experimentos revelaram que microinjeção intramigdalina bilateral de OT intensificou a autolimpeza, dado inédito na literatura. A administração de OT em WARs teve dois resultados principais. Primeiro, a OT mostrou ser menos eficaz na exacerbação do comportamento de autolimpeza destes animais do que em ratos resistentes, sugerindo uma

alteração endógena do sistema ocitocinérgico. O segundo resultado é o fato de que injeção bilateral de OT na CeA, conseguiu retardar o início das CAs e impediu o desenvolvimento do abrasamento audiogênico, uma evidente ação anticonvulsiva. Porém, este efeito protetor contra as crises foi parcial, pois não influenciou a severidade das crises. Já que o efeito intensificador da OT sobre a autolimpeza está atenuado, provavelmente isto explica porque a ação anticonvulsiva também se encontra diminuída.

As principais conclusões deste trabalho são: (1) a OT induz o comportamento de autolimpeza exacerbada em ratos Wistar resistentes e WARs quando injetada bilateralmente na amígdala central; (2) A OT é menos eficiente em induzir este quadro nos WARs; e (3) a OT possui efeito anticonvulsivo parcial sobre crises audiogênicas. Este trabalho, portanto, reforçou a existência de uma relação OT-amígdala que possivelmente tenha importante papel na co-expressão de TOC e epilepsia.

### **DESINIBIÇÃO GABAÉRGICA DO TORO SEMICIRCULAR DORSAL EM GYMNOTUS CARAPO: EFEITOS ELETROMOTORES E COMPORTAMENTAIS; DETERMINAÇÃO POR TÉCNICA DE RASTREAMENTO DAS POSSÍVEIS VIAS ENVOLVIDAS**

**Terence Teixeira Duarte**

Orientadora Profa. Dra. Anette Hoffmann

Dissertação de Mestrado apresentada em 02/06/2003

Neste trabalho estudamos os efeitos eletromotores e motores somáticos decorrentes da desinibição GABAérgica do toro semicircular dorsal (TSd) em um peixe elétrico de campo fraco, *Gymnotus carapo* bem como as possíveis vias envolvidas na expressão destes efeitos, valendo-nos de abordagem funcional e de técnica de rastreamento neuronal bidirecional, usando como traçador a amina de dextrana biotinilada (BDA).

A microinjeção do antagonista GABA<sub>A</sub> bicuculina em camadas profundas do TSd induziu paradas na descarga do órgão elétrico (DOE) cuja intensidade é concentração-dependente. Nenhum efeito foi observado pela microinjeção nos mesmos sítios, do agonista muscimol ou de salina.

Em outros gimnotiformes já estudados, paradas da DOE resultam da atuação de glutamato em receptores NMDA das células relé do núcleo marcapasso (Pn) rombencefálico. O mecanismo parece ser semelhante em *Gymnotus carapo* pois observamos paradas da DOE por microinjeção de NMDA na região ventral do Pn onde estão as células relé. Reforçando este achado, observamos que as paradas da DOE de-

correntes da microinjeção de bicuculina são bloqueadas pelo pré-tratamento com o antagonista de NMDA, AP-5 microinjetado no Pn.

Para determinar o possível caminho envolvido nos efeitos observados, aplicamos o traçador BDA “in vivo” no TSd e observamos fibras varicosas e neurônios marcados no núcleo eletrosensorial (nE), projeção esta confirmada pelo encontro de fibras varicosas e neurônios retrogradamente marcados no TSd em animais em que o BDA foi injetado naquele núcleo.

A microinjeção de bicuculina no TSd induz igualmente uma intensa resposta motora cujos componentes são descritos como característicos do comportamento agonístico. A frequência de ocorrência destes padrões é função da concentração aplicada. A deposição de BDA no TSd mostrou também terminais na formação reticular rombencefálica medial em planos situados na altura do lemnisco lateral. A microinjeção de NMDA nesta região induziu uma intensa resposta motora semelhante à observada por desinibição do TSd, sem entretanto a ocorrência de paradas da DOE. O aparecimento de terminais marcados na medula espinhal após injeção de BDA naquela região da formação reticular, e o preenchimento de corpos neuronais nesta após injeção do traçador na porção ventral da medula espinhal, apontam para a possibilidade de serem estes neurônios origem do trato

bulboespinal. Juntando ao dado funcional, podemos supor que os efeitos motores decorrentes da desinibição GABAérgica do TSd decorram da liberação de glutamato que ativa receptores NMDA dos neurônios que compõem o trato bulboespinal.

Considerando que paradas da DOE ocorrem em situações de confronto agonístico e que no caso da

desinibição GABAérgica do TSd as paradas se expressam paralelamente a padrões motores de defesa, propomos que a informação eletrosensorial que chega ao TSd espacialmente organizada, procedente do lobo eletrosensorial, seja convertida em respostas eletromotoras e motoras somáticas ligadas ao comportamento defensivo.

## **PARTICIPAÇÃO DO GLUTAMATO NA HIPOTERMIA INDUZIDA POR ARGININA VASOPRESSINA SISTÊMICA EM RATOS**

**Flávia Marini Paro**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Guilherme de S. Branco  
Tese de Doutorado apresentada em 06/06/2003

Tem sido demonstrado que a injeção intravenosa (i.v.) de arginina vasopressina (AVP) induz à queda na temperatura corporal ( $T_c$ ), contudo, pouco se conhece sobre os mecanismos envolvidos nessa resposta. Visto que o glutamato é um importante neurotransmissor envolvido em alguns mecanismos termorregulatórios, no presente estudo, nos testamos a hipótese de que o glutamato participa da hipotermia induzida por AVP sistêmico. Ratos Wistar foram pré-tratados intracerebroventricularmente (i.c.v.) com ácido quinurênico, um antagonista dos receptores ionotrópicos do glutamato,  $\alpha$ -metil-4-carboxifenilglicina (MCPG), um antagonista dos receptores metabotrópicos do glutamato, ou salina 15 minutos antes da injeção intravenosa de AVP (2  $\mu$ g/kg) ou salina. Foram monitorados os seguintes parâmetros durante os experimentos:  $T_c$ , temperatura do tecido adiposo marrom ( $T_{TAM}$ ), pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (fc), temperatura da cauda ( $T_{Cauda}$ ) e temperatura ambiente ( $T_{amb}$ ). Com base nesses parâmetros foi também calculado o índice de perda de calor pela cauda.

O tratamento i.c.v. com salina, seguido por injeção i.v. de AVP, causou uma queda significativa na  $T_c$  dos animais, que não foi afetada pelo pré-tratamento com MCPG. Contudo, o pré-tratamento i.c.v. com ácido quinurênico aboliu a hipotermia induzida por AVP

sistêmica, mas não afetou o aumento de PA, queda de fc e redução do  $T_{TAM}$  induzidos por AVP. Por outro lado, o aumento do índice de perda de calor pela cauda, causado pelo AVP, foi reduzido de forma significativa em animais pré-tratados com ácido quinurênico.

Com base nestes resultados, e visto que os barorreceptores aferentes participam da hipotermia induzida por AVP, e o glutamato é um importante neurotransmissor excitatório do barorreflexo no núcleo do trato solitário (NTS), nós hipotetizamos que o NTS comissural lateral, que a primeira sinapse dos barorreceptores no SNC, poderia estar envolvido no mecanismo de hipotermia induzida por AVP sistêmica. Os ratos foram então pré-tratados com micro-injeções bilaterais de ácido quinurênico ou salina, no NTS comissural lateral, seguidas por injeções i.v. de AVP ou salina. Contudo as micro-injeções de ácido quinurênico não tiveram qualquer efeito na queda da  $T_c$  induzida por AVP.

Estes dados indicam que os receptores glutamatérgicos ionotrópicos no SNC não participam da manutenção basal da  $T_c$ , mas participam da hipotermia induzida por AVP sistêmica, afetando o mecanismo de perda de calor pela cauda. Nossos resultados também indicam que os receptores glutamatérgicos metabotrópicos antagonizados por MCPG, não participam de nenhum desses mecanismos, nas condições experimentais estudadas. Além disso, os receptores glutamatérgicos ionotrópicos do NTS comissural lateral, parecem não participar da manutenção da temperatura basal e da hipotermia induzida por AVP sistêmica.

## **CARACTERIZAÇÃO DE RECEPTORES PURINÉRGICOS EM CÉLULAS DE LEYDIG DE CAMUNDONGOS**

**Luiz Artur Poletto Chaves**

Orientador: Prof. Dr. Wamberto Antonio Varanda  
Dissertação de Mestrado apresentada em 06/06/2003

Em anos recentes, a função do ATP tem sido

associada também à sinalização intercelular, mediante eventos rápidos através da liberação conjunta com neurotransmissores no sistema nervoso periférico, central, autonômico e imunológico entre outros. Além disso, existe um número crescente de evidências que sugere

re sua participação em processos celulares de longo prazo. Os efeitos do ATP extracelular são mediados por receptores purinérgicos do tipo P2X (canais iônicos ativados por ligante) e do tipo P2Y (canais iônicos acoplados à proteína G). Até o momento, sete tipos de receptores P2X foram identificados e clonados: P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>5</sub>, P2X<sub>6</sub>, P2X<sub>7</sub>. Em tecidos excitáveis e não excitáveis, o influxo de Ca<sup>+2</sup> por esses canais justifica em parte o aumento da [Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub> observado em algumas situações fisiológicas sendo, portanto, esta uma importante via envolvida nas respostas mediadas por receptores P2X “in vivo”. O tratamento das células de Leydig de rato e camundongos, com ATP, causou um aumento na [Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub> e na secreção de testosterona reforçando a hipótese de que a sinalização via Ca<sup>+2</sup> contribui para o controle dessa função nestas células. Embora esses estudos tenham sugerido que as células de Leydig expressam receptores P2X, uma investigação detalhada sobre os possíveis subtipos dos receptores P2X aí presentes falta na literatura. Neste estudo, são investigadas em células

de Leydig de camundongos, através da técnica de “patch-clamp”, as correntes iônicas evocadas por ATP extracelular e de imunocitoquímica, a expressão de receptores P2X. Os dados mostraram que pulsos de ATP ativam correntes rápidas (300 μM – 108 ms), as quais foram bloqueadas por suramina e PPADS, e apresentaram dessensibilização lenta. Para as correntes evocadas por ATP foi determinado um K<sub>d</sub> de 44 μM e coeficiente de Hill de 2 sendo que o análogo αβMeATP não atuou nem como agonista ou antagonista. As correntes macroscópicas são retificantes de entrada, catiônicas e moduladas pelo pH. Correntes unitárias também sugerem uma retificação de entrada e mostraram, ainda que a probabilidade de abertura varia em função do tempo, como observado para as correntes macroscópicas. Com base nas propriedades farmacológicas e cinéticas das correntes sugere-se que essas células expressam os receptores purinérgicos do subtipo P2X<sub>2</sub> e ou P2X<sub>5</sub> e com base nos experimentos de imunomarcagem mostra-se que a subunidade P2X<sub>5</sub> está presente.

## GENÉTICA

### EFEITO DO TOURO NA SOBREVIVÊNCIA DE EMBRIÕES *IN VITRO* AO CONGELAMENTO

**Maurício Barros Fernandes**

Orientador: Prof. Dr. Raysildo Barbosa Lôbo

Dissertação de Mestrado apresentada em 07/02/2003

A competência dos embriões *in vitro* é dependente da origem dos gametas submetidos ao processamento e do sistema de cultivo utilizado. A hipótese de que os touros diferem quanto a competência de seus embriões *in vitro* em sobreviver a um processo de congelamento foi testada. Óvários colhidos de matadouro foram transportados ao laboratório em tempo não superior a duas horas onde oócitos de grau I foram submetidos a maturação *in vitro*, fertilização *in vitro* distribuídos com o sêmen congelado de 29 touros da raça nelore. Blastocistos de grau I, desenvolvidos em meio CR2 e monocamada de células do cumulus foram selecionados 168 horas após a FIV e então congelados por método de equilíbrio termodinâmico com diluição em duas etapas de crioprotetores a 0,2M de sacarose e 1,5M de glicerol, desde -7C até -32,5 à taxa de 0,3 C/minuto. Após descongelamento ao ar por 8 segundos e 20C por 20 segundos em ba-

nho Maria, procedeu-se a retirada de crioprotetores e submeteu-se os embriões a cultivo de 72 horas em meio CR2 e monocamada de células do cumulus. A sobrevivência de embriões ao congelamento foi analisada na taxa de eclosão desses embriões após 72 de cultivo. O teste do qui quadrado com grau de liberdade =28 e nível de significância de 5% foi aplicado para detectar a diferença entre touros nas características de desenvolvimento embrionário e sobrevivência ao congelamento. Coeficientes de correlação de Spearman (rs) com nível de significância de 5% e o modelo de regressão linear foram aplicados para a predição da sobrevivência ao congelamento. Os touros diferem quanto a sobrevivência de seus Blastocistos GI *in vitro* após congelamento e essa característica não pode ser predita por índices de desenvolvimento embrionário por touro. Estudos de comparação entre touros quanto a características ultraestruturais, citogenéticas e de expressão gênica de embriões *in vitro* poderão esclarecer as causas da diferença entre os touros quanto a capacidade de sobrevivência de seus embriões ao congelamento.

## ASSOCIAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES A CARACTERÍSTICAS DE PRODUÇÃO NA RAÇA NELORE

**Fernando Henrique Biase**

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Regina Martelli

Dissertação de Mestrado apresentada em 17/02/2003

A investigação de polimorfismos no genoma pode contribuir para aumentar as informações sobre a variabilidade das características quantitativas. O objetivo deste trabalho foi obter a frequência alélica dos polimorfismos dos genes kappa caseína (CSN3) e fator de transcrição da pituitária (PIT 1) e correlacionar a variabilidade genotípica com o valor genético dessas características economicamente importantes para a produção da raça nelore. Foram genotipados 408 e 241 animais para os polimorfismos do CSN3 e PIT 1, respectivamente. As diferenças esperadas na progênie (DEP) analisadas com o polimorfismo do CSN3 foram as maternas e diretas para peso aos 120 e 210 dias e diretas para peso aos 365, 450 e 550 dias. Para o polimorfismo do PIT 1, também foram analisadas as DEPs diretas para perímetro escrotal aos 365, 450 e 550 dias. Na análise por regressão linear as DEPs fo-

ram consideradas variáveis dependentes e os genótipos variáveis independentes. Cada genótipo e DEP foram avaliados separadamente. A frequência do alelo A da kappa caseína foi 0,908. Não houve significância ( $P > 0,05$ ) entre os genótipos quando estimado o efeito de substituição do alelo A para as DEPs. Os coeficientes de determinação indicaram pouca variabilidade causada pelos diferentes genótipos. Em relação ao polimorfismo do PIT 1, observamos um novo padrão de restrição enzimática, considerado um novo alelo para gene na raça nelore. As frequências alélicas obtidas foram 0,00825, 0,7841 e 0,2072 para A, B e C, respectivamente. Como resultado da regressão dos genótipos BB e BC sobre as DEPs, o efeito de substituição alélica foi significativo ( $P < 0,05$ ) para a DEP perímetro escrotal aos 365 dias. Sugerimos que o polimorfismo do CSN3 não deve ser utilizado como marcador em programas cujo objetivo é o crescimento precoce. Entretanto, consideramos o polimorfismo do PIT 1 um marcador adequado quando a característica selecionada é a precocidade reprodutiva.

## MODELOS NÃO LINEARES PARA DESCREVER O CRESCIMENTO DE FÊMEAS DA RAÇA NELORE

**Anália Del Valle Garnero**

Orientador: Prof. Dr. Raysildo Barbosa Lôbo

Tese de Doutorado apresentada em 18/02/2003

Utilizaram-se 14563 pesagens de 1158 fêmeas da raça Nelore, nascidas entre 1985 e 1995, pertencentes a dez fazendas participantes do Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore, distribuídas em sete Estados do Brasil (BA, GO, MS, MG, PA, PR e SP). A finalidade foi descrever e discutir a curva de crescimento de fêmeas da raça Nelore utilizando dados de crescimento até idade à maturidade, através das funções de Brody, Von Bertalanffy, Logístico e Gompertz, tendo os seguintes objetivos pontuais: a) Estabelecer um padrão médio de crescimento para as fêmeas da raça Nelore, b) Obter parâmetros individuais e médios das curvas a partir das diferentes funções, c) Comparar os modelos Brody, Von Bertalanffy, Logístico e Gompertz, d) Estimar sob modelo animal utilizando máxima verossimilhança restrita e inferência bayesiana os componentes de variância, as herdabilidades e as correlações genéticas do peso assintótico

(A) e taxa de maturidade (K), e) Predizer valores genéticos para A e K, f) Estimar a tendência genética de A e K, entre os anos de 1988 e 1995, g) Simular curvas de crescimento para animais com diferença esperada na progênie (DEP) alta, média e baixa para A e K. Foi utilizado o procedimento NLIN do SAS (1996) para a obtenção dos parâmetros da curva de crescimento A e K. Para a obtenção dos componentes de (co)variância e valores genéticos de A e K utilizou-se máxima verossimilhança restrita sob modelo animal em análise unicarater e bicarater e, inferência bayesiana sob modelo animal em análise unicarater. Os parâmetros médios A e K foram: 515,06 e 0,071 para Von Bertalanffy; 552,77 e 0,045 para Brody; 501,11 e 0,097 para Logístico, e 507,00 e 0,083 para Gompertz, respectivamente. As estimativas de herdabilidade para A e K a partir da máxima verossimilhança restrita foram: 0,39 e 0,42 para Von Bertalanffy, 0,42 e 0,44 para Brody, 0,40 e 0,41 para Logístico e 0,39 e 0,39 para Gompertz, respectivamente. As correlações genéticas variaram entre -0,69 e -0,49. As estimativas médias de herdabilidade para A e K a partir da inferência

bayesiana foram: 0,41 e 0,45 para Von Bertalanffy, 0,45 e 0,47 para Brody, 0,42 e 0,45 para Logístico e 0,41 e 0,43 para Gompertz, respectivamente. As tendências genéticas da DEP sobre o ano de nascimento das vacas foram, em média, -0,0065kg/ano para A e 0,006g/dia para K (com variações entre os modelos estudados). Quando feitas simulações com DEP alta, baixa e média para ambas características, observouse, que a utilização destas características como critérios de seleção é viável, não somente pelas herdabilidades das mesmas e pela grande variabilidade observada, mas também pelo progresso genético que poderia ser alcançado. Todos os modelos foram adequados para descrever o crescimento dessas fêmeas. Levando em consideração o número de interações necessárias para atingir a convergência, o quadrado médio do erro e o coeficiente de determinação, o melhor modelo para descrever a curva de crescimento foi o Brody, em segundo lugar Von Bertalanffy, ter-

ceiro Logístico e por último, Gompertz. Os quatro modelos estudados foram apropriados para estabelecer padrões médios de crescimento e obter parâmetros individuais das curvas nas fêmeas da raça Nelore. O modelo Brody, com os parâmetros estimados no presente estudo, seria o mais indicado para representar a curva de crescimento média, neste conjunto de fêmeas da raça Nelore. Em função dos parâmetros genéticos estimados a partir da máxima verossimilhança restrita e da inferência bayesiana para o peso assintótico e para a taxa de maturação, estas características são passíveis de serem incluídas em um índice de seleção, como critérios que não favoreceriam o grande aumento do peso adulto das fêmeas Nelore. O tamanho das cadeias de Gibbs, o período de descarte, o tamanho amostral, e a forma da distribuição inicial quando utilizada a inferência bayesiana, não tiveram influência nas estimativas da variância genética e residual, assim como da herdabilidade.

### **A INFLUÊNCIA DA VITAMINA B6 SOBRE A FREQUÊNCIA DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS INDUZIDAS PELA DOXORRUBICINA *IN VITRO* E *IN VIVO***

**Paula Lumy Takeuchi**

Orientadora: Profa. Dra. Catarina Satie Takahashi  
Dissertação de Mestrado apresentada em 18/02/2003

Doxorrubicina (DXR) é um quimioterápico pertencente ao grupo das antraciclinas e é usado no tratamento de muitas neoplasias malignas sendo capaz de intercalar-se com a molécula de DNA e produzir radicais livres, induzindo aberrações cromossômicas (AC) *in vitro* e *in vivo*. Sabendo-se que as vitaminas representam uma classe de antimutagênicos, capazes de sequestrar radicais livres ou eletrófilos, que danificam o DNA e outras estruturas celulares, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da vitamina B<sub>6</sub> (VB<sub>6</sub>) sobre a frequência de AC (600 células/tratamento) induzidas pela DXR *in vitro* (linfócitos do sangue periférico humano) e *in vivo* (células da medula óssea de ratos Wistar) e também se esta vitamina exerce

influência sobre o índice de divisão celular pelo cálculo do índice mitótico (IM), para o qual foram contadas 2000 células/tratamento.

Os resultados obtidos com os experimentos *in vitro* mostraram que culturas pré-tratadas com 90 µgVB<sub>6</sub>/ml de meio de cultura e que, posteriormente, receberam DXR apresentaram IM estatisticamente significativo quando comparadas às culturas tratadas apenas com DXR. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre as frequências de AC para os diferentes tratamentos associados, independente do protocolo de tratamento utilizado.

Os experimentos *in vivo* mostraram que a concentração de 50 mgVB<sub>6</sub>/Kg p.c., quando aplicada no protocolo de pré-tratamento, foi capaz de diminuir significativamente a frequência de AC em comparação aos resultados obtidos com tratamento realizado apenas com DXR somente quando os “gaps” foram excluídos.

### **DIVERSIDADE GENÉTICA DE AFRO-BRASILEIROS: DNA MITOCONDRIAL E CROMOSSOMO Y**

**Kiyoko Abe-Sandes**

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Zago  
Tese de Doutorado apresentada em 25/02/2003

O presente estudo tem por objetivo avaliar a contribuição genética oriunda de brancos europeus,

negros africanos e ameríndios na população atual brasileira, e identificar mecanismos que concorrem para a sua diversidade. A amostra é composta por 382 indivíduos pertencentes a seis populações: uma de descendentes de japoneses, uma de descendentes de europeus, e quatro de afro-brasileiros (duas urbanas e

dois semi-isolados). Essas populações foram investigadas quanto à diversidade genética para estimar a contribuição de cada grupo étnico na composição da nossa população brasileira. Foram analisados 12 marcadores bialélicos da região não recombinante do cromossomo Y (SRY1532I, SRY1532II, SRY2627, SRY8299, DYS287, DYS271, DYS199, 92R7, PN2, PN3, M34 e M9), 103 sítios polimórficos da região hipervariável I (HVS I), 22 SNPs em regiões codificadoras e uma deleção de 9 pares de bases na região intergênica COII/tRNA<sup>LYS</sup> do DNA mitocondrial. Os resultados mostram que a população mais homogênea foi a dos descendentes de japoneses, não tendo sido detectada mistura nesta amostra com nenhum grupo étnico. Nos brancos descendentes de europeus detectamos apenas um cromossomo Y de origem africana e nenhum

de origem ameríndia, mas observamos 12,8% e 21,4% de linhagens de DNA mitocondrial ameríndias e africanas, respectivamente. Nos afro-brasileiros foram detectados dois cromossomos Y típicos de ameríndios em Salvador e seqüências de DNA mitocondrial de origem ameríndia com frequência que variou de 2,9% a 21,9%, além de raras linhagens de origem européia (4%) em Ribeirão Preto. O conjunto dos resultados mostra que na formação da população atual houve uma maior contribuição de mulheres ameríndias e africanas do que de homens desses mesmos grupos, sendo a contribuição masculina maior a dos europeus. Dados sociais e históricos corroboram esses achados. Além disso, demonstramos a grande heterogeneidade das populações de afro-descendentes, principalmente em virtude da grande variabilidade da miscigenação.

## ASPECTOS REPRODUTIVOS ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE AFRICANIZAÇÃO DAS ABELHAS *APIS MELLIFERA* NO BRASIL

**Alexandre dos Santos Cursino**

Orientador: Prof. Dr. Ademilson E. Egea Soares

Dissertação de Mestrado apresentada em 21/03/2003

O processo de africanização de *Apis mellifera* no Brasil é um dos problemas biológicos mais interessantes, mas que ainda está por merecer melhor compreensão. Estudos da complexa biologia destas abelhas podem ajudar na compreensão do processo de africanização. Aspectos genéticos, ecológicos e evolutivos devem ser inter-relacionados para uma completa e elucidativa conclusão do processo de africanização. Várias pesquisas foram feitas com estas abelhas desde sua introdução nas Américas, no entanto pouco se sabe sobre a reprodução natural das abelhas africanizadas. Trabalhos sobre a reprodução natural de *Apis mellifera* foram realizados por pesquisadores estrangeiros, que localizaram e definiram Áreas de Congregação de Zangões (ACZ) como áreas bem delimitadas, onde um grande número de machos se reúnem e disputam rainhas virgens que possam passar por dentro dessas áreas. No presente trabalho foram localizadas e descritas 10 ACZ (5 em Ribeirão Preto e 5 no Rio Grande do Sul). Estas ACZ foram localizadas levantando-se uma rainha atada a um balão com gás hélio e os zangões foram coletados no ar, utilizando-se uma armadilha aérea. Após a descrição destas ACZ, foram realizados estudos para verificar uma possível estruturação genética entre 7 amostras

coletadas em 5 ACZ no Rio Grande do Sul. Estas ACZ se encontravam próximas à apiários que possuíam colônias de origem carniça (*Apis mellifera carnica*) e africanizada e a estrutura genética entre estas amostras foi estudada através da análise de 9 locos enzimáticos (*EST-1*, *EST-1a*, *EST-2*, *EST-3*, *EST-5*, *PGM-1*, *HK-1*, *MDH*, *LAPD*). Dados de diferenciação genética de amostras coletadas em diferentes períodos da tarde em duas ACZ distintas e observação direta de horário de vôo dos machos, não mostraram nenhuma relação raça-horário. Este fato indica a ausência de uma barreira reprodutiva eficiente e a consequente hibridação entre populações européias e africanas durante o processo de africanização. Os resultados dos estudos ecológicos nas ACZ permitem concluir que os aspectos visuais constituídos por árvores, construções e relevo de uma área são importantes para a sua formação, enquanto fatores como nebulosidade e velocidade do vento são importantes para a presença de machos no interior das ACZ. O período de desenvolvimento ontogenético das abelhas africanizadas parece ser menor do que o das abelhas européias. Além disso, a produção de zangões e enxames também é superior nas colônias africanizadas. Esta maior taxa reprodutiva das abelhas africanizadas deve estar relacionada a sua maior adaptabilidade ao clima neotropical e consequentemente, ao seu domínio sobre as populações de abelhas européias nas Américas.

## VARIAÇÃO ALOENZIMÁTICA E SISTEMÁTICA DE UMA NOVA ESPÉCIE DE *CNEMIDOPHORUS* (REPTILIA, TEIIDAE) DE RONDÔNIA

**Lílian Gimenes Giugliano**

Orientadora: Profa.Dra. Eucleia Primo Betioli Contel  
Dissertação de Mestrado apresentada em 21/03/2003

O presente trabalho consiste na caracterização da variabilidade genética de uma nova espécie de *Cnemidophorus* encontrada em Rondônia e na elaboração de uma hipótese filogenética para *C. parecis* em relação a outras espécies sul-americanas. Foram analisadas as enzimas ACOH (EC 4.2.1.3), AK (EC 2.7.4.3), AAT (EC 2.6.1.1), CK (EC 2.7.3.2), ME (EC 1.1.1.40), FBP (EC 3.1.3.11), GTDH (EC 1.4.1.2), IDH (EC 1.1.1.42), LDH (EC 1.1.1.27), MDH (EC 1.1.1.37), MPI (EC 5.3.1.8), PK (EC 2.7.1.40) e SOD (EC 1.15.1.1) das espécies *Tupinambis merianae*, *Kentropyx altamazonica*, *Ameiva ameiva*, *C. ocellifer* e *C. parecis*.

Três índices de variabilidade genética foram estimados: número efetivo de alelos por loco (A), porcentagem de locos polimórficos (P) e heterozigose média (H). Estes valores mostraram uma menor variabilidade genética de *C. parecis* em relação às outras espécies estudadas, possivelmente relacionada à restrita distribuição geográfica dessa espécie em alguns enclaves de Cerrado nos arredores de Vilhena-RO.

Uma hipótese filogenética foi elaborada utilizando-se dados destas cinco espécies com os de *C. lemniscatus* e *C. gramivagus* obtidos na literatura e usando *Tupinambis merianae* como grupo externo. A partir desta análise concluímos que *C. parecis* é mais aparentado a *A. ameiva* do que com as outras espécies congênicas corroborando que o gênero *Cnemidophorus* é parafilético. Este trabalho também discute sobre a origem e evolução de *C. parecis*.

## DESENVOLVIMENTO DE UM VETOR PLASMIDIAL PARA A INTEGRAÇÃO DIRIGIDA NO LOCUS rDNA DE LEISHMANIA MAJOR

**Juliano Simões de Toledo**

Orientadora: Profa. Dra. Ângela Kaysel Cruz  
Dissertação de Mestrado apresentada em 24/03/2003

Foi demonstrado, previamente, através de ensaios de transfecção transitória, que a superexpressão do gene mini-exon de *Leishmania major*, envolvido no processo de “trans-splicing”, diminui nitidamente o padrão de virulência de linhagens originalmente virulentas em camundongos BALB/c “in vivo”. No entanto, quando camundongos BALB/c foram infectados com linhagens atenuadas superexpressoras de miniexon, notou-se que não havia desenvolvimento de lesão até cerca de 10 semanas após a infecção. Depois deste período, possivelmente devido à perda da molécula epissomal, a linhagem atenuada reverteu ao seu fenótipo virulento. O desenvolvimento de vetores, com características integrativas é necessário para o desenvolvimento de linhagens atenuadas superexpressando estavelmente o gene miniexon, que poderão tornar-se possíveis candidatos a vacinas vivas. O objetivo do presente estudo foi desenvolver um vetor ponte

(“shuttle vector”) que se integre, por recombinação homóloga, no locus do rDNA cujo promotor, reconhecido pela RNA polimerase I (*Pol I*), promove transcrição constitutiva em altos títulos. O vetor foi projetado para dirigir a integração do cassete de expressão para o espaçador ribossomal homólogo do rDNA de *Leishmania amazonensis*, região à montante do promotor do rDNA, e manter o transgene sob controle do promotor heterólogo do rDNA de *L. amazonensis*. Em ensaios de transfecção transitória, o rDNA de *L. amazonensis* mostrou-se mais ativo em hospedeiros heterólogos do que em homólogos, e induziu alta taxa de transcrição de genes sob seu controle. Além da região promotora, o vetor contém um sítio acceptor de “splicing” (para que o mRNA produzido possa ser processado adequadamente durante o processo de maturação), uma marca de seleção (necessária para selecionar os clones de interesse), e sequências flanqueadoras que apresentam cerca de 95% de homologia com os elementos repetitivos do espaçador intergênico ribossomal (para que ocorra a integração sítio-dirigida no locus rDNA por recombinação homóloga).

## REARRANJOS CROMOSSÔMICOS DETECTADOS POR PCR (GENES HÍBRIDOS TCR BETA/GAMA) EM LINFÓCITOS NORMAIS E EM LINHAGENS DE FIBROBLASTOS NORMAIS E AT (ATAXIA TELANGIECTASIA) IRRADIADOS *IN VITRO*

**Luciana Paula Grégio D'Arce**

Orientadora: Profa. Dra. Elza Tiemi Sakamoto Hojo  
Tese de Doutorado apresentada em 28/03/2003

A maturação das células-T depende de reações que aproximam os segmentos das regiões variável (TCRV) e junção-constante (TCRJ-C) no início do desenvolvimento de timócitos num processo conhecido como recombinação V(D)J, originando genes receptores de células-T ativos. Uma inversão no cromossomo 7 e uma recombinação ilegítima V(D)J entre o gene TCR $\beta$  (7q35) e o gene TCR $\gamma$  (7p14-15) levam à formação do gene híbrido TCR $\beta/\gamma$ , o qual pode ser encontrado em baixas frequências ( $1/10^5$  células) em linfócitos-T normais de indivíduos adultos. O processo de recombinação ilegítima V(D)J em neoplasias linfóides envolve o rearranjo nos *loci* de receptores de células-T e imunoglobulinas, sugerindo a correlação deste com eventos oncogênicos. O objetivo do presente estudo foi verificar o potencial da radiação ionizante na indução do gene híbrido TCR $\beta/\gamma$  em linfócitos do sangue periférico (culturas temporárias) e em linhagens de fibroblastos transformados pelo vírus SV-40 (AT-5BIVA e MRC-5) e linhagens primárias (AT-5BI e VH-16) antes e depois da irradiação- $\gamma$ . Amos-

tras de sangue foram coletadas de 12 indivíduos saudáveis e as culturas foram submetidas à irradiação com doses entre 0,4 a 3,2 Gy de raios- $\gamma$ , antes do estímulo mitogênico. O DNA foi extraído após 48 h, seguindo-se a "nested" PCR e hibridação dot-blot. Foi demonstrado que somente a dose mais elevada de 3,2 Gy induziu significativamente a formação de TCR $\beta/\gamma$ . Com base nos dados da literatura, este resultado é compatível com a hipótese de que há uma via comum no mecanismo envolvendo o reparo das DSBs induzidas pela radiação ionizante e a recombinação V(D)J ilegítima. Adicionalmente, experimentos realizados com as linhagens de fibroblastos mostraram que, embora as doses de 2 e 4 Gy de radiação não tenham induzido um aumento na formação de TCR $\beta/\gamma$ , ambas as linhagens transformadas exibiram uma frequência basal desse rearranjo, cujos fragmentos foram clonados e sequenciados. As seqüências obtidas para as células AT-5BIVA (ID: AY092758) e MRC-5 (ID: AY193884 e AY193885) confirmaram que os segmentos correspondem ao gene híbrido TCR $\beta/\gamma$ , mas o rearranjo não foi detectado nas células primárias (VH-16 e AT-5BI). Tais resultados indicaram que a presença do rearranjo deve ter sido consequência da instabilidade genômica causada pela transformação pelo SV-40.

## ESTUDO DO TRANSCRIPTOMA DE *APIS MELLIFERA* (HYMENOPTERA: APIDAE) NO DESENVOLVIMENTO ONTOGENÉTICO

**Francis de Moraes Franco Nunes**

Orientador: Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Jr.  
Dissertação de Mestrado apresentada em 17/04/2003

As abelhas são insetos sociais de relevante interesse biológico. *Apis mellifera* apresenta características peculiares que motivam investigação de sua biologia, especialmente sua genética. Apresentam excelente *fitness* reprodutivo, enorme potencial adaptativo, plasticidade fenotípica em estratégias de sobrevivência, capacidade de aprendizado e memória, eficiência na comunicação e formação de sociedades altamente organizadas, divididas castas, que as tornam organismos-chave para estudos de genética molecular. Embora essa abelha seja um dos organismos mais estudados em todo o mundo, devido ao seu curto ciclo de vida, fácil aquisição de amostras, relevância biológica e econômica, pouco se conhece sobre seu geno-

ma. O presente trabalho mostra o perfil de expressão gênica de *A. mellifera* a partir do seqüenciamento de bibliotecas obtidas pelo método ORESTES (*Open Reading frame Expressed Sequence Tags*), dos estágios de desenvolvimento ontogenético, além de validar a expressão de genes associados à fase de pupa. Descreve, ainda, os 25 genes mais expressos em cada estágio. Foram geradas 11296 ORESTES, das quais 4870 foram validades *in silico*, de acordo com parâmetros estridentes de análise por bioinformática. Dessas, 1327 foram categorizadas como *ApisESTs*, 1007 *Orthologs* e 2536 *No matches*. Apesar dos dados de *No matches* representarem 22,45% do total de seqüências, pode-se estimar que cerca de 80% dos dados apresentados são seqüências ainda desconhecidas, pois os dados de *A. mellifera* encontrados nos bancos públicos de dados, não possuem anotação bem definida. Após clusterização foi encontrada redundân-

cia média de 30%. Análises de expressão gênica identificaram 10 genes com padrão diferencial durante a fase de pupa, dois dos quais, os ortólogos de ácido farnesóico metil transferase e proteína ligante de APP, parecem estar sob controle dos níveis do hormônio 20-hidroxiecdisona. Outros 7 genes mostraram alta expressão durante todo o desenvolvimento de pupa: *sparc*, *IDGF like protein*, *chickadee*, *eukaryotic initiation factor 4E binding*, *SgAbd-1*, *replication*

*licensing factor MCM5*, *heat shock protein hsp20.8A*. Esses dados, procuram elucidar eventos moleculares que ocorrem no desenvolvimento de *Apis mellifera* e que, também, podem ser base para estudos em Hymenoptera. A comparação dos dados aqui gerados com outros já descritos, aliados a resultados experimentais, abrem perspectivas para elucidação de questões biológicas complexas, estudos de evolução molecular e filogenia dos eucariotos.

### ESTUDO DA ESTRUTURA GENÉTICA DE *Pimelodus* (Pisces-Siluriformes) ATRAVÉS DO USO DE RAPD E DNAr 5S COM ÊNFASE NA BACIA DO RIO PARANÁ

**Fernanda Simões de Almeida**

Orientadora: Profa.Dra. Eucleia Primo Betioli Contel  
Tese de Doutorado apresentada em 22/04/03

A família Pimelodidae, à qual o gênero *Pimelodus* pertence, apresenta grande importância econômica por ser utilizada como fonte alimentar. A sistemática desta família tem sido objetivo de vários estudos com a finalidade de revisá-la para uma melhor compreensão de sua classificação. Deste modo, foram utilizados os marcadores de RAPD e DNAr 5S para estudar a estrutura genética de espécies do gênero *Pimelodus* em cinco rios diferentes da bacia do rio Paraná e realizar análises comparativas incluindo as bacias do Paraguai, Uruguai e Paraíba do Sul.

A espécie *P. maculatus* foi analisada em 4 rios da bacia do Paraná (Tietê, Tibagi, Paraná e Paranapanema); a população do rio Paraná foi a que apresentou a menor variabilidade genética e a população do rio Tibagi a maior. Todas as populações se encontraram estruturadas pelo teste theta. O dendrograma evidencia esta tendência de agrupamento entre os indivíduos de cada uma das subpopulações. As espécies *P. heraldoi* do rio Tibagi e *P. ortmanni* e *Pimelodus* sp do rio Iguaçu apresentaram níveis de polimorfismo semelhantes aos obtidos para *P. maculatus*. Destas três espécies apenas *P. heraldoi* não apresentou indicativos de estruturação genética. *Pimelodus* sp apresentou uma tendência a estruturação genética observada nas análises genéticas e também no agrupamento entre os indivíduos obtido no dendrograma. *P. ornatus*

do rio Paraná foi a espécie com a menor variabilidade genética o que pode ser devido a esta espécie ter sido encontrada apenas no alto Paraná.

Nas análises comparativas foi observado que no Alto Paraná ocorre a presença de dois padrões eletroforéticos de RAPD nos indivíduos de *P. maculatus* e que estes indivíduos devem pertencer a espécies distintas. A análise comparativa entre *P. absconditus* (Miranda) e *P. heraldoi* (Tibagi) indica uma grande identidade genética entre elas, embora os dados confirmem se tratarem de espécies distintas. A análise comparativa entre *P. maculatus* de diferentes bacias mostrou que apenas a população do rio Miranda (bacia do rio Paraguai) é geneticamente diferente das demais, podendo ser um indicativo desta pertencer a uma outra espécie. Na comparação entre espécies do rio Miranda (*P. maculatus*, *P. argenteus* e *Pimelodus* sp1) e do alto Paraná (*P. maculatus* de Porto Primavera e Jupiá) observou-se uma grande semelhança entre *P. maculatus* de Porto Primavera com *Pimelodus* sp1 do rio Miranda tanto na análise genética como na análise morfométrica, podendo ser um indicativo para concluir que estes indivíduos pertencem a mesma espécie. Na análise comparativa do gênero *Pimelodus* foi observada uma grande similaridade entre *P. maculatus* e *P. platicirris* indicando que estes dois nomes de espécies são sinônimos; também foi observado que *P. ornatus* fica separada das demais espécies no dendrograma e nas análises genéticas o que pode ser uma evidência de que esta espécie pode pertencer a outro gênero.

### ESTUDOS DE CITOGENÉTICA SOMÁTICA E GENÉTICA MOLECULAR DOS GENES AZF NA ESTERILIDADE MASCULINA HUMANA

**Rafael Bisinella**

Orientador: Prof.Dr. João Monteiro de Pina Neto  
Dissertação de Mestrado apresentada em 21/05/03

Este trabalho teve como objetivos investigar a frequência de anormalidades cromossômicas somáticas (numéricas e estruturais) e de microdeleções dos genes

AZF em pacientes estéreis com alterações no espermatograma.

Foram estudados 100 homens estéreis que apresentavam azoospermia, oligospermia (número de espermatozoides abaixo de  $20 \times 10^6/\text{mL}$ ) e/ou alterações na motilidade dos espermatozoides. A análise do cariótipo somático destes pacientes foi realizada através de cultura temporária de linfócitos onde se analisaram um número de 100 metáfases por paciente, visando à detecção de mosaicismos cromossômicos.

Para a análise das microdeleções na região Yq11 foi utilizada a técnica de PCR multiplex, utilizando-se 28 STSs (*Sequence Tagged Sites*) específicos para os intervalos 5 e 6 da região Yq11.

Foram encontradas anormalidades cromossômicas somáticas em 11% (11/100) da amostra pesquisada. A anomalia cromossômica mais freqüente foi a aneuploidia 47,XXY (6%) em 6 pacientes; sendo que um destes pacientes apresentava o mosaico [46,XY(94%

/ 47XXY(6%)]. Foram também detectadas duas translocações Robertsonianas; uma com o cariótipo [45,XY,rob(14q;21q)], e outro paciente em mosaico [46,XY(18%) / 45,XY,rob(13q;14q)(82%)] e um homem portador de cariótipo 46,XX. Foi também encontrado um paciente com uma deleção no cromossomo Y [46,X,del(Y)] e um paciente com 45,X(11%) / 45,X,+frag(89%), ambos apresentando microdeleções nos genes AZF, sendo o primeiro com uma e o outro com 13 STSs deletadas das 28 estudadas.

Microdeleções em Yq11 foram encontradas em 9% (9/100) da amostra estudada. Estas microdeleções estavam presentes em todas as regiões AZF (a, b e c), sendo o lócus AZFc o mais freqüentemente alterado (58% das microdeleções).

Este trabalho deixa claro a importância do uso destas técnicas na avaliação de homens estéreis antes de serem submetidos à técnicas de reprodução assistida.

## PROFENOLOXIDASE DE *APIS MELLIFERA*: CLONAGEM PARCIAL, CARACTERIZAÇÃO E EXPRESSÃO NAS CASTAS E SEXOS

**Anete Pedro Lourenço**

Orientadora: Profa.Dra. Zilá Luz Paulino Simões  
Dissertação de Mestrado apresentada em 26/05/03

Em insetos, a fenoloxidase (PO) desempenha importantes funções como participação na pigmentação e esclerotização, e ainda na cicatrização de ferimentos e resposta imune. Essa enzima é encontrada na hemolinfa, como também na cutícula, na forma de um precursor, a profenoloxidase (proPO). Apesar de ter sido estudada em inúmeros insetos, suas diferentes propriedades, expressão diferencial nos sexos e castas e idades, ou em relação à modulação hormonal durante o desenvolvimento, estão ainda por serem investigadas em *Apis mellifera*. A isolamento do cDNA da proPO de *A. mellifera* permitiu a caracterização e o seqüenciamento do mRNA e o estudo da expressão desse gene durante o desenvolvimento. Utilizando-se um *primer* reverso degenerado, desenhado próximo à extremidade 3' foi sintetizada a primeira cadeia de cDNA por RT, a partir de RNA poli (A)+ de hemócitos de pupas Pbd (pupa de olho escuro com cutícula fortemente pigmentada), fase em que a enzima tem maior expressão. Com esse cDNA, foi realizada uma PCR com os *primers* degenerados reverso (PPO-R) e o direto (PPO-F), resultando um fragmento de cer-

ca de 1,3 kb que foi, posteriormente, clonado e seqüenciado. Os trechos seqüenciados foram analisados pelos programas Phred/Phrap/Consed, que constituíram um consenso de 1.319 nucleotídeos. Quando o fragmento foi analisado pelo programa BLAST-P, verificou-se a existência de uma grande similaridade com as *ProPOs* de outros insetos, como por exemplo com a de *Sarcophaga bullata*, cuja identidade foi de 65%. A análise por *Neighbor joining* mostrou inclusive a proximidade desse trecho com as *POs* de um outro *Hymenoptera*, *Pimpla hypochondriaca*. Análises posteriores dessa seqüência revelaram a presença de quatro domínios bastante conservados, entre eles os sítios de ligação ao cobre CuA e CuB, característicos da proPO de artrópodos. Por digestão com enzima específica, obtiveram-se dois fragmentos, de 400 e 900 pb, que foram usados como sondas nos experimentos de *Northern* e *Southern blot*. Primeiramente, as sondas foram usadas para detectar o mRNA da proPO com o uso de *Northern blot*. Neste caso somente um transcrito foi identificado, com peso aproximado de 4,7 kb. Utilizando-se RT-PCR semiquantitativa para estudo de expressão diferencial nos sexos e nas castas, foi observado maior número de transcritos em operárias, seguido de rainhas e zangões. A expressão de *AmProPO* durante o

desenvolvimento nas fases larvais, pupais e adultos até 15 dias, também foi analisada. Nesse caso, maior quantidade de transcritos foi observado em larvas e adultos. A menor quantidade de transcritos foi detectada em pupas, com exceção de Pbd. Pode-se observar ainda uma provável transcrição do gene para proPO em tegumento do tórax, ovário de rainha e cabeça de pupa. A análise por *Southern blot* demons-

trou a existência de apenas um gene para proPO. A partir desses resultados pode-se concluir que o fragmento de 1,3 kb corresponde realmente ao cDNA para proPO de *A. mellifera*, o que permitiu a verificação de expressão desse gene nos sexos e castas dessas abelhas, ao longo do desenvolvimento ontogenético, abrindo novas possibilidades para investigação de novas funções para essa enzima.

## EXPRESSÃO DO GENE CTCF EM EMBRIÕES NO PERÍODO PRÉ-IMPLANTAÇÃO E NA MATURAÇÃO DOS OÓCITOS EM BOVINOS

**Álvaro Fabrício Lopes Rios**

Orientadora: Profa.Dra. Éster Silveira Ramos

Dissertação de Mestrado apresentada em 06/06/03

Durante os últimos anos, apesar dos avanços nas tecnologias de reprodução assistida, o pleno êxito destas técnicas ainda encontra-se comprometido por anomalias decorrentes da produção *in vitro*. Muitas das falhas no desenvolvimento de embriões têm sido atribuídas a alterações epigenéticas, em especial a modificações no padrão de metilação normal em várias partes do genoma. Metilação em dinucleotídeos CpG está relacionada a genes que são regulados pelo processo de marcação (*imprinting*) genômico e cuja perturbação é mostrada em vários de tumores e em alterações em níveis de expressão de vários genes durante o desenvolvimento embrionário em mamíferos. Acredita-se que alterações na expressão de genes marcados possam ocorrer por perda dos padrões de metilação normal em regiões controladoras de *imprinting* (ICRs) e por alterações em genes responsáveis pelo estabelecimento, manutenção e leitura dos loci submetidos a esse tipo de regulação. Várias modificações na expressão desses genes foram demonstradas como sendo induzidas por componentes do meio de cultura,

a qual a exposição é uma característica comum para todas as técnicas de reprodução *in vitro*. Vários genes marcados estão relacionados ao desenvolvimento embrionário, entre eles destacam-se os genes IGF2 e H19 os quais demonstraram-se padrões de expressão alterados em vários de tipos de tumores e na Síndrome de Beckwith-Wiedemann em humanos. Dois importantes genes envolvidos no processo de regulação de loci marcados estão sendo estudados por grupos de pesquisa em todo o mundo, mas nenhuma dessas pesquisas enfoca o papel dos mesmos no desenvolvimento embrionário. São eles CTCF e o recentemente isolado BORIS, os quais vários pesquisadores com base em várias características dos seus produtos e no padrão de expressão mutuamente exclusivo durante a espermatogênese, serem fortes candidatos a genes responsáveis ou parcialmente envolvidos na reprogramação das marcas diferenciais de metilação envolvidas no estabelecimento do *imprinting* genômico. O estudo desses genes e sua suscetibilidade de sua expressão a perturbações induzidas por fatores ambientais, como componentes de diversos meios, tornam-se de fundamental importância para novos avanços nas áreas de reprodução assistida e dos demais processo que envolvam exposição de linhagens celulares a meios de cultura.

## DESCRIÇÃO E ANÁLISE DE LOCI DE MICROSSATÉLITES EM POPULAÇÕES NATURAIS DA ESPÉCIE *CACTOFÍLICA DROSOPHILA ANTONIETAR* (DÍPTERA, DROSOPHILIDAE)

**Luciana Paes de Barros Machado**

Orientadora: Profa.Dra. Maura Helana Manfrin

Tese de Doutorado apresentada em 11/06/03

As espécies de *Drosophila* (*Diptera*; *Drosophilidae*) que compõem o *cluster buzzatii* do grupo *repleta* são cactofílicas, endêmicas da América do Sul e são sempre encontradas em áreas de ocorrência de

cactos hospedeiros, onde utilizam cladódios em decomposição como sítios de oviposição. Diferentes marcadores genéticos mostraram que as espécies deste *cluster* constituem um sistema biológico interessante para estudos evolutivos devido à presença de polimorfismos, politipia, especificidade ecológica e níveis variáveis de diferenciação interpopulacional. A espécie *Drosophila antonietae*, pertencente ao *cluster buzzatii*, é encon-

trada nos vales dos rios das regiões sul e sudeste do Brasil e ao norte da borda leste do chaco argentino, geralmente associada ao cacto *Cereus hildmannianus*. Esta espécie de *Drosophila* possui tipo morfológico D de edeago, inversão fixa  $2x^7$ , e tipo metafásico V.

No presente trabalho foram descritos 23 *loci* de microssatélites para a espécie *Drosophila antonietae*. Estes são marcadores codominantes, altamente polimórficos, considerados seletivamente neutros e que permitem o estudo da dinâmica de populações naturais e a inferência de eventos evolutivos que possam estar ocorrendo nestas populações. Os *loci* de microssatélites foram isolados do genoma de *D. antonietae* a partir de digestão do DNA com enzimas de restrição, clonagem e posterior sequenciamento. Entre os 23 *loci* descritos, 7 *loci* polimórficos foram analisados em 361 indivíduos de 12 populações. O sequenciamento dos alelos encontrados mostrou homoplasia de tamanho em mais de 50% dos *loci*. Do total de alelos, cerca de 15% apresentaram homoplasia de tamanho, e estas ocorreram com frequências muito semelhantes dentro e entre populações.

A análise interpopulacional, realizada no presente trabalho, mostrou alta deficiência de heterozigotos ( $Fis = 0,4123$ ) e diferenciação genética moderada entre as populações ( $Fst = 0,0730$ ). Não foi detectada estruturação entre populações do alto e da porção baixa da bacia dos rios Paraná-Uruguaí ( $Fst_{pop} = -0,0070$ ), ao contrário do que foi observado por outros autores para a análise de DNA mitocondrial. A diferenciação genética detectada através do DNA mitocondrial é possivelmente reflexo de eventos vicariantes passados, e a homogeneidade interpopulacional encontrada com marcadores microssatélites poderia ser explicada através de altas taxas de mutação recorrente ou manutenção de polimorfismo ancestral, com a influência do ta-

manho efetivo populacional, seleção natural e/ou fluxo gênico.

Mutações recorrentes teriam como um dos resultados a geração de alelos raros, o que não foi observado no presente trabalho. Outro fato que não corrobora com esta hipótese é a baixa probabilidade das mutações recorrentes manterem frequências alélicas similares em diferentes populações, considerando *loci* com muitos alelos.

Os eventos vicariantes que separaram as populações de *Drosophila antonietae* podem ser resultado de retrações das áreas xerofíticas que ocorreram durante os ciclos paleoclimáticos do Terciário e Quaternário. A cada retração, as populações remanescentes podem ter mantido o polimorfismo da população ancestral através de três fatores não excludentes: 1) por apresentarem tamanho efetivo populacional grande, diminuindo a ação da deriva genética; 2) os marcadores microssatélites estariam sofrendo um efeito “carona” de seleção natural em outros sistemas genéticos, com a provável exceção de isoenzimas, uma vez que, no presente trabalho, não foi encontrada correlação entre os *loci* de microssatélites e 13 *loci* isoenzimáticos, e; 3) o efeito homogeneizador do fluxo gênico entre populações. Teste de Mantel foi realizado neste trabalho e demonstrou que há correlação entre posicionamento geográfico e diferenciação genética, possibilitando a análise de equilíbrio regional. A confirmação desta correlação possibilitou determinar o número efetivo de migrantes ( $Nm = 3,1746$ ). Este valor indica que o fator evolutivo homogeneizador das frequências gênicas pode ser o fluxo gênico. A distribuição das cactáceas ao longo dos vales dos rios da bacia Paraná-Uruguaí formam corredores por onde pode estar ocorrendo fluxo gênico entre as populações de *Drosophila antonietae*.

## PESQUISA DE ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS, DISSOMIA UNIPARENTAL E DO PADRÃO DE METILAÇÃO NA SÍNDROME DE BECKWITH-WIEDEMANN E NA HEMIHIPERPLASIA ISOLADA

**Marcus Vinícius de Matos Gomes**

Orientadora: Profa. Dra. Ester Silveira Ramos

Dissertação de Mestrado apresentada em 12/06/2003

A Síndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW) é uma patologia congênita relacionada ao crescimento, caracterizada por sua etiologia complexa e heterogênea envolvendo alterações do imprinting genômico na região cromossômica 11p15.5. A Hemihiperplasia

Isolada (HHI) não possui causa conhecida e pode representar, na verdade, uma expressão parcial ou incompleta da SBW, pois com essa compartilha predisposição aos mesmos tipos de neoplasias. Este trabalho objetivou a pesquisa da presença de rearranjos cromossômicos, dissomia uniparental paterna (DUP) e alterações do padrão de metilação na região controladora do imprinting H19DMR, em 12 pacientes com SBW e HHI, através de técnicas de análise citogenética e de biologia molecular (PCR). Para a pesquisa de

DUP e de alterações na H19DMR, foram utilizados marcadores polimórficos no DNA como RFLPs e microssatélites. Nenhum paciente apresentou alteração cromossômica, o que coincide com os dados da literatura que revelam uma baixa incidência deste tipo de alteração. A DUP foi excluída em 10 pacientes, os quais apresentaram herança bialélica de 11p15.5. A pesquisa do padrão de metilação na região H19DMR revelou que 8 pacientes apresentaram metilação normal nesta região, indicando que as características clí-

nicas podem ter sido causadas por alterações moleculares em outra região controladora do imprinting, independente da H19DMR. A ausência de neoplasias nos pacientes analisados pode estar relacionada à presença do padrão normal de metilação da H19DMR. O conhecimento dos mecanismos etiológicos e a utilização de um protocolo laboratorial de detecção das alterações nessas patologias são imprescindíveis para seguimento clínico e aconselhamento genético mais adequados.

### DINÂMICA EVOLUTIVA DE DNAs SATÉLITES EM POPULAÇÕES E ESPÉCIES DE *DROSOPHILA* DO CLUSTER BUZZATTI

**Gustavo Campos e Silva Kihn**

Orientador: Prof.Dr. Fábio de Melo Sene

Tese de Doutorado apresentada em 12/06/03

Uma porção considerável do genoma de eucariotos é composta por seqüências de DNA satélite (DNAsat). Trata-se de uma classe de DNA altamente repetitivo que consiste de milhares de cópias que se repetem em tandem, formando extensas cadeias homogêneas em regiões heterocromáticas dos cromossomos. No presente trabalho, seqüências de DNA satélite foram analisadas em populações e espécies de *Drosophila* do *cluster buzzatii*.

Através dos métodos de digestão do DNA genômico e PCR, foram isoladas várias seqüências de uma família de DNAsat comum às 7 espécies do *cluster buzzatii*: *D. buzzatii*, *D. koepferae*, *D. serido*, *D. antonietae*, *D. gouveai*, *D. seriema* e *D. borborema*. Como estas seqüências possuem similaridades nucleotídicas significativas com o DNAsat pBuM189 de *D. buzzatii* (previamente descrito), esta família foi denominada de pBuM.

De acordo com a estrutura primária e o tamanho das unidades de repetição, a família pBuM pode ser dividida em duas subfamílias. A subfamília pBuM-1 possui unidades de repetição de aproximadamente 190 pb. A subfamília pBuM-2 possui unidades de repetição que contêm, além da seqüência de 190 pb presente na subfamília pBuM-1, uma inserção de 180 pb, resultando em uma unidade de repetição de aproximadamente 370 pb. Não existem similaridades nucleotídicas significativas entre as seqüências de 190 pb e a inserção de 180 pb. Experimentos de hibridação mostraram que cópias pBuM-1 e pBuM-2 estão organiza-

das em cadeias separadas, provavelmente em cromossomos não-homólogos.

Apesar da família de DNA satélite pBuM possuir várias características em comum com DNAsat descritos em outras espécies de insetos, nenhuma seqüência pBuM-homóloga foi encontrada após uma busca no *GeneBank*.

Seqüências da subfamília pBuM-1 encontram-se presentes em um grande número de cópias em *D. buzzatii*, *D. serido* e *D. antonietae*, mas em um reduzido número de cópias em *D. borborema* e *D. koepferae*. Seqüências da subfamília pBuM-2 encontram-se presentes em um grande número de cópias em *D. serido*, *D. antonietae*, *D. gouveai* e *D. seriema*, mas em um pequeno número de cópias em *D. buzzatii*, *D. koepferae* e *D. borborema*.

Todas as seqüências pBuM obtidas por digestão do DNA exibiram, após eletroforese, um padrão de migração mais lento que o esperado pelo tamanho real das seqüências. Foi especulado que esta diferença entre tamanho aparente e real das seqüências pode ser consequência de curvatura do DNA, fenômeno que já foi observado em outros DNAsat satélites previamente descritos.

Todas as seqüências obtidas da família pBuM possuem elevados níveis de similaridade nucleotídica intra-específica. Além disso, a presença das mesmas substituições em vários ou em todos os clones de uma mesma espécie sugere que evolução combinada ocorreu várias vezes na família pBuM ao longo de sua evolução. A grande variabilidade intra e inter-específica existente no número de cópias das subfamílias pBuM-1 e pBuM-2 deve ter sido resultado de ciclos repetidos de *crossing-over* desigual entre cópias pBuM.

Baseado em uma combinação de dados provenientes das seqüências de nucleotídeos, distâncias genéticas e padrões de ramificações obtidos em dendogramas, seqüências da família pBuM foram divididas em várias classes. A presença de seqüências das mesmas classes no genoma de diferentes espécies indica que grande parte das variantes pBuM surgiram anteriormente aos eventos de especiação que deram origem à maioria das espécies do *cluster buzzatii*. Foi proposto que o *crossing-over* desigual foi o principal mecanismo responsável pela fixação (homogeneização) de diferentes variantes da família pBuM no genoma das espécies do *cluster*. Aparentemente, este processo de homogeneização foi mais eficaz em espécies que atualmente possuem um grande número de seqüências pBuM no genoma.

Distâncias genéticas foram calculadas separadamente entre as seqüências das subfamílias pBuM-1 e pBuM-2 e dendogramas foram construídos. Uma árvore consenso derivada de todos os dendogramas obtidos divide as espécies do *cluster buzzatii* em 3 ramificações principais: A primeira contém *D. buzzatii*, a segunda contém *D. antonietae* e a terceira contém as espécies *D. serido*, *D. gouveai*, *D. borborrema*, *D. seriema* e *D. koepferae*. A topologia desta árvore foi comparada com a topologia de árvores filogenéticas obtidas por outros marcadores.

Foi elaborada uma hipótese de evolução da família de DNAsat pBuM, que considera que a espécie ancestral do *cluster buzzatii* possuía em seu genoma apenas monômeros pBuM de 190 pb. De acordo com esta hipótese, a subfamília pBuM-2 surgiu após a separação das linhagens que deram origem à *D. buzzatii* (linhagem I) e às demais espécies do *cluster* (linhagem II). Foi proposto que o surgimento da subfamília pBuM-2 foi possível devido a uma distribuição multicromossômica de cópias pBuM-1 no genoma da linhagem II. A presença de cópias pBuM-2 no genoma de *D. buzzatii* foi considerada como resultado de introgressão, possivelmente envolvendo populações ancestrais de *D. koepferae*.

Com base em informações disponíveis e nos da-

dos apresentados no presente trabalho, foi proposta uma hipótese para a origem e evolução do *cluster buzzatii* na América do Sul. De acordo com esta hipótese, a região sul da América do Sul foi o centro de irradiação do *cluster buzzatii*.

A dinâmica evolutiva inter-populacional de seqüências pBuM também foi investigada. Seqüências pBuM189 (subfamília pBuM-1) de *D. buzzatii* foram analisadas em 14 populações (9 brasileiras e 5 argentinas) que cobrem grande parte da área de distribuição desta espécie na América do Sul. Os dados indicam um alto grau de conservação das seqüências pBuM189 entre todas as populações de *D. buzzatii* analisadas. Os resultados foram interpretados com base em dados provenientes de outros marcadores. Foi proposto que o alto grau de similaridade inter-populacional entre seqüências pBuM189 foi consequência da colonização recente (~100.000 anos) de *D. buzzatii* no Brasil e de fluxo gênico em grande parte da distribuição da espécie.

Seqüências pSma349 (subfamília pBuM-2) também foram analisadas em 5 populações de *D. seriema* da Cadeia do Espinhaço, entre os estados de Minas Gerais e Bahia. Os dados mostraram que seqüências pSma349 encontram-se altamente conservadas entre todas as populações analisadas. Este resultado é congruente com dados de inversões cromossômicas que sugerem que *D. seriema* seja uma linhagem evolutiva praticamente monomórfica.

Finalmente, foi isolado e caracterizado um DNAsat abundante no genoma de *D. koepferae*, denominado de pKoe150. Trata-se de um DNAsat com unidades de repetição de aproximadamente 150 bp. Uma busca por seqüências homólogas ao DNAsat pKoe150 não revelou nenhuma similaridade nucleotídica significativa com seqüências de DNA presentes no banco de dados *GeneBank*. Também não foi possível alinhar as seqüências dos clones pKoe150 com as cópias da família pBuM descritas no presente trabalho. Portanto, os dados indicam que o DNAsat pKoe150 surgiu por evolução saltatória e não por uma divergência gradual de seqüências da família pBuM no genoma de *D. koepferae*.

## ESTUDOS MOLECULARES EM TUMORES CEREBRAIS HUMANOS

**Nilson Praia Anselmo**

Orientador: Profa.Dra. Cacilda Casartelli

Tese de Doutorado apresentada em 13/06/2003

As causas das neoplasias são muito amplas e diversas e incluem a exposição a fatores externos ou ambientais, como também sucessivos eventos genéti-

cos e/ou epigenéticos. Sabe-se que três tipos de genes estão associados com a formação de tumores, os oncogenes, os genes reparadores de DNA e os genes supressores de tumor. Dentre os supressores de tumor, o gene *TP53* é um dos mais estudados, possuindo uma organização genômica altamente conservada; ele codifica uma fosfoproteína nuclear, cuja inativação ou perda é um evento comum na iniciação e progressão de diversos tipos de neoplasias humanas. Foram identificados outros membros da família da proteína p53; um dos membros é a p73, que não só contém um alto grau de semelhança com a p53 em sua seqüência primária, mas também parece desempenhar funções semelhantes e já foi identificado e demonstrado seu potencial como um supressor de tumor. A epigenética adquiriu um papel importante nas pesquisas, tanto biológicas quanto no estudo de tumores, pois sabe-se que ela afeta a biologia do câncer. A metilação aberrante das ilhas CpG localizadas nas regiões promotoras representa um dos mais importantes mecanismos epigenéticos para a inativação de genes relacionados ao câncer em células tumorais. Os objetivos deste trabalho foram: fazer uma triagem de alterações conformacionais na região de “hot spots” do gene *TP53*, bem como em 10 dos 14 éxons do *TP73* e fazer o seqüenciamento dos casos que apresentaram alterações pela análise do PCR–SSCP e investigar o estado de metilação das regiões promotoras de sete genes pelo método da PCR–metilação específica (MSP) em 55 tumores cerebrais, consistindo de 26 tumores neuroepiteliais (8 astrocitomas, 10 glioblastomas, 1 neuroblastoma, 2 ependimomas e 5 oligodendrogliomas), 6 tumores de nervo periférico (schwannomas), 13 tumores das meninges (meningiomas), e outros 10 tumores cerebrais metastáticos, coletados em dois hospitais da cidade de Ribeirão Preto. Pela técnica da PCR, os éxons 4-10 do *TP53* e os éxons 3-11 e 13 do *TP73* foram amplificados e posteriormente analisados através da SSCP (*Single Strand Conformational Polymorphism*), utilizando-se corrida eletroforética em gel não desnaturante de poliacrilamida com ou sem 10% de glicerol. As únicas alterações encontradas ocorreram no mesmo tumor, um astrocitoma anaplásico de alto grau (9401/3). As alterações foram uma deleção da trinca AAG na posição 595-597 de *TP53* (éxon 6), resultando na deleção do aminoácido Glu 199 na proteína e um polimorfismo genômico em *TP73*, identificado como uma alteração A para G, na posição E8/+15 do íntron 8 (IVS8-

15A>G). Observamos um estado de metilação aberrante em pelo menos um dos sete genes estudados em uma taxa de 83,6% (46 of 55) dos casos. As frequências de metilação aberrante foram: 40% para *p14<sup>ARF</sup>*, 38,2% para *MGMT*, 30,9% para *p16<sup>INK4a</sup>*, 14,6% para *TP73* e para *TIMP-3*, 12,7% para *DAPK* e 1,8% para *RBI*. Estes dados sugerem que a hipermetilação observada nos genes *p14<sup>ARF</sup>*, *MGMT* e *p16<sup>INK4a</sup>* é um evento muito importante na formação ou progressão de tumores cerebrais, uma vez que a inativação destes genes interfere diretamente com o bom funcionamento de ciclo celular. A taxa de metilação dos demais genes estudados se encontra dentro da média descrita na literatura, com exceção do *RBI*, cuja baixa taxa de metilação encontrada em nossos tumores discorda de muitos dos dados da literatura, sugerindo que talvez a metilação da região promotora não seja o principal evento na inativação deste gene. A aparente falta de alterações de *TP53* e *TP73* observada nas nossas amostras não significa que estes genes não estejam inativos ou envolvidos na tumorigênese, pois nossos resultados estão de acordo com a grande variabilidade das taxas de mutação encontradas em tumores do Sistema Nervoso Humano (SNH) relatadas na literatura para estes genes. Ou seja, a aparente falta de alterações aqui observada pode significar que outros mecanismos, como, por exemplo, eventos epigenéticos ou mesmo mutações fora das regiões aqui estudadas, podem estar agindo na inativação destes genes, uma vez que se sabe que a inativação destes genes, principalmente do *TP53*, geralmente está associada com o processo de formação e proliferação tumoral em vários tipos de câncer. Nossos resultados também concordam com a literatura, que sugere a hipermetilação das regiões promotoras é um evento muito comum em tumores cerebrais. Vale ressaltar que os processos de inativação gênica através da metilação não ocorrem única e exclusivamente em um único gene, mas podem ocorrer simultaneamente em um número grande de genes localizados muitas vezes em cromossomos diferentes, assim podemos concluir que a frequência de metilação varia de acordo com o gene e/ou com o tipo de tumor estudado. Este tipo de estudo se mostrou muito importante, pois as análises de metilação de diferentes genes e a determinação da frequência com que este evento ocorre pode nos dar a oportunidade de uma melhor compreensão do processo de inativação gênica nos tumores cerebrais.

## IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

### AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE UM LIGANTE DE INTERFERON-GAMA EM *TOXOPLASMA GONDII*

**Leandro Licursi de Oliveira**

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Mineo

Dissertação de Mestrado apresentada em 16/04/2003

*Toxoplasma gondii* é um protozoário intracelular obrigatório, causador da toxoplasmose em diferentes espécies animais, inclusive o homem. Os casos de doença são raros, porém importantes em gestantes e indivíduos imunodeprimidos, pois, nesses casos o parasita torna-se altamente virulento, podendo causar a morte ou danos irreparáveis.

Um dos pontos críticos da toxoplasmose refere-se à indução de resposta imune pelo hospedeiro. O IFN- $\gamma$  é considerado o elemento central da resposta imune ao *T. gondii*, e cabe a ele controlar a replicação de taquizoítas no curso da toxoplasmose. O IFN- $\gamma$  participa de vários eventos da resposta imune de mamíferos contra o *T. gondii*, porém sua participação é indireta, existindo poucos relatos de uma ação direta do IFN- $\gamma$  sobre o parasita.

Neste trabalho, avaliamos a expressão de um ligante de IFN- $\gamma$  em *T. gondii*. Para tanto sincronizamos taquizoítas com a intenção de investigar a expressão diferencial de antígenos durante as fases do ciclo celular. Utilizamos a hidroxiuréia como agente

sincronizador, obtendo desta maneira populações sincronizadas. Demonstramos que os parasitas apresentam nítidas mudanças nos perfis de distribuição quanto a fase do ciclo celular. Após esses experimentos constatamos uma diferença entre taquizoítas oriundos de animais infectados e de cultura de células. Ensaios de marcação com IFN- $\gamma$  e anticorpo anti-IFN- $\gamma$  foram realizados, sendo possível constatar a presença de um ligante de IFN- $\gamma$  na superfície de taquizoítas de *T. gondii*, porém quando esses são recuperados de ascite de animais infectados, se apresentam recobertos pela citocina IFN- $\gamma$  endógena. A caracterização do ligante procedeu-se por análise eletroforética e *Western blotting*, resultando na obtenção de duas bandas em condições desnaturantes e uma única banda em condições redutoras, bandas essas que estão atualmente sendo seqüenciadas.

A identificação de um ligante na superfície do parasita abre novas perspectivas para entender os mecanismos pelos quais o IFN- $\gamma$  pode interagir de forma direta com *T. gondii*. Dessa maneira, nossos resultados nos encorajam a investir novos esforços no sentido de se investigar a função do ligante e a ação direta do IFN- $\gamma$ , enfoque este que tem sido pouco explorado até o momento.

### SENESCÊNCIA DE ERITRÓCITOS NA ANEMIA FALCIFORME E NO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

**Patrícia de Fátima Florêncio Henschel**

Orientador: Prof. Dr. Eduardo A. Donadi

Dissertação de Mestrado apresentada em 16/04/2003

A fagocitose de eritrócitos pode ser mediada por mecanismos imunes (IgG e complemento) e não imunes, como aqueles relacionados com a perda da assimetria fosfolipídica, com exposição de fosfatidilserina (FS), perda de receptores de superfície (CD71) e de proteínas regulatórias do complemento (CD55 e CD59) por vesiculação da membrana plasmática. Em algumas patologias o tempo de sobrevivência dos eritrócitos da circulação está reduzido em consequência de fatores intrínsecos como na Anemia Falciforme (AF) ou extrínsecos, como no Lúpus Eritematoso Sistêmico

(LES). Neste estudo, avaliamos a senescência espontânea (estocagem por 35 dias) ou induzida (tratamento com cálcio ou calor) de eritrócitos de 20 pacientes com AF (10 tratados com hidroxiuréia- HU e 10 não tratados) e de 20 pacientes com LES (10 com anticorpos anti-eritrocitários- AH e 10 sem anticorpos) e ainda, 20 indivíduos normais como controle. A senescência de hemácias foi avaliada pela expressão das moléculas CD55, CD59, CD71 e FS, pelo método de citometria de fluxo. As comparações intragrupos (efeito do tratamento de senescência) pelo teste de Friedman; as intergrupos (efeito da doença) foram realizadas usando o teste de Kruskal-Wallis, e as comparações antes e após estocagem (efeito da estocagem) pelo teste de Wilcoxon.

Comparados com os controles, os eritrócitos de pacientes com AF apresentaram diminuição de CD55 e de FS, aumento de CD71 e o CD59 permaneceu inalterado. O tratamento com cálcio foi mais eficaz do que o pelo calor no envelhecimento das hemácias, nos diferentes grupos estudados. Os eritrócitos de pacientes AF, tratados com HU, exibiram uma menor expressão de FS, indicando que a droga posa conferir

uma maior resistência ao envelhecimento.

A expressão de CD55, CD59 e CD71 em eritrócitos de pacientes com LES, apresentando ou não anticorpos anti-hemácias, foi semelhante àquelas observadas nos controles. A expressão de FS estava aumentada nos pacientes com LES com ou sem anticorpos anti-hemácias, particularmente pelo tratamento com cálcio.

## CININAS E CITOCINAS NO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

**Renata Dellalibera-Joviliano**

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Antonio Donadi  
Tese de Doutorado apresentada em 29/04/2003

**Objetivo:** Avaliar os diversos componentes do sistema das cininas (cininogênios, caliceínas e cininase II) e as citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  no plasma, urina e líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes apresentando lúpus eritematoso sistêmico (LES).

**Métodos:** Um total de 62 pacientes com LES apresentando lupus cutâneo (n=15), nefrite lúpica (n=18) antes e após o tratamento com imunossupressor, lupus neuropsiquiátrico (LESNP, n=29) e ainda, 42 indivíduos normais pareados em termos de sexo e idade aos pacientes foram selecionados neste estudo. As frações de baixo peso (CBPM) e alto peso (CAPM) molecular do cininogênio e as citocinas foram determinadas por ELISA. As atividades da caliceína tecidual, caliceína plasmática e cininase II foram avaliadas utilizando substratos específicos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando os testes não paramétricos de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis e Wilcoxon.

**Resultados:** Comparados aos controles, os pacientes lúpicos, independentemente da manifestação

clínica, apresentaram aumentos dos níveis plasmáticos dos cininogênios, aumento das atividades das caliceínas, da cininase II e das citocinas IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  (p< 0,001 para cada comparação). Os níveis de IL-1 $\beta$  também foram aumentados no plasma (p< 0.001) dos pacientes, enquanto que os níveis de IL-8 não foram significativamente diferentes em relação ao grupo controle. IL-1 $\beta$  e IL-8 não foram detectados no LCR dos pacientes com LESNP. As atividades da caliceína tecidual e cininase II estavam aumentadas somente na urina dos pacientes apresentando nefrite lúpica. Nos pacientes com nefrite, os níveis de todos os componentes do sistema das cininas e das citocinas avaliado estavam diminuídos após o tratamento com imunossupressor quando comparados aos valores pré-tratamento, no entanto, mantiveram-se ainda aumentados em relação ao grupo controle.

**Conclusão:** O aumento dos níveis de cininogênios e de citocinas, associados aos aumentos da atividade das caliceínas e cininase II foram achados compartilhados nas diversas formas de apresentação do LES, indicando que as cininas estejam aumentadas na fase aguda da doença, facilitando o aumento da permeabilidade de diversos tecidos, contribuindo para a deposição de imunocomplexos e auto-anticorpos, e ainda, possivelmente induzindo a produção de citocinas.

## NEUROLOGIA

### AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DE NEUROIMAGEM E HISTOLÓGICAS NA EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL MESIAL

**Luciana Torres Ribeiro**

Orientador: Prof. Dr. João Pereira Leite  
Dissertação de Mestrado apresentada em 11/04/2003

A epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM) é a forma mais comum de epilepsia focal intratável em adultos, sendo a esclerose hipocampal (EH) o seu

substrato histológico mais frequente. A EH é definida pela perda neuronal e proliferação de células gliais, de intensidade variável nos diversos subcampos hipocampais. Observa-se ainda o brotamento de colaterais axonais anômalas das células granulares, as fibras musgosas, na camada molecular interna (MI) do hipocampo, processo que possivelmente representa um fenômeno de sinaptogênese reacional.

A ressonância magnética (RM) permite que se obtenham informações detalhadas sobre alterações hipocampais na EH, caracterizadas por redução volumétrica associada ao aumento do sinal hipocampal nas sequências ponderadas em T2. As alterações de volume hipocampal estariam provavelmente associadas a perda neuronal. Enquanto que o hipersinal hipocampal em T2 seria causado pelo aumento da quantidade de água tecidual, sendo que este aumento poderia estar, de alguma forma, relacionado a gliose.

Este trabalho objetivou o estudo das bases histológicas das alterações volumétricas e de sinal nas sequências ponderadas em T2 (FLAIR) do hipocampo associadas à epilepsia do lobo temporal mesial secundária à esclerose hipocampal.

Trinta e um pacientes, com ELTM secundária a EH, foram submetidos à quantificação da densidade neuronal nos diversos setores hipocampais objetivando a determinação de quais setores apresentavam maior contribuição na redução volumétrica hipocampal. De modo semelhante, foi analisada contribuição da densidade neuronal sobre o sinal hipocampal em sequências ponderadas em T2. Foi também estudado o papel da reorganização axonal e da densidade de marcação pelo GFAP nos vários setores hipocampais sobre o sinal

hipocampal. Foram utilizados como grupo controle tecido hipocampal obtido a partir de necrópsias e RM obtidas de voluntários saudáveis.

A atrofia hipocampal correlacionou-se com a redução da densidade neuronal no subcampo do estrato piramidal de CA1. A densidade neuronal hilar esteve correlacionada com o hipersinal hipocampal nas sequências ponderadas em T2. Adicionalmente, não foi encontrada correlação entre gliose e proliferação de fibras musgosas na MI e o sinal hipocampal.

Pode-se concluir que a redução volumétrica do hipocampo está correlacionada com a perda neuronal, sobretudo no subcampo de CA1, setor frequentemente mais lesado na EH e que provavelmente contribuiu com o maior volume na formação do corno de Ammon. O papel da redução da densidade neuronal hilar sobre o aumento do sinal hipocampal em T2 não é bem definido. Possivelmente a redução da densidade neuronal está associada a um aumento dos espaços intercelulares que preenchidos por proteínas ricamente hidratadas conduziram a um aumento do conteúdo de água tecidual. Além disso, os nossos achados sugerem a existência de uma correlação indireta entre gliose e sinal hipocampal, uma vez que a região hilar, correlacionada com o sinal hipocampal no presente trabalho, foi um dos setores hipocampais com perda neuronal mais acentuada e também um dos maiores índices de marcação pelo GFAP (proteína astrocitária).

Finalmente, as evidências acima reforçam a noção de que alterações de neuroimagem observadas na EH estejam correlacionadas com substratos histológicos específicos.

## RESULTADO CIRÚRGICO NAS EPILEPSIAS FÁRMACO-RESISTENTES ASSOCIADAS ÀS MALFORMAÇÕES FOCAIS DO DESENVOLVIMENTO CORTICAL

**Veriano Alexandre Jr**

Orientador: Prof. Dr. Américo Ceiki Sakamoto

Dissertação de Mestrado apresentada em 14/04/2003

Com o advento da ressonância nuclear magnética de encéfalo (RNM), cada vez mais as malformações do desenvolvimento cortical (MDC) estão sendo diagnosticadas *in vivo* e associadas com epilepsias fármaco-resistentes (FR). Conseqüentemente, um maior número de pacientes têm sido encaminhados para a avaliação pré-cirúrgica. Séries cirúrgicas têm sido descritas, porém, as amostras são pequenas e não homogêneas (quanto ao tipo de MDC), dificultando a interpretação

dos resultados. Portanto, mais estudos que contribuam para a troca de informações devem ser realizados.

Neste estudo, nós descrevemos uma série com pelo menos dois anos de seguimento pós-operatório de pacientes tratados cirurgicamente para epilepsia fármaco-resistente (FR) associada a MDC. Para tentar homogeneizar nossa amostra, nós incluímos na análise os casos de MDC nas quais os achados histopatológicos do tecido cerebral ressecado mostraram lesões displásticas predominando no córtex cerebral. Excluímos os casos em que as MDC predominaram na substância branca subcortical ou com alterações difusas vistas pela RNM.

Nós analisamos os resultados cirúrgicos correlacionando-os com os dados da avaliação pré-cirúrgica, abordagem cirúrgica e achados histopatológicos. Obtivemos 65,5% dos pacientes livres de crises. A idade dos pacientes no momento da cirurgia, a localização e a extensão da MDC, o eletrencefalograma (EEG) interictal e ictal de superfície, as eletrocortico-

grafias crônica e aguda, o tipo de ressecção cirúrgica e os achados histopatológicos não se correlacionaram significativamente com o bom prognóstico pós-operatório. A única análise que mostrou apenas uma tendência ( $p=0,08$ ) para o controle das crises no período pós-operatório foi a retirada completa da lesão visível pela RNM.

### **CEFALÉIA CRÔNICA DIÁRIA COM USO EXCESSIVO DE DAPIRONA: CONSEQÜÊNCIAS DA INTERRUÇÃO DO USO**

**Jackeline Soraya Soares Barbosa**

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo Speciali  
Dissertacao Mestrado apresentada em 16/04/2003 -

A Sociedade Internacional de Cefaleia classificou, em 1988, a cefaléia associada ao uso crônico de analgésicos. A dipirona é medicamento de venda livre, baixo custo e comprovada eficácia (FERREIRA, 2001, BIGAL, 2001 e BIGAL et al, 2001), disponível nos serviços públicos brasileiros e frequentemente utilizado para o controle das crises de Cefaléia, tendo sido apontado como o analgésico mais prescrito nos serviços de emergência como tratamento da crise (FRAGOSO, 1998). Entretanto, não há estudos sobre o papel deste fármaco nas cefaléias diárias primárias. O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta a retirada de dipirona usada excessivamente por portadores

de cefaléia crônica diária.

Foram analisados pacientes de ambulatórios especializados em duas cidades do interior de São Paulo que tratavam suas crises exclusivamente com altas doses deste medicamento, verificando-se os efeitos da retirada da droga sobre a amostra estudada em até seis meses. Sintomas de abstinência leves foram registrados por 27,1% dos pacientes nas duas semanas iniciais. No mesmo período, observou-se a ocorrência de Cefaléia de rebote em 25,7% da amostra. Concluiu-se que, no 2º e 3º meses após a retirada de dipirona, 92,7% dos pacientes evoluíram para melhora expressiva da cefaléia. Entretanto parte da população estudada, após um período de remissão, retomou o padrão diário de dor mesmo na ausência do uso de dipirona, o que nos leva a questionar se, de fato, a alta frequência de crises estaria na dependência do uso excessivo de analgésico.

### **CONTRIBUIÇÃO DAS MEDIDAS VOLUMÉTRICAS DAS ESTRUTURAS TEMPORAIS MESIAIS E NEOCORTICAIS AO TRATAMENTO CIRÚRGICO DAS EPILEPSIAS DO LOBO TEMPORAL**

**David Araújo**

Orientador: Prof. Dr. Américo Ceiki Sakamoto  
Tese de Doutorado apresentada em 24/04/2003-

A epilepsia do lobo temporal é a forma mais comum de epilepsia focal sintomática e a esclerose mesial temporal a sua causa mais frequente.

A volumetria por ressonância magnética pode ser útil na investigação da epileptogênese na epilepsia temporal, bem como na lateralização das alterações hipocampais em pacientes candidatos à, cirurgia, como já relatado em diversas séries.

Realizamos a volumetria das estruturas do lobo temporal em 69 pacientes com suspeita clínica de epilepsia mesial temporal, avaliados consecutivamente no

Centro de Cirurgia de Epilepsia do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. As estruturas medidas foram o pólo temporal, o segmento posterior do lobo temporal, a amígdala, o hipocampo e o giro parahipocampal.

Estas medidas foram comparadas às variáveis clínicas e neurofisiológicas dos pacientes, buscando fatores de bom prognóstico para o tratamento cirúrgico, bem como de variáveis clínicas que permitissem a correlação entre comprometimento estrutural e funcional.

Nossos resultados mostraram uma importância central do hipocampo na epileptogênese temporal, embora não esteja elucidado se este papel é primário e

independente ou secundário a alterações conjuntas com as outras estruturas. Todos os nossos casos apresentaram comprometimento hipocampal absoluto, relativo ou de assimetria.

A variável que se correlacionou ao prognóstico pós-cirúrgico foi o índice de assimetria hipocampal, maior nos pacientes com boa evolução após ressecção temporal.

O pólo temporal foi a estrutura neocortical mais

comprometida e houve uma correlação entre sua perda volumétrica e o tempo de epilepsia, sugerindo um dano progressivo.

Houve diferença significativa entre o volume das estruturas mesiais contralaterais à cirurgia, quando comparadas às dos controles. Este dado sugere comprometimento mais difuso e bilateral, mesmo em pacientes com epilepsia unilateral ao EEG e aos dados clínicos.

### **EFITOS DA PRIMEIRA NOITE EM LABORATÓRIO DE SONO SOBRE OS DESPERTARES E MICRODEPERTARES E SOBRE A MACRO E A MICROESTRUTURA DO SONO EM VOLUNTÁRIOS NORMAIS**

**José Roberto Santiago Barreto**

Orientador: Prof. Dr. Américo Ceiki Sakamoto  
Tese de Doutorado apresentada em 28/04/2003

A microestrutura vem se revelando um aspecto importante da análise da polissonografia. A motivação maior para o desenvolvimento desta pesquisa é avaliar as alterações na macro e na microestrutura do sono causadas pelo efeito de primeira noite em laboratório. Ainda não existem estudos na literatura avaliando a microestrutura do sono neste tipo de situação. A importância deste trabalho é conhecer as alterações que a primeira noite em laboratório causam sobre a macro e a microestrutura do sono. Isto pode ajudar a compreender melhor os exames de polissonografia e a fisiologia do sono. Foram recrutados 20 voluntários que se submeteram a duas polissonografias em um laboratório de sono com intervalo mínimo de cinco dias entre os exames. Os resultados encontrados na macroestrutura do sono foram a redução da eficiência do sono nos exames de primeira noite (PN) ( $p=0,01$ ), o au-

mento do Tempo Total de Vigília nos exames de PN ( $p=0,02$ ), o aumento no Número de Despertares e no Número de Despertares por Hora de Sono nos exames de PN ( $p<0,001$  em ambos), a diminuição na quantidade de sono MOR nos exames de PN ( $p<0,001$ ) e o aumento da Latência ao Sono MOR nos exames de PN ( $p<0,001$ ). Na microestrutura do sono foram encontrados o aumento da duração do Padrão Alternante Cíclico em minutos e em percentagem do TTS nos exames de PN ( $p=0,01$  e  $p=0,02$ , respectivamente). Nos sub-tipos de microdespertares foram encontrados a diminuição do tipo A1 e o aumento dos tipos A2 e A3 nos exames de PN ( $p=0,04$ ,  $p<0,001$  e  $p<0,001$ , respectivamente). Concluindo, os exames de PN apresentam maior instabilidade do sono (aumento do PAC), com redução dos microdespertares relacionados com a manutenção do sono (A1) e aumento dos microdespertares relacionados com os despertares (A2 e A3). Tais achados demonstram a importância da análise dos microdespertares, reforçando sua importância na fisiologia do sono e na análise da polissonografia.

### **ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E PERFUSIONAIS CEREBRAIS DOS TRANSTORNOS PSICÓTICOS ASSOCIADOS A EPILEPSIA DE LOBO TEMPORAL**

**Ricardo Guarnieri**

Orientador: Américo Ceiki Sakamoto  
Dissertação de Mestrado apresentada em 29/04/2003

**Introdução:** A incidência de psicoses do tipo esquizofrênica em indivíduos portadores de epilepsia de lobo temporal (ELT) pode ser até 10 vezes superior

à incidência de esquizofrenia primária em indivíduos não epiléticos. **Objetivo:** Estudar as características clínicas e os padrões interictais de perfusão sanguínea cerebral (PSC) com o uso de SPECT em indivíduos portadores de ELT com psicoses (PNE), comparando-os ao grupo dos indivíduos com ELT sem transtornos psicóticos. **Metodologia:** Foram selecionados dois grupos: (1) grupo de 21 indivíduos com ELT e PNE; (2) grupo de 23 indivíduos com ELT sem PNE (grupo controle). Os grupos foram pareados segundo as variáveis: sexo, idade, escolaridade, dominância manual e lateralidade das crises. Todos os indivíduos foram submetidos à vídeo-monitorização e às avaliações psiquiátrica, neuropsicológica e social. Foram excluídos portadores de outros transtornos psiquiátricos, retardo mental, história de abuso ou dependência de álcool ou drogas ilícitas e presença de lesões estruturais grosseiras (tumores, mal-formações). Os exames de SPECT foram submetidos a um estudo de semi-quantificação. As regiões estudadas foram desenhadas a partir de dois cortes transaxiais seguin-

do a linha órbito-meatal e um corte orientado ao longo do eixo do lobo temporal. As medidas incluíram: pólo frontal, pré-frontal, cíngulos anterior e posterior, gânglios da base, tálamo, lobo temporal, parietal superior, pólo occipital e cerebelo. **Resultados:** Quanto aos aspectos clínicos, foram observadas tendências a um pior desempenho médio do QI Geral ( $p=0,090$ ), idade mais precoce do IPI (*initial precipitating injury*) ( $p=0,10$ ) e aumento do número de descargas interictais bilaterais ( $p=0,094$ ) no grupo PNE. Tais tendências podem estar associadas com fatores de risco para PNE. A semi-quantificação das imagens de SPECT mostrou aumento da PSC no cíngulo posterior direito no grupo PNE ( $p=0,034$ , teste *t*). **Discussão:** O aumento da PSC no cíngulo posterior direito nos indivíduos com PNE poderia revelar envolvimento do sistema límbico, corroborando com observações mais recentes de anormalidades do giro do cíngulo na esquizofrenia. O trabalho reforça a hipótese de que o giro do cíngulo estaria intimamente relacionado aos transtornos psicóticos.

## ASPECTOS NEUROLÓGICOS, ELETROGRÁFICOS E RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NA FORMA CRÔNICA DA DOENÇA DE CHAGAS

**Paula Carvalho Viana**

Orientador: Prof. Dr. Amilton Antunes Barreira  
Tese de Doutorado apresentada em 30/06/2003

O objetivo deste estudo foi avaliar se há envolvimento do sistema nervoso central na forma crônica da doença de Chagas (CD), representado por distúrbios orgânicos ou funcionais, não resultantes do comprometimento da fase aguda. Foram investigados 27 pacientes e 16 controles epidemiológicos. Todos foram submetidos a exame neurológico, mini-exame do estado mental e ao EEG digital, obtido a partir de 20 eletrodos de chumbo, colocados no couro cabeludo de acordo com o Sistema Internacional 10-20. Quatro eletrodos adicionais foram colocados para o registro de movimentos oculares, atividade muscular e EEG. A análise de frequência foi feita em épocas de 60 segundos de duração de EEG livre de artefatos, nas condições de olhos fechados (OF) e olhos abertos (AO), obtendo-se assim os mapas quantitativos e topográficos. Vinte-três pacientes e 16 controles foram subme-

tidos à ressonância magnética do encéfalo e da medula espinhal. A forma clínica predominante foi a cardíaca (70% dos casos), todavia não se observou nenhuma relação entre as formas clínicas da DC e as anormalidades eletrencefalográficas. Os pacientes apresentaram discreto comprometimento do sistema nervoso central e periférico, evidenciado pelas síndromes córtico-subcortical e de neuropatias periféricas. O achado mais relevante ao EEG quantitativo foi o maior potencial relativo teta na derivação têmporo-occipital direita e a menor frequência teta dominante na derivação têmporo-occipital esquerda, sugerindo discreta disfunção cortical em chagásicos. A gliose da substância branca e o infarto cortical corresponderam a alterações eletrencefalográficas em alguns pacientes. A ressonância magnética de medula mostrou principalmente alterações degenerativas, que não diferiram das encontradas em controles. Futuros estudos com maior número de pacientes e controles e protocolos mais amplos de avaliação neuropsicológica e eletroneuromiográfica poderão, possivelmente, detectar anormalidades não encontradas no presente estudo.

## ORTOPEDIA TRAUMATOLOGIA E REABILITAÇÃO

### **AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOMÉTRICA DA EPÍFISE E DO NÚCLEO DE OSSIFICAÇÃO SECUNDÁRIO PROXIMAL DO ÚMERO EM CRIANÇAS MASCULINAS EUTRÓFICAS ATÉ O QUARTO MÊS DE VIDA PELA ULTRA-SONOGRAFIA. ESTUDO DE 99 CASOS.**

**Marcelo Novelino Simão**

Orientador: Prof. Dr. José Batista Volpon

Dissertação de Mestrado apresentada em 14/02/2003

Foi realizado estudo ultra-sonográfico do ombro direito de 99 crianças do berçário e dos ambulatórios de pediatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, com idades entre 31 semanas de gestação e 4 meses de vida, utilizando transdutores lineares de 7,5 a 10,0 mHz. Foram obtidas imagens nos planos coronal, sagital e transversal, com o braço estático e em movimento, com manobra dinâmica de abdução do ombro, com a finalidade de avaliação do aspecto normal das partes moles e da epífise proximal.

O aspecto dos tecidos moles, inclusive da musculatura, evidenciou características semelhantes às observadas em indivíduos adultos. A epífise proximal do úmero foi sempre facilmente identificada, aparecendo como uma estrutura ovalada, seccionada na face em contato com a metáfise, com ecotextura hipoecóica e

heterogênea.

O surgimento do núcleo de ossificação secundário da epífise proximal do úmero foi correlacionado com as variáveis idade, peso, altura da epífise, diâmetro ântero-posterior ou látero-lateral e volume da epífise. O núcleo de ossificação secundário apresentou aspecto entre linear, globular e curvilíneo com sombra acústica posterior. Na análise estatística foi feita avaliação uni e multi-variada da influência de cada uma das variáveis na ossificação da epífise.

De maneira geral, houve diferença significativa entre os grupos sem e com ossificação, em relação a todas as variáveis estudadas, com sua presença sendo mais freqüente na medida em que cada uma das variáveis também aumentava. A avaliação multi-variada com técnica de análise de regressão logística mostrou que a variável diâmetro ântero-posterior ou látero-lateral é a que exerceu um efeito predominante sobre a ossificação, isto é, entre todas as variáveis, ela foi isoladamente, a que melhor indicou a presença ou não de ossificação.

## PATOLOGIA

### **ANÁLISE DA NECROSE EM TECIDOS NORMAIS FOTOSSENSIBILIZADOS PÓS TERAPIA FOTODINÂMICA – ESTUDO *IN VIVO*.**

**Juliana Ferreira**

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Zucoloto

Dissertação de Mestrado apresentada em 26/06/2003

O conceito de PDT é a fotoindução da citotoxicidade das células proliferativas envolvendo um agente fotossensibilizador, uma fonte de luz e oxigênio. Apesar de ser uma terapia eficiente no tratamento de várias neoplasias, a PDT apresenta algumas limitações dentre as quais a não seletividade em células do tecido

hepático. O presente trabalho avaliou a correlação entre penetração luminosa e necrose, assim como a extensão da mesma em função da concentração do fotossensibilizador utilizado (Photogem®) e de três diferentes doses de energia. A transição do epitélio necrosado e do epitélio sadio, foi realizada após a irradiação de fígados normais de ratos previamente fotossensibilizados. O acúmulo do Photogem, administrado via endovenosa, no fígado, foi investigado através da espectroscopia de fluorescência. As fontes de luz utilizadas para irradiação foram um laser de diodo

de 630nm e um dispositivo a base de LEDs (diodos emissores de luz). Observamos que o tecido hepático normal, fotossensibilizado, apresenta suas características ópticas alteradas, evidenciadas nos estudos de penetração da luz e alteração térmica durante a irradiação, refletindo na profundidade da necrose. Verificamos que a presença do FS no tecido alvo diminui a penetração da luz, levando a um aumento da temperatura, devido à grande quantidade de energia absorvida pelo FS, a qual é dissipada na forma de calor. Notamos uma abrupta delimitação da necrose correspondendo à queda de intensidade luminosa no tecido ilu-

minado. A profundidade de necrose obtida com o uso do LED apresentou uma pequena variação, devido à linha espectral do mesmo ser mais larga, quando comparado ao laser. Histologicamente o tecido hepático e irradiado apresentou necrose coagulativa, infiltrado inflamatório neutrofilico e necrose da veia centrolobular em todos os grupos experimentais; também observamos uma nítida delimitação entre o tecido epitelial normal e o tecido epitelial fotossensibilizado. Estes resultados serão importantes para o desenvolvimento de estratégias para um possível protocolo para aplicação da PDT em tumores malignos hepáticos.

## PEDIATRIA

### EXPRESSÃO DO GENE CODIFICADOR DA SUBUNIDADE REGULADORA ALFA DA PROTEÍNA QUINASE A TIPO I NA DOENÇA PIGMENTAR PRIMÁRIA DA ADRENAL; E SEU SEQÜENCIAMENTO E EXPRESSÃO EM TUMORES DE TIREÓIDE

**Fabiano Sandrini**

Orientador: Prof. Dr. Ayrton Custódio Moreira

Tese de Doutorado Apresentada em 25 /02/2003

O gene de supressão tumoral que codifica a subunidade reguladora  $\alpha$  da proteína quinase A tipo I (*PRKARIA*) está localizado na região cromossômica 17q22-24 e está mutado na metade dos casos de complexo de Carney (CNC), uma síndrome familiar de neoplasias múltiplas, caracterizada pela presença de lentiginos, cardiomiomas, mixomas de pele e outros tumores, incluindo doença nodular pigmentar primária da adrenal (PPNAD), e tumores tireoidianos. A proteína quinase A (PKA) tipo I é formada pelas subunidades reguladoras I $\alpha$  ou I $\beta$  e a isoforma tipo II é formada pelas subunidades reguladoras II $\alpha$  ou II $\beta$  e possuem variações de expressão tecido-específico. Com objetivo de estudar a expressão gênica e proteica das subunidades do heterodímero da PKA, foram estudadas células linfocitárias imortalizadas de 16 indivíduos com CNC (12 com mutações no *PRKARIA* e 4 sem mutações) e 6 indivíduos sem CNC como grupo controle; 11 amostras de PPNAD de pacientes com CNC (5 sem mutações (PPNADnomut) e 6 com mutações (PPNADmut) no *PRKARIA*) e 3 amostras de hiperplasias adrenais secundárias a doença de Cushing (ACTH-Tu) como controle para este grupo; e 38 tumo-

res esporádicos de tireóide (14 carcinomas indiferenciados (UC), 16 carcinomas papilíferos (PC), 6 adenomas foliculares (FA), e 2 carcinomas foliculares (FC). A expressão dos genes que codificam as 4 subunidades reguladoras (*PRKARIA*, *PRKAR1B*, *PRKAR2A*, *PRKAR2B*) e a subunidade catalítica alfa (*PRKACA*) foi quantificada nas linhagens linfocitárias e adrenais. Ainda, analisamos a quantidade de proteína das subunidades da PKA (R1A, R1B, R2A, R2B e CA) nas amostras de PPNAD e em tumores tireoidianos. E, finalmente, foi estudado o seqüenciamento do gene *PRKARIA* e a perda de heterozigose (LOH) de marcadores polimórficos da região 17q22-24 nos tumores tireoidianos. Observamos uma menor expressão do gene *PRKARIA* em linfócitos transformados de pacientes com mutação neste gene. A expressão do *PRKARIA* também é menor em PPNADmut e ACTH-Tu do que nos PPNADnomut. A quantidade das proteínas reguladoras da PKA não foi diferente entre as amostras com ou sem mutação no gene *PRKARIA*, mas houve uma menor relação da quantidade de R1A/R2B em PPNADmut. O estudo de marcadores polimórficos observou LOH no marcador intragênico ao *PRKARIA* em 6 das 16 amostras informativas: 4 UC e 2 PC. No seqüenciamento do gene *PRKARIA* foi observada uma mutação C449T no exon 4B em um UC, que resulta na substituição de glicina para um codon de finalização (Q167X). Em um PTC, foi observada uma deleção no

intron 7 – 7IVS-78delTT; entretanto não altera a sequência do DNA complementar do gene *PRKARIA*. A quantidade de proteína R1A não apresentou correlação com o comportamento maligno de tumor tireoideano. Concluímos que há uma tendência de substituição

de PKA tipo I em tipo II em linhagens celulares de linfócitos transformados e PPNAD de pacientes com CNC e mutação no gene *PRKARIA*; e é possível que a subunidade R1A exerça uma função de supressão tumoral nas células tireotróficas.

### MORTALIDADE INFANTIL: COMPARAÇÃO ENTRE DUAS COORTES DE NASCIMENTOS DO SUDESTE E NORDESTE DO BRASIL

**Valdinar Sousa Ribeiro**

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Barbieri  
Tese de Doutorado apresentada em 21/02/2003

**Objetivos:** Obter estimativas populacionais e fatores de risco de mortalidade infantil (MI) e avaliar a causa básica do óbito segundo o critério de evitabilidade, em coortes de nascimentos de São Luís (SL) e Ribeirão Preto (RP). Buscaram-se diferenças nos fatores de risco de MI em cidades de diferentes regiões do país.

**Métodos:** Em RP, a MI foi avaliada em 1/3 dos nascidos vivos hospitalares (2846 partos únicos) em 1994. Em SL foi feita amostragem sistemática de partos estratificada por maternidade (2443 partos únicos) em 1997/98. Risco relativo (RR) e intervalo de confiança de 95% foram estimados pela regressão de Poisson.

**Resultados:** O coeficiente de mortalidade infantil (CMI) em SL foi 26,6/1000 nascidos vivos, o

coeficiente de mortalidade neonatal (CMN) 18,4/1000 e o coeficiente de mortalidade pós-neonatal (CMPN) 8,2/1000, valores superiores aos de RP, com CMI 16,9/1000, CMN 10,9/1000, CMPN 6,0/1000. Na análise ajustada, nas duas cidades, natimorto prévio (RR=3,67 vs 4,13) e idade materna <18 anos (RR=2,62 vs 2,59) foram fatores de risco para mortalidade infantil. Apenas em SL, pré-natal inadequado (RR=2,00) e sexo masculino (RR=1,79) foram fatores de risco, e domicílios com 5 ou mais moradores foi fator protetor (RR=0,53). Em RP, hábito materno de fumar foi associado à MI (RR=2,64). Nas duas cidades observaram-se percentuais elevados de óbitos reduzíveis (88% em SL, 79% em RP). Os óbitos reduzíveis por adequado controle da gravidez e parto ocorreram em 72% dos casos em SL e 42% em RP.

**Conclusões** Além de desigualdades socioeconômicas, diferenças no acesso e na qualidade da atenção médica entre as cidades influenciaram as taxas de MI.

### DETECÇÃO DA DEFICIÊNCIA DE VITAMINA A ATRAVÉS DO TESTE “+S30DR” E DE ALGUNS FATORES DE RISCO PARA A HIPOVITAMINOSE A EM CRIANÇAS PRÉ-ESCOLARES

**Ivan Savioli Ferraz**

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Daneluzzi  
Tese de Doutorado apresentada em 24/02/2003

**Introdução:** Importante causa de morbimortalidade infantil, a deficiência de vitamina A (DVA) é endêmica em várias regiões do país, porém recebe pouca atenção das autoridades de saúde do Estado de São Paulo. **Objetivos:** O objetivo deste trabalho foi identificar a DVA através do teste +S30DR (“*serum 30-day dose response test*”) em pré-escolares saudáveis seguidos em um ambulatório de Pediatria Geral, além de tentar se estabelecer a prevalência de xeroftalmia nas crianças estudadas. Além disso, visou-se estudar a interferência de algumas variáveis

(fatores de risco) na importância da gênese da DVA nas crianças estudadas. **Metodologia:** Foram incluídas no estudo 188 crianças com idades  $\geq 24$  meses e  $< 72$  meses sem doenças diarreicas e/ou febris no momento da coleta. Amostras de sangue periférico foram obtidas sob jejum prévio para obtenção dos valores de hemoglobina, ferro sérico, saturação de transferrina, zinco sérico, velocidade de hemossedimentação e +S30DR. O + S30DR consiste na coleta de uma amostra de sangue para dosagem dos níveis de retinol sérico imediatamente antes ( $T_0$ ) da suplementação com 200.000 UI de palmitato de retinil administrados por via oral e de uma nova coleta de sangue para a mesma dosagem 30-45 dias após ( $T_1$ ) a referida suplementação. Para cálculo do +S30DR, aplicou-se a fórmula

mula  $(T_1 - T_0 / T_1) \times 100$ . Resultados individuais  $\geq 20\%$  indicam baixas reservas hepáticas de vitamina A. A análise laboratorial do retinol sérico foi realizada através do HPLC. Inspeção ocular à procura de sinais de xeroftalmia foram realizadas em todas as crianças, além das medidas de peso e altura para classificação antropométrica do estado nutricional. Exames à procura de parasitas nas fezes foram realizados para determinação da taxa de infestação no grupo estudado. Realizaram-se entrevistas com os responsáveis diretos das crianças a fim de se obterem informações sobre o grau de escolaridade dos pais, renda “*per capita*” da família, número de pessoas residentes no domicílio, ocorrência de episódios febris e diarreicos nas duas semanas prévias à entrada da criança no estudo. **Resultados:** 74,5% (140/188) das crianças apresentaram +S30DR indicativos de baixas reservas hepáticas. As médias dos níveis de retinol sérico pré-suplementação foram significativamente menores do que os níveis pós-suplementação (0,92  $\mu\text{mol/l}$  e 1,65  $\mu\text{mol/l}$ , respectivamente;  $p < 0,0001$ , teste “t” de Student para amostras pareadas), havendo um deslocamento significativo para a “direita” do polígono de frequências dos níveis séricos de retinol após a administração do palmitato de retinil. Nenhuma criança apresentou xeroftalmia. Apenas 3,7% (7/188) das cri-

anças apresentaram algum grau de desnutrição protéico-energética. Nenhuma das variáveis estudadas se mostraram como fatores de risco para a DVA. A presença de febre e/ou diarreia nos 15 dias precedentes à entrada da criança na pesquisa ou ainda, um valor de VHS elevado ( $> 20 \text{ mm/na } 1^{\text{a}} \text{ hora}$ ) não modificaram os níveis de retinol sérico pré-suplementação. **Conclusões:** Apesar da baixa prevalência de desnutrição e de todas as crianças selecionadas estarem “saudáveis” no momento da entrada no estudo, elevada proporção de crianças com baixas reservas hepáticas de vitamina A (DVA) foram detectadas pelo +S30DR. Tal teste mostrou-se útil, pois seu resultado não foi modificado pela presença de febre, diarreia ou de um valor de VHS elevado. Todos os casos mostraram ser subclínicos, já que nenhum caso de xeroftalmia foi observado. A suplementação foi capaz de mudar o “status” de vitamina A, como mostraram os polígonos de frequências dos níveis séricos de retinol pré e pós-suplementação. Tais achados mostram-se preocupantes e devem estimular mais estudos para a identificação da DVA em outras comunidades de risco, além de se estimular o emprego de medidas de combate à deficiência nas crianças da comunidade estudada, como, por exemplo, a suplementação sistemática e periódica de vitamina A.

### FATORES ENVOLVIDOS NA MANUTENÇÃO DO ALEITAMENTO MATERNO, NOS PRIMEIROS 4 MESES DE VIDA: A IMPORTÂNCIA DO PEDIATRA COM TREINAMENTO ESPECÍFICO

**Luciano Borges Santiago**

Orientador: Prof.Dr. Marco Antônio Barbieri

Tese de Doutorado apresentada em 24/03/2003

Neste estudo foram investigados os fatores envolvidos na manutenção do Aleitamento Materno Exclusivo (AME) em lactentes saudáveis nos primeiros 4 meses de vida, com ênfase na atuação do pediatra.

Foram seguidos longitudinalmente, no Ambulatório de Pediatria da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro Uberaba/MG, 101 lactentes nascidos a termo, saudáveis, durante os primeiros 4 meses de vida, distribuídos de forma aleatória em três grupos: G1 equipe multiprofissional de aleitamento materno (AM), G2 pediatra com treinamento em AM e G3 pediatra sem treinamento em AM. Foi confirmado a aleatoriedade dos grupos por meio de análise de variância. Os fatores associados ao tipo de prática alimentar aos 4

meses foram avaliados pelo teste de qui-quadrado, análises de variância e multivariável.

Constatou-se de forma significativa que ao final do seguimento, os Grupos 1 e 2 apresentaram-se com percentuais semelhantes em relação ao AME e superiores ao Grupo 3 ( $p = 0,002$ ); o uso de chupeta associou-se negativamente ao AME ( $p = 0,003$ ) e quanto mais anos de escolaridade materna, maiores as possibilidades de AME ( $p = 0,041$ ).

O pediatra com formação continuada e treinamento específico em amamentação, que representa um baixo custo em saúde pública, atingiu índices de AME semelhantes aos de uma equipe multiprofissional de AM, o que mostra seu importante e insubstituível papel neste cenário alimentar. O uso de chupeta associou-se à perda do AME, podendo entretanto tratar-se de um marcador de dificuldades do AM e quanto mais anos de escolaridade materna, maiores as possibilidades da prática do AME.

## SAÚDE NA COMUNIDADE

### **RASTREAMENTO COGNITIVO POR INSTRUMENTO BASEADO NO MEEM EM IDOSOS NÃO INSTITUCIONALIZADOS RESIDENTES EM BATATAIS-SP.**

**Maria Betriz Ferreira Gurian**

Orientador: Prof. Dr. Milton Roberto Laprega

Dissertação de Mestrado apresentada em 23/01/2003

O transtorno cognitivo no idoso acarreta repercussões na sua vida, na família e na relação com a sociedade. Um instrumento de avaliação cognitiva amplamente utilizado é o MEEM-Mini Exame do Estado Mental-que é um teste de rastreamento com o objetivo de selecionar pessoas com provável déficit cognitivo. Uma amostra representativa da população de 394 idosos do município de Batatais SP foi avaliada através de inquérito domiciliar em relação às condições socioeconômicas e de saúde, e foi feito rastreamento dos sintomas depressivos e do desempenho cognitivo através de um instrumento baseado no MEEM. A maioria dos entrevistados era do sexo fe-

minino(66%), sendo que 75,4% dos idosos pertenciam a uma faixa etária de 60-74 anos, chamada idoso jovem. Com relação à escolaridade a grande maioria (62,2%) cursou o primeiro grau. Com relação aos analfabetos 77,1% eram mulheres. Para o estado conjugal a diferença foi na proporção da viuvez 80,2% para o sexo feminino e 19,8% para o masculino. Quanto a renda familiar, 43,7% da população recebiam menos de 2,5 salários mínimos. Para a avaliação do desempenho cognitivo usou ponto de corte menor igual a 23 para o MEEMN. Observou-se que 81,7% ficaram acima deste ponto de corte e 18,3% ficaram abaixo. Os idosos que tiveram os escores mais elevados foram associados aos fatores como idade (60-69 anos), maior nível de escolaridade, ter hábito de leitura, ter boa relação social principalmente com parentes, não ter hipertensão arterial, diabete, incontinência urinária, catarata e ausência de sintomas depressivos.

### **O IMPACTO DO TRABALHO SOBRE A SAÚDE DAS TRABALHADORAS EM ÁREA HOSPITALAR: UM ESTUDO SOBRE O TRABALHO E SUA RELAÇÃO COM A SAÚDE DAS PROFISSIONAIS DE ENFERMAGEM**

**Marisa Aparecida Elias**

Orientadora: Prof. Dra. Vera Lúcia Navarro

Dissertação de Mestrado apresentada em 05/02/2003

As mudanças no mundo do trabalho que se ampliaram e se intensificaram nas últimas décadas no bojo do processo de globalização, trouxeram como consequência o aumento assustador do desemprego, do trabalho informal, terceirizado e uma crescente intensificação do trabalho, que resultaram em maior precarização das condições e das relações de trabalho e afetaram de forma intensa diferentes setores, expondo os trabalhadores a condições mais extenuantes, que se refletem em suas condições de vida e saúde. Tomando como objeto de estudo o trabalho das profissionais de enfermagem do Hospital de Clínicas

da Universidade Federal de Uberlândia – MG, esta dissertação de mestrado teve por objetivo investigar as relações entre aquela atividade e a saúde das profissionais que a realizam. A partir da análise das peculiaridades da profissão-enfermagem e do trabalho que é realizado em uma instituição pública de saúde, foi possível avaliar em que medida o trabalho influencia, afeta e transforma a saúde daquelas trabalhadoras. Considerando o ambiente de trabalho, a organização e divisão das tarefas, duração da jornada, o trabalho em turnos, a pressão da chefia, os baixos salários e as peculiaridades do trabalho em hospital que submetem o trabalhador à vivência constante com a dor, doença e morte, podemos afirmar que há relação entre trabalho e os problemas de saúde referidos pelas entrevistadas, o que confirma a hipótese norteadora desta pesquisa.

## **PREVALÊNCIA DAS DOENÇAS PERIODONTAIS EM PACIENTES COM DOENÇA ISQUÊMICA CORONARIANA ATEROSCLERÓTICA, EM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO**

**Ana Lúcia de Azevedo Barilli**

Orientador: Prof. Dr. Laércio Joel Franco

Dissertação de Mestrado apresentada em 06/02/2003

As doenças periodontais (DP) são precedidas em importância apenas pela cárie dentária como problema de saúde bucal coletiva no Brasil. Ambas são doenças infecciosas ainda muito prevalentes, entretanto é dada às DP uma importância questionavelmente secundária, pois não são sistematicamente investigadas e prevenidas em saúde pública. Pelo fato de sua prevalência ser atualmente desconhecida no Brasil, a alta frequência das formas leves e moderadas das doenças periodontais na população como um todo e de suas formas mais graves em grupos ou indivíduos de risco, dentre estes os portadores de cardiopatias isquêmicas, motivou este estudo no Ambulatório de Cardiopatia Isquêmica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, cotejando os resultados com outros obtidos em grupo de pessoas não-cardiopatas atendidas na mesma instituição. Foi investigada a prevalência e gravidade das doenças periodontais, bem como a prevalência de seus fatores de risco, história médica da presença de doenças de interesse à periodontia (diabetes, hipertensão, acidente vascular cerebral) e comportamento relativo à higiene bucal. Dentre as 634 pessoas examinadas na fase de recrutamento dos participantes, 480 foram do grupo de pacientes cardiopatas isquêmicos e 154 de grupo de não-cardiopatas. Foram selecionados respectivamente de cada grupo, 58 e 62 participantes, na faixa etária de 30 a 79 anos, para a investigação periodontal. A média da idade foi de 53 anos em ambos os sexos para os pacientes cardiopatas e de 40 anos nos homens e 37 anos nas mu-

lheres nos pacientes não-cardiopatas. Foram utilizados o Índice Periodontal Comunitário (IPC) e o índice de Perda de Inserção periodontal (PI), ambos recomendados pela OMS (1999). Os resultados mostraram um predomínio de sextantes nos escores indicativos das formas graves da DP entre os pacientes cardiopatas (74,1% contra 20,2%;  $p < 0,00001$ ). Dentre os pacientes cardiopatas apenas 1,1% dos sextantes exibiram saúde periodontal, contra 32,0% nos pacientes não-cardiopatas ( $p < 0,00001$ ). No tocante a história pregressa da DP, mensuradas através da perda de inserção, 6,0% dos sextantes não a exibiram entre os pacientes cardiopatas, contra 68,0% dos não-cardiopatas ( $p < 0,00001$ ). Eram portadores de fatores de retenção de biofilme dental 100,0% dos pacientes cardiopatas e 82,3% dos pacientes não-cardiopatas ( $p < 0,001$ ). Exigiam tratamento periodontal mais complexo, normalmente praticados por especialistas em periodontia, 94,8% dos pacientes cardiopatas contra 33,9% dos pacientes não-cardiopatas ( $p < 0,0001$ ). Necessitavam de tratamento de bolsas  $\geq 6$ mm 79,3% dos pacientes cardiopatas contra 9,7% dos pacientes não-cardiopatas ( $p < 0,0001$ ). Alguns fatores de risco comprovado e/ou provável às DP, foram investigados nos pacientes cardiopatas e pacientes não-cardiopatas: observou-se tabagismo em 10,4% e 33,9% ( $p < 0,01$ ), respectivamente; alcoolismo em 44,8% e 24,2% ( $p < 0,02$ ), respectivamente; diabetes em 29,3% e 1,6% ( $p < 0,0001$ ), respectivamente; hipertensão arterial em 34,5% e 8,1% ( $p < 0,001$ ), respectivamente. Conclusões: As DP mostraram-se muito prevalentes nos dois grupos estudados, sendo de maior gravidade nos pacientes com cardiopatia isquêmica. A elevada prevalência de fatores de risco às DP aponta para a necessidade de adoção de estratégias de intervenção para minimizá-los.

## **ABORTO: PERCEPÇÃO DE PROFISSIONAIS DE UNIDADES DE EMERGÊNCIA DE RIBEIRÃO PRETO**

**Patrícia do Socorro M. Franco do Espírito Santo**

Orientadora: Profa.Dra. Elisabete Meloni Vieira

Dissertação de Mestrado apresentada em 06/02/2003

**Objetivos:** Temos como objetivo geral desta dissertação investigar as percepções sobre o aborto

de diferentes profissionais de saúde, que trabalham em dois serviços de emergência do município de Ribeirão Preto. Como objetivos específicos identificar no conjunto das percepções destes profissionais os valores em relação ao aborto provocado e comparar estas percepções entre os profissionais de saúde de diferentes formações.

**Procedimentos metodológicos:** Neste trabalho privilegiamos a percepção dos profissionais de saúde a respeito do aborto provocado, utilizando-se de uma metodologia do tipo qualitativa. Foram entrevistados doze profissionais de saúde. Os dados foram coletados utilizando-se entrevistas do tipo semi-estruturadas e diário de campo, e analisados pela técnica de análise de conteúdo proposta por Bardin.

**Resultados e Discussão:** De maneira geral estabeleceu-se uma clara distinção do estado emocional das mulheres atendidas, os profissionais acreditam que quando as mulheres desejam o filho e sofrem um aborto espontâneo elas ficam tristes e quando a gravidez não é desejada e o aborto possivelmente provocado elas ficam aliviadas. A visão que se tem da mulher que provoca o aborto é valorada negativamente, elas são encaradas como mulheres que negam a maternidade. Embora os profissionais refiram que o atendimento é igual para todas as mulheres, relataram também que aquelas que abortaram espontaneamente são tratadas com mais cuidado, denunciando que frente à situação de abortamento as reações dos profissionais são influenciadas por suas percepções do aborto ter sido provocado ou não. Como motivos para a realização do aborto, os profissionais citaram, entre outros, a

falta de informação que previna a gravidez indesejada. Os entrevistados acreditam que a decisão de provocar ou não o aborto cabe à mulher, o que pode guardar relação com a posição de que à mulher cabe a responsabilidade pela anticoncepção. Os profissionais, de maneira geral, mostraram-se inseguros sobre a legislação. Também citaram casos não previstos na lei, como má formação fetal, como componente do aborto legal. O argumento principal utilizado pelos que se posicionam contra o aborto é o direito à vida do feto e o a favor da descriminalização é ser o aborto clandestino um problema de saúde pública.

**Conclusões:** A visão que o profissional tem da mulher que provoca o aborto é pré-concebida, já que esperam reações emocionais das mulheres de acordo com o tipo de aborto. Os profissionais de uma maneira geral, apesar de sua formação biomédica, encaram o sofrimento da mulher como um aspecto relevante a ser considerado no atendimento. Entretanto, demonstram despreparo para atuar nesta área. O desconhecimento da legislação revelou-se um aspecto preocupante. No atendimento pós-aborto detectou-se a necessidade do repasse de informações sobre planejamento familiar. A religião é um importante aspecto que influencia os argumentos contra o aborto.

## ESTUDO DE INTERVENÇÃO NUTRICIONAL ALEATORIZADO EM ADULTOS COM SOBREPESO EM UNIDADE BÁSICA DE SAÚDE

**Daniela Saes Sartorelli**

Orientador: Prof. Dr. Laércio Joel Franco

Dissertação de Mestrado apresentada em 07/02/2003

Ensaio clínico aleatorizado conduzido para avaliar o impacto de intervenção intensiva para mudança de estilo de vida em indivíduos com sobrepeso em um Centro de Saúde-Escola em São José do Rio Preto, Estado de São Paulo, Brasil.

Dos 259 voluntários (203 mulheres e 56 homens; idade entre 25 e 72 anos) que concordaram em participar do estudo, 104 foram elegíveis (83 mulheres e 21 homens), sendo distribuídos aleatoriamente em dois grupos: grupo intervenção (10 homens e 41 mulheres), com acompanhamento nutricional individualizado, e grupo controle (11 homens e 42 mulheres), que receberam somente orientações gerais e folheto explicativo sobre estilo de vida saudável. A avaliação da composição corporal, indicadores bioquímicos, consumo alimentar e estilo de vida - incluindo-se a prática de atividades físicas, foi realizada no princípio, após 6 meses

e 1 ano de estudo.

A intervenção nutricional consistiu de incentivo ao consumo de frutas, vegetais, óleo de oliva e produtos lácteos pobres em gordura, associados com a redução do consumo de gorduras saturadas e doces, bem como o estímulo à prática de atividades físicas por pelo menos 30 minutos ao dia.

O programa de intervenção mostrou-se efetivo na redução do consumo de calorias, gorduras totais, gorduras saturadas, colesterol, frequência de carnes, óleos/gorduras e doces. Além disso, observamos um incremento no consumo de fibra total da dieta, fibras de frutas e vegetais,  $\beta$ -caroteno, vitamina A, cálcio, frequência de consumo de frutas em geral, vegetais em geral, vegetais verde escuros e leite/derivados.

O programa mostrou-se viável em unidades básicas de saúde e efetivo na redução de peso, índice de massa corporal, pressão arterial, colesterol total, LDL colesterol, ácido úrico, homocisteína, aumento da prática de atividades físicas, contribuindo para a melhoria da qualidade de vida no grupo intervenção.

## **AVALIAÇÃO EM PROJETOS DE EDUCAÇÃO SEXUAL: UM ESTUDO SOBRE AVALIAÇÕES EM PROJETOS SÓCIO-EDUCATIVOS DESENVOLVIDOS COM ADOLESCENTES EM UMA ESCOLA PÚBLICA**

**Simone Rodrigues Neves**

Orientadora: Profa.Dra. Elisabeth Meloni Vieira

Dissertação de Mestrado apresentada em 10/02/2003

Embora projetos de educação sexual tenham sido bastante divulgados pela literatura científica, tanto da área de saúde quanto da área de educação, pouco tem sido discutido em relação à sua avaliação. O objetivo desta pesquisa é a análise das avaliações existentes em dois projetos sócio-educativos relacionados à educação sexual para adolescentes da Escola Básica da Universidade Federal de Uberlândia – ESEBA, desde a sua implantação em 1989. O método adotado foi qualitativo, utilizando-se como estratégias de coleta de dados observações de trabalho em grupo com adolescentes, investigação de registros existentes na escola acerca dos projetos e entrevistas semi-estruturadas realizadas com adolescentes e coordenadoras. O referencial teórico utilizado neste trabalho foi construído a partir da realização de um levantamento bi-

bliográfico acerca de avaliação em projetos de educação sexual. Utilizou-se o método de análise de conteúdo, com o uso de procedimentos sistemáticos de descrição de conteúdo das mensagens obtidas nas coletas de dados. As avaliações desses projetos consistem na maioria das vezes de avaliações orais, frequentemente presentes nos grupos de adolescentes, valorizando a auto-avaliação e avaliação do relacionamento interpessoal; e ainda, por observações cotidianamente realizadas pelas coordenadoras dos projetos. Os resultados obtidos evidenciam falhas na sistematização destas avaliações. Os participantes e coordenadoras dos projetos consideram que estes contribuem para a conscientização dos adolescentes frente à sua sexualidade e decisões da prática sexual, ajudam a superar preconceitos, a respeitar as diferenças e diversidade sexual, e na formação para a cidadania. Porém, as educadoras consideraram as avaliações desses projetos como falhas devido a ausência de registros e sua sistematização.

## **MARCADORES DO VÍRUS DA HEPATITE B EM PORTADORES DO HIV/AIDS ATENDIDOS NO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**Milta Gomes de Souza**

Orientador: Prof. Dr. Afonso Dinis Costa Passos

Dissertação de Mestrado apresentada em 14/02/2003

Esta investigação foi realizada no período de janeiro a agosto de 2002, com os seguintes objetivos: 1) estudar a prevalência dos marcadores sorológicos do vírus da hepatite B em portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana ou paciente com aids, maiores de dezoito anos de idade, acompanhados na Unidade Especial de Tratamento de Doenças Infecciosas (UETDI) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo-USP, em Ribeirão Preto; 2) estimar fatores de risco para a infecção pelo vírus B na população estudada. Participaram deste estudo 401 pacientes que, após consentimento escrito, foram submetidos a entrevista individual. Os exames referentes aos marca-

dores sorológicos da hepatite B foram realizados através de técnicas imunoenzimáticas de terceira geração, como parte da rotina de atendimento na UETDI. A cada participante foi aplicado questionário padronizado para obtenção das informações relativas às características pessoais e socioeconômicas, assim como fatores de risco para a hepatite B. A prevalência global de infecção pelo vírus da hepatite B foi de 40,9%, com 8,5% para HBsAg, 39,7% para o anti-HBc e 5,5% para o anti-HBs. Todas as variáveis, que na análise univariada mostraram um valor de  $p < 0,25$ , foram introduzidas em um modelo de regressão logística não condicional. As variáveis que demonstraram associação com a infecção pelo vírus B foram: idade, escolaridade de nível superior, antecedente de icterícia, tempo passado como presidiário, existência de parceiro homossexual e positividade para o marcador anti-HCV. A co-infecção HBV/HCV esteve presente em 20,4% dos participantes deste estudo.

## ANÁLISE CRÍTICA DO SIAB E DE SUA IMPLANTAÇÃO NA REGIÃO DE RIBEIRÃO PRETO, SÃO PAULO

**Anderson Soares da Silva**

Orientador: Prof. Dr. Milton Roberto Laprega

Dissertação de Mestrado apresentada em 25/02/2003

O Sistema de Informação de Atenção Básica (SIAB) foi criado para auxiliar o acompanhamento e avaliação das atividades realizadas pelos agentes comunitários de saúde, bem como do trabalho do médico de família e da enfermeira, agregando e processando os dados advindos das visitas domiciliares (MS/SIAB, 2000). Por ser o sistema de informação em saúde utilizado pelas equipes de saúde da família, o SIAB é uma ferramenta de extremo valor para o acompanhamento das famílias assistidas, assim como para o planejamento local, razão pela qual se propôs o presente estudo. Foram realizadas entrevistas com os indivíduos-chaves na cadeia de articulação desse sistema de informação em saúde (SIS) na região de Ribeirão Preto (agentes comunitários de saúde, enfermeiras e responsáveis técnicos das secretarias municipais de saú-

de e da DIR XVIII). Analisou-se o conhecimento geral do software, das fichas e relatórios, fluxo de envio dos dados, recebimento de treinamento adequado para utilização do SIAB, supervisão da qualidade de preenchimento das fichas e relatórios, dúvidas no manejo do SIAB e sua utilização para planejamento local e controle social. Concluiu-se, então, que o SIAB é um sistema de fácil manipulação, mas que apresenta algumas limitações já encontradas em outros SIS. As equipes utilizam-no pouco para subsidiar o planejamento e a tomada de decisões a nível local e não tem sido utilizado como ferramenta para o controle social. As instâncias regionais também não o utilizam para planejamento, funcionando estas apenas como repassadoras de dados para as secretarias estaduais de saúde e Ministério da Saúde. Então, a análise do SIAB foi de suma importância para o aprimoramento desse SIS, o que pode contribuir para futuras melhorias ou adaptações no programa, permitindo, assim, um melhor emprego do SIAB como ferramenta no trabalho das equipes de Saúde da Família.

## TOGINECOLOGIA

### EFEITOS DO ARSENITO NA MEIOSE, NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO PRÉ-IMPLANTAÇÃO E NA APOPTOSE EMBRIONÁRIA DE CAMUNDONGOS

**Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro**

Orientador: Prof. Dr. Rui Alberto Ferriani

Tese de Doutorado apresentada em 17/02/2003.

**Objetivo:** Como previamente identificamos efeitos deletérios do comprometimento da função mitocondrial e dos radicais livres do oxigênio na oogênese, investigamos os efeitos do arsenito na meiose, no desenvolvimento embrionário pré-implantação e na apoptose embrionária em camundongos.

**Material e Métodos:** Camundongas com 6 semanas de idade foram tratadas com baixa (0,16 mg) ou média dose de arsenito (0,32 mg), por meio de 7 injeções intraperitoneais, 1 a cada 2 dias, durante 14 dias. Os controles foram injetados com solvente. A incidência de anomalias meióticas, caracterizadas por anormalidades do fuso celular e/ou mal alinhamento

cromossômico, foi significativamente aumentada tanto nos oócitos *in vivo* ovulados, como nos *in vitro* maturados, oriundos dos animais tratados com arsenito. Foram detectadas reduções significativas das taxas de clivagem (24 horas de cultivo), de formação de mórula (72 h) e de desenvolvimento para blastocisto (96 h), nos embriões dos grupos tratados com arsenito. Apesar do número total de núcleos não ter diferido significativamente entre os blastocistos dos grupos controle e de tratamento, a percentagem de núcleos apoptóticos foi significativamente maior nos blastocistos derivados dos animais tratados com a dose média de arsenito.

**Conclusões:** Estes dados sugerem que o arsenito causa aberrações meióticas, que podem contribuir tanto para o comprometimento do desenvolvimento embrionário pré-implantação, como para a apoptose embrionária.