

## Resumos de Dissertações de Mestrado e Teses de Doutorado apresentadas na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP de julho a setembro de 2012

### Biologia Celular e Molecular

#### PROTEÍNAS DE MICRONEMAS DE *T. gondii*: NOVOS PAPÉIS ATRIBUÍVEIS A SUA INTERAÇÃO COM RECEPTORES DO TIPO TOLL

**Carla Duque Lopes**

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Roque Antunes Barreira

Tese de Doutorado apresentada em 13/09/2012

*Toxoplasma gondii*, como outros parasitos do Filo Apicomplexa, invadem ativamente as células do hospedeiro num processo, criticamente, dependente das proteínas de micronema (MICs). Proteína de micronema 1 (TgMIC1), 4 (TgMIC4) e 6 (TgMIC6) formam um complexo sobre a superfície celular, capaz de se ligar à célula hospedeira através de TgMIC1, uma adesina ligante de ácido siálico e TgMIC4, ligante de glicanas terminadas em galactose. Nosso grupo já havia revelado que a imunização com o complexo Lac+ (formado por TgMIC1 e TgMIC4) confere resistência contra o parasito. Entretanto, os mecanismos pelos quais essas proteínas ativam o sistema imune não são conhecidos. Nós objetivamos estudar se os efeitos desencadeados pelas proteínas de micronemas em células do sistema imune inato são mediados pela ativação de receptores do tipo toll. A produção de TgMIC1 e TgMIC4 recombinantes viabilizou a elucidação de atividades exercidas pelas MICs em células do sistema imune inato. A elevada produção de citocinas pró-inflamatórias e o padrão de ativação dessas células sugeriram que a resposta ao estímulo com as proteínas de micronemas dependesse de sua interação com receptores da superfície de APCs como TLR-2 e TLR-4. A interação foi determinada pelo uso de células HEK293 transfectadas com TLR-4 ou TLR-2 (homodímero ou heterodímeros TLR2/1 ou TLR2/6), em associação, ou não, com correceptores CD14 e CD36. Ativação de NFκB e produção de IL-8 foram usados como parâmetros para a detecção da ativação celular. Mostramos que tanto TgMIC1 como TgMIC4 de *T. gondii* ativam TLR-2/1, TLR-2/6 e TLR-4. Em ensaios, utilizando macrófagos de camundongos nocautes para MyD88, TLR-2 e TLR-4, mostramos que a produção de citocinas pró-inflamatórias foi reduzida em células MyD88<sup>-/-</sup>, TLR-2<sup>-/-</sup> e TLR-4<sup>-/-</sup>. Investigamos ainda se a natureza lectínica de TgMIC1 e TgMIC4 seria responsável pela ligação a TLRs, através de ensaios com TLR-2 mutados em seus sítios de N-glicosilação; TgMIC1, mas não TgMIC4, liga-se a N-glicanos de TLR-2. Estudos futuros são necessários para detalhar as interações estabelecidas por TgMIC4 e o seu glicocalvo em moléculas TLRs. Assim, em acréscimo à função de adesão, atribuímos a TgMIC1 e TgMIC4 o papel de interagir com TLRs e iniciar a ativação do sistema imune inato durante a invasão de *T. gondii*.

### Bioquímica

#### ANÁLISE DAS VIAS PKA/ AMPC E DO SISTEMA PROTEOLÍTICO UBIQUITINA-PROTEASSOMA COMO UMA POSSÍVEL NOVA SINALIZAÇÃO NO PROCESSO DE OOGÊNESE DO *Schistosoma mansoni*

**Érika Bueno de Carvalho Moreira**

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Rodrigues

Tese de Doutorado apresentada em 20/09/2012

A esquistossomose é uma das doenças parasitárias mais importantes em áreas tropicais e subtropicais, que acomete mais de 200 milhões de pessoas. Crescentes são os casos de linhagens de *Schistosoma mansoni* resistentes ao Praziquantel,

atual droga de escolha para seu tratamento, daí a necessidade em se buscar novas ferramentas no combate a esta parasitose. Em experimentos anteriores realizados em nosso laboratório, utilizando vermes adultos tratados com isobutilmetil xantina (IBMX), foi observado que o composto inibiu a atividade do proteassoma sendo esta inibição avaliada pelo aumento de proteínas ubiquitinadas nos parasitos mantidos na presença do IBMX. Essa redução da atividade do proteassoma, foi relacionada com uma desmontagem do complexo proteolítico, indiretamente mostrada pelo aumento da expressão da proteína de maturação do proteassoma (SmPOMP), a qual é conhecida como um marcador molecular indicando montagem de novas populações de proteassoma, bem como pela diminuição nos níveis de proteassomas 20S. Além das alterações que ocorreram no proteassoma, também foi observada uma drástica redução no número de ovos durante o cultivo *in vitro* de casais de *S. mansoni* sob o tratamento, sendo que essa redução, nas concentrações utilizadas, não causou a separação dos casais e nem alterou a viabilidade dos parasitos. Além disso, foi observado que a inibição da ovoposição é reversível. De posse desses resultados, e com auxílio dos crescentes trabalhos nesta área, no atual trabalho, procuramos entender o mecanismo da possível participação da via AMPc/PKA na inibição da ovoposição e atividade do proteassoma causada em vermes adultos de *S. mansoni* devido ao tratamento com IBMX, utilizando dois conhecidos inibidores da PKA (H89 e PKI 14-22) e conhecidos inibidor e agonista da adenilato ciclase: SQ 22536 e Foskolina, respectivamente. Continuando a avaliar o efeito de IBMX, utilizamos a metodologia da proteômica para analisar alterações na expressão proteica total do parasito frente ao tratamento, buscando entender o mecanismo de regulação da via AMPc/PKA, bem como identificar o envolvimento de outras prováveis vias de sinalização, para tentar entender um pouco mais da biologia deste parasito.

## Clínica Cirúrgica

### AVALIAÇÃO TEMPORAL DA HISTOLOGIA DA TRAQUEIA APÓS OCLUSÃO TRAQUEAL EM FETOS DE RATOS

**Rodrigo Melo Gallindo**

Orientador: Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto

Dissertação de Mestrado apresentada em 05/07/2012

**Introdução/Objetivo:** A traqueo-oclusão fetal (TO) aumenta a sobrevida de pacientes com hérnia diafragmática congênita grave. Casos de traqueomegalia após este procedimento foram relatados recentemente. Nós avaliamos as mudanças histológicas causadas pela TO na cartilagem e epitélio traqueais de fetos de ratos, em diferentes idades gestacionais.

**Material e Métodos:** Os fetos de ratos foram divididos em dois grupos: a) Controle externo (CE) e b) Grupo de intervenção, composto de ratos operados nos dias gestacionais (DG) 18,5 (termo = 22 dias), o qual foi dividido em três: 1) TO, 2) Controle interno e 3) Sham (manipulados, mas não operados). Os dados morfológicos do peso corporal (PC), peso pulmonar total (PP) e a razão PP/PC foram coletados e medidos nos DG 19,5, 20,5 e 21,5. As amostras de traqueia foram processadas histologicamente e a espessura epitelial (EE), espessura da cartilagem (EC) e espessura total da traqueia (ET) foram medidas em cada DG.

**Resultados:** O grupo TO mostrou um aumento na razão PP/PC ( $p < 0,001$ ). Histologicamente, este grupo apresentou uma maior EE ( $p < 0,05$ ) e menores EC ( $p < 0,05$ ) e ET ( $p < 0,001$ ). Estas diferenças foram mais proeminentes nos DG 20,5 e 21,5.

**Conclusão:** A TO levou à expansão pulmonar e mudou a morfologia traqueal, aumentando a EE e diminuindo consideravelmente a ET. Essas mudanças poderiam explicar as alterações funcionais na parede traqueal de fetos humanos submetidos à TO.

### A RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DA LEP, LEPR, DO IGF1E DA IL10 COM OS MICRORNAS: MIR-27A, MIR-27B, MIR- 143 E MIR-145 NA OBESIDADE MÓRBIDA DO TIPO CENTRAL

**Renata Viesti Advincula Collares**

Orientador: Prof. Dr. Wilson Salgado Junior

Dissertação de Mestrado apresentada em 17/07/2012

Obesidade central é caracterizada pelo acúmulo de gordura no tecido adiposo ocasionado pelo aumento do tamanho e do número de adipócitos. É um componente da síndrome metabólica juntamente com a resistência a insulina,

diabetes mellitus tipo 2, hipertensão, doenças cardiovasculares e dislipidemia. Esse tipo de obesidade é considerado um estado inflamatório crônico, devido o aumento de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo. Por sua vez, o tecido adiposo é formado por vários tipos celulares, entre eles, os macrófagos, pré-adipócitos e adipócitos; além de ser reservatório de energia, sabe-se hoje, que é um órgão endócrino devido à secreção de substâncias, como a leptina, IL-10 e IGF-1. A leptina atua por meio de receptores específicos que estão localizados no hipotálamo e em órgãos periféricos, e tanto este hormônio como o IGF-1 participam da regulação do peso corpóreo. A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, sendo na obesidade a principal inibidora da produção de citocinas pró-inflamatórias, e suas concentrações encontram-se alteradas na obesidade com presença de síndrome metabólica. Assim como a síndrome metabólica, a obesidade central é uma doença multifatorial, e recentes estudos sugerem sua associação com a expressão de microRNAs. Os microRNAs são pequenos RNAs não codificadores de proteínas que tem como função a regulação da expressão gênica. Como a obesidade é um problema de saúde pública, que aumenta globalmente a cada ano, afetando todas as idades e grupos socioeconômicos, estudar eventos moleculares, relacionando os microRNAs específicos com substâncias que encontram-se alterada na presença de obesidade mórbida do tipo central, justificam este trabalho. Foi verificado em amostras de gordura subcutânea abdominal, epíplon, mesentério e fígado de indivíduos com obesidade mórbida do tipo central, incluindo homens com circunferência abdominal maior que 102 cm e mulheres com circunferência abdominal maior que 88 cm, e indivíduos sem obesidade, a expressão dos microRNAs: miR-143, miR-145, miR-27<sup>a</sup> e miR-27b e dos genes leptina, receptores de leptina, IGF-1 e IL-10, por PCR em tempo real e correlacionar as expressões. Encontramos que a LEP está mais expressa apenas na gordura subcutânea dos obesos, assim como o IGF1, que mostrou estar mais expresso também no epíplon dos controles. Encontramos também que o microRNA-27a está mais expresso apenas na epíplon dos obesos, não havendo diferença de expressão entre os obesos e os controles nos outros genes e microRNAs envolvidos no estudo.

## PERFIL DE EXPRESSÃO DE MICRORNAS E GENES ASSOCIADOS AO MECANISMO DE APOPTOSE EM MENINGIOMAS COM E SEM DELEÇÃO DO CROMOSSOMO 22Q

**Marina Augusto Silveira**

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli  
Dissertação de Mestrado apresentada em 20/07/2012

**Introdução:** Os meningiomas são tumores intracranianos que se originam das células meningoteliais da aracnóide, com incidência anual de aproximadamente seis a cada 100.000 pessoas, sendo mais comum em adultos, mulheres e após a quinta década de vida. Pouco se sabe sobre os eventos genéticos que são importantes na patogenia molecular e sobre a progressão da malignidade dos meningiomas. O evento genético mais comum e encontrado em aproximadamente 60% dos casos é a deleção no cromossomo 22q. O entendimento da iniciação e do crescimento dos meningiomas a nível molecular, pode ajudar a definir alvos de terapia molecular. A formação de tumores cerebrais é um processo complexo que envolve um acúmulo de alterações genéticas. Os MicroRNAs (miRNAs ou miRs) são uma classe de pequenos RNAs não codificadores que regulam expressão gênica, com um papel crucial no desenvolvimento do câncer e recentemente, o envolvimento dos miRNAs na fisiopatologia do câncer cerebral vem se destacando. Considerando-se que a deleção no cromossomo 22 é a alteração mais freqüente neste tipo de tumor, as vias moleculares que resultam no comportamento cromossômico anormal durante a progressão dos meningiomas estão relacionados a uma série de complexas interações que ainda precisam ser bem caracterizadas, uma delas é a possível relação entre esta alteração cromossômica e a expressão de genes e dos microRNAs.

**Objetivos:** Avaliar perfis diferenciais de expressão de genes e microRNAs entre os meningiomas que apresentam deleção do cromossomo 22 e compará-los aos meningiomas que não apresentam esta deleção.

**Pacientes e Métodos:** Para este estudo foram utilizadas 90 amostras de meningiomas grau I. Os casos foram selecionados com base em diagnósticos clínicos e histopatológicos de meningiomas grau I, segundo critérios da OMS. Como controles foram utilizadas amostras de aracnóide obtidas de pacientes submetidos à cirurgia de aneurisma. Para determinar a deleção do cromossomo 22, foi utilizada a hibridização in situ fluorescente (FISH), seguido por uma análise global da expressão gênica por microarrays de genes e miRNAs e posterior validação dos resultados por PCR em tempo real.

**Resultados:** Inicialmente foram realizadas análises de FISH para 50 amostras de meningiomas grau I visando a obtenção dos grupos com e sem deleção do cromossomo 22. Nos resultados obtidos, 31 amostras (62%) apresentaram deleção no cromossomo 22 e 19 amostras (38%) não apresentaram deleção no cromossomo 22. Pela técnica de microarrays foram encontrados 2055 genes diferencialmente expressos quando comparamos meningiomas com o grupo controle, sendo que 761 estavam hipoeexpressos e 1294 estavam hiperexpressos. Quando observamos meningiomas com deleção no

cromossomo 22q comparados com meningiomas sem deleção no cromossomo 22q, 1401 genes apresentaram-se diferencionalmente expressos, sendo que 976 estavam hipoexpressos e 425 hiperexpressos. Na análise de microarrays de microRNAs constatamos que 36 microRNAs estão alterados na comparação entre meningiomas com o grupo controle, sendo que 14 microRNAs estão hipoexpressos e 22 hiperexpressos. Ao analisarmos a comparação entre o grupo de meningiomas com deleção do cromossomo 22q em relação o grupo de meningiomas sem deleção do cromossomo 22q, encontramos 37 microRNAs alterados sendo que 17 encontravam-se hipoexpressos e 20 hiperexpressos. Na validação por PCR em tempo real o gene SLPI apresentaram-se hiperexpresso apenas nos meningiomas sem deleção. Também conseguimos identificar microRNAs hipoexpressos nos meningiomas em relação ao grupo controle: miR-326 e miR-1183.

## **CORRELAÇÃO ENTRE A ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA INDUZIDA PELO LASER E AS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NA ISQUEMIA E REPERFUSÃO RENAL EM RATOS**

**Marcelo Ferreira Cassini**

Orientador: Prof. Dr. Silvio Tucci Junior

Tese de Doutorado apresentada em 20/09/2012

**Introdução:** O transplante renal é amplamente reconhecido como a melhor forma de tratamento para os pacientes que necessitam de terapia de substituição renal. Frequentemente a equipe transplantadora se depara com a difícil questão de determinar se órgãos, provenientes de doadores cadavéricos marginais ou em parada cardíaca, estão aptos para serem transplantados. É difícil quantificar a intensidade do dano provocado pela isquemia no enxerto a ser utilizado, especialmente se o doador apresentou quadro de instabilidade hemodinâmica com queda significativa da perfusão tecidual e aumento do risco de diminuir a função do enxerto e afetar adversamente sua sobrevivência. Desta forma torna-se justificável a utilização da técnica de espectroscopia de fluorescência induzida pelo laser, na tentativa de se avaliar a correlação entre os seus achados e o grau de lesão histológica renal experimental, uma vez que se trata de um método objetivo, não invasivo, rápido e em tempo real que, futuramente, pode ser aplicada nos transplantes renais em humanos.

**Objetivos:** Avaliar a correlação entre os dados da espectroscopia de fluorescência induzida pelo laser e alterações histológicas na isquemia e reperfusão renal em ratos, e se existe diferença significativa na leitura da espectroscopia entre os polos superior, inferior e o terço médio.

**Materiais e Métodos:** Foram utilizados 33 ratos (*Rattus norvegicus*) machos adultos da linhagem Wistar que, depois de anestesiados, tiveram seus rins esquerdos abordados. Inicialmente os rins foram submetidos à detecção da espectroscopia de fluorescência dos polos superiores, inferiores e terços médios. As excitações foram geradas por lasers com comprimentos de onda de 408, 442 e 532 nm. Em seguida os pedículos renais esquerdos foram dissecados, isolados e clampados com auxílio de mini-pinça vascular. Então, os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos isquêmicos de 30, 60 e 120 minutos de isquemia quente. Em cada um dos grupos, os rins foram novamente analisados pela espectroscopia de fluorescência, bem como após 5 minutos de reperfusão, utilizando novamente feixes excitatórios com os mesmos comprimentos de onda, nas mesmas regiões renais. Posteriormente os rins esquerdos foram coletados e enviados para estudo histológico.

**Resultados:** O tempo de isquemia mostrou forte influência com a graduação histológica. Com 30 minutos de isquemia, nenhum comprimento de onda (408, 442 e 532 nm) apresentou correlação com a graduação histológica ( $p = 0,81$ ;  $p = 0,11$ ;  $p = 0,21$ , respectivamente). Com 60 minutos de isquemia, o laser de excitação de 532 nm (na fase de reperfusão) apresentou coeficiente de correlação negativa significativa ( $r = -0,61$ ) com a graduação histológica. Na isquemia de 120 minutos, o laser com 442 nm de comprimento de onda (na fase de reperfusão) mostrou o coeficiente de correlação negativa significativa ( $r = -0,73$ ) com a graduação histológica. O terço médio renal apresentou média estatística superior à dos polos ( $p < 0,001$ ) na leitura da espectroscopia de fluorescência.

**Conclusões:** Há correlação entre os dados da espectroscopia de fluorescência induzida pelo laser e as alterações histológicas na isquemia renal em ratos, sendo necessário, durante a investigação, analisar apenas o terço médio renal.

## Farmacologia

### PAPEL DA MITOCÔNDRIA NA GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO INDUZIDA PELA TESTOSTERONA EM CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR EM CULTURA

**Rhéure Alves Moreira Lopes**

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia

Dissertação de Mestrado apresentada em 19/07/2012

Os mecanismos pelos quais a testosterona (testo) induz efeitos no sistema cardiovascular não são inteiramente elucidados, mas podem envolver geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). A mitocôndria representa importante fonte de EROs e também alvo para os efeitos danosos de EROs. Aumento na geração de EROs ativa vias de sinalização que culminam em morte celular. Recentemente nosso laboratório mostrou que a testo induz geração de EROs em células de músculo liso vascular (CMLV). No presente estudo, hipotetizamos que testo induz geração de EROs via mitocôndria, culminando na ativação de caspase 3 e apoptose de CMLV. CMLV em cultura, provenientes do mesentério de ratos *Wistar*, foram pré-incubadas por 30 min com flutamida (flu, 10<sup>-5</sup> mol/L, antagonista de receptor para andrógeno), CCCP (10<sup>-6</sup> mol/L, agente desacoplador mitocondrial), MnTmPyP (3x10<sup>-5</sup>mol/L, mimético da SOD) ou veículo e, em seguida, estimuladas com testo (10<sup>-7</sup> mol/L, 2 a 6 h). A geração de EROs foi mensurada por ensaio com lucigenina e com 5-(6)-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato, acetil ester (CM-H2DCFDA); apoptose celular, por fluorescência para 4, 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e calceína; expressão proteica de procaspases 3 e 8 e caspases 3 e 8, por immunoblotting. Para analisar a expressão do citocromo C, Bax e Bcl-2 por immunoblotting, foi realizado fracionamento celular para obtenção de proteínas do citoplasma e da mitocôndria. Os resultados são expressos em unidades arbitrárias e valores com p<0,05 foram considerados como significativos. A testo aumentou a geração de EROs [(2 h) (url/μg de proteína) 162,60 ± 15,95 vs 100,00 ± 0,02 (veículo) n=7], efeito abolido por CCCP (90,43 ± 14,94 n=4), MnTmPyP (26,24 ± 11,61 n=4) e flu (80,11 ± 13,28 n=4). Testo induziu clivagem de caspase-3 [(6hs) 166,2 ± 11,19 vs 100,00 ± 0,02 (veículo) n=9], efeito abolido por flu (122,70 ± 10,60 n=4), MnTmPyP (61,78 ± 2,52 n=3) e CCCP (71,58 ± 13,19 n=3). Testo aumentou a fluorescência para DAPI [146,90 ± 8,23 (2 h), 192,1 ± 10,12 (6 h) vs 100,00 ± 0,01 n=4-5] e diminuiu a fluorescência para calceína [34,42 ± 6,41 (2 h) vs 100,0 ± 0,01 n=7], ambos indicativos de apoptose celular. Apesar da testo induzir clivagem de caspase 3 e apoptose de CMLV, a razão de proteínas Bax (pró-apoptótica)/Bcl-2 (anti-apoptótica) na fração mitocondrial foi reduzida [65,10 ± 8,78 (6hs) vs 100,00 ± 0,01 (veículo) n=3] e a testo não induziu translocação do citocromo C da mitocôndria para o citoplasma [70,05 ± 26,48 (2 h), 110,60 ± 46,28 (6 h) vs 100,0 ± 0,02 (veículo) n=4]. Testo induziu clivagem de caspase 8 [161,10 ± 13,47 (6 h) vs 100,0 ± 0,01 n=6].

**Em conclusão**, a testo induz apoptose de CMLV por mecanismos que envolvem geração de EROs via mitocondrial, receptor para andrógeno e ativação de mecanismos da via apoptótica extrínseca.

### ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO CYP3A5 E DA PGP COM A FARMACOCINÉTICA DO TACROLIMUS, NEFROTOXICIDADE AGUDA E REJEIÇÃO DO ENXERTO APÓS TRANSPLANTE RENAL

**Diego Alberto Ciscato Cusinato**

Orientador: Prof.Dr. Eduardo Barbosa Coelho

Dissertação de Mestrado apresentada em 1º/08/2012

Tacrolimus (TAC) é um fármaco imunossupressor muito utilizado na prevenção de rejeição aguda após o transplante de órgãos. Essa droga apresenta um índice terapêutico muito baixo e grande variabilidade intra e interindividual, sendo necessário programas de monitorização terapêutica para se otimizar a eficácia e limitar a toxicidade. O TAC é um fármaco substrato do CYP3A5 e transportado pela proteína de efluxo PGP e acredita-se que o polimorfismos genéticos (SNPs) destas proteínas estejam relacionados a alta variabilidade farmacocinética desta droga. Neste estudo, investigamos a influência dos polimorfismos destas proteínas sobre alguns parâmetros farmacocinéticos do TAC e também, na incidência de lesões renais e rejeição em receptores de transplante renal. Pacientes recebendo TAC a no mínimo 12 meses (n=108) foram genotipados (PCR real time) para os polimorfismos do CYP3A5\*3 (rs776746) e do gene ABCB1 1236C>T (rs1128503),

2677G>T/A (rs2032582) e 3435C>T (rs1045642). Dados da concentração plasmática de vale (Co; ng/mL), dose diária normalizada (mg/dia por Kg do paciente) e a concentração plasmática do fármaco normalizada pela dose ingerida (Co/dose, ng/mL por mg/dia por kg do paciente) de TAC foram obtidos dos prontuários médicos ao longo de três anos após o transplante renal. O desfecho clínico foi analisado avaliando-se a curva de sobrevida do enxerto, a função renal obtida pelo clearance de creatinina (Equação de Cockcroft-Gault), e desenvolvimento de lesões renais e rejeição aguda e crônica com diagnósticos estabelecidos mediante suspeita clínica e confirmados pela avaliação das biópsias quanto a presença de necrose tubular aguda (NTA) e nefropatia crônica do enxerto (NFC) de acordo com a classificação de BANFF 07. Os haplótipos do gene ABCB1 foram inferidos estatisticamente utilizando o software PHASE (version 2.1). Diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Não observamos desvios em relação ao esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg em nossa população para nenhum dos genes estudados. Frequências alélicas destes polimorfismos (6986G 74%; 1236C 60%; 3435C 59% and 2677G 64%) e haplótipos (49% 2677G-3435C-1236C e 31% 2677T-3435T-1236T) foram consistentes com outros estudos realizados na população brasileira. Indivíduos portadores de ao menos um alelo \*1 do gene CYP3A5 necessitavam de maiores doses de TAC para obter níveis plasmáticos semelhantes aos dos indivíduos homocigotos para o alelo \*3 ( $0,09 \pm 0,03$  vs.  $0,06 \pm 0,03$ ; mg/dia/kg;  $p < 0,001$ ). Ao final do primeiro ano de transplante pacientes CYP\*3/\*3 apresentavam praticamente o dobro da razão Co/dose quando comparados com os pacientes CYP\*1/\*1 ( $144,60 \pm 67,29$  vs.  $70,44 \pm 56,05$  ng\*mL<sup>-1</sup>/mg\*kg<sup>-1</sup>/dia;  $p < 0,001$ ). Observou-se semelhante em relação quando indivíduos portadores dos alelos e haplótipo variante da PGP foram avaliados. Não encontramos associações significativas entre os genótipos e a sobrevida do enxerto ou clearance de creatinina. No entanto, observamos que os pacientes portadores do haplótipo GCC apresentaram maior incidência de desenvolvimento de NFC. Este estudo confirma o efeito dos polimorfismos do CYP3A5 e, em menor grau da PGP na farmacocinética do TAC. No entanto, não encontramos associações entre esses polimorfismos e desfechos clínicos significantes, sugerindo que a genotipagem para o CYP3A5 ou ABCB1 ainda não deva ser incorporada na prática clínica como uma ferramenta para o manejo de transplante renal.

## **PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES SEROTONÉRGICOS DO SUBTIPO 5-HT<sub>2C</sub> DO HIPOCAMPO DORSAL DE RATOS NA ANSIEDADE EXPERIMENTAL**

**Ana Beatriz Sant'ana do Nascimento**

Orientador: Prof. Dr. Hélio Zangrossi Júnior

Dissertação de Mestrado apresentada em 03/08/2012

Estudos com microinjeções de drogas vêm sendo realizados na tentativa de se compreender a participação da neurotransmissão serotoninérgica do hipocampo na modulação de comportamentos defensivos relacionados à ansiedade. Nesse sentido, observou-se que a ativação dos receptores do tipo 5-HT<sub>1A</sub> do hipocampo dorsal (HD) promoveu efeito do tipo ansiogênico sobre a resposta de esquiva inibitória, sem alterar a resposta de fuga, em ratos submetidos ao labirinto em T elevado (LTE). Essa alteração seletiva na resposta de esquiva inibitória sustenta a hipótese da participação do hipocampo na fisiopatologia do transtorno de ansiedade generalizada, uma vez que, as respostas defensivas de esquiva inibitória e fuga, expressas no LTE, têm sido relacionadas respectivamente ao transtorno de ansiedade generalizada e ao transtorno do pânico. Além de receptores do tipo 5-HT<sub>1A</sub>, destaca-se no HD a presença de receptores do tipo 5-HT<sub>2C</sub>. Tem sido observado que a estimulação desses últimos em áreas límbicas associadas à ansiedade, como a amígdala, promove efeito do tipo ansiogênico em diferentes modelos animais de ansiedade. Porém, ainda é desconhecida a participação desses receptores presentes no HD sobre as resposta de esquiva inibitória e fuga, geradas no LTE. Assim, o presente estudo procurou avaliar a participação dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT<sub>2C</sub> na modulação de respostas defensivas relacionadas à ansiedade generalizada e ao transtorno do pânico. Os resultados mostram que injeções bilaterais intra-HD dos agonistas de receptores 5-HT<sub>2C</sub> MK-212 ou RO-600175 prejudicaram a aquisição da resposta de esquiva inibitória, em ratos testados no LTE, indicando um efeito do tipo ansiolítico. Por outro lado, a administração do antagonista de receptores 5-HT<sub>2C</sub> SB-242084 promoveu efeito oposto sobre essa mesma resposta. Adicionalmente administração do agonista preferencial de receptores 5-HT<sub>2A</sub> DOI não foi capaz de promover efeito em nenhuma das doses utilizadas. Nenhum dos tratamentos empregados alterou a resposta de fuga no LTE. O efeito ansiolítico da ativação dos receptores 5-HT<sub>2C</sub>, bem como o efeito ansiogênico resultante do seu bloqueio, foram confirmados no teste do beber punido de Vogel. Em suma, nossos resultados sugerem que os receptores do tipo 5-HT<sub>2C</sub> do hipocampo dorsal estão envolvidos na modulação de comportamentos defensivos relacionados ao transtorno de ansiedade generalizada, mas não ao transtorno do pânico.

## O PAPEL DA ALDOSTERONA NO DESENVOLVIMENTO DAS LESÕES TUBULOINTERSTICIAIS EM RATOS HIPERTENSOS 2R-1C

**Junya de Lacorte Singulani**

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Barbosa Coelho

Dissertação de Mestrado apresentada em 06/08/2012

A aldosterona participa da progressão das doenças renais em modelos experimentais e ensaios clínicos. Considerando que o modelo de hipertensão renovascular 2 rins-1 clipe (2R-1C) é caracterizado pela atividade elevada do sistema renina-angiotensina-aldosterona, o objetivo desse trabalho foi avaliar o papel da aldosterona na lesão renal presente nesse modelo através do bloqueio do receptor mineralocorticóide (RM) com espironolactona. Ratos *Wistar* foram submetidos ao procedimento cirúrgico para colocação de um clipe de prata na artéria renal esquerda e após 2 semanas do desenvolvimento da hipertensão renovascular 2R-1C, foram divididos em 3 grupos sendo que para o primeiro grupo nenhuma droga foi administrada (n=8), para o segundo grupo foi administrado por via oral 20 mg/Kg/dia de espironolactona (n=10) e para o terceiro, 7 mg/Kg/dia de amilorida (n=12). O peso e a pressão sistólica foram monitorados semanalmente. Coletas de urina (durante 24 h) e sangue foram realizadas em 3 períodos distintos: antes do procedimento cirúrgico; na 2ª semana após a cirurgia (antes do início do tratamento) e na 6ª semana após a cirurgia (após o término do tratamento). As amostras foram utilizadas para análise de creatinina, osmolalidade, sódio, potássio e albuminúria. Ao final do experimento, os rins foram perfundidos e pesados. Análise histológica para avaliar a extensão das alterações tubulointersticiais foi realizada. Além disso, marcadores de inflamação (ED-1 e p-JNK), de produção de matriz extracelular (fibronectina), de miofibroblastos (á-actina de músculo liso) e de transdiferenciação tubular (vimentina) na região tubulointersticial cortical e de lesão nos podócitos (desmina) foram avaliados. O tratamento com espironolactona foi capaz de atenuar o aumento na excreção de albumina, o aumento na concentração plasmática de creatinina e a redução na depuração de creatinina. No rim clipado dos ratos 2R-1C, as lesões tubulointersticiais e podocitárias, demonstradas pelos marcadores estudados, foram discretas e a terapia com espironolactona ou amilorida não foi capaz de minimizá-las. Por outro lado, no rim não clipado, a administração de espironolactona atenuou o aumento de matriz extracelular e a lesão nos podócitos. Os efeitos benéficos da espironolactona ocorreram independentes da redução na pressão sanguínea e podem ser em parte, dependentes do bloqueio do canal epitelial de sódio (ENaC). Tais efeitos trazem perspectiva para espironolactona como uma ferramenta terapêutica a ser explorada em pacientes com estenose de artéria renal.

## EFEITOS DA INIBIÇÃO DAS METALOPROTEINASES DA MATRIZ EXTRACELULAR NA DISFUNÇÃO VENTRICULAR DIREITA CAUSADA POR EMBOLIA PULMONAR AGUDA EM CARNEIROS

**Evandro Manoel Neto-Neves**

Orientador: Prof. José Eduardo Tanus dos Santos

Tese de Doutorado apresentada em 12/09/2012

As metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) podem estar envolvidas na lesão cardíaca e disfunção ventricular direita induzida por embolia pulmonar aguda (EPA). O objetivo do estudo foi avaliar se o pré-tratamento com doxiciclina (inibidor não seletivo de MMPs) poderia proteger contra o desenvolvimento de disfunção ventricular direita associada à EPA experimental em carneiros.

Carneiros anestesiados receberam pré-tratamento com doxiciclina (10 mg/kg por via intravenosa) ou salina. EPA foi induzida por infusão de coágulos autólogos (350 mg/kg) no átrio direito. Decorridos 30 e 120 minutos após EPA (ou infusão de salina em animais não embolizados) os animais foram estimulados com dobutamina (1, 5 e 10 µg/kg/min, 5 minutos para cada dose) ou receberam salina. A indução da EPA aumentou a pressão média da artéria pulmonar e do índice de resistência vascular pulmonar em aproximadamente 185% no grupo EPA (ambos P<0,05). O pré-tratamento com doxiciclina atenuou a hipertensão pulmonar (P<0,05). As avaliações ecocardiográficas mostraram que a indução de EPA produziu aumento do diâmetro da câmara ventricular direita (de 10.7±0.8 para 18.3±1.6 mm, P<0,05) e perda da responsividade cardíaca à dobutamina (viabilidade cardíaca), essas mudanças foram atenuadas pelo tratamento com doxiciclina (P<0,05).

Aumentos na expressão de MMP-9, na atividade gelatinolítica, no estresse oxidativo e diminuição na expressão de MMP-2 foram observados no ventrículo direito (VD) de animais embolizados (P<0,05). Embora o pré-tratamento com doxiciclina não tenha produzido mudanças significativas na expressão das MMP-2 e -9, reduções foram observadas na atividade gelatinolítica e na produção de estresse oxidativo no VD (P<0,05). A concentração de troponina cardíaca I sérica

e a degradação de titina no VD, marcadores de lesão cardíaca, aumentaram após EPA e esses aumentos foram atenuados pelo pré-tratamento com doxiciclina ( $P < 0,05$ ). A indução de EPA foi associada à dissolução e ruptura das fibras colágenas no VD. Além disso, o pré-tratamento com doxiciclina evitou a diminuição do diâmetro dos miócitos e o acúmulo de colágeno no VD observados após EPA ( $P < 0,05$ ).

Concluindo, nossos resultados sugerem que as MMPs participam da lesão cardíaca e da disfunção ventricular direita induzida por EPA. Consistente com essa sugestão, a inibição das MMPs com doxiciclina atenuou a hipertensão pulmonar e preservou a função cardíaca durante EPA.

## Fisiologia

### CARACTERIZAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DOS NEURÔNIOS DO NIDOPÁLIO CAUDOMEDIAL, UMA ÁREA RESPONSÁVEL PELO PROCESSAMENTO AUDITIVO EM AVES CANORAS

**André Luiz A. Dagostin**

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Mauricio Xavier Leão  
Tese de Doutorado apresentada em 27/07/2012

Aves canoras aprendem a vocalizar de maneira similar àquela dos humanos. Dentro do circuito auditivo das aves, o nidopálio caudomedial (NCM) é o núcleo telencefálico responsável pelo reconhecimento do canto da espécie e também muito provavelmente responsável pelo armazenamento do canto do tutor aprendido. De fato, esses neurônios respondem ao canto da própria espécie (observado pela expressão de zenk), ao passo que quando cantos de outras espécies ou outros sons são apresentados ao animal, os neurônios do NCM não respondem. Observamos no NCM que estes neurônios podem se comportar de três maneiras distintas quanto ao disparo de potenciais de ação, disparando uma vez apenas (neurônios fásicos), disparando algumas vezes e depois cessam (neurônios acomodativos) e ininterruptamente (neurônios tônicos). Todos esses tipos de neurônios podem expressar mRNA da enzima glutamato descarboxilase (GAD), caracterizando-os como neurônios GABAérgicos. Neurônios fásicos apresentam baixa resistência de entrada ( $R_e$ ), menor constante de tempo de membrana e maior reobase (quantidade de corrente injetada a partir do repouso neuronal necessária para disparo de um potencial de ação) do que neurônios acomodativos e tônicos. Neurônios tônicos expressam uma corrente ativada por hiperpolarização sensível a CsCl 5 mM, enquanto neurônios fásicos e acomodativos apresentaram uma maior expressão de uma corrente sensível a BaCl<sub>2</sub> 0,2 mM. Todos os neurônios expressam similarmente correntes de potássio retificadoras retardadas sensíveis ao TEA. O bloqueio de correntes de potássio sensíveis à voltagem tanto por TEA, 4-aminopiridina e dendrotoxina não alteram o padrão fásico de disparo, apenas o bloqueio de correntes de vazamento por BaCl<sub>2</sub> 5 mM o faz. Além disso, demonstramos, através de estudos de correntes evocadas por estímulos no mesopálio caudomedial (CMM), que os neurônios do NCM e CMM se conectam, produzindo tanto correntes glutamatérgicas como GABAérgicas no NCM em resposta a estímulos elétricos aplicados no CMM. As correntes glutamatérgicas do NCM são potenciadas pelo bloqueio dos receptores GABA<sub>A</sub> pela bicuculina, mostrando uma forte inibição GABAérgica da rede glutamatérgica no NCM.

### ATLAS ESTEREOTÁXICO DO TELENCEFALO DO PEIXE PIAUÇU *Leporinus macrocephalus*. PARTICIPAÇÃO DO TELENCEFALO DORSOLATERAL NA CONSOLIDAÇÃO DO MEDO CONDICIONADO

**Augusto Barbosa Junior**

Orientadora: Profa. Dra. Anette Hoffmann  
Tese de Doutorado apresentada em 27/07/2012

Em reptéis, pássaros e mamíferos diferentes tipos de aprendizado, incluindo o medo condicionado, são dependentes do hipocampo. Similar aos vertebrados terrestres, os peixes apresentam a habilidade preditiva de associar estímulos condicionados e incondicionados exibindo elevado nível de aprendizado. Além disso, evidências substanciais sugerem que a capacidade cognitiva em peixes é dependente do prosencéfalo, particularmente do telencefalo dorsolateral (DI) que supostamente é homóloga ao hipocampo. Estudos recentes tem demonstrado que o telencefalo DI encontra-se envolvido com o aprendizado espacial em peixes, porem nada se sabe sobre sua participação no medo condicionado. Assim, o presente trabalho investigou a importância do telencefalo DI na consolidação do medo condicionado em um teleosteo



(piaçu, *Leporinus macrocephalus*). Primeiro foi criado um atlas do telencéfalo com parâmetros estereotáticos que permite a localização de estruturas telencefálicas, afim de, facilitar intervenções cirúrgicas. O experimento seguinte propôs a validar a tarefa de medo condicionado que consiste na exposição simultânea do animal a um estímulo visual (luz azul) e a substância de alarme de co-específico (CAS que foi o estímulo incondicionado empregado e que induz *freezing* comportamental no piaçu). Concomitantemente, analisamos a expressão de *c-fos* no bulbo olfatório e no telencéfalo 90 minutos após o teste. Por último investigamos se lesões no telencéfalo Dl e Dm compromete a consolidação do medo condicionado. O atlas foi construído usando um parâmetro de referencia externo (quarto par de eletroceptores cefálicos) e representa uma ferramenta útil para localização precisa de estruturas telencefálicas sem expor uma grande superfície cerebral. A análise da citoarquitetura do telencéfalo do piaçu foi baseada em seções transversais coradas pelos métodos de Nissl e da AChE. Rostralmente, o encéfalo do piaçu é composto por um par de bulbos olfatórios sesseis acoplados aos hemisférios telencefálicos. Fora reconhecidas 16 estruturas telencefálicas que foram classificadas em 2 áreas principais: *pallium* ou *area dorsalis* e *subpallium* ou *area ventralis*. O *pallium* é composto por 8 estruturas que estão organizadas em 5 zonas principais: **dorsomedial** (divisões Dmr e Dmc); **dorsocentral** (Dc); **dorsoposterior** (Dp); **dorsodorsal** (Dd) e; **dorsolateral** (divisões Dld, Dlv-d e Dlv-v). O *subpallium* apresenta 6 núcleos periventriculares: **ventrodorsal** (Vdd, Vdi e Vdv); **ventroventral** (Vv); **ventrosupracomissural** (Vs); e **poscomissural** (Vp); e 2 populações celulares migradas: **ventrolateral** (Vl) e **ventrointermediário** (Vi). Animais experimentais (n=10) treinados com luz e CAS apresentam o comportamento de *freezing* e mostram redução significativa dos parâmetros locomotores quando expostos ao contexto do aprendizado (teste). Concomitantemente, foi observado um significativo aumento na expressão de *c-fos* no bulbo olfatório e no telencéfalo 90 minutos após o teste. Adicionalmente, nossos resultados mostraram que animais sham (n=7) e com ablação no telencéfalo Dm (n=7) apresentam o comportamento de *freezing* e mostram redução significativa dos parâmetros locomotores durante o teste. Entretanto, animais com ablação do telencéfalo Dl (n=7) demonstram comprometimento na consolidação do medo condicionado, similar ao observados em vertebrados terrestres com lesão hipocampal. Esses achados trazem fortes indícios de que o telencéfalo Dl é requerido para o processo de consolidação do medo condicionado em peixes, dando suporte para hipótese de homologia com o hipocampo dos mamíferos.

## IMPORTÂNCIA DO TECIDO ADIPOSEO MARROM NA ATIVAÇÃO DA TERMOGÊNESE INDUZIDA PELA INJEÇÃO CENTRAL DO C75, UM INIBIDOR DA ÁCIDO GRAXO SINTASE

**Priscila Cassolla**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes

Tese de Doutorado apresentada em 13/08/2012

C75, um inibidor sintético da ácido graxo sintase, causa anorexia e perda de peso em roedores, mas os mecanismos envolvidos com esses efeitos ainda não são totalmente conhecidos. A hipótese testada nesse trabalho foi que o tecido adiposo marrom (TAM), um órgão com importante função no controle da termogênese, poderia estar envolvido nos efeitos mediados pelos inibidores da ácido graxo sintase. Para isso, ratos *Wistar* foram submetidos ao implante de cânula no ventrículo lateral direito seguido, ou não, pela desnervação simpática cirúrgica do TAM. Sete dias após, C75 (150 µg, 7,5 µL-1), cerulenina, um inibidor natural da ácido graxo sintase, (150 µg, 7,5 µL-1) ou RPMI (veículo) foi administrado nos animais com privação alimentar de 24 horas. Foi demonstrado que uma única injeção intracerebroventricular de C75 reduziu a ingestão alimentar no primeiro dia e induziu perda de peso por dois dias. Além disso, as análises de telemetria mostraram que o C75 promoveu um rápido aumento na temperatura corporal interna, maior taxa de estoque de calor de 30 minutos a 6 horas da administração, e um aumento na dissipação de calor por 4 horas. A desnervação do TAM atenuou os efeitos do C75 sobre a regulação térmica bem como seu efeito sobre o peso corporal e a ingestão alimentar. Em paralelo, o C75 induziu aumento na temperatura do TAM (até 8 horas após a injeção), no conteúdo de noradrenalina e na atividade da citocromo c oxidase mitocondrial e da expressão do RNAm da UCP-1 no tecido. Todos esses efeitos foram abolidos com a desnervação simpática do TAM. Tal como o C75, a cerulenina, também induziu um aumento na temperatura corporal interna e do TAM, o qual também foi abolido pela desnervação do TAM. A atividade locomotora espontânea não foi alterada por nenhum inibidor da ácido graxo sintase. A imunohistoquímica para c-Fos revelou que o C75 aumentou o número de células imunorreativas a c-Fos na área pré-óptica, núcleo paraventricular, dorsomedial do hipotálamo, ventromedial do hipotálamo, locus coeruleus e rafe pálida, regiões que estão envolvidas com a regulação central da temperatura. Estes dados sugerem um papel do TAM no aumento da temperatura corporal evocado pelos inibidores da ácido graxo sintase e provêm novos mecanismos para explicar a hipofagia e o aumento do gasto energético observados com a administração desses compostos.

## **EFEITO DA INIBIÇÃO DA nNOS SOBRE A EXPRESSÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS NOS NÚCLEOS DA BASE DE RATOS PARKINSONIANOS E DISCINÉTICOS**

**Roberta Cavalcanti Kwiatkoski**

Orientadora: Profa. Dra. Elaine A. Del Bel B. Guimarães  
Tese de Doutorado apresentada em 27/08/2012

A L-3,4-dihidroxi-fenilalanina (L-DOPA), precursor da dopamina, é o tratamento sintomático mais efetivo da doença de Parkinson. Entretanto, sua administração prolongada provoca complicações motoras debilitantes como as discinesias. Trabalhos do nosso laboratório demonstraram que inibidores de enzimas de síntese de óxido nítrico (NOS) atenuam as discinesias induzidas por LDOPA sem comprometer os efeitos motores benéficos. Nosso objetivo geral foi analisar se as discinesias induzidas pelo tratamento com L-DOPA são acompanhadas de alterações celulares neuroinflamatórias nos núcleos da base e se a inibição da nNOS apresenta algum efeito sobre as mesmas. Os objetivos específicos são analisar o efeito do tratamento de animais parkinsonianos com LDOPA e também o efeito do tratamento de animais parkinsonianos com L-DOPA simultaneamente com a inibição da nNOS, sobre a expressão da nNOS e de marcadores inflamatórios como a iNOS, a COX-2, astrócitos e micróglia ativada nos núcleos da base. Para tanto, ratos *Wistar* machos (200g - 250g) foram submetidos à lesão da via nigroestriatal pela 6-OHDA no feixe prosencefálico medial. Vinte e um dias após o procedimento cirúrgico ratos do grupo controle (injeção de salina no FPM) e ratos parkinsonianos (injeção de 6-OHDA no FPM) receberam: (i) veículo + Salina (n=6); (ii) veículo + L-DOPA (n=7); (iii) 7-NI + Salina (n=3) e (iv) 7-NI + LDOPA (n=7) durante 21 dias. Durante esse período os movimentos involuntários anormais foram avaliados periodicamente. No 21º dia após o início do tratamento com L-DOPA, os animais foram perfundidos com paraformaldeído 4% sacrificados e os encéfalos removidos para realização dos procedimentos histológicos. A neurodegeneração da via nigroestriatal causada pela 6-OHDA induziu (1) diminuição da imunorreatividade para TH; (2) discreto aumento na densidade de células nNOS positivas no estriado ipsilateral à lesão corroborando resultados obtidos em nosso laboratório (Gomes & Del Bel, 2003; Ponzoni, 2000); (3) discreta indução de COX-2 no estriado ipsilateral a lesão; (4) discreta indução de iNOS no estriado ipsilateral e contralateral a lesão; (5) aumento na marcação para GFAP e OX-42 no estriado ipsilateral. Além disso, o tratamento contínuo dos animais parkinsonianos com L-DOPA induziu um aumento ainda mais pronunciado de todos os marcadores analisados. O pré-tratamento dos animais com 7-NI atenuou o efeito do tratamento contínuo com L-DOPA sobre as alterações celulares estriatais. Dessa forma, podemos concluir que as discinesias induzidas pelo tratamento crônico com L-DOPA são acompanhadas de alterações celulares inflamatórias nos núcleos da base, em especial no estriado. Além do mais, assim como as discinesias, as alterações neuroinflamatórias foram prevenidas pela inibição da nNOS em quase todos os núcleos da base. As exceções constituem o globo pálido e substância negra, que apresentam baixa densidade de células nNOS positivas.

## **EXPRESSÃO DE SUBUNIDADES P2X EM CÉLULAS DE LEYDIG DE CAMUNDONGOS EM DIFERENTES IDADES E INTERAÇÕES ENTRE AS SUBUNIDADES P2X2, P2X4 E P2X6 FORMADORAS DE RECEPTORES FUNCIONAIS**

**Ligia Subitoni Antonio**

Orientador: Prof. Dr. Wamberto Antonio Varanda  
Tese de Doutorado apresentada em 28/08/2012

A maturação sexual em mamíferos resulta da interação entre diversos sinais celulares, controlados por genes relacionados ao sexo e hormônios produzidos pela Hipófise e gônadas. As células de Leydig, situadas no interstício dos testículos, são responsáveis pela produção de Testosterona e estimuladas principalmente pelo Hormônio Luteinizante. O tratamento dessas células com ATP extracelular induz aumento do cálcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) e, conseqüentemente, um aumento na secreção de Testosterona. Esse influxo de cálcio ocorre via ativação de Receptores Purinérgicos P2X. Até o momento, sete subunidades de receptores P2X foram identificadas, P2X1 - P2X7, que interagem na forma de trímeros: homoméricos (subunidades iguais) ou heteroméricos (subunidades diferentes). Cada arranjo de subunidades apresenta características distintas. Atualmente, seis receptores heteroméricos foram descritos, entre eles P2X2/6 e P2X4/6, porém nenhum envolvendo três subunidades diferentes. Além disso, algumas subunidades não apresentam interações entre si, como as subunidades P2X2/P2X4. Estudos eletrofisiológicos sugerem a presença de receptores heteroméricos P2X2/4/6 em células de Leydig de camundongos adultos. O aumento da  $[Ca^{2+}]_i$ , decorrente do influxo deste íon através de receptores P2X, pode indicar uma via de modulação da Esteroidogênese. Além da dependência de cálcio, o processo esteroidogênico é influenciado pelo envelhecimento do animal. Sendo assim, o presente estudo objetivou estudar a expressão de subunidades P2X em células de Leydig durante os estágios da maturação sexual do camundongo e investigar a formação de

receptores heteroméricos P2X2/4/6. A análise semi-quantitativa de RNA mensageiro (mRNA) em camundongos Suíços mostrou que os mRNA das subunidades P2X2 e P2X4 são expressos em todas as idades e estão aumentados nas células imaturas/adultas, e mesenquimais/adultas, respectivamente. O mRNA da subunidade P2X6 é expresso a partir de 21 após o nascimento (pnd) e mostra-se aumentado nas células imaturas/adultas. As subunidades P2X1, P2X3 e P2X5 não apresentam mRNA nas células mesenquimais e seu mRNA está mais expresso nas células progenitoras/adultas, imaturas/adultas, e adultas, respectivamente. A subunidade P2X7 apresenta seu mRNA expresso em todas as idades menos aos 07 pnd e a menor expressão ocorre aos 28 pnd. As proteínas correspondentes às subunidades P2X2, P2X3, P2X4, P2X6 e P2X7 estão presentes em todas as idades avaliadas e variam durante o envelhecimento do camundongo. Não há marcação para a subunidade P2X5 em nenhuma das idades avaliadas. As características dos transientes de cálcio de células de Leydig de camundongos com 14, 24, 35, 60 e 100 pnd estimuladas com ATP ou  $\alpha\beta$ MeATP variam, indicando que a expressão de receptores P2X funcionais também se altera durante a maturação sexual do camundongo, possivelmente por consequência das alterações na expressão das subunidades. Experimentos de Imunofluorescência mostraram que há co-expressão das subunidades P2X2/P2X4, P2X4/P2X7 e P2X2/P2X4/P2X6. Além disso, esses três grupos de subunidades foram co-immunoprecipitadas entre si quando co-expressas em células tsA201. Através de experimentos de Ligação Cruzada observou-se que a interação entre as subunidades P2X2/P2X4 e P2X4/P2X7 ocorre preferencialmente na forma de receptores homoméricos. Imagens de Microscopia de Força Atômica mostraram que o arranjo formado entre as subunidades P2X2/P2X4, P2X4/P2X7 é uma dimerização de receptores trímeros. Além disso, mostraram que as subunidades P2X2/P2X4/P2X6 formam um único receptor heteromérico, evidenciado pela decoração dupla das subunidades com anticorpo e fragmento Fab de anticorpo. Concluímos que a expressão de subunidades P2X em células de Leydig varia durante o envelhecimento do camundongo, sugerindo que esses receptores podem participar da modulação da secreção de Testosterona. Concluímos também que as subunidades P2X2/P2X4 e P2X4/P2X7 interagem, na forma de dímeros de receptores homoméricos. Por último, concluímos que as subunidades P2X2, P2X4 e P2X6 interagem em conjunto, na forma de um receptor heteromérico ainda não descrito P2X2/4/6.

## Genética

### EFEITOS DA INIBIÇÃO DE GENES ASSOCIADOS AO CONTROLE DO CICLO CELULAR EM GLIOBLASTOMA

**Andressa Gois Morales**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone

Tese de Doutorado apresentada em 17/07/2012

Os tumores astrocíticos são originados a partir dos astrócitos e classificados de acordo com a Organização Mundial de Saúde em astrocitoma pilocítico (grau I), astrocitoma subependimial de células gigantes (grau I), xantastrocitoma pleomórfico (grau II), astrocitoma difuso (grau II), astrocitoma anaplásico (grau III) e glioblastoma (GBM) (grau IV). Este último é o tumor cerebral mais frequente em adultos, possuindo uns dos piores prognósticos, devido principalmente à radioresistência do tumor, com uma sobrevida média de 14 meses. Vários estudos têm procurado encontrar novos alvos terapêuticos e os genes da família *BUB* são candidatos promissores, devido ao seu papel no controle do ciclo celular. Estes genes participam do mecanismo do ponto de checagem do fuso mitótico, prevenindo a separação prematura das cromátides irmãs. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a expressão de *BUB1*, *BUB3* e *BUBR1* em amostras de pacientes portadores de gliomas de baixo grau (I e II) e glioblastoma, relacionar as expressões destes genes à sobrevida e estudar os efeitos da inibição dos genes *BUB1* e *BUBR1*, por RNAi, na linhagem pediátrica SF188. Nossos resultados mostraram que tanto *BUB1* quanto *BUBR1* foram hiperexpressos nos glioblastomas e nos gliomas de baixo grau em relação à substância branca ( $p < 0,05$ ). A análise da expressão destes genes em amostras de glioblastomas em relação a amostras de grau I e II demonstrou uma hiperexpressão dos genes *BUB1* e *BUBR1* e uma hipopressão do *BUB3* em glioblastoma ( $p < 0,05$ ). Em relação à sobrevida, os baixos níveis de expressão dos genes *BUB1* e *BUBR1* foram relacionados a uma melhor sobrevida quando analisado o total de todos os pacientes. Paralelamente, a inibição dos genes *BUB1* e *BUBR1* na linhagem SF188 resultou em uma diminuição da proliferação e também da capacidade clonogênica, além de um aumento na apoptose quando combinado com temozolomida (TMZ). Também foram realizados experimentos com inibições dos genes com ou sem a presença de irradiação. Esta combinação resultou em uma diminuição tanto da proliferação quanto da capacidade clonogênica. Estes resultados sugerem que o *BUB1* e o *BUBR1* podem ser considerados alvos interessantes para o tratamento de glioblastoma, porém estudos adicionais são necessários para confirmar tal potencial.

## **EXPRESSÃO DO GENE IAAM DE AGROBACTERIUM TUMEFACIENS NO ESTIGMA DE *Nicotiana tabacum*: EFEITOS DE NÍVEIS AUMENTADOS DE AUXINA NO DESENVOLVIMENTO DO PISTILO**

**Luís Antonio Alves de Toledo Filho**

Orientadora: Profa. Dra. Maria Helena de Souza Goldman

Dissertação de Mestrado apresentada em 03/08/2012

A reprodução das plantas é um tópico de grande interesse para a ciência básica e para a agricultura. O pistilo, a estrutura reprodutiva feminina das angiospermas, é um órgão que desempenha papéis importantes no sucesso reprodutivo. É responsável por receber os grãos de pólen, fornecer as condições para a hidratação destes e a emissão de tubos polínicos que crescem em direção ao ovário. Adicionalmente, o pistilo produz frutos e sementes após a fecundação dos óvulos, contidos no interior do ovário. Há muito tempo se estuda o fito-hormônio auxina e muito se sabe sobre sua ação fisiológica e molecular. Contudo, embora avanços recentes sugiram uma grande influência deste hormônio no controle do desenvolvimento do pistilo, são escassos os dados na literatura sobre a influência de níveis aumentados de auxina no desenvolvimento das partes superiores do pistilo: estigma e estilete. Para preencher esta lacuna, este projeto teve como objetivos: I) produzir plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum* com níveis aumentados de auxina no pistilo, através da expressão da enzima de biossíntese de auxina triptofano-monooxigenase (iaaM), de *Agrobacterium tumefaciens*, sob controle do promotor de *N. tabacum* STIG1, o qual confere expressão específica no estigma; II) analisar o fenótipo do pistilo das plantas transgênicas obtidas, comparando-as com plantas selvagens, principalmente quanto à morfologia do pistilo e aos parâmetros reprodutivos; e III) caracterizar, através de RT-PCR quantitativa, os padrões de expressão de diferentes genes putativos de resposta a auxina nos pistilos de plantas transgênicas e controle. No total, 19 plantas transgênicas estáveis foram obtidas, das quais 13 apresentaram alterações morfológicas evidentes no pistilo. Os estiletos das plantas transgênicas STIG1prom::iaaM apresentaram-se mais compridos nos estádios iniciais do desenvolvimento floral, porém mais curtos e espessos nos estádios finais. Juntos, tais fatos sugerem um modo diferencial de percepção de níveis elevados de auxina pelo pistilo ao longo de seu desenvolvimento. Na antese, observou-se nestas plantas uma diminuição da área da superfície estigmática, com concomitante redução na secreção de exudato. Adicionalmente, plantas STIG1prom::iaaM apresentaram dificuldades no processo de auto-polinização e frutos, produzidos a partir de polinização manual controlada de pistilos transgênicos, apresentaram um tamanho final reduzido, evidenciando efeitos deletérios de níveis aumentados de auxina no desenvolvimento do pistilo e/ou no processo de polinização. Medições de auxina via LQ-MS confirmaram um considerável incremento dos níveis endógenos deste hormônio nos pistilos de uma planta transgênica (STIG1prom::iaaM 4), para os três estádios do desenvolvimento analisados. Análises de expressão gênica para 9 genes putativos de resposta a auxina, por qRT-PCR, para pistilos de três plantas transgênicas de três estádios distintos do desenvolvimento floral, revelaram significativas alterações no transcriptoma do pistilo das plantas transgênicas, sugerindo uma contribuição molecular para alguns dos genes analisados no estabelecimento dos fenótipos observados. Além de fornecerem informações relevantes sobre o papel da auxina no desenvolvimento do pistilo, as plantas transgênicas STIG1prom::iaaM, obtidas neste projeto, constituem excelentes ferramentas para investigações futuras sobre os efeitos da auxina na regulação da expressão gênica em nível transcricional e pós-transcricional de genes expressos no pistilo.

## **ABORDAGEM COMPUTACIONAL PARA IDENTIFICAR NOVOS SNVS EM BASES DE DADOS DE ESTS**

**Rodrigo Guarischi Mattos Amaral de Sousa**

Orientador: Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Jr.

Dissertação de Mestrado apresentada em 06/08/2012

Indivíduos não relacionados apresentam apenas 1% de diferenças entre seus genomas. Estas variações ocorrem na forma de substituições, inserções, deleções, rearranjos complexos ou até estruturais. Dentre essas variações, aquelas que apresentam uma frequência populacional acima de 1% são denominadas de polimorfismos. Tais variações são responsáveis por diferenças que vão desde a resposta imunológica até o tratamento com drogas, incluindo sensibilidade das células tumorais, níveis de plasma, efeitos colaterais e toxicidade. A forma mais comum de polimorfismo genético entre humanos são os polimorfismo de base única ou Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), sendo mais de 47 milhões descritos no dbSNP, um banco de dados de pequenos polimorfismos do NCBI. No presente estudo, foi estabelecida uma abordagem computacional, com etapas de exclusão de regiões parálogas ou de baixa qualidade, com o objetivo de identificar variantes genéticas em sequências expressas gerados pelo método de Open Reading Frame ESTs (ORESTES) durante

o Projeto Genoma Humano do Câncer. Diferentemente de outros softwares de detecção de polimorfismos, a abordagem computacional descrita neste estudo leva em consideração a informação a priori do número de bibliotecas distintas que reportaram a mesma variação. Foram identificadas 1900 mutações (853 sinônimas e 1047 não-sinônimas) presentes em duas ou mais bibliotecas distintas, que foram validados in-silico contra o dbSNP v130. O resultado da análise identificou 901 mutações já descritas no dbSNP (47,42%). Para confirmação da análise, foram selecionadas 10 mutações (6 novas e 4 já presentes no dbSNP) para validação pelo método de High Resolution Melt (HRM), seguido da caracterização por sequenciamento de DNA. Nesse caso, o resultado foi a validação de 50% das mutações selecionadas. A análise de interação proteica, Protein-Protein Interaction (PPI), realizada com as mutações não-sinônimas localizadas em domínios funcionais, revelou redes gênicas mais complexas em tecidos tumorais do que nos tecidos normais. Esta observação ratificou a literatura a respeito da transformação tumorigênica ser desencadeada pela combinação de mutações que ativam uma série de processos biológicos, para isso, afetando genes, vias gênicas e networks de vias gênicas relacionados. Em resumo, o presente estudo descreve uma abordagem computacional eficiente para identificação de mutações em dados de sequências expressas, além de avaliar o papel das mutações na tumorigênese.

### **PROCESSOS CELULARES E MOLECULARES NO DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA VISUAL EM OPERÁRIAS E ZANGÕES DE *Apis mellifera***

**David Santos Marco Antonio**

Orientador: Prof. Dr. Kalus Hartman Hartfelder  
Tese de Doutorado apresentada em 10/08/2012

Mecanismos que regem o desenvolvimento do olho composto e lóbulo óptico tem sido amplamente estudados em *Drosophila melanogaster* onde a retina é formada a partir de um disco imaginal anexado com o cérebro e os lóbulos ópticos a partir do primórdio óptico externo. Através de histologia comparativa e análise de expressão gênica no desenvolvimento do sistema visual em *Apis mellifera* nós procuramos elucidar questões sobre plasticidade do desenvolvimento subjacente a fortes diferenças sexo- e casta-específico no olho assim como contribuir com aspectos evo-devo. O desenvolvimento dos lóbulos ópticos ocorre por dobramento neuroepitelial a partir de um centro de diferenciação no cérebro larval. Deste centro, a medula, lamina e lóbula surgem ao mesmo tempo em operárias e zangões. Dois passos marcam a diferenciação da lâmina (i) sua origem a partir da diferenciação de neuroblastos da camada mais externa da medula, isso coincidindo com o primeiro pico de expressão de *roughest*, e (ii) 24 horas mais tarde o aparecimento dos omatídeos hexagonais coincidindo com o segundo pico de expressão de *roughest*. Com a inclusão de genes candidatos relacionados com o desenvolvimento do olho e lóbulos ópticos em insetos [*small optic lobe (sol)*, *eyes absent (eya)*, *minibrain (mnb)*, *sine oculis (so)*, *embryonic lethal, abnormal vision (elav)* e *epidermal growth factor receptor (egfr)*] nós encontramos distintos picos de expressão para *sol*, *eya*, *mnb* e *so* em níveis de transcritos e tempo de aparição do pico diferindo entre operárias e zangões. Enquanto estes quatro genes mostraram relativa sincronia durante o desenvolvimento em zangões, o mesmo não ocorreu em operárias. Além disso, em operárias *sol* é muito mais expresso na pré-pupa do que em zangões. Ambos os sexo mostraram padrões muito similares de expressão de *elav*, exceto por um atraso em zangões. Em contraste, a expressão de *egfr* ocorre antes em zangões. Durante a fase chave no desenvolvimento do sistema visual, uma análise global do transcriptoma, por meio de micro-arrajos mostrou vários genes relacionados com ciclo celular entre os diferencialmente expressos. Em conclusão, a relação entre tempo e eventos morfológicos com os padrões de expressão gênica revelou diferenças possivelmente relacionadas com mecanismos subjacentes ao desenvolvimento do sistema visual altamente dimórfico de *Apis mellifera*.

### **ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE MICRORNAS NA LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA**

**Jaqueline Carvalho de Oliveira**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone  
Tese de Doutorado apresentada em 10/08/2012

Recentemente, diferentes estudos têm demonstrado que os microRNAs estão relacionados com a classificação e prognóstico em alguns tipos tumorais, sendo inclusive relatada uma melhor identificação do perfil de expressão desses quando comparados com o perfil de RNAs mensageiros, mostrando o grande potencial da avaliação dos microRNAs no diagnóstico. Na LLA existem ainda poucos estudos sobre o tema, sendo objetivo do presente trabalho, analisar a expressão dos microRNAs: miR-92a, miR-100, miR-125a-5p, miR-128a, miR-181b, miR-196b, miR-708 e let-7e em 128 amostras de

medula óssea e em 11 medulas de pacientes livres de doenças hematopoiéticas, e correlacionar a expressão diferencial dos mesmos com características clínicas. Também objetivou-se avaliar os efeitos *in vitro* da inibição ou hiperexpressão dos miRNAs evidenciados na análise de expressão gênica, além do estudo dos alvos preditos para estes. A partir desse trabalho, foi verificado que os microRNAs miR-100, miR-196b e let-7e estão hipoexpressos por outro lado, miR-128a, miR-181b e miR-708 estão hiperexpressos nos pacientes com LLA em relação a amostras de medula óssea normal. A expressão do miR-100 foi associada a contagem de glóbulos brancos ao diagnóstico > 50.000, ausência de t(12;21) e hiperdiploidia; o miR-708 associado aos pacientes com idades entre 12 e 108 meses, contagem de glóbulos brancos ao diagnóstico <50.000, presença de CALLA+ e fenótipo B; por outro lado, o miR-196b foi associado ao fenótipo T. Os miR-128a e miR-181b foram relacionados a ausência da translocação t(4;11), os miR-125a-5p e let-7e associados a medula M1 no dia 28, sendo ainda a expressão do let-7e associado a ausência de DRM no dia 14. O aumento artificial do miR-100 levou a uma diminuição de proliferação após 120h na linhagem de LLA-B, e a uma diminuição da capacidade clonogênica da linhagem LLA-T. Com relação ao miR-708, o silenciamento da linhagem B levou à diminuição de proliferação, porém nenhum efeito foi verificado após o aumento de expressão na linhagem T. Como alvos preditos do miR-100 estão as proteínas CDC25A, ST5 e TRIB2, além das vias de sinalização Wnt e MAPK e como preditos do miR-708 foram encontradas GONL4, BAG1, DKK3, USP9X e as vias JAK-STAT e MAPK. Frente a complexidade das regulações microRNAs-alvos fica evidente a necessidade adicional de estudos adicionais a fim de corroborarem e aprofundarem esses achados.

## ANÁLISE CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR PARA OS GENES AURORA CINASE A E B EM CÉLULAS HEMATOPOÉTICAS E MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA DE PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

**Sabrina Dias Leite Cueva**

Orientadora: Profa. Dra. Aparecida Maria Fontes

Dissertação de Mestrado apresentada em 10/08/2012

A síndrome mielodisplásica (SMD) é uma doença hematológica heterogênea, caracterizada por hematopoese anormal, displasia e instabilidade genômica, portanto, a análise citogenética é determinante no diagnóstico, prognóstico e acompanhamento evolutivo da doença. Considerando que as células hematopoéticas (CHs) e as estromais mesenquimais multipotentes (CTMs) estão em estreita associação, estudos que visem à caracterização destas poderão contribuir para elucidar os mecanismos que governam a progressão tumoral e identificar novos alvos terapêuticos.

**Objetivo:** Caracterizar e comparar as CHs e CTMs derivadas de pacientes através da citogenética convencional e molecular para os genes aurora cinase A e B. Avaliar as propriedades biológicas das CTMs derivadas de SMD e controles saudáveis. Métodos: o estudo iniciou-se com a avaliação clínica de 25 pacientes e 8 controles saudáveis doo HCFMRP-USP e HAC-Jaú. Em seguida, foi realizada a análise cariótipica das CHs e CTMs da medula óssea pelo bandamento G e por FISH para os genes aurora A e B e o perfil imunofenotípico, bem como potencial de diferenciação em adipócito e osteócito das CTMs de pacientes portadores de SMD e controles saudáveis.

**Resultados:** A avaliação clínica mostrou plaquetopenia (76%), neutropenia (100%), hemoglobina baixa (16%). A análise citogenética das CHs revelou cariótipo alterado em 13 pacientes (52%), com cariótipo complexo resultando em alterações numéricas e estruturais. Ao contrário, nas CTMs, o cariótipo se mostrou alterado em sete pacientes (28%) e um padrão de menor complexidade, apenas quatro pacientes apresentaram alterações nas duas populações celulares, porém, diferentes. Foram encontradas apenas alterações numéricas (sendo 86% monossomia e 14% ganho de cromossomo). As CHs e CTMs dos controles apresentaram cariótipos 100% normais. Na análise de FISH não foi evidenciada amplificação dos genes *AURKA* e *AURKB*. As CTMs dos pacientes e controles apresentaram-se semelhantes quanto à morfologia e potencial de diferenciação. Entretanto, as CTMs de pacientes mostraram-se alteradas para dois antígenos de superfície, CD90 e CD146, os quais mostraram níveis de expressão mais elevados nas amostras dos pacientes ( $p=0,04$ ,  $p=0,001$  respectivamente).

**Conclusão:** Observou-se que as CTMs se encontram alteradas embora em menor frequência e diferindo das alterações encontradas nas CHs. Esses dados sugerem que as CTMs devem exercer importante papel na progressão tumoral e devem ser consideradas como alvos na busca de novas terapias e melhor esclarecimento dos mecanismos que governam a progressão tumoral. Apesar de não ter evidenciado amplificação dos genes *AURKA* e *AURKB* em SMD, estudos futuros que visem avaliar o nível de expressão dessas enzimas em pacientes portadores ou não de alterações citogenéticas poderão contribuir para a compreensão do envolvimento ou não desse gene com a evolução da doença. Além disso, não foi evidenciada associação de anemia profunda e citogenética alterada.

## PADRÕES DIFERENCIAIS DE EXPRESSÃO GÊNICA NO DESENVOLVIMENTO DAS CASTAS DE *Apis mellifera*, COM ÊNFASE NA DIFERENCIAÇÃO DAS OPERÁRIAS

**Aline Carolina Aleixo Silva**

Orientadora: Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões

Tese de Doutorado apresentada em 13/08/2012

Nas abelhas sociais *Apis mellifera* a determinação de castas está relacionada à nutrição diferencial durante o desenvolvimento larval. Os indivíduos são alimentados com geléia real até o terceiro estágio larval, quando aqueles que são destinados a se tornarem operárias passam a receber uma mistura de secreções glandulares, mel e pólen. O conteúdo da dieta recebida após o terceiro estágio larval ativará respostas endócrinas diferenciais que resultarão no estímulo de vias distintas de expressão gênica que culminarão no desenvolvimento de rainhas e operárias. Vários modelos de determinação de castas foram propostos envolvendo diferentes fatores que atuam sobre o desenvolvimento de cada uma, em especial o Hormônio Juvenil (HJ), as vias de sinalização por insulina/IGF e TOR (*target of rapamycin*) a metilação diferencial e a proteína recentemente descoberta, royalactin, que favorecem o desenvolvimento de rainhas. Para o desenvolvimento de operárias foi sugerido estímulo de outras vias de sinalização, que possivelmente envolveria a participação dos genes *ultraspiracle (usp)*, *cryptocephal (crc)* e *retinoid- and fatty acid-binding protein (RfaBp)*. Utilizando diferentes abordagens avaliamos a participação destes genes no processo que culmina no desenvolvimento das castas. Através da análise de expressão gênica em larga escala utilizando microarrays, observamos a existência de genes diferencialmente expressos em rainhas e operárias, sendo a maior parte deles apresentou expressão preferencial em operárias. Muitos destes genes, inclusive *esterase do hormônio juvenil (jhe)*, *failed axon connections (fax)*, *activating transcription factor-3 (atf-3)*, *cathepsin-D (cath-D)* e *peptidoglycan recognition protein-SC2 (pgrp-sc2)*, preferencialmente expressos em operárias, estão envolvidos, segundo análises de função por *Gene Ontology*, em processos essenciais no desenvolvimento das castas como crescimento, reprodução, apoptose, neurogênese, degradação do hormônio juvenil, entre outros. A partir destes resultados, incluímos o gene da esterase do *hormônio juvenil (jhe)* em nossas análises, como um possível candidato a determinante do desenvolvimento diferencial das operárias. Além disto, foi determinado o perfil de expressão de *usp*, *crc*, *RfaBp* e *jhe*, durante o desenvolvimento de rainhas e operárias. Observamos que os maiores níveis de expressão de cada um são encontrados em fases posteriores ao período crítico de determinação de castas e que em geral, os maiores níveis de expressão são encontrados em operárias, especialmente *crc*, *RfaBp* e *jhe*. Para *usp*, os níveis são distintos em rainhas e operária apenas em pontos específicos entre o quinto estágio larval e a fase pré-pupal. Adicionalmente avaliamos a influência da diminuição, através de interferência por RNA (RNAi), dos níveis de expressão de cada um destes genes sobre os níveis dos outros genes estudados, e também sua atuação no desenvolvimento. Vimos que mesmo pequenas modificações nestes níveis inibem ou estimulam a expressão de outros genes e, em alguns casos causam alterações no desenvolvimento das abelhas. Sabendo da importância dos microRNAs (miRNAs) na regulação da expressão gênica e do desenvolvimento, avaliamos os níveis de expressão dos miRNAs preditos como reguladores de *jhe*. Os resultados obtidos mostraram que alguns deles, como *let-7*, *miR-2796* e *miR-263b*, por apresentarem correlação negativa com os níveis do gene alvo, são realmente fortes candidatos a seus reguladores. Além disto, alterações nos níveis do gene alvo, mostraram a capacidade de alterar os níveis de expressão da maioria dos miRNAs preditos. Este resultado foi corroborado por sequenciamento em larga escala das amostras tratadas com *dsjhe* e controle, que apontou também outros possíveis reguladores de *jhe*, entre eles *miR-100*, *miR-306* e *mi-13b*. Analisando os resultados obtidos de forma conjunta podemos sugerir que o desenvolvimento de operárias está sob complexa regulação que envolve a participação dos genes aqui estudados, além de outros fatores como os miRNAs. Estes genes agem de maneira coordenada, inclusive com os miRNAs, em momentos específicos do desenvolvimento atuando sobre cascatas de expressão gênica de forma a ativar ou inibir a expressão uns dos outros e também de outros genes, o que culminará no desenvolvimento diferencial de rainhas e operárias em *A. mellifera*.

## CARACTERIZAÇÃO CITOGÊNÉTICA MOLECULAR DE REARRANJOS CROMOSSÔMICOS APARENTEMENTE EQUILIBRADOS ASSOCIADOS AO FENÓTIPO DE INFERTILIDADE

**Juliana Dourado Grzesiuk**

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Regina Martelli

Dissertação de Mestrado apresentada em 13/08/2012

A translocação recíproca é o rearranjo equilibrado mais comum em humanos. Frequentemente, indivíduos com rearranjos equilibrados não apresentam manifestações clínicas, entretanto, na meiose, o pareamento entre cromossomos

translocados forma uma figura quadrivalente em forma de cruz que torna a disjunção cromossômica incerta e dependendo do rearranjo, o indivíduo pode vir a ser infértil, apresentar um risco aumentado de abortamento espontâneo e/ou da prole apresentar alterações fenotípicas. Neste projeto, investigamos duas famílias de pacientes inférteis, portadores de translocações cromossômicas. O objetivo foi caracterizar as alterações citogenéticas e citogenômicas relacionadas à infertilidade masculina em pacientes portadores de rearranjos aparentemente equilibrados, associando técnicas de citogenética clássica (bandeamento GTG), citogenética molecular (FISH) e citogenômica (array-CGH). Foram estudados sete indivíduos da família 1, sendo diagnosticados três portadores da translocação (X;22), sendo um deles azoospermico. Nesta família foram ainda detectados dois casos de mosaïcismo para síndrome de Turner. A família 2 foi composta por dois irmãos oligozoospermicos, portadores de translocação (8;13). Com a aplicação da técnica de FISH, definimos o cariótipo final dos portadores dos rearranjos como 46,XX ou 46,XY,t(X;22)(p22.3;q11.2) para a família 1 e 46,XY,t(8;13)(q13;q14) para a família 2. A técnica de array-CGH (plataforma 2x400K, Agilent) detectou alterações no número de cópias de algumas sequências candidatas relacionados ao fenótipo de infertilidade, sendo 132 sequências de piRNAs, os genes DDX11, Jag 2 e ADAM18 na família 1 e o gene candidato ADAM18 nos pacientes 8 e 9 e POTE no paciente 9.

### **CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO GENE DA FAMÍLIA F-BOX EXPRESSO NO PISTILO DE *Nicotiana tabacum* L.**

**Samantha Vieira Abbad**

Orientadora: Profa.. Dra. Maria Helena de Souza Goldman

Dissertação de Mestrado apresentada em 13/08/2012

O estudo da reprodução sexual de plantas é uma área de crescente interesse devido a importância de sementes e frutos em nossa dieta diária, ambos resultantes do desenvolvimento de partes do pistilo, após fertilização. O objetivo deste trabalho foi caracterizar um novo gene F-box expresso no pistilo de *N. tabacum*. Proteínas F-box atuam na interação proteína-proteína, geralmente direcionando proteínas alvo para degradação pela via ubiquitina-proteassomo. Foram identificados cinco genes de função desconhecida que codificam putativas proteínas F-box, em duas bibliotecas de cDNAs de estigmas/estiletos de *N. tabacum* (Depaoli, 2006; Quiapim et al., 2009) previamente construídas em nosso laboratório. A expressão de cada um destes genes foi analisada nos diferentes órgãos de *N. tabacum*, por qRT-PCR. O clone 085H05 da biblioteca TOBEST (Quiapim et al., 2009) apresentou expressão preferencial nos órgãos florais. Este clone foi selecionado para uma caracterização funcional mais detalhada. O padrão de expressão deste gene foi avaliado no estigma/estilete durante os 12 estádios do desenvolvimento floral de *N. tabacum* (Koltunow et al., 1990). O resultado revelou que sua expressão é regulada durante o desenvolvimento, atingindo o maior nível de expressão na antese (estádio 12). Isto sugere que este gene esteja envolvido no desenvolvimento do estigma/estilete. A sequência codificadora do gene correspondente a 085H05 foi determinada e, após amplificação e clonagem, este gene foi denominado S/S\_F-box (Stigma/Style\_F-box). Para compreender a função da proteína de S/S\_F-box, plantas transgênicas de superexpressão e de silenciamento (por RNAi) deste gene foram geradas. As plantas de RNAi apresentaram o estilete e o ovário reduzidos quando comparados ao controle SR1. Em concordância, as plantas de superexpressão produziram flores com o estilete mais alongado do que o controle, além do estigma e do ovário de maior tamanho. Altas concentrações de exudato foram observadas na superfície do estigma destas plantas, a partir do estágio 7 tardio. No controle SR1, concentrações equivalentes apenas são observadas nos estádios finais do desenvolvimento. Os fenótipos observados nas plantas transgênicas sugerem que a proteína codificada por S/S\_F-box esteja envolvida com o desenvolvimento do pistilo e com o controle do tamanho deste órgão. Adicionalmente, as plantas de RNAi apresentaram o fenótipo de perda da dominância apical. Os níveis de expressão do gene S/S\_F-box foram avaliados em plantas que tiveram aumento na produção de auxina no estigma/estilete (plantas STIG1prom::iaaM), revelando que este gene não é regulado, a nível transcricional, por este hormônio. Experimentos de localização subcelular, realizados por expressão transitória da sequência de S/S\_F-box fusionada a sequência dos genes reporteres GFP e YFP (S/S\_F-box::GFP; S/S\_F-box::YFP), indicaram que a proteína S/S\_F-box está localizada no citoplasma e no núcleo celular. Adicionalmente, foi realizado o screening de uma biblioteca de cDNAs de estigma/estilete, construída no sistema de duplo-híbrido, para investigar proteínas candidatas a interagirem com a proteína de S/S\_F-box. Os resultados indicaram interação da proteína S/S\_F-box com SKP1, confirmando a participação de S/S\_F-box no complexo SCF, que promove a degradação de proteínas alvo pela via ubiquitina-proteassomo. Duas proteínas candidatas a alvo foram identificadas: os fatores de transcrição VOZ1 e SIP1, ambos envolvidos com a proliferação celular. Em suma, é possível propor que a proteína codificada por S/S\_F-box tenha função relacionada a proliferação celular e ao desenvolvimento dos órgãos vegetais, incluindo o pistilo.



## ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS MEIS PRODUZIDOS POR *Apis mellifera* E ABELHAS SEM FERRÃO NATIVAS DO BRASIL

**Matheus de Oliveira Bazoni**

Orientador: Prof. Dr. David De Jong

Tese de Doutorado apresentada em 14/08/2012

Nós avaliamos a atividade antimicrobiana do mel coletado de ninhos de 12 espécies de abelhas nativas sem ferrão comumente encontrados no Brasil e 25 amostras de mel de *Apis mellifera* não pasteurizados que foram identificadas como sendo unifloral e uma amostra de mel multifloral. A atividade antimicrobiana de cada amostra de mel foi testada contra cinco espécies de bactérias patogênicas, uma espécie de fungo patogênico e uma espécie de levedura patogênica, comparando esta atividade com o mel terapêutico de manuka produzido por abelhas *Apis mellifera* na Nova Zelândia a partir do néctar de *Leptospermum scoparium* (*Myrtaceae*). Cinco das treze amostras de mel das abelhas sem ferrão foram bactericidas e oito foram fungicidas contra o fungo patogênico *Trichophyton rubrum*. Somente a levedura *Candida albicans* foi resistente a todas as amostras de mel. As amostras de mel de *Apis mellifera* que apresentaram atividade bactericida foram caju, romã e cana, nenhuma das amostras de mel de *A. mellifera* afetou o fungo *T. rubrum*. Os meis de *Nannotrigona testaceicornis*, *Plebeia remota*, *Tetragona clavipes* e *Scaptotrigona depilis* todos com alto nível de atividade antimicrobiana, foram significativamente mais eficiente em termos de atividade antimicrobiana que o mel de manuka, especialmente contra *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *T. rubrum*. O mel artificial feito com os principais açúcares encontrados no mel e com teor de água semelhante, não teve atividade antimicrobiana em nossas análises. Nós também fizemos análises de espectrometria de massas das amostras de mel e encontramos alguns "fingerprint" característicos que foram associadas com a atividade antimicrobiana.

## DISSOMIA UNIPARENTAL E MOSAICISMO SOMÁTICO COMO MECANISMOS DE ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS DO *imprinting* GENÔMICO

**Filipe Brum Machado**

Orientadora: Profa. Dra. Ester Silveira Ramos

Tese de Doutorado apresentada em 16/08/2012

O *imprinting* genômico é um processo regulado epigeneticamente que faz com que os alelos sejam expressos de acordo com a sua origem parental. No cromossomo 11 (11p15.5), existem duas regiões controladoras de *imprinting* (ICR1 e ICR2), que controlam a expressão de genes marcados (*imprinted*). Os padrões de metilação dessas regiões podem ser alterados pela dissomia uniparental (DUP), que ocorre quando parte de ou um cromossomo inteiro do mesmo par de homólogos é herdado de somente um genitor. Erros mitóticos podem gerar mosaicismos com uma linhagem de células com DUP e a outra biparental. As síndromes de Silver-Russell (SSR) e Beckwith-Wiedemann (SBW) são doenças de alterações do *imprinting* genômico, envolvendo os cromossomos 7 (SSR) e 11 (SSR e SBW). A Hemihiperplasia Isolada (HHI) parece corresponder a uma forma mais leve da SBW. No presente trabalho, foi realizada uma varredura *in silico* para busca de novos microssatélites nos cromossomos 7 e 11, e selecionados seis do tipo tetra ou pentanucleotídeos, no cromossomo 7, e 12, no cromossomo 11. O perfil de metilação nas ICRs foi verificado por três técnicas distintas: MS-MLPA, DESM-RT e por uma nova estratégia desenvolvida neste trabalho denominada DESM-QFPCR. Foram avaliados 32 pacientes com SBW, 16 HHI, 20 com SSR e seus pais, quando disponíveis, além de um paciente com fenótipo aparentemente normal com cariótipo 46,XX/46,XY e cuja placenta apresentou displasia mesenquimal placentária (DMP) a qual está associada à SBW. Os novos marcadores apresentaram alta taxa de heterozigose (média de 70%), e ausência das características indesejáveis dos dinucleotídeos predominantemente utilizados para detecção de DUP. Seis marcadores estão entre genes controlados pelas ICRs 1 e 2. A DUP paterna do cromossomo 11 (DUPpat Cr11), sempre restrita a 11p15.5, foi responsável por 13% dos casos de HHI e 19% dos de SBW. As alterações estruturais foram confirmadas por minissequenciamento quantitativo de SNPs e por MS-MLPA. Um paciente apresentou duplicação paterna abrangendo ambas as ICRs. Uma deleção não descrita anteriormente no gene *CDKN1C* foi observada em uma paciente e sua mãe. Para os pacientes com DUPpat Cr11, foram investigados microssatélites em 13 autossomos e nos cromossomos sexuais para detecção de mosaicismos globais. Apenas o paciente com DMP apresentou mosaicismos [células androgenéticas (25-30%) e biparentais], sugerindo evento de dupla fertilização. Nos pacientes com SSR, foi observada hipometilação na ICR1 em 25% dos casos. Para a SBW, foi observada hipermetilação na ICR1 e hipometilação na ICR2 em 6% e 42% dos casos, respectivamente. Os casos com DUPpat Cr11

apresentaram alteração de metilação em ambas as ICRs. As frequências de alterações (epi) genéticas encontradas foram semelhantes às previamente descritas na literatura para as SBW, SSR e HHI. Neste trabalho, foi desenvolvida uma nova técnica para estudo de metilação do DNA de ICRs e testados marcadores microssatélites inéditos na região 11p15, que quando comparados com metodologias mais tradicionais de avaliação, como DESM-RT e MS-MLPA, mostraram elevada correlação dos resultados. Os achados mostram a complexidade da etiologia das doenças estudadas no presente trabalho e os dados moleculares serão imprescindíveis para o aconselhamento genético adequado para cada caso em particular e suas famílias.

## **ESTUDO DA EXPRESSÃO DOS GENES *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *MGMT* E EFEITOS DA ZEBULARINA EM GLIOBLASTOMA (TESE)**

**Daniel Antunes Moreno**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone

Tese de Doutorado apresentada em 24/08/2012

Os gliomas são tumores que surgem a partir de células da glia e são considerados os mais comuns do sistema nervoso central. São subdivididos em quatro grupos: astrocitoma pilocítico (grau I), astrocitoma difuso (grau II), astrocitoma anaplásico (grau III) e glioblastoma (grau IV ou GBM). Entre esses, o GBM é o tumor mais agressivo e mais freqüente. Apesar de ser encontrado em qualquer faixa etária, esse tumor é raro em crianças. Atualmente a cirurgia seguida de radioterapia e quimioterapia com temozolomida (TMZ) tem sido utilizado como protocolo de tratamento padrão para a maioria dos pacientes e mesmo assim a sobrevida se mantém extremamente baixa. Além disso, grande parte dos pacientes não respondem ao tratamento com TMZ indicando a necessidade de agentes quimioterápicos alternativos. A zebularina (ZB) é um agente inibidor de DNA metiltransferases (iDNMTs) estável, pouco tóxico, que promove radiosensibilização e tem mostrado efeitos promissores em diversos tipos de neoplasias, entretanto pouco se sabe a respeito dos efeitos da ZB em glioblastoma. Os objetivos deste trabalho foram analisar a expressão dos genes *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *MGMT* em 5 amostras de substâncias brancas (SB), 6 linhagens de GBM e 33 amostras de gliomas (13 grau I, 2 grau II e 18 grau IV), correlacionar a expressão desses genes com os diferentes graus de gliomas e analisar os efeitos da ZB combinada ou não com TMZ em linhagens de GBM irradiadas e não irradiadas. Para análise da expressão gênica foi realizada a técnica de PCR em tempo Real. Os ensaios de proliferação celular, clonogênico, radiação e apoptose foram realizados em 3 linhagens de GBM (U251, SF188 e T98G) e uma de fibroblastos (MRC5). Também foi realizado o ensaio de proliferação celular em 5 culturas primárias de GBM tratadas com zebularina. Os genes *DNMT3A* e *MGMT* mostraram expressão maior nas amostras de SB comparando-se com gliomas e linhagens de GBM. O gene *DNMT3B* foi mais expresso nas linhagens de GBM comparando-se com as SB. O gene *DNMT1* não mostrou diferenças significativas entre as amostras analisadas. Os ensaios de proliferação celular mostraram diminuição na proliferação com doses a partir de 50-100µM de ZB e de 250-500µM de TMZ nas linhagens e a partir de 50µM de ZB para as culturas primárias de GBM. As combinações de ZB com TMZ não mostraram sinergia na grande maioria das doses testadas. A ZB aumenta a apoptose nas 3 linhagens com doses a partir de 100µM. A ZB e TMZ mostraram diminuição na formação de colônias com as doses de 100µM e 10µM nas linhagens U251 e SF188 não irradiadas e irradiadas com 2, 4 e 6 Gy. A linhagem T98G expressa o gene *MGMT*, mostrou resistência a 10µM de TMZ e respondeu ao tratamento com 100µM de ZB. Também foi observado que 10µM de TMZ é mais citotóxico do que 100µM de ZB em fibroblastos não irradiados e irradiados (2Gy). Os resultados obtidos neste estudo mostram que a ZB pode representar um alvo terapêutico interessante para o estudo em glioblastoma.

## **INFLUÊNCIA DA IDADE GESTACIONAL NO PERFIL EPIGENÉTICO PLACENTÁRIO**

**Sarah Blima Paulino Leite**

Orientadora: Profa. Dra. Ester Silveira Ramos

Dissertação de Mestrado apresentada em 18/09/2012

O *imprinting* genômico, processo regulado epigeneticamente segundo o qual os genes se expressam de acordo com sua origem parental, está envolvido no crescimento e desenvolvimento placentário. Na região 11p15.5 encontram-se vários genes regulados por duas regiões controladoras de *imprinting* (ICR1 e ICR2), onde se encontram as regiões diferencialmente metiladas H19DMR e KvDMR1. Acredita-se que o padrão de *imprinting* seja dinamicamente regulado durante o desenvolvimento da placenta. Em humanos, há poucas informações sobre *imprinting* genômico e desenvolvimento placentário, principalmente para estágios precoces do desenvolvimento devido às dificuldades técnicas de obten-

ção dessas placentas. A descrição de mosaicismos do padrão de metilação restrito a placenta ou entre a placenta e o feto evidencia um perfil epigenético único deste órgão. A 5-hidroximetilação, a qual não tem um papel de silenciamento gênico, pode ser confundida com a metilação do DNA nas análises moleculares. O objetivo principal do presente estudo foi o de verificar a influência da idade gestacional (IG) no perfil de metilação do DNA das ICRs 1 e 2 em vilosidade coriônica, bem como a existência de mosaicismos do perfil de metilação intra-placentário. Neste trabalho também foi investigada a presença de hidroximetilação na KvDMR1. Foram coletadas amostras de tecido placentário, sendo 25 de vilosidades coriônicas (VC) (15 de 3º trimestre gestacional e 10 do 1º trimestre) e nove de cordão umbilical (UC) de 1º trimestre (pareadas com a VC). Quatro placentas de 3º trimestre foram analisadas em separado para o estudo de mosaicismos. O perfil de metilação do DNA das regiões foi verificado por PCR Específica para a Metilação (MS-PCR), Análise Combinada de Bissulfito e Restrição Enzimática (COBRA) e Método de Digestão Enzimática Sensível à Metilação Associada à PCR em Tempo Real (DESM-RT), além do ensaio para hidroximetilação na KvDMR1. Com os ensaios qualitativos (MS-PCR e COBRA) foi observado um perfil de metilação monoalélico, sendo que na H19DMR foi identificada a presença de CpGs diferentemente metilados. Para a H19DMR foram observadas médias de 0,43 de metilação em VC e 0,31 em UC de 1º trimestre, e de 0,41 em VC de 3º trimestre. Para a KvDMR1, foram encontradas médias de 0,47 em VC e 0,57 em UC de 1º trimestre, e de 0,41 em VC de 3º trimestre. A presença de hidroximetilação na KvDMR1 foi excluída. Não foram observadas diferenças significativas entre as médias das diferentes IGs ou entre tecidos pelos testes t e F para ambas as regiões. Não foi observada correlação positiva no perfil de metilação para H19DMR e KvDMR1 entre os tecidos. Em relação ao mosaicismos, não houve diferenças significativas no perfil de metilação entre os diferentes cotilédones amostrados numa mesma placenta. Os resultados demonstram uma discordância entre tecido embrionário (UC) e extraembrionário (VC). Apesar de não serem observadas alterações significantes nos perfis de metilação da H19DMR e KvDMR1 em diferentes IGs, as informações apresentadas são importantes para as pesquisas sobre a dinâmica do fenômeno de *imprinting* genômico ao longo da gestação, para os estudos de mosaicismos intraplacentário bem como o perfil epigenético da placenta em relação a outros tecidos.

## Ginecologia e Obstetrícia

### EFEITO DO IMPLANTE LIBERADOR DE ETONOGESTREL SOBRE O SISTEMA HEMOSTÁTICO DURANTE O PUERPÉRIO DE MULHERES SADIAS

**Milena Bastos Brito**

Orientadora: Profa. Dra. Carolina Sales Vieira Macedo

Tese de Doutorado apresentada em 30/07/2012

O puerpério representa o período de maior risco para trombose durante a vida reprodutiva feminina e, representa, também, um momento muito oportuno para início de uma contracepção eficaz. Os contraceptivos de progestagênios isolados, como o implante de etonogestrel, representam uma opção para uso no puerpério. Classicamente, recomenda-se seu uso, a partir da sexta semana após o parto, mas sabe-se que para um grupo de pacientes de risco para curtos intervalos intergestacionais (com baixa adesão ou pouco acesso às orientações contraceptivas neste período), os mesmos podem ser prescritos no puerpério imediato. Porém, estudos são necessários para avaliar a segurança sobre o sistema hemostático materno do implante de etonogestrel (ENG), quando inserido no puerpério imediato. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do implante contraceptivo subdérmico liberador de ENG, inserido no puerpério imediato, sobre o sistema hemostático de mulheres hígdas, comparadas a usuárias do acetato de medroxiprogesterona de depósito (AMPD) seis semanas após o parto, durante as primeiras 12 semanas do puerpério. Foram randomizadas 40 mulheres, entre 18-35 anos, no Ambulatório de Pré-Natal de Baixo Risco do HCFMRP-USP, para dois grupos: 20 para uso do implante liberador de etonogestrel (grupo ENG), inserido 24-48 horas após o parto; e 20 para uso de 150 mg de acetato de medroxiprogesterona de depósito a partir da 6ª semana de puerpério (grupo de controle). Os parâmetros hemostáticos avaliados foram: fibrinogênio, fatores de coagulação (F), proteína C, proteína S livre, antitrombina, razão normalizada de sensibilidade à proteína C (nAPCRs), ?2 -antiplasmina, inibidor do ativador do plasminogênio (PAI)-1, complexo trombina-antitrombina (TAT), fragmento da protrombina (FP) 1+2, D-dímeros, tempos de coagulação.

As pacientes apresentavam características clínicas e laboratoriais basais semelhantes, com exceção para antitrombina e proteína S. No puerpério imediato, a concentração dos marcadores globais da hemostasia (nAPCRs, TAT, D-dímero e FP1+2) estava acima dos limites de normalidade em ambos os grupos. Nas primeiras seis semanas (comparação entre o implante de ENG e ausência de contracepção hormonal no grupo de controle) observou-se redução nos fatores: II, VII, X e, fibrinogênio e; elevação do FV maior no grupo de controle que no ENG. Os fatores de coagulação permaneceram dentro

dos limites de normalidade durante todo o estudo. Entre seis e doze semanas (comparação do implante de ENG e uso do AMPD), observou-se redução do FVII e proteína C no grupo ENG comparada a elevação dos mesmos no grupo de controle. As demais variáveis não diferiram entre os grupos no período do estudo. O mais importante resultado foi que a inserção do implante contraceptivo de ENG não alterou a redução fisiológica dos marcadores globais da coagulação (TAT e FP1+2) e da fibrinólise (D-dímero) ou nAPCRs (marcador mais importante de risco de trombose em contracepção hormonal). Podemos concluir que a inserção do implante liberador de ENG no pós-parto imediato não alterou a redução fisiológica dos marcadores globais da coagulação, sugerindo uma segurança do mesmo sobre o sistema hemostático materno.

### **AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO CITOPLASMÁTICA DA TUMOR M2-PK EM NEOPLASIAS MALIGNAS DE OVÁRIO ORIGEM EPITELIAL E SUAS IMPLICAÇÕES CLÍNICO-PATOLÓGICAS EM UMA COORTE RETROSPECTIVA**

**Christiâni Bisinoto de Sousa**

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Candido dos Reis

Dissertação de Mestrado apresentada em 10/08/2012

Câncer de ovário é a malignidade ginecológica mais letal. A maioria das pacientes tem a doença diagnosticada em estádios avançados e as opções de tratamento ficam restritas a cirurgia citorrredutora e a quimioterapia baseada em derivados de platina. Como estas modalidades terapêuticas são parcialmente efetivas, a maioria das pacientes apresentam recorrência e óbito em função da doença. A investigação de novos fatores prognósticos se faz fundamental à medida que se desenvolvem novas terapêuticas cada vez mais específicas. O metabolismo tumoral é uma área, atualmente, de grande interesse em pesquisas e a glicólise aeróbica para o metabolismo da glicose uma característica comum do crescimento tumoral. As células de câncer expressam a isoenzima M2-PK que é necessária para a glicólise aeróbica e proliferação celular *in vivo*. Para se avaliar a expressão da isoenzima tumor M2-PK no citoplasma de células de tumores epiteliais de ovário e verificar suas implicações clínico patológicas, foram avaliadas 282 pacientes atendidas nos serviços de Oncologia Ginecológica do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e do Hospital de Câncer de Barretos no período de janeiro de 1990 a abril de 2010. A média de idade das pacientes no estudo foi 54anos  $\pm$  16. A amostra era representada por 171 tumores serosos, 30 mucinosos, 25 endometrioides, 12 de células claras, 43 tumores indiferenciados e 1 tumor de Brenner. Foi observado que 74% dos tumores serosos eram estádios III e IV. 45 tumores tinham grau histológico I e 237 com graus II e III. Com relação ao estágio, 24,1%(n=29) e 67,5%(n=81) se encontravam no estágio I e III/IV, respectivamente. Todos os pacientes foram submetidos a procedimento cirúrgico, sendo que citorrredução ótima foi realizada em 46,8%(n=132) e destas 35,6%(n=47) correspondem a estádios avançados. A sobrevida global em 60 meses para as pacientes segundo o estágio foi de 92,2%, 80,7%, 41,5% e 13,1%, para estádios I, II, III e IV respectivamente. A tu-M2-PK está expressa em todos os carcinomas ovarianos, apresentando expressão citoplasmática, não foi evidenciada expressão nuclear ou em células estromais. Quando a expressão semiquantitativa da tu-M2PK foi relacionada com o estágio, tipo e grau histológico, apresentou grande variabilidade, mas sem diferença significativa entre os grupos separados por estes parâmetros. Quando avaliamos a sobrevida global das pacientes, o score de expressão da tu-M2PK mostrou uma mediana de 0,5 nas sobreviventes e 0,5 nas que foram a óbito, mas não foi capaz de prever óbito em 5 anos pela doença em nenhum de seus valores; quando avaliado em relação a recorrência, o score também apresentou uma mediana de 0,5 nas com recorrência e de 0,5 nas sem, mas não foi capaz também de prever recorrência em nenhum de seus valores. Deste estudo experimental podemos concluir que a tu-M2-PK está expressa em todos os carcinomas ovarianos, demonstrando atividade glicolítica nestes tumores e que é promissora para terapêuticas clínicas no futuro.

### **ESTUDO CASO-CONTROLE DAS ALTERAÇÕES METABÓLICAS NO COMPRIMENTO DO TELÔMERO NAS MULHERES COM SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS**

**Daiana Cristina Chielli Pedroso**

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Maria dos Reis

Dissertação de Mestrado apresentada em 28/08/2012

**Introdução:** Distúrbios metabólicos estão associados à SOP, como a presença de hiperinsulinemia, Resistência à Insulina (RI), Diabetes Mellitus tipo 2 de início precoce, dislipidemia e aumento de risco para doença cardiovascular. Estas repercussões metabólicas da SOP por estarem relacionadas com a resposta inflamatória e ao estresse oxidativo, podem ter uma ação direta no tamanho do telômero.

**Objetivo:** Analisar o tamanho do telômero nas mulheres com SOP e a associação do comprimento do telômero com a RI e os marcadores inflamatórios. Desenho do estudo: Estudo caso-controle.

**Casística e Metodologia:** Cada mulher com SOP foi pareada com uma mulher controle, saudável e com ciclo menstrual ovulatório. Estas foram pareadas por idade ( $\pm 2$  anos) e índice de massa corporal (IMC) ( $\pm 2$  kg/m<sup>2</sup>). A pressão arterial sistêmica, circunferência da cintura, perfil lipídico, glicemia, insulina, índice HOMA-IR (modelo homeostático da sensibilidade à insulina), LH (hormônio luteinizante), FSH (hormônio folículo estimulante), testosterona, androstenediona, 17-hidroxiprogesterona, prolactina, globulina de ligação de hormônio sexual (SHBG), proteína C reativa (PCR), homocisteína, Índice de androgênio livre (FAI) e hormônio estimulador da tireóide (TSH) foram analisados. Para a avaliação do telômero, o DNA foi extraído a partir de leucócitos e mensurado por qRT-PCR. Os dados foram analisados através do teste não paramétrico de Wilcoxon para as amostras dependentes, e o modelo de regressão linear com efeitos mistos foi utilizado para avaliar as variáveis preditoras do tamanho do telômero.

**Resultados:** 50 mulheres com SOP (Idade 28,78 anos  $\pm$  5,36 e IMC 29,17 kg/m<sup>2</sup>  $\pm$  6,59) e 50 mulheres Controle (Idade 28,64 anos  $\pm$  5,58 e IMC 28,98 kg/m<sup>2</sup>  $\pm$  6,33) foram avaliadas. O grupo SOP apresentaram níveis mais elevados de Pressão arterial sistólica (116,6 mmHg  $\pm$  9,55 vs 112,11  $\pm$  12,64, p=0,02), Insulina (8,14  $\mu$ IU/ml  $\pm$  7,37 vs 4,98  $\pm$  4,52, p<0,01), HOMA-IR (2,27  $\pm$  2,18 vs 1,42  $\pm$  1,35, p=0,03), LH (7,4 mU/ml  $\pm$  5,21 vs 4,98  $\pm$  3,26, p<0,01), FSH (4,39 mU/ml  $\pm$  2,05 vs 3,57  $\pm$  1,93, p=0,03), Testosterona (86,78 ng/dl  $\pm$  31,5 vs 66,5  $\pm$  29,76, p<0,01), Androstenediona (104,68 ng/dl  $\pm$  45,24 vs 87,2  $\pm$  32,04, p=0,01) e FAI (8,98  $\pm$  9,61 vs 4,92  $\pm$  3,43, p<0,01). O TL no grupo SOP (3347,56 Kb  $\pm$  536,27) não diferiu do controle (3435,18 Kb  $\pm$  483,02) (p=0,52). Não houve associação da RI e da PCR com o comprimento do telômero.

**Conclusão:** Não encontramos encurtamento do telômero em mulheres com SOP. Também não foi encontrada associação da RI e da PCR com o tamanho do telômero. Mais estudos em diferentes faixas etárias são necessários para determinar a influência das alterações metabólicas da SOP durante a vida reprodutiva no comprimento do telômero.

## AVALIAÇÃO DA FORÇA MUSCULAR E COMPOSIÇÃO CORPORAL EM MULHERES COM ANOVULAÇÃO HIPERANDROGÊNICA

**Gislaine Satyko Kogure**

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Maria dos Reis

Dissertação de Mestrado apresentada em 29/08/2012

É evidente o perfil androgênico elevado e a predisposição a resistência insulínica (RI) na maioria das mulheres síndrome dos ovários policísticos (SOP). A hipótese que se apresenta decorrente dessas características fenotípicas é de que as mulheres com SOP apresentam alterações nos componentes da composição corporal (CC) comparada com mulheres com ciclos menstruais regulares (CO), podendo apresentar maior força muscular (FM). Portanto, o objetivo desse estudo foi comparar a CC e a FM de mulheres com SOP a um grupo CO e investigar a relação dessas variáveis com a RI. Trata-se de um estudo caso controle, onde estudamos voluntárias com SOP e CO, entre 18 e 37 anos, com o IMC de 18 a 39,9 Kg/m<sup>2</sup>, não fumantes e não praticantes de atividade física regular e orientada. O grupo de mulheres com SOP estudadas apresentou níveis elevados de testosterona e FAI e redução do SHBG, assim como diminuição da sensibilidade à insulina, com quadro de RI. A CC foi avaliada através do método antropométrico de dobras cutâneas e através da absorciometria radiológica de dupla energia (DEXA), e os resultados mostraram que não houve diferença em nenhuma variável estimada para gordura corporal e massa muscular magra em mulheres com SOP. No entanto, observou-se uma prevalência da distribuição de gordura do tipo andróide no grupo SOP em relação ao grupo CO (SOP - 72% versus CO - 27,78%) associada a RI. A força isométrica (FIPM) foi testada através da preensão manual no membro dominante e a força muscular dinâmica através do teste de 1-RM (FMDM) nos exercícios supino reto, cadeira extensora e rosca bíceps direta, onde avaliou-se respectivamente força do músculo peitoral maior representando a região do tronco, a força dos músculos extensores do joelho para os membros inferiores e a força do músculo bíceps braquial para os membros superiores. Foram também calculadas a força relativa ao peso corporal total (FMRPC) e força relativa a massa muscular magra regional (FMRMMg) determinada previamente pelo DEXA, no tronco e nos membros superiores e inferiores dominantes. O grupo SOP apresentou maior FM nos testes FIPM, de FMDM no supino reto e na FMRMMg do membro inferior dominante. Apesar das mulheres com SOP apresentarem níveis mais elevados de insulina e de HOMA-IR, a RI não se apresentou como preditor para o desempenho de FM. Adicionalmente, ser portadora de SOP esteve associado a um maior desempenho de FM nos exercícios para tronco e o IMC esteve associado a quase todas as variáveis estimadas para análise da FM. Concluiu-se nesse estudo que a RI não foi uma variável preditora da MMmg, mas está associada a obesidade centrípeta. As mulheres com SOP apresentam maior FM no tronco, nos membros inferiores e nas mãos, sem diferença na CC. A RI não esteve associado ao desempenho da FM. Possivelmente a FM pode estar relacionada ao hiperandrogenismo nas mulheres com SOP.

## Imunologia Básica e Aplicada

### ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DOS FC R E DO CR3 NO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E SUA INFLUÊNCIA NO BURST OXIDATIVO DOS NEUTRÓFILOS

**Juliana Escher Toller Kawahisa**

Orientadora: Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado

Dissertação de Mestrado apresentada em 30/07/2012

As infecções constituem a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES), representando 20-55% das mortes e sendo 80% delas causadas por bactérias. O LES é uma doença autoimune inflamatória crônica e a suscetibilidade às infecções está associada às próprias anormalidades imunológicas da doença, bem como a sua terapia, particularmente imunossupressora e citotóxica. Além disso, os polimorfismos genéticos dos FcγR, FcγRIIa e FcγRIIb, nos neutrófilos, têm sido associados com as disfunções imunes do LES. Os FcγR são importantes mediadores das funções efetoras do neutrófilo e atuam em sinergismo com os CR. O polimorfismo dos genes FCGR2A e FCGR3B determina a expressão de variantes alélicas com diferenças funcionais, as quais podem influenciar as respostas biológicas e a suscetibilidade e o prognóstico das doenças infecciosas. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência dos polimorfismos dos receptores FcγRIIa (H/R131), FcγRIIb (HNA-1a, HNA-1b e HNA-1c) e CR3 (HNA-4a) no *burst* oxidativo de neutrófilos de pacientes com LES. Neutrófilos de pacientes com LES (n=36) e indivíduos saudáveis (n=36) foram purificados do sangue periférico ( $0.5 \times 10^6/500\mu\text{L}$ ) e estimulados com  $30\mu\text{g}$  de IC, IC/soro humano normal (SHN), IC/SHN inativado ou PMA  $10^{-7}\text{M}$ . O *burst* oxidativo foi medido por quimioluminescência (QL) na presença de luminol  $10^{-4}\text{M}$  ou lucigenina  $10^{-4}\text{M}$ . As frequências dos genótipos de FcγRIIa, FcγRIIb e HNA-4a em pacientes com LES (n=157) e indivíduos saudáveis (n=147) foram determinadas por PCR com *primers* oligoespecíficos e gel de agarose 2%. Quanto aos polimorfismos genéticos, foi observado que o alelo positivo de HNA-4a contribui para a proteção e o alelo negativo para a suscetibilidade ao LES. Entre os pacientes com LES, as infecções foram mais frequentes quando os alelos R131 de FCGR2A, HNA-1b de FCGR3B e HNA-4a positivo do CR3 estavam presentes. Para o *burst* oxidativo com luminol, no grupo controle, as homozigoses H131, HNA-1b e HNA-4a negativo foram associadas à redução do *burst* oxidativo dos neutrófilos comparado às homozigoses para os respectivos alelos correspondentes. No LES, o *burst* oxidativo foi maior na homozigose R131 do grupo LES inativo comparado ao homozigoto H131 controle; menor na homozigose HNA-1b do grupo LES ativo comparado ao homozigoto HNA-1a do controle e, também, na heterozigose HNA-4a positivo/negativo o *burst* foi menor no grupo LES ativo comparado ao LES inativo. A ausência de diferenças entre os grupos com LES e controle, nos ensaios de *burst* oxidativo com lucigenina e com PMA, sugerem que a NADPH oxidase, responsável pela geração do *burst* oxidativo, não está comprometida nos neutrófilos dos pacientes com LES. Esses resultados têm implicações para a fisiopatologia do LES e, sobretudo, reforçam a hipótese de que os polimorfismos dos FCGR2A, FCGR3B e HNA-4a modulam o *burst* oxidativo de neutrófilos nos indivíduos saudáveis e no LES. Assim, o presente estudo contribui para o entendimento das anormalidades nas funções dos neutrófilos no LES.

### PRODUÇÃO DE RNAs INFECCIOSOS A PARTIR DE CDNAS DE CLONES DO VÍRUS DA DENGUE TIPO 3 (DENV-3) E CLONES QUIMÉRICOS DE DENV-3/VÍRUS ROCIO

**Alberto Anastacio Amarilla Ortiz**

Orientador: Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana

Tese de Doutorado apresentada em 28/08/2012

A dengue é uma doença infecciosa causada pelo vírus da dengue (gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*), e transmitida pela picada de mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti*. Esta doença é um importante problema de saúde pública em todo o mundo e, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 50 a 100 milhões de pessoas são infectadas anualmente em mais de 100 países de todos os continentes. A dengue apresenta-se em três formas clínicas principais; doença febril indiferenciada, febre clássica do dengue (FD) e dengue hemorrágica com ou sem choque (DHF/DSS). Recentemente, viu-se um dramático aumento do número de casos de DHF/DSS nas Américas, e este aumento coincidiu com a introdução sorotipo 3 do vírus da dengue (DENV-3) especificamente o genótipo III.

A proteína E é o principal componente da superfície viral, responsável pelas propriedades antigênicas, entrada do vírus na célula assim como também pelo neurotropismo de alguns flavivírus. Na década de 70, a emergência de um novo arbovírus causou um importante surto de encefalite no Brasil em 1975, na região do Vale do Ribeira, localizado no sul do estado de São Paulo. Este novo arbovírus foi denominado de Rocio vírus (ROCV), o qual é membro do sorocomplexo do vírus da encefalite Japonesa. Recentemente foi desenvolvido um modelo animal para avaliar a patogênese da doença, observando que o ROCV causa uma inflamação aguda no SNC e que este vírus tem capacidade neuroinvasiva. Mas os mecanismos envolvidos na neurovirulência e neuroinvasividade ainda não foram investigados. O objetivo deste trabalho foi a construção de uma ferramenta para estudo da patogenia de DENV-3 e ROCV. Dois clones infecciosos de isolados Brasileiros de DENV-3 (D3BR/RP1/2003 e D3BR/SL3/2002) e dois vírus quiméricos de ROCV (SPH34675) foram construídos. A proteína E dos isolados D3BR/RP1/2003 e D3BR/SL3/2002 foram substituídas pela proteína E do ROCV usando a plataforma de clonagem em levedura. Após a síntese e transfeção dos RNA virais, os genomas virais foram detectados no sobrenadante de células C6/36 e Vero E6, sugerindo a capacidade infectiva das construções. Estas construções virais servirão como uma importante ferramenta para estudar os aspectos relacionados à patogênese, assim como também poderiam fornecer subsídios para futuras vacinas.

## Neurologia

### **CORRELATOS DE MEDIDAS VOLUMÉTRICAS E METABÓLITAS DE EXAMES DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA COM MEDIDAS COGNITIVAS E FISIOLÓGICAS DO TESTE DE CONTROLE POSTURAL EM PACIENTES COM FOBIA À ARANHA**

**Ila Marques Porto Linares**

Orientador: Prof. Dr. José Alexandre de Souza Crippa

Dissertação de Mestrado apresentada em 13/07/2012

O Transtorno de Fobia Específica (FE) é um transtorno de ansiedade com prevalência de 9% a 13% na população geral, sendo caracterizado por medos irracionais associados com evitação a estímulos específicos ou situações determinadas. São exemplos de estímulos relacionados à FE: animais, altura, trovão, sangue, agulha, avião. A fobia a animais é uma categoria importante na FE; e particularmente, a fobia à aranha aparece como uma das formas mais comuns deste transtorno de ansiedade. O objetivo do presente trabalho foi: registrar o balanço corporal (teste de controle postural -estabilômetro) de dezenove pacientes com FE à aranha e dezenove voluntários saudáveis submetidos a diferentes estímulos visuais, incluindo estímulos de aranha. Paralelamente, avaliar medidas fisiológicas (condutância da pele e frequência cardíaca -FC) e psicométricas (Escala Analógica Visual de Humor -EAH, "termômetro", inventário de ansiedade traço estado - IDATE), visando o estudo dos mecanismos cognitivos e fisiológicos manifestados no distúrbio. Posteriormente, foram coletadas imagens de Ressonância Magnética Estrutural (RMe), buscando examinar possíveis alterações de espessura cortical; bem como quantificados, por meio de Espectroscopia de Próton por Ressonância Magnética (H1ERM), os níveis de diferentes metabólitos presentes no córtex cingulado. Por fim, investigou-se possíveis correlações entre as medidas obtidas através dos exames de imagem, tanto com os dados sócio-demográficos quanto com os achados psicométricos e fisiológicos. O presente estudo registrou diminuição na espessura cortical no cíngulo anterior do grupo com FE à aranha em comparação aos voluntários saudáveis, porém não foram encontradas alterações metabólicas no córtex cingulado. Medidas psicométricas de estados subjetivos (EAH, termômetro e IDATE) e medidas fisiológicas como FC e condutância da pele convergem com resultados que indicam aumento de ansiedade do grupo FE em comparação aos voluntários saudáveis durante todo o protocolo experimental, bem como durante a exposição dos estímulos visuais. Os dados do teste de controle postural registraram aumento no balanço corporal dos grupos FE quando expostos à imagens de aranha. Não foram encontradas correlações entre os achados de neuroimagem e os outros parâmetros de avaliação. Os dados de neuroimagem reiteram a importância do cíngulo anterior na neurobiologia da FE e os dados do teste de controle postural indicam aumento de balanço corporal do grupo FE, o que nos permite inferir uma resposta defensiva de fuga.

## **AVALIAÇÃO QUANTITATIVA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA PREDIZENDO A RESPOSTA DE METÁSTASES ENCEFÁLICAS À RADIOTERAPIA HOLOCRAIANA**

**Augusto Elias Mamere**

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos dos Santos

Tese de Doutorado apresentada em 30/07/2012

Os pacientes com metástases encefálicas tem prognóstico desfavorável e a radioterapia holocraniana é geralmente aplicada como tratamento paliativo. Há evidências relatadas em estudos anteriores da correlação entre hipóxia, vascularização e resposta tumoral à radioterapia nas neoplasias cerebrais. Com o objetivo de testar a hipótese de que os valores do volume sanguíneo cerebral relativo (rCBV), do fluxo sanguíneo cerebral relativo (rCBF) e do coeficiente de difusão aparente (ADC) medidos no interior das metástases encefálicas antes do início da radioterapia holocraniana podem ser utilizados como ferramentas preditivas da resposta tumoral ao tratamento, foram estudados 25 pacientes submetidos a exames de ressonância magnética antes do início da radioterapia e 1 mês e 3 meses após o seu término. Estes pacientes foram divididos em 2 grupos: o grupo respondente, formado pelos pacientes com resposta completa (desaparecimento) ou resposta parcial (redução do volume  $\geq 50\%$ ), e o grupo não respondente, formado pelos pacientes com doença estável (redução do volume  $< 50\%$  ou aumento  $< 25\%$ ) ou com doença em progressão (aumento do volume  $\geq 25\%$ ). As médias dos valores do rCBV e do rCBF nas metástases antes do início do tratamento foram, respectivamente, 6,33 e 5,24 no grupo respondente e 3,03 e 2,77 no grupo não respondente, com diferença estatisticamente significativa entre os grupos nestas duas variáveis ( $p=0,002$  para rCBV e  $p=0,001$  para rCBF). As médias dos valores do ADC nas metástases antes do início do tratamento foram  $129,03 \times 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s}$  no grupo respondente e  $105,03 \times 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s}$  no grupo não respondente, sem diferença estatisticamente significativa ( $p=0,120$ ). Para avaliar se os valores do rCBV e rCBF medidos nas lesões antes do início do tratamento podem ser utilizados como ferramentas preditivas do tempo de sobrevida global e para identificar os fatores prognósticos clínicos e biológicos (sexo; idade; sítio do tumor primário; índice de desempenho de Karnofsky (KPS); controle do sítio primário; metástases extracranianas; classificação pela análise recursiva fragmentada (RPA); número de nódulos) relacionados ao tempo de sobrevida global, foram estudados, retrospectivamente, 136 pacientes com metástases encefálicas submetidos a radioterapia holocraniana paliativa. O tempo de sobrevida global mediano destes pacientes foi de 2,3 meses. Não foi observada diferença estatisticamente significativa do tempo de sobrevida global comparando pacientes com nódulos apresentando baixos valores de rCBV e rCBF e pacientes cujos valores foram altos. As categorias das covariáveis associadas a pior prognóstico, ou seja, a menor tempo de sobrevida global, na análise univariada pelo método de Kaplan-Meier, foram KPS  $< 70$  ( $p < 0,001$ ), a presença de mais de 2 nódulos encefálicos ( $p = 0,043$ ) e RPA classe 3 ( $p = 0,001$ ). Com base nos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que a medida dos valores do rCBV e do rCBF nas metástases encefálicas, antes do início da radioterapia holocraniana paliativa, tem potencial na previsão da resposta tumoral, mas não do tempo de sobrevida global. As covariáveis que se correlacionaram significativamente com o tempo de sobrevida global (fatores prognósticos) são o KPS, a classificação pela RPA e o número de nódulos encefálicos

## **AVALIAÇÃO SENSORIO-MOTORA DE RATOS WISTAR FÊMEAS E MACHOS APÓS ESTIMULAÇÃO DOLOROSA NO PERÍODO NEONATAL AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO**

**Elisabete de Cassia do Carmo**

Orientadora: Profa. Dra. Valeria Paula Sassoli Fazan

Dissertação de Mestrado apresentada em 06/08/2012

Evidências sugerem que procedimentos dolorosos realizados em recém-nascidos em uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN), podem levar a uma sensibilização de suas respostas a dor em longo prazo. A exposição do neonato a dor pode ser preditiva de respostas globais a dor na infância e no adulto. Entretanto, ainda são poucas as investigações sobre os efeitos dolorosos na evolução sensorio-motora em longo prazo, particularmente em modelos experimentais. O objetivo do presente estudo foi avaliar o desenvolvimento sensorio-motor de ratos Wistar, expostos à estimulação dolorosa após o nascimento. Foram utilizados 66 animais que foram acompanhados desde o nascimento até os 180 dias de vida. Os animais foram separados em quatro grupos experimentais: fêmeas controle ( $n=17$ ), machos controle ( $n=17$ ), fêmeas dor ( $n=16$ ) e machos dor ( $n=16$ ). Os animais do grupo dor foram submetidos a procedimentos dolorosos que consistiram de rápidas agulhadas nas regiões lateral e plantar da pata posterior direita, logo após o nascimento, durante 15



dias consecutivos. Os animais do grupo controle receberam estímulos táteis através de um cotonete, nas regiões lateral e plantar da pata posterior direita, logo após o nascimento durante 15 dias consecutivos. Todos os animais foram avaliados com 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias de vida. A avaliação funcional consistiu em avaliação sensorial e motora através do teste de retirada da pata com os monofilamento de von Frey (alodínia mecânica), teste de pressão da pata (hiperalgesia mecânica) e Grip Strength Meter (GSM) (força de garra). Os animais foram pesados, em seguida foram posicionados em caixas de acrílico individuais por 15 minutos para período de adaptação ao ambiente, em seguida receberam estímulos táteis com os monofilamentos de von Frey, iniciando com o filamento de menor valor, de forma crescente até a resposta de retirada da pata. A hiperalgesia mecânica foi avaliada através do teste de pressão da pata, onde um fórceps conectado a dois "strain gauges" medidores de tensão são conectados a um indicador digital. Durante o teste, o pesquisador exerce uma compressão nos braços do fórceps do aparelho, que é então convertida para a pata traseira do animal, a força aplicada pelo examinador é aumentada gradualmente, até que o animal retire a pata e então, o aparelho registra os valores obtidos. Para avaliação da força de garra, os animais foram posicionados no GSM, com suas patas traseiras voltadas para a barra, sendo então incentivado a agarrar a barra do aparelho, logo em seguida o examinador exerce uma pequena força, afastando o animal do aparelho, a força de preensão é então determinada pela força (média) registrada no GSM. A análise estatística dos dados foi realizada através da comparação dos dados obtidos entre machos e fêmeas (teste t de student não pareado para dados com distribuição normal) e entre as diferentes idades no mesmo gênero (One way ANOVA, seguida de um pós-teste de Tukey para dados com distribuição normal). Diferenças significativas foram consideradas quando  $p < 0,05$ . Nossos resultados sugerem que a dor no período neonatal pode alterar o peso corporal, bem como provocar alodínia, hiperalgesia e alterações nas funções musculares, como a diminuição da capacidade de preensão da pata.

### **PLASTICIDADE SINÁPTICA NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL INDUZIDA POR ESTIMULAÇÃO DO TÁLAMO MEDIODORSAL DE RATOS IN VIVO: EFEITOS DA MODULAÇÃO COLINÉRGICA MUSCARÍNICA E NICOTÍNICA**

**Lézio Soares Bueno Junior**

Orientador: Prof. Dr. João Pereira Leite

Tese de Doutorado apresentada em 17/08/2012

O nucleo talamico mediodorsal (Tmd) e o cortex pre-frontal (CPF) comunicam-se mutuamente, formando um circuito envolvido em funcoes executivas e transtornospsiquiatricos. As funções executivas estão sujeitas aos níveis de alerta gerados pela atividade oscilatória talamocortical, que por sua vez é controlada pela transmissão colinérgica. Possivelmente, a plasticidade sináptica do circuito Tmd\_CPF é sensível tanto aos padrões oscilatórios do próprio circuito quanto a modulação colinérgica. Porém, esta possibilidade ainda não foi testada, muito menos dissociando-se a participação dos receptores muscarínicos e nicotínicos. Assim, nosso objetivo foi examinar como a plasticidade Tmd\_CPF é modulada sob estados oscilatórios globais mediados pelo sistema colinérgico, e se esta modulação varia com os tipos de receptores recrutados. Anestesiámos ratos com ureta na e implantamos um eletrodo de estimulação no Tmd, um eletrodo de registro no CPF e uma cânula de microinjeção acima do ventrículo. Emitimos 90 pulsos elétricos no Tmd (0,05 Hz) para evocação de potenciais pós-sinápticos de campo (PPSCs) no CPF formando uma linha de base de 30 min. Em seguida, aplicamos injeção intraventricular do agonista muscarínico pilocarpina (PILO), do agonista nicotínico nicotina (NIC), ou veículo controle (Veic). Os efeitos das substâncias sobre potenciais de campo locais (eletrencefalograma) foram monitorados através dos mesmos eletrodos. PILO e NIC induziram aumento das oscilações rápidas (4-80 Hz) e proporcional redução das oscilações lentas mantidas pela anestesia (0,5-4 Hz) e tais efeitos duraram ~10-15 min, conforme padronização prévia das concentrações das drogas. Justamente durante este período, aplicamos estimulação em alta frequência (EAF) ou baixa frequência (EBF) para indução de, respectivamente, potencialização (PLD) ou depressão (DLD) de longa duração, que são modelos bem conhecidos de plasticidade sináptica. Em grupos controle, a injeção de PILO, NIC ou Veic foi desacompanhada de EAF/EBF. Por fim, retomamos a coleta de PPSCs a 0,05 Hz por 240 min. Os resultados mostraram que a EAF não afetou os PPSCs quando aplicada a pós Veic. Porém, nos ratos PILO e NIC, os PPSCs tiveram amplitude aumentada a partir de 150 min após EAF, indicando que a pré-ativação colinérgica foi necessária à indução de uma PLD tardia. Inversamente, quando a EBF foi aplicada após Veic, a amplitude dos PPSCs foi reduzida de modo estável por 240 min. Isto não ocorreu quando a EBF foi aplicada após PILO e NIC, sugerindo que a modulação colinérgica suprimiu a DLD. Nos grupos controle, PILO, NIC e Veic sozinhos não afetaram PPSCs em longo prazo, confirmando que os resultados de PLD e DLD são devidos a uma interação entre a pré-ativação colinérgica e mecanismos sinápticos desencadeados pela EAF/EBF. Portanto, as oscilações rápidas induzidas pela transmissão colinérgica favorecem a PLD no circuito Tmd\_CPF, enquanto impedem uma DLD

dependente de oscilações lentas. Além disso, os efeitos muscarínicos e nicotínicos sobre a plasticidade de longo prazo são iguais, apesar de os mecanismos celulares destes receptores serem diferentes. Nossos achados ajudam a esclarecer a regulação dos inibitórios no CPFs obmodulação colinérgica fisiológica (atenções onoparadoxal) e disfuncional (esquizofrenias e doença de Alzheimer).

## Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço

### EFICÁCIA DA FONOTERAPIA NO PÓS-OPERATÓRIO DE EDEMA DE REINKE EM MULHERES

**Fernanda Maria de Oliveira**

Dissertação de Mestrado apresentada em 02/07/2012

Orientador: Prof. Dr. Hilton Marcos Alves Ricz

O tratamento mais indicado para o edema de Reinke é a cirurgia, podendo ser associada à fonoterapia, que deve ser baseada nas orientações de saúde vocal e no treinamento utilizando técnicas vocais, com objetivo de promover adequada cicatrização e restabelecimento da voz em menor período de tempo. Diante disso, faz-se necessário avaliar a importância da terapia vocal como um instrumento que auxilia e influencia o restabelecimento da qualidade da voz e a reestruturação anatomofisiológica da prega vocal em indivíduos submetidos à fonomicrocirurgia. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da fonoterapia após fonomicrocirurgia em mulheres com edema de Reinke, por meio da auto-percepção de sinais e sintomas vocais, dos parâmetros acústicos e perceptivo-auditivos da voz. Foram avaliadas 22 mulheres, com idade média de 52 anos, submetidas à microcirurgia de laringe para tratamento de edema de Reinke e encaminhadas para avaliação fonoaudiológica no pré-operatório. Os sujeitos foram divididos em: grupo estudo (GE), composto de oito indivíduos que apresentaram adesão ao tratamento fonoaudiológico e grupo controle (GC), com 14 sujeitos, que não foram considerados aderentes. Os critérios de adesão foram: execução dos exercícios orientados, eliminação do abuso/mau uso vocal, realização do repouso vocal, hidratação adequada, eliminação do tabagismo e comparecimento à fonoterapia. Foram oferecidos, em média, cinco atendimentos fonoaudiológicos semanais. As mulheres foram submetidas à aplicação de escala visual analógica para auto-avaliação auditiva e tátil-cinestésica, utilizando o Questionário de Sintomatologia Vocal, mensuração do tempo máximo de fonação (TMF) e captura da amostra vocal para avaliação acústica, utilizando o *software* MDVP-Adv (*KayPentax®*), realizando análise da frequência fundamental e medidas de perturbação, de ruído, complementares e de estabilidade; e análise perceptivoauditiva realizada por três juízes fonoaudiólogos especialistas em Voz, fazendo-se uso da escala GIRBAS, acrescida do *pitch* e *loudness*. A coleta de dados foi realizada em quatro momentos: pré-operatório, uma semana de pós-operatório, de quatro a seis semanas depois da cirurgia e no retorno médico, cinco meses após. Observou-se redução dos sintomas vocais referidos pelos sujeitos de ambos os grupos, com o GE referindo melhora significativa para os sintomas táteis-cinestésicos, especialmente a fadiga vocal, e para os auditivos, como rouquidão e *pitch*, comparado ao GC. Na avaliação perceptivo-auditiva e acústica, houve melhora nos sujeitos de ambos os grupos. Quando comparados, após o término do tratamento, o GE apresentou aumento significativo do TMF, da F0 e medidas de estabilidade, além de melhor desempenho para os parâmetros *pitch* e rugosidade, em relação ao GC. A maioria do GE continuou apresentando melhora dos parâmetros vocais nas avaliações perceptivo-auditiva e acústica, mesmo quatro meses após a alta fonoaudiológica. Com a comparação dos grupos, foi possível concluir que a fonoterapia oferecida foi eficaz, promovendo a melhora das queixas táteis-cinestésicas e de *pitch* grave referidas pelos sujeitos, o aumento da estabilidade vocal e da F0 obtidos pela análise acústica e a adequação do padrão vocal revelada pela avaliação perceptivo-auditiva.

### ESTUDO DA FARMACOCINÉTICA VÍTREA E TOXICIDADE DA CICLOSPORINA INTRAVÍTREA EM OLHOS DE COELHOS

**Felipe Piacentini Paes de Almeida**

Orientador: Prof. Dr. André Márcio Vieira Messias

Tese de Doutorado apresentada em 16/07/2012

O tratamento de pacientes com doenças inflamatórias oculares crônicas frequentemente implica no uso prolongado de drogas anti-inflamatórias sistêmicas como corticosteroides e outros imunossuppressores, podendo acarretar efeitos

colaterais importantes. O uso local destas drogas pode contribuir para aumentar seus efeitos desejáveis e reduzir os colaterais. Implantes intraoculares biodegradáveis são capazes de disponibilizar o fármaco diretamente na cavidade vítrea em doses terapêuticas por período prolongado. O copolímero do ácido lático e glicólico (PLGA) é um clássico exemplo entre os polímeros sintéticos biodegradáveis aplicados em sistemas de liberação de fármacos devido à sua biocompatibilidade e ausência de toxicidade em testes *in vivo*. A ciclosporina A (CsA) é um imunossupressor largamente utilizado na clínica médica, e também tem sido empregada no tratamento de várias doenças inflamatórias intraoculares. O objetivo deste estudo foi avaliar a farmacocinética vítrea da CsA, quando aplicada por meio de implante biodegradável de PLGA intravítreo na concentração de 350 µg em olhos de coelhos, assim como avaliar a ocorrência de toxicidade retiniana causada pela presença intraocular do sistema de liberação de fármacos por meio de eletrorretinografia (ERG) e histopatologia. Dos sessenta coelhos que foram utilizados neste estudo, 38 receberam o implante intravítreo de PLGA contendo CsA e 22 somente os veículos. Somente o olho direito dos coelhos foi analisado na pesquisa. O estudo teve duração de oito semanas. Quatro coelhos do grupo CsA e dois do grupo controle foram sacrificados semanalmente para a coleta do vítreo e posterior estudo farmacocinético. Quatro animais de cada grupo foram escolhidos para terem a pressão intraocular aferida semanalmente. Seis coelhos foram submetidos à ERG no início e ao final do estudo, sendo então sacrificados, e os olhos processados para estudos histológicos da retina. O período inferido de permanência da CsA na cavidade vítrea foi de 17 semanas. Nos dois grupos, com e sem CsA, não foram observadas alterações histológicas na retina, entretanto houve importante redução da onda b nas fases escotópicas da ERG no grupo CsA, indicando toxicidade na via dos bastonetes após as oito semanas de seguimento. Em resumo, estes resultados mostraram que a CsA aplicada por meio de implantes oculares de PLGA na dose de 350 µg não causa alterações histológicas da retina, mas provoca um padrão exclusivo de diminuição da onda b. Em estudos futuros, seria interessante avaliar os efeitos de implantes contendo concentrações inferiores a 350 µg de CsA, e também, veículos que permitam que sua liberação seja mais lenta, evitando-se, assim, a toxicidade observada nos ERGs e confirmar sua aplicabilidade clínica como alternativa interessante para o tratamento de doenças oculares inflamatórias crônicas.

## EXPRESSÃO GÊNICA DOS FATORES DE APOPTOSE NA RINOSSINUSITE CRÔNICA COM POLIPOSE NASOSSINUSAL E SUA CORRELAÇÃO COM O ÍNDICE DE RECIDIVA

**Daniel Salgado Küpper**

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

Tese de Doutorado apresentada em 03/08/2012

**Introdução:** A rinossinusite crônica (RSC) com polipose nasossinusal (PNS) é uma doença inflamatória crônica, de caráter proliferativo e benigna. O gatilho de perpetuação do processo inflamatório tem sido amplamente estudado, porém, na literatura, pouco se encontra sobre a morte celular. Desse modo, a avaliação molecular dos mecanismos envolvidos na apoptose celular pode fornecer informações para melhor entendimento da patogênese da RSC com PNS.

**Objetivos:** Avaliar a diferença de expressão gênica dos fatores de apoptose caspases 3, 7 e 9 e p53 em pacientes com pólipos nasais e controles e correlacionar essa expressão com o índice de recidiva da doença.

**Casuística e Métodos:** A expressão gênica dos RNAm, foi analisada por meio de Rtg-PCR, em 26 amostras de pólipos nasais (PN) e em 19 controles dos seguintes mediadores de apoptose: caspases 3, 7 e 9 e p53. Elaborou-se um protocolo clínico, sendo realizada endoscopia nasal e estadiamento radiológico pela escala de Lund-Mackay no pré e pós-operatório.

**Resultados:** A expressão gênica dos fatores caspase 3 e 9 e p53 se mostrou significativamente menor nos pacientes com RSC com PNS quando comparados aos controles. Em relação à caspase 7, não foi encontrada diferença estatística na expressão gênica quando comparada aos controles. Não foi observada nenhuma relação direta quando realizada a correlação entre a expressão gênica e o índice de recidiva dos pacientes com RSC com PNS.

**Conclusão:** Os pacientes com RSC com PNS apresentaram menor expressão da caspases 3 e 9 e da p53, quando comparados aos controles, não sendo observada diferença na expressão da caspase 7. E não foi observada correlação entre a menor expressão de caspase 3 e 9 e proteína p53 eo índice de recidiva na RSC com PNS.

## ESTUDO DA OSCILAÇÃO CORPORAL RELACIONADO À ELETRONISTAGMOGRAFIA COMPUTADORIZADA E AO *DIZZINESS HANDICAP INVENTORY* (DHI)

**David Greco Varela**

Orientador: Prof. Dr. José Fernando Colafêmina

Tese de Doutorado apresentada em 11/09/2012

**Introdução:** Os sistemas proprioceptivo, visual e vestibular devem ser avaliados da melhor forma no caso de pacientes com tontura. Informações referentes ao reflexo vestibulo espinal e à integração do mesmo com outros sistemas não são disponíveis nos exames eletrônístagmográficos. A aplicação de um novo sistema com sensores eletromagnéticos para monitoração dos movimentos corporais é importante para o desenvolvimento e a disseminação da avaliação posturográfica.

**Objetivos:** Verificar se há diferença na oscilação corporal entre voluntários hígidos e voluntários com queixa de tontura em diferentes condições sensoriais (superfície estável e instável, de olhos abertos e fechados), segundo a presença ou ausência de exame eletrônístagmográfico compatível com vestibulopatia e positividade ou não das manobras de Epley e Dix Hallpike e relacionar as alterações de oscilação corporal com o questionário *Dizziness Handicap Inventory* (DHI).

**Casuística e Métodos:** Participaram 29 mulheres e 22 homens hígidos entre 18 e 59 anos. Oito homens e 22 mulheres integraram o grupo 1, com provas calóricas e eletrônístagmografia compatíveis com disfunção vestibular periférica; quinze homens e 39 mulheres formaram o grupo 2, com manobras de Dix Hallpike e exames eletrônístagmográficos normais; um homem e oito mulheres integraram o grupo 3, com manobras de Dix Hallpike e Epley positivas e exame eletrônístagmográfico normal e apenas dois homens fizeram parte do grupo 4, em que as manobras labirínticas e eletrônístagmografia foram alteradas. Todos realizaram avaliação posturográfica com o equipamento *Polhemus Patriot®* em diferentes posições sensoriais e foi procedida análise intergrupos tomando-se  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$  como valores significativos. O questionário DHI foi aplicado no grupo de casos.

**Resultados:** No grupo de mulheres com tontura houve maior número de variáveis com significância estatística do que o de homens, bem como maior número de correlações, com  $p < 0,01$ . Os grupos 1 e 2, com casos de mulheres, apresentaram alterações significativas em relação ao grupo controle, havendo concordância em 29 das 32 variáveis examinadas, sendo a situação OFSI (olhos fechados em superfície instável) a mais sensível. No grupo 3 de mulheres, após ajuste por idade, houve diferenças estatísticas em relação ao grupo controle na posição OASE (olhos abertos superfície estável). O grupo 1 de homens apresentou diminuição dos padrões de oscilação corporal na posição OASE ( $p < 0,05$ ).

**Conclusão:** Houve diferença nos padrões de oscilação corporal entre voluntários hígidos e com tontura à avaliação posturográfica estática, e também diferença dos padrões de oscilação de homens e mulheres e associados à idade. As variáveis velocidade e trajetória de oscilação foram as mais sensíveis na detecção do aumento da oscilação corporal, principalmente nos grupo 1 e 2 de casos de mulheres.

## ANÁLISE DA FUNÇÃO MASTIGATÓRIA POR MEIO DE MÉTODOS CLÍNICOS E “*DIFFERENTIAL LISSAJOUS EMG FIGURE*” EM PACIENTES COM DESORDEM TEMPOROMANDIBULAR

**Cláudia Lucia Pimenta Ferreira**

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Maria de Felício

Tese de Doutorado apresentada em 20/09/2012

**Objetivo:** analisar a função mastigatória em pacientes com DTM articular, de longo prazo, por meio dos métodos clínicos de auto-avaliação da dificuldade para mastigar e avaliação miofuncional e do método instrumental “*differential Lissajous EMG figure*”, comparativamente a sujeitos controles, bem como verificar a relação entre as variáveis obtidas por esses métodos.

**Método:** Participaram 55 pacientes com DTM articular, segundo o Research Diagnostic Criteria for TMD, eixo I (grupo DTM: 50 mulheres e 5 homens; média de idade 32, DP 11,34 anos) e 35 sujeitos saudáveis (grupo C: 31 mulheres e 4 homens; média de idade 29, DP 8,57 anos). As medidas empregadas foram: (a) auto-avaliação dos sinais e sintomas de DTM de acordo com o protocolo validado ProDTMmulti, (b) escala de dificuldade para mastigar; (c) avaliação miofuncional orofacial, de acordo com o protocolo validado AMIOFE, análise clínica da mastigação de acordo o protocolo AMIOFE-

E, (d) eletromiografia de superfície (EMG) dos músculos temporais e masseteres (direito e esquerdo), registrada durante a realização de teste mastigatório padronizado com goma de mascar, analisada pelo “*Differential Lissajous EMG Figure*” (DL-EMG). A análise dos dados intervalares foi efetuada por estatística não paramétrica (Mann-Whitney para amostras não pareadas). Aos dados contínuos, como da EMG, foi aplicada a análise de variância (ANOVA), com dois fatores de variação (grupo e lado) e o teste *t*-Student para amostras não pareadas, para o índice Simetria. As correlações entre as variáveis foram calculadas pelo coeficiente de correlação de Spearman. O nível de significância estabelecido foi  $P < 0,05$ .

**Resultados:** Os sujeitos do grupo DTM, em comparação ao grupo C, indicaram maior severidade da sintomatologia (média 129,04, DP 82,04 x média 2,91, DP 4,75) ( $P < 0,000$ ); maior dificuldade para mastigar (média 44,98, DP 17,84 x média 16,66, DP 10,04) ( $P < 0,000$ ); pior condição miofuncional orofacial global (média 85,96, DP 5,61 x média 94,91, DP 4,74) ( $P < 0,000$ ), pior escore quanto ao tipo mastigatório pelo AMIOFE-E (média 7,05, DP 3,03 x média 8,74, DP 1,84) ( $P < 0,01$ ), e maior tempo despendido na mastigação do alimento (média 50,84, DP 11,50 x média 41,53, DP 11,02), ( $P < 0,001$ ). Na EMG, o grupo DTM apresentou, na mastigação do lado direito, maior incoordenação que do lado esquerdo, bem como em comparação a mastigação à direita e à esquerda do grupo C, como verificado pelos valores médios do índice Fase direita (média 93,21, DP 103,05 x média 54,30, DP 73,79) e Fase esquerda (média 48,96, DP 36,36 x média 31,27, DP 18,63) ( $P < 0,01$ ). A Simetria entre a mastigação dos lados direito e esquerdo foi menor no grupo DTM (média 45,91, DP 29,86 x média 68,52, DP 18,88) ( $P < 0,0001$ ), o qual também utilizou maior atividade muscular total, representada pelo Impacto direito (média 1791,55, DP 1797,48 x média 1229,89, DP 573,39) e Impacto esquerdo (média 1762,98, DP 2097,67 x média 1159,16, DP 591,01) ( $P < 0,01$ ) para a realização da função, bem como maior atividade percentual em relação à máxima contração voluntária, representada pelo Impacto% direita (média 89,61, DP 79,64 x média 66,20, DP 25,30) e Impacto% esquerda (média 89,09, DP 99,47 x média 65,82, DP 33,39) ( $P < 0,05$ ). O escore de dificuldade para mastigar foi correlacionado de modo significativo e negativo com a Simetria ( $r = -0,25$ ,  $P = 0,019$ ) da DL-EMG e escore total do AMIOFE ( $r = -0,49$ ,  $P < 0,000$ ).

**Conclusão:** Pacientes com DTM articular relataram maior severidade da sintomatologia e maior dificuldade para mastigar. Clinicamente foi observado padrão mastigatório unilateral, o que pode explicar o menor índice de Simetria e o recrutamento aumentado dos músculos do lado de balanceio, que se refletiu na Fase (ângulo). A avaliação clínica e a EMG são métodos de diagnóstico complementares e úteis para o planejamento da reabilitação das funções motoras orofaciais.

## ALTERAÇÕES DA AMPLITUDE DE PULSO OCULAR E DA PRESSÃO INTRAOCULAR RELACIONADAS AO USO DE ÓCULOS DE NATAÇÃO

Ana Paula Branco de Paula

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Veronese Rodrigues

Dissertação de Mestrado apresentada em 21/09/2012

As variações da pressão intraocular (PIO) de curto e de longo prazo têm sido consideradas como importantes fatores de risco para o glaucoma. Estudos prévios mostraram que os óculos de natação podem promover a elevação da PIO. O objetivo deste estudo foi investigar os fatores relacionados ao aumento da PIO causado pela compressão periocular resultante do uso de óculos de natação. Trinta e cinco olhos de voluntários saudáveis foram aleatoriamente selecionados para avaliação com dois óculos de natação profissionais. Um deles teve a parte central das lentes retiradas (ON1) para permitir a medição da PIO e da amplitude de pulso ocular (APO) durante o seu uso (com tonômetro de Aplanção de Goldmann – TAG e com o Tonômetro de Contorno Dinâmico Pascal – TCD, respectivamente) e o outro ficou inalterado (ON2). As leituras da TAG e TCD foram realizadas antes do uso do ON1 e do ON2, durante (2,0 minutos de uso - ON1) e 5,0 minutos após (ON1 e ON2). A rigidez escleral (calculada com base nas leituras do tonômetro Schiotz), área de rebordo orbitário, exoftalmometria de Hertel, equivalente esférico, comprimento axial do olho, a espessura central da córnea e força elástica da borracha dos óculos de natação foram consideradas como variáveis potencialmente relacionadas com as alterações da PIO. Os resultados observados demonstraram que o uso dos óculos de natação pode levar ao aumento significativo da PIO avaliada pelo TAG (13,14 vs 20,6 mmHg;  $p < 0,0001$ ), mas não significativo da APO média avaliada pelo TCD (1,87 vs 2,17 mmHg;  $p > 0,05$ ). Após a sua retirada, houve redução significativa tanto da PIO (9,19 mmHg;  $p < 0,0001$ ), quanto da APO (1,54 mmHg;  $p = 0,012$ ). Dentre os fatores anatômicos estudados da região periocular, a área do rebordo orbitário ( $p = 0,0052$ ) e a força elástica ( $p = 0,0019$ ) foram os únicos que apresentaram correlação significativa com a elevação da PIO verificada com o TAG. Tais observações sugerem a necessidade de escolha adequada dos modelos de óculos de natação por parte de seus praticantes, assim como podem nortear estudos futuros voltados ao desenvolvimento destes equipamentos de forma personalizada, principalmente para portadores de glaucoma.

## VALIDAÇÃO DO PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO MIOFUNCIONAL OROFACIAL COM ESCALAS PARA IDOSOS E RELAÇÃO COM O ÍNDICE DE SAÚDE ORAL

**Maria do Rosário Ferreira Lima**

Orientadora: Profa.Dra. Cláudia Maria de Felício

Dissertação de Mestrado apresentada em 21/09/2012

Instrumentos validados são necessários para a avaliação fonoaudiológica. Na literatura, somente um protocolo, apropriado para triagem, foi validado considerando as condições miofuncionais orofaciais de idosos. O objetivo deste trabalho foi analisar o Critério de Validade do Protocolo de Avaliação Miofuncional Orofacial com escalas (AMIOFE) modificado para idosos (AMIOFE-I), comparando-o ao protocolo “*NOT-S*” e verificar a capacidade do AMIOFE-I para diferenciar sujeitos com base no índice de saúde oral (*Oral Health Index: OHX*). A amostra foi composta por 83 indivíduos idosos (média de idade= 69, DP 7,24), avaliados com os protocolos AMIOFE-I, *NOT-S* e *OHX*, e complementada pela análise de imagens gravadas em vídeo, pela examinadora 1 (E1), cirurgiã-dentista e fonoaudióloga. A E1 realizou novas análises de 20% da amostra para os protocolos AMIOFE-I e *NOT-S*, e uma segunda examinadora (E2), fonoaudióloga, procedeu análises de 20% da amostra com o AMIOFE-I, para os cálculos de confiabilidade intra e entre-examinadores. O coeficiente de correlação de Spearman foi calculado para a validação do AMIOFE-I em relação ao *NOT-S*. Para verificar a capacidade do AMIOFE-I em diferenciar sujeitos idosos com base no índice *OHX*, foram compostos cinco grupos: grupo I (*OHX* d” 50%, n= 15), grupo II (50,1% < *OHX* < 66,23%, n=17), grupo III (66,24% < *OHX* < 84,71%, n= 17), grupo IV (84,72% < *OHX* < 92,05%, n= 17) e grupo V (*OHX* > 92,05%, n= 17). Como não houve diferença entre os grupos II, III e IV, estes foram agrupados, formando três grupos: grupo I (*OHX* d” 50%, n= 15), grupo II (50% < *OHX* d” 92,05%, n= 51), grupo III (*OHX* > 92,05%, n= 17) e a Análise de Variância (ANOVA) foi aplicada. O pós-teste de Tukey foi aplicado aos dados que apresentaram diferenças significantes ( $\alpha=0,05$ ). Foram calculados a sensibilidade, a especificidade e os valores preditivos do AMIOFE-I. Para isto a mediana foi estabelecida como ponto de corte. Como resultado encontrou-se correlação negativa significativa entre as avaliações realizadas com o AMIOFE-I e o *NOT-S* ( $r=-0,81$ ,  $P<0,0001$ ), que possuem escalas inversas. A validade de construto foi demonstrada pela capacidade do AMIOFE-I em refletir as condições miofuncionais orofaciais de acordo com o *OHX*, com diferenças significantes na aparência/postura de lábios e mandíbula, na deglutição e na mastigação. As menores médias foram observadas no grupo com menores *OHX* (média= 41,07) e as melhores para os grupos com maiores *OHX* (média= 96,71). Não houve diferença de idade entre os três grupos. O coeficiente de confiabilidade entre as examinadoras E1 e E2 para a aplicação do AMIOFE-I foi 0,91, e a correlação entre as avaliações realizadas por ambas foi significativa ( $r=0,84$ ,  $P<0,01$ ). A confiabilidade da E1 para a aplicação do AMIOFE-I foi excelente ( $r=0,99$ ,  $P<0,01$ ) e para a aplicação do *NOT-S* foi boa, com coeficiente de 0,89 e correlação de 0,80 ( $P<0,01$ ). A análise de sensibilidade do AMIOFE-I foi realizada em relação ao escore total do *NOT-S* (entrevista e avaliação) e em relação ao escore da avaliação apenas. Os valores foram, respectivamente, 67,92% e 64,52%. Para os outros cálculos, os valores foram: especificidade 76,67 e 85,71; prevalência 63,86 e 74,70; valores preditivos positivo 87,72 e 93,02 e negativo 57,50 e 45%, respectivamente. Este estudo mostrou que o AMIOFE-I é um instrumento válido para avaliação miofuncional orofacial de idosos e sensível às condições orais, podendo ser utilizado para aplicação clínica e pesquisas.

## Ortopedia, Traumatologia E Reabilitação

### AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MUSCULAR DO ASSOALHO PÉLVICO, INCONTINÊNCIA URINÁRIA E FUNÇÃO SEXUAL EM MULHERES NA PÓS-MENOPAUSA

**Maíra de Menezes Franco**

Orientadora: Profª Drª Cristine Homsy Jorge Ferreira

Dissertação Mestrado apresentada em 03/07/2012

A pós-menopausa inicia-se um ano após o último ciclo menstrual. A redução dos níveis de estrogênio circulante leva a alterações no aparelho genital como atrofia do epitélio do intróito vaginal e vulvar, que podem favorecer o aparecimento de incontinência urinária (IU) e disfunção sexual. O presente estudo teve como objetivo avaliar a função dos músculos do assoalho pélvico (MAP), os relatos de perda urinária e função sexual entre mulheres na pós-menopausa.

Trata-se de um estudo clínico transversal que incluiu 76 mulheres na pós-menopausa. O protocolo de avaliação dos MAP incluiu a palpação vaginal utilizando a escala de Oxford modificada, e a perineometria com Peritron™ (*Neen HeathCare, East Dereham, Norfolk, UK*). Os relatos de incontinência urinária e a função sexual foram avaliados utilizando-se respectivamente o "International Consultation on Incontinence Questionnaire-Short Form" (ICIQ-SF) e o Índice de Função Sexual Feminina (IFSF). Para as variáveis categóricas foi proposto o teste exato de Fisher. Para as correlações entre as variáveis contínuas, foi proposto o coeficiente de correlação de Spearman ( $\rho$ ). Para a correlação da avaliação da função dos MAP e da severidade com as variáveis contínuas, foi calculado o coeficiente de correlação de Kendall. Para associação da avaliação da função dos MAP e IU e avaliação da função dos MAP e a disfunção sexual foi utilizado Teste Qui-quadrado e Regressão logística simples. Das 76 mulheres avaliadas, 34 (45%) apresentavam IU, 54 (71%), tinham vida sexual ativa. A função dos músculos do assoalho pélvico de 51% das mulheres foi classificada como grau 1 e 2 segundo a escala de Oxford modificada. A média do pico de perineometria foi de 34,73 cmH<sub>2</sub>O. Apresentaram disfunção sexual segundo o IFSF, 39 (72%) mulheres. As mulheres incontinentes tiveram escores mais baixos segundo a escala de Oxford modificada, sendo que 58% delas foram classificadas com grau 1 ou 2, comparado a 45% das mulheres continentas ( $p=0,18$ ). Não houve diferença significativa na média do pico de perineometria entre as mulheres incontinentes (31,92 cmH<sub>2</sub>O) quando comparado com as continentas (37,18 cmH<sub>2</sub>O) ( $p=0,41$ ). Verificou-se uma alta ocorrência de incontinência urinária e disfunção sexual entre as mulheres avaliadas, além disso a função dos MAP da maior parte delas foi deficiente.

### **A RELAÇÃO DA IDADE E MOBILIDADE DO SEGMENTO VERTEBRAL COM AS SEPARAÇÕES ENTRE A PLACA VERTEBRAL TERMINAL E O CORPO VERTEBRAL**

**Carlos Fernando Pereira da Silva Herrero**

Orientador: Prof. Dr. Helton Luiz Aparecido Defino  
Tese de Doutorado apresentada em 31/07/2012

O objetivo do estudo foi avaliar por meio de histomorfometria as separações entre a placa vertebral terminal e o corpo vertebral, e sua correlação com a idade e a mobilidade do segmento estudado. Foram estudados os segmentos T7-T8 e L4-L5 de 41 espécimes de cadáveres humanos. Os cadáveres foram divididos em dois grupos de idade com o grupo 1 consistindo de 17 cadáveres com idade variando entre 20 e 40 anos e o grupo 2 por 24 cadáveres com idade que variou de 41 a 80 anos. Todos os segmentos vertebrais foram removidos por meio da abordagem anterior. Os tecidos moles adjacentes foram ressecados dos segmentos torácicos (T7-T8) e lombares (L4-L5), foram realizadas osteotomias em cada pedículo e na porção média dos corpos vertebrais dos segmentos vertebrais selecionados para o estudo. Os cortes de 3 a 5  $\mu$ m de espessura foram realizados no eixo sagital e incluíram parte dos corpos vertebrais e do disco adjacente. Os cortes foram colocados em lâminas e corados com hematoxilina e eosina. Os parâmetros avaliados na microscopia óptica foram o comprimento da vértebra estudada, e a quantidade e a extensão das separações entre a placa vertebral terminal e o corpo vertebral. Enquanto na microscopia com luz polarizada foi qualitativamente analisada a morfologia das fibras colágenas. Para excluir o viés dos diferentes tamanhos dos corpos vertebrais, foram criados o índice de separação (número de separações/ comprimento da área estudada) e o índice de separação de extensão (soma das separações / comprimento da área estudada). O índice de separação e o índice de extensão de separação foram estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) quando comparamos os grupos de idade e os diferentes segmentos. A avaliação qualitativa por meio de luz polarizada evidenciou inserções irregulares do colágeno adjacentes às separações. Os resultados deste estudo indicam que as separações entre a placa vertebral e o corpo vertebral apresentam relação direta com a idade e com a mobilidade do segmento vertebral estudado.

### **INFLUÊNCIA DA FORÇA E DA POTÊNCIA MUSCULAR NO CONTROLE POSTURAL DE IDOSAS DE DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS**

**Matheus Machado Gomes**

Orientadora - Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Daniela Cristina Carvalho de Abreu  
Tese de Doutorado apresentada em 16/08/2012

O controle postural de idosos tem sido estudado com o objetivo de melhor entender os fatores que levam esta população a sofrer mais quedas que os indivíduos jovens. A redução da força e da potência muscular está entre os

aspectos que contribuem para o declínio do controle postural. Entretanto, faltam esclarecimentos sobre a capacidade de produzir força e potência muscular em idosos de diferentes idades. Adicionalmente, faltam informações sobre a relação entre força e potência muscular com o desempenho do controle postural em idosas de diferentes faixas etárias. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a força e a potência muscular e sua relação com o desempenho do sistema de controle postural de mulheres idosas de diferentes faixas etárias. Participaram do estudo 80 mulheres que foram divididas em 4 grupos de acordo com a idade: Grupo Jovens (n=20) com idade entre 18 e 30 anos; Grupo 60-64 anos (n=20) com idade entre 60 e 64 anos; Grupo 65-69 anos (n=20) com idade entre 65 e 69 anos; Grupo 70-74 anos (n=20) com idade entre 70 e 74 anos. A força (uma repetição máxima - 1RM) e a potência dos músculos extensores e flexores de joelho produzida nas intensidades de 40%, 70% e 90% de 1-RM foram avaliadas através de uma cadeira extensora/flexora. A oscilação do centro de pressão (plataforma de força) e a atividade muscular (Vasto Lateral, Tibial Anterior, Bíceps Femoral e Gastrocnêmio Lateral) foram avaliadas durante a manutenção do controle postural em situação estática, dinâmica e com perturbação da base de suporte. Os resultados revelaram que idosas nas faixas etárias 60-64, 65-69 e 70-74 anos apresentaram força e potência muscular semelhantes, porém inferiores em comparação com as jovens. Além disso, mostraram que o desempenho do controle postural de idosas nestas faixas etárias é semelhante, mas inferior em relação às jovens. Não houve diferença entre os grupos para a ativação muscular. Análises de regressão linear múltipla apontaram que a força e a potência muscular estiveram fracamente relacionadas com o desempenho do controle postural. Portanto, estes resultados indicam que, para mulheres com idade entre 60 e 74 anos, a força e a potência muscular são semelhantes e exercem pouca influência no desempenho do controle postural que também é similar nesta faixa etária.

## **ESTUDO EXPERIMENTAL COMPARATIVO DOS EFEITOS DA MENOPAUSA PRECOCE E FISIOLÓGICA SOBRE O CONTROLE AUTÔNOMICO CARDIOVASCULAR - PAPEL DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO**

**Geisa Cristina Singolani Vaccari Tezini**

Orientador: Prof. Dr. Hugo Celso Dutra de Souza

Tese de Doutorado apresentada em 29/08/2012

O presente estudo teve por objetivo avaliar e comparar os efeitos da menopausa fisiológica e da menopausa precoce sobre o controle autonômico cardiovascular de ratas velhas, assim como as adaptações promovidas pelo treinamento físico aeróbio nas duas situações, utilizando diferentes abordagens; 1) balanço simpatovagal cardíaco, avaliado pela administração de metilatropina e propranolol; 2) análise espectral da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e da pressão arterial sistólica (VPAS); 3) sensibilidade barorreflexa (SBR), avaliada de forma espontânea e após teste farmacológico com fenilefrina e nitroprussiato de sódio; 4) estudo da contratilidade cardíaca em preparações isoladas, avaliada por meio da administração de agonistas  $\beta$ -adrenérgicos; e 5) quantificação da expressão de RNAm dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos cardíacos. Para tanto, ratas *Wistar* (N = 144) foram divididas em 3 grandes grupos: Controle (ratas com 22 semanas de idade, submetidas à cirurgia sham na 10ª semana de vida); Menopausa Fisiológica (ratas com 82 semanas de idade, submetidas à cirurgia sham na 10ª semana de vida) e Menopausa Precoce (ratas com 82 semanas de idade, submetidas à ovariectomia na 10ª semana de vida). Em cada grupo, metade das ratas foram submetidas a um protocolo de treinamento físico aeróbio (natação) nas últimas 10 semanas. Os grupos sedentários, menopausa fisiológica e menopausa precoce, apresentaram aumento da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC) basal e redução da FC intrínseca em comparação ao grupo controle sedentário. O treinamento físico reduziu a PAM somente no grupo menopausa fisiológica. Todos os grupos treinados apresentaram redução da FC basal, no entanto, apenas os grupos controle e menopausa fisiológica treinados tiveram redução na FC intrínseca. Em relação ao balanço simpatovagal cardíaco, o grupo controle sedentário apresentou predominância autonômica vagal, enquanto que os demais grupos sedentários, menopausa fisiológica e menopausa precoce, apresentaram predominância autonômica simpática. Após o treinamento físico, o grupo menopausa fisiológica passou a apresentar predominância vagal. A VFC foi semelhante entre os três grupos sedentários em unidades normalizadas. No entanto, após o treinamento físico, os grupos controle e menopausa fisiológica mostraram redução na potência da banda de baixa frequência (LF; 0,2-0,75 Hz) e aumento na potência da banda de alta frequência (HF; 0,75-3,0 Hz). A análise da VPAS revelou que os grupos sedentários, menopausa fisiológica e menopausa precoce, tiveram aumento na potência da banda de LF. Após o treinamento físico, somente o grupo menopausa fisiológica apresentou redução. Em relação à SBR, os grupos sedentários, menopausa fisiológica e menopausa precoce, apresentaram menor



ganho em relação ao grupo controle sedentário, e, esses mesmos grupos, quando submetidos ao treinamento físico, apresentaram elevação na SBR em relação aos seus respectivos grupos sedentários. A avaliação da contratilidade em coração isolado mostrou que a administração de dobutamina induziu menores respostas contráteis nos grupos sedentários menopausa fisiológica e menopausa precoce, quando comparados ao grupo controle sedentário. O treinamento físico promoveu aumento das respostas contráteis à dobutamina somente nos grupos controle e menopausa fisiológica, em relação aos seus respectivos grupos sedentários. Por outro lado, a resposta contrátil ao salbutamol não foi influenciada, nem pela menopausa, nem pelo treinamento físico. Por fim, os grupos sedentários, menopausa fisiológica e menopausa precoce, tiveram aumento na expressão de RNAm dos receptores 1-adrenérgicos, comparados ao grupo controle sedentário, e, após o treinamento físico, houve redução na expressão nos dois grupos menopausa. A expressão dos receptores 2-adrenérgicos cardíacos, por sua vez, foi similar entre os seis grupos estudados. Em conjunto, os resultados do presente estudo mostram que a menopausa fisiológica e a menopausa precoce promovem prejuízos semelhantes em todos os parâmetros avaliados (hemodinâmicos, autonômicos e cardíacos). Entretanto, ao contrário do ocorrido com o grupo menopausa fisiológica, o treinamento físico não foi capaz de atenuar todos os efeitos negativos observados sobre o controle autonômico cardiovascular no grupo menopausa precoce.

## EFICÁCIA DA UTILIZAÇÃO SIMULTÂNEA DE APARELHOS DE ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NERVOSA TRANSCUTÂNEA (TENS) EM PACIENTES PORTADORES DE FIBROMIALGIA

**Eliana Fazuoli Chubaci**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gabriela Rocha Lauretti

Dissertação de Mestrado apresentada em 06/09/2012

**Introdução:** Fibromialgia é caracterizada como síndrome, a qual inclui dor muscular, fadiga e distúrbio do sono. Ansiedade e depressão estão frequentemente associados, porém a causa é desconhecida. A intensidade da dor piora ao se deitar, durante a noite e no despertar. Normalmente a dor se difunde na região lombar e cervical. A TENS é um método não medicamentoso, estabelecido para controle da dor, o qual minimiza o consumo de analgésicos.

**Objetivos:** Este estudo visou avaliar a utilização de dispositivos de TENS simultâneos em pacientes portadores de Fibromialgia.

**Métodos:** Após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa e consentimento, 39 pacientes portadores de Fibromialgia foram avaliados de forma prospectiva, aleatória e duplamente-encoberta. Avaliou-se a utilidade clínica de um novo, muito pequeno e leve dispositivo de a TENS (TANYX). Dois dispositivos de TENS, foram aplicados de forma simultânea em cada paciente: 1) na região lombar (perpendicular à coluna sobre L5), e 2) na região cervical (perpendicular à coluna, entre C7 e T1), durante 20-min, a cada 12 horas, durante 7 dias consecutivos (antes de se deitar, à noite, e antes de se levantar, pela manhã). Os pacientes foram divididos em 3 grupos (n=13). O grupo placebo (GP) utilizou adesivos que não transmitiam estímulo elétrico, semelhantes aos originais. O grupo de únicoTENS (TENS-1) (n=13), utilizou um adesivo de TENS ativo na área mais dolorida (cervical ou lombar) e placebo na área menos dolorosa. O terceiro grupo (TENS-2) utilizou dois adesivos ativos de TENS nas áreas cervical e lombar, simultaneamente. Para controlar a dor, diclofenaco (50mg) foi utilizado como analgésico de resgate, até três vezes ao dia. Foram avaliados a intensidade da dor através da escala numérica visual (ENV 0-10 cm), consumo de analgésicos de resgate, qualidade do sono e fadiga.

**Resultados:** Os pacientes foram demograficamente semelhantes. 36 pacientes completaram o estudo. Três pacientes do grupo placebo desistiram no 4o dia de ausência de alívio da dor. A avaliação entre cada grupo antes e após o tratamento revelou que pacientes do grupo placebo não apresentaram alívio da dor (ENV 8 cm,  $p>0,05$ ), da fadiga, ou melhora do padrão de sono, enquanto o grupo TENS-1 apresentou diminuição de 2,5 cm na ENV para dor (ENV anterior 8,5 cm e após 6 cm) ( $p<0,05$ ). Finalmente, o grupo TENS-2 referiu redução de 4 cm na intensidade da dor (ENV anterior ao tratamento 8,5 cm e 4,3 cm após tratamento) ( $p<0,02$ ). O consumo de analgésicos diários foi menor para TENS-1 ( $p<0,05$ ) e TENS-2 ( $p<0,02$ ). A comparação entre os 3 grupos revelou que a analgesia, qualidade de sono e melhora da fadiga foi: grupo TENS-2 > TENS-1 > GP ( $p<0,05$ ). Os participantes consideraram os aparelhos ativos úteis. Não foram observados efeitos adversos.

**Conclusões:** enquanto a aplicação de um dispositivo de TENS na área dolorida, lombar ou cervical, amenizou a dor em pacientes portadores de fibromialgia, a fadiga e a qualidade do sono foram minimizadas apenas quando dois dispositivos foram utilizados, demonstrando que este novo dispositivo pode ser adjuvante para dor da fibromialgia.

## **ESTUDO DO EFEITO DA ESTIMULAÇÃO COLINÉRGICA CRÔNICA SOBRE AS ADAPTAÇÕES AUTONÔMICAS CARDIOVASCULARES EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR) SEDENTÁRIOS E TREINADOS**

**João Henrique Dutra Blanco**

Orientador: Prof. Dr. Hugo Celso Dutra de Souza

Tese de Doutorado apresentada em 20/09/2012

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do treinamento físico aeróbico e da estimulação colinérgica crônica (14 dias), com brometo de piridostigmina (30mg/kg/dia) sobre os parâmetros hemodinâmicos e autonômicos cardiovasculares, utilizando diferentes abordagens: 1) avaliação do efeito autonômico tônico por meio do duplo bloqueio farmacológico com metil-atropina e propranolol; 2) análise espectral da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e da pressão arterial sistólica (VPAS); 3) avaliação farmacológica da sensibilidade barorreflexa (SBR); 4) avaliação da sensibilidade quimiorreflexa à estimulação por meio da hipóxia e hipercapnia; e 5) quantificação da fração de ejeção ventricular esquerda (FE). Para tanto, 100 ratos espontaneamente hipertensos (SHR), com 20 semanas de idade, foram divididos em 04 grupos: SHR sedentários controle (SED-H<sub>2</sub>O), SHR sedentários e tratados com brometo de piridostigmina (SED-PYR), SHR submetidos ao treinamento por meio da natação (TRE-H<sub>2</sub>O) e SHR treinados e tratados com brometo de piridostigmina (TRE-PYR). Os grupos SED-PYR, TRE-H<sub>2</sub>O e TRE-PYR apresentaram redução na frequência cardíaca (FC) basal, pressão arterial (PA) e fração de ejeção (FE). Os grupos treinados também apresentaram redução na FC intrínseca. Quanto aos parâmetros autonômicos, o grupo SED-PYR apresentou aumento na participação vagal na determinação tônica da FC basal, redução na VPAS e menores respostas reflexas quimiorreflexa da FC à estimulação por hipóxia e hipercapnia. Por sua vez, o grupo TRE-H<sub>2</sub>O, além das respostas observadas no grupo SED-PYR, também apresentou significativa atenuação dos aumentos da PA à ativação quimiorreflexa por hipóxia, menores oscilações na banda de LF e maiores oscilações na banda de HF da VFC. Por sua vez, o grupo TRE-PYR apresentou maior predomínio tônico vagal na determinação da FC basal em relação aos demais grupos, redução na resposta taquicárdica à hipercapnia severa, elevação nas oscilações da banda de LF e redução nas oscilações da banda de HF da VFC.

Dessa forma, nós concluímos que o treinamento físico, bem como, o tratamento crônico com brometo de piridostigmina, da forma que foram aplicados, promoveram alterações hemodinâmicas importantes, caracterizadas pela redução da PA, da FC basal e da FE. O tratamento com brometo de piridostigmina em ratos sedentários promoveu a potencialização do tônus vagal cardíaco, entretanto sem alterar os demais parâmetros autonômicos. O treinamento físico, por sua vez, melhorou a maioria dos parâmetros autonômicos avaliados, no entanto, quando associado ao tratamento com brometo de piridostigmina os resultados foram menos favoráveis.

## **Patologia**

### **AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE DO ÁCIDO ROSMARÍNICO NA ISQUEMIA-REPERFUSÃO HEPÁTICA NORMOTÉRMICA EM RATOS**

**Angelo Augusto Chiachia Pasta**

Orientador: Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho

Dissertação de Mestrado apresentada em 03/08/2012

A lesão do fígado secundária à isquemia e reperfusão (I/R) é a principal responsável pela falência primária do enxerto hepático após o transplante clínico, e também responsável pela elevada morbidade das grandes cirurgias de ressecção hepática. A interrupção do fluxo sanguíneo para o fígado com subsequente reperfusão conduzem a intensa resposta inflamatória aguda e a importante déficit microcirculatório hepáticos, capazes de induzir lesão e disfunção hepática graves. O ácido rosmarínico (AR), um composto polifenólico encontrado em plantas como o alecrim (*Rosmarinus officinalis*), apresenta diversas propriedades terapêuticas, dentre as quais se podem destacar as atividades antioxidante e anti-inflamatória. O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito do AR sobre a lesão hepática por I/R em ratos machos *Wistar*. Os animais foram submetidos a I/R normotérmica dos lobos hepáticos lateral esquerdo e mediano por meio do clampeamento seletivo da tríade portal durante período de 60 minutos. Os ratos foram divididos em 3 grupos: sham (cirurgia simulada - n=5), I/R + solução glicofisiológica (controle - n=8) e I/R + AR na dose de 50 mg/kg de peso corporal,

via intraperitoneal (i.p.), 30 minutos antes da isquemia, 30 minutos antes da reperfusão e 2 horas pós-reperfusão (n= 8). Os ratos foram sacrificados seis horas após a reperfusão, sendo colhidas amostras de plasma e do fígado para análises posteriores. Avaliou-se o grau de lesão hepatocelular (dosagem das aminotransferases ALT e AST, e cálculo do escore histológico de agressão tecidual), a intensidade do estresse oxidativo [medida da nitrotirosina, glutatona reduzida (GSH), capacidade antioxidante total e lipoperoxidação das membranas celulares hepáticas], os níveis de óxido nítrico (NO) hepático (dosagem do NO e das enzimas eNOS e iNOS hepáticos) e a magnitude da resposta inflamatória aguda (acúmulo hepático de neutrófilos e de citocinas pró-inflamatórias). Constatou-se que a lesão hepatocelular (avaliação bioquímica e histológica) e o estresse oxidativo hepático (mensuração da nitrotirosina, lipoperoxidação de membranas, GSH e capacidade antioxidante total) foram significativamente diminuídos nos animais submetidos ao tratamento com AR em relação ao grupo controle. Adicionalmente, verificou-se reduzida atividade inflamatória aguda (expressão de citocinas pró-inflamatórias e infiltrado inflamatório neutrofílico hepáticos) e menores níveis de NO e das enzimas eNOS e iNOS no fígado dos ratos que receberam infusão i.p. de AR em comparação ao fígado dos animais que receberam solução glicossalina. Diante destes resultados, pode-se concluir que o AR apresenta importante efeito hepatoprotetor frente à lesão por I/R normotérmica em ratos, com ênfase para suas atividades anti-inflamatória e antioxidante.

## Saúde Mental

### ALTERAÇÕES DE NEURODESENVOLVIMENTO AVALIADAS POR MEIO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA ESTRUTURAL EM PACIENTES EM PRIMEIRO SURTO PSICÓTICO E EM EPILEPSIA

**Clarissa Maria Ferreira Trzesniak**

Orientador: Prof. Dr. José Alexandre de Souza Crippa

Tese de Doutorado apresentada em 06/08/2012

**Introdução:** Dentre as hipóteses etiológicas para manifestação das psicoses e epilepsia, destaca-se a de alterações do neurodesenvolvimento, tais como presença de *cavum septum pellucidum* (CSP) e ausência de adesão intertalâmica (AI). Em psicose, estudos em ressonância magnética (RM) sobre CSP/AI têm apresentado resultados conflitantes. Além disso, não há pesquisas populacionais e investigação longitudinal. Na epilepsia, não existem estudos que avaliaram CSP/AI com técnicas semiquantitativas de mensuração.

**ESTUDO (1): Objetivo:** Avaliar com RM estrutural o CSP e a não-AI em esquizofrenia e outras psicoses, realizando o primeiro estudo de base populacional com intuito de examinar essas alterações.

**Metodologia:** Indivíduos em primeiro episódio psicótico (PEP, N=122 - subdivididos em esquizofrenia (N=62); transtornos de humor (N=46); e outras psicoses (N=14)) foram comparados a 94 controles saudáveis, os quais residiam na mesma área geográfica dos pacientes. Após 13 meses, 80 pacientes e 52 controles foram submetidos a segundo exame de RM. Resultados: Na avaliação transversal, foram encontradas reduções no comprimento da AI em indivíduos PEP com esquizofrenia, comparados aos subgrupos humor e controle, sem nenhuma diferença para o CSP. Em contraste, verificou-se interação diagnóstico-por-tempo para o comprimento do CSP, cujo aumento foi mais proeminente para o grupo psicose. Houve involução do comprimento da AI ao longo do tempo para todos os grupos, sem evidência de interações.

**Conclusão:** Os resultados sugerem que o CSP parece relacionado à progressão de transtornos com psicose. O fato de o comprimento da AI mostrar-se mais curto no início da esquizofrenia suporta o modelo de neurodesenvolvimento para o transtorno, indicando que uma alteração nessa junção de substância cinzenta pode ser fator de risco para o desenvolvimento de psicose.

**Estudo (2) Objetivo:** avaliar pioneiramente por RM estrutural o CSP/AI na epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM). Metodologia: 181 pacientes com ELTM foram comparados a 156 controles saudáveis.

**Resultados:** Pacientes sem esclerose temporal mesial (ETM) apresentaram maior comprimento de CSP do que aqueles com ETM. Pacientes em geral demonstraram menor prevalência e comprimento de AI do que voluntários saudáveis.

**Conclusão:** Os resultados sugerem que pacientes com e sem ETM parecem ter padrões morfológicos cerebrais extratemporais distintos. As alterações na AI corroboram a influência do tálamo na ELTM. Futuras pesquisas, com desenho longitudinal e pacientes em estágios iniciais do transtorno, auxiliarão na compreensão se tais modificações seriam causa ou consequência de crises epilépticas recorrentes.

## **CARACTERIZAÇÃO DOS ATENDIMENTOS POR TENTATIVA DE SUICÍDIO EM HOSPITAL GERAL DE EMERGÊNCIAS E EVOLUÇÃO DURANTE DOIS ANOS**

**Alcinéia Donizeti Ferreira**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristina Marta Del Ben

Dissertação de Mestrado apresentada em 13/08/2012

Suicídio é uma das dez causas mais frequentes de óbito, representando um sério problema de saúde pública. Vários fatores são associados a um aumento do risco de suicídio, como a presença de condições psiquiátricas e de fatores sócio-demográficos. Os objetivos deste estudo foram a) Traçar o perfil sócio-demográfico e clínico de tentadores de suicídio; b) Verificar a existência de possíveis fatores preditores da tomada de decisão quanto ao tipo de encaminhamento dado na alta do hospital de emergência; c) Verificar a existência de possíveis fatores preditores da ocorrência de novas tentativas de suicídio graves, a ocorrência de óbitos e novo atendimento de emergência nos dois anos subsequentes à tentativa de suicídio índice. Os dados foram colhidos em prontuários médicos por meio de protocolos criados especificamente para este fim. A amostra foi constituída por 412 pacientes atendidos no período de janeiro de 2006 a dezembro de 2007 com diagnóstico de lesão auto-provocada intencionalmente (CID-10: X60 a X84), para as quais a intenção suicida foi confirmada. A população em estudo constituiu-se de pacientes jovens, de ambos os sexos, mas com predomínio de mulheres, com diagnóstico de transtornos psiquiátricos graves, sendo que uma parcela significativa já se encontrava em tratamento psiquiátrico e possuía história de tentativas de suicídio prévias. Mulheres tentaram suicídio mais frequentemente por intoxicação exógena e os homens por métodos violentos, Diagnóstico de transtornos depressivos e de personalidade foram mais comuns entre mulheres, enquanto que transtornos psicóticos foram mais frequentes entre homens. Durante o período de internação índice 15 (3,6%) pacientes foram a óbito. Quanto ao encaminhamento dado no momento da alta do hospital de emergência, após ajuste por regressão logística, sexo masculino, uso de método violento na tentativa de suicídio e história de tratamento psiquiátrico prévio foram preditores de encaminhamento para internação integral ou parcial em serviço psiquiátrico. Dentre os pacientes procedentes do município de Ribeirão Preto e que sobreviveram à tentativa inicial (n = 258), 10 (3,9) foram a óbito nos anos subsequentes, sendo três (1,2%) por suicídio, 3 (1,2%) por causas violentas e 4 (1,5%) por causas clínicas e 24 (9,3%). Foram readmitidos no hospital de emergências devido a uma nova tentativa de suicídio. Histórico de tratamento psiquiátrico prévio foi preditor independente de nova tentativa. Neste estudo a estimativa de risco de morte foi de 3,6%, sinalizando para a gravidade das tentativas de suicídio atendidas em hospital de emergência de referência.

## **Saúde na Comunidade**

### **PERFIS DE MORBIDADE NOS DIFERENTES TERRITÓRIOS DE ADSCRIÇÃO DA ESTRATÉGIA SAÚDE DA FAMÍLIA**

**Lara Marina Almeida E Fonseca**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria do Carmo Gullaci Guimarães Caccia-Bava

Dissertação de Mestrado apresentada em 06/08/2012

A Atenção Básica (AB), através da Estratégia Saúde da Família (ESF), caracteriza-se por um conjunto de ações de saúde, no âmbito individual e coletivo, que abrangem a promoção e a proteção da saúde, a prevenção de agravos, o diagnóstico, o tratamento. A AB fundamenta-se em quatro atributos essenciais: atenção ao primeiro contato, coordenação do cuidado, integralidade e longitudinalidade, que operados, possibilitam o acesso, a produção do cuidado e a identificação do perfil da população do território de adscrição. Considerando que dentro do território municipal encontram-se grupos heterogêneos, com perfis e necessidades particulares, traçar as características sociais e as singularidades do adoecer dos territórios de adscrição das ESF pode permitir adequar os serviços da equipe a essas necessidades. O objetivo do presente trabalho epidemiológico, é caracterizar, através do perfil de morbidade e sócio demográfico, os grupos cadastrados nas diferentes equipes e territórios de implantação da Estratégia Saúde da Família, tendo como campo de estudo o município de Patrocínio/MG. Nele existem 16 equipes da ESF, das quais três localizam-se na área central, uma na área rural e 12 na região periférica da cidade (três estratos). A fonte de dados foi os prontuários de pacientes usuários

destas unidades assistenciais. Após calculado o tamanho amostral em 596 prontuários, o processo de amostragem ocorreu em múltiplas etapas. Foi feita uma amostragem estratificada das ESF com partilha proporcional entre os estratos, e dentro de cada ESF feita uma amostragem sistemática dos prontuários familiares. Um sorteio casual simples permitiu que fosse selecionado um indivíduo daquela família. Nos prontuários foram coletados os seguintes dados: idade, sexo, ocupação, escolaridade e diagnósticos referentes a última consulta médica realizada no ano de 2010. As variáveis foram transferidas para um banco de dados e descritas posteriormente. Os 564 prontuários analisados, trouxeram os seguintes resultados: na região periférica predominaram mulheres, na faixa etária de 40 ? 60, maioria alfabetizadas (82%), com ocupações consideradas fora da População Economicamente Ativa (PEA) e uma maior frequência das doenças do aparelho circulatório (18%). Na região central predominaram as mulheres, na faixa etária dos 20 ? 40, pessoas alfabetizadas (92%), aposentados e doenças do aparelho circulatório. Na região rural houve maior prevalência de mulheres, idosos, alfabetizados (94%), fora da PEA e as doenças do aparelho circulatório também prevaleceram. Apesar das regiões apresentarem características parecidas, os achados posteriores de idades, ocupações e morbidades foram diferentes, o que confirma a idéia de diferenças regionais dentro de um mesmo município. Os resultados podem servir de instrumento para um melhor planejamento direcionado das ações em saúde.

## **O EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO NA CAPACIDADE FUNCIONAL, MARCHA, EQUILÍBRIO E QUALIDADE DE VIDA DE PACIENTES COM DOENÇA DE ALZHEIMER**

**Fabricia Mabelle Silva**

Orientador: Prof. Dr. Jair Lício Ferreira Santos

Dissertação de Mestrado apresentada em 17/09/2012

O fenômeno do envelhecimento populacional tem sido observado em todo o mundo e traz consigo o aumento da prevalência das demências destacando-se como mais frequente a Doença de Alzheimer (DA). O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de um programa de exercícios físicos na capacidade funcional e qualidade de vida de pacientes com Doença de Alzheimer residentes em instituições asilares privadas do município de Ribeirão Preto. A amostra foi constituída de 34 sujeitos com DA diagnosticada de acordo com os critérios CID-10 e no DSM-IV, sendo que 17 pacientes fizeram parte do Grupo Experimental, que participaram de programa de exercícios físicos com duração de 10 semanas. Cada sessão tinha duração de uma hora, sendo dividido em quatro fases: aquecimento, exercício aeróbico (dança), exercícios resistidos, alongamento/relaxamento. O grupo controle foi formado por 17 pacientes que participaram de rodas de canto com a mesma frequência e duração das sessões de exercícios. Antes de iniciar as intervenções e após a conclusão das mesmas, foram aplicados nos dois grupos o Índice de Barthel e a bateria de testes da AAHPERD para avaliar capacidade funcional e a escala de qualidade de vida para pacientes com doença de Alzheimer proposta por Logsdon. Os dados foram avaliados por meio do modelo linear de efeitos mistos (efeitos aleatórios e fixos). Em relação à Qualidade de Vida do paciente na visão do cuidador observamos evidência de melhora somente no grupo experimental ( $p < 0,05$ ), no que diz respeito à Qualidade de Vida na Visão do paciente sobre ele mesmo e à Qualidade de Vida Total, não observamos evidência de melhoras em nenhum dos grupos. O grupo experimental apresentou evidência de melhoras em todos os domínios da capacidade funcional: Coordenação ( $p < 0,001$ ), Resistência e Força ( $p < 0,001$ ), Agilidade ( $p < 0,001$ ), Flexibilidade ( $p < 0,001$ ) e Resistência Aeróbica Geral ( $p < 0,001$ ), o mesmo não pôde ser observado no grupo controle. Conclui-se portanto, que a prática de exercícios físicos aos idosos com Doença de Alzheimer, deve ser incentivada pois auxiliará na manutenção e melhora da capacidade funcional dessa população.