JULIANA SHIMARA PIRES FERRÃO

**Tratamento com VEGFC para revascularização linfática em
membros pélvicos de camundongos**

SÃO PAULO

2013

JULIANA SHIMARA PIRES FERRÃO

**Tratamento com VEGFC para revascularização linfática em
membros pélvicos de camundongos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestrado em Ciências

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:
Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa.

De acordo: _____
Orientador(a)

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2825
FMVZ

Ferrão, Juliana Shimara Pires
Tratamento com VEGFC para revascularização linfática em membros pélvicos de camundongos / Juliana Shimara Pires Ferrão. -- 2013.
102 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa.

1. Camundongos. 2. Revascularização. 3. Sistema linfático. 4. Fator de crescimento endotelial vascular C. 5. Membros pélvicos. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Tratamento com VEGFC para revascularização linfática de membros pélvicos de camundongos", protocolado sob o nº 2289/2011, utilizando 60 (sessenta) camundongos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/8/2011.

We certify that the Research "VEGFC Treatment for lymphatic revascularization of mice hindlimbs", protocol number 2289/2011, utilizing 60 (sixty) mice, under the responsibility Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 8/17/2011.

São Paulo, 10 de maio de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autora: FERRÃO, Juliana Shimara Pires

Título: Tratamento com VEGFC para revascularização linfática em membros pélvicos de camundongos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICO

Aos meus pais, Wagner Pires Ferrão e Jeanete Aparecida Shimara Pires Ferrão, meus exemplos de dignidade, humildade, esforço e perseverança. Agradeço por me apoiarem em todas as decisões, por sempre estarem presentes quando eu precisei e por todos os ensinamentos. Amo muito vocês.

A estes amores pacientes e incondicionais dedico este momento.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Paula de Carvalho Papa, pela dedicação, ensino e paciência durante esse período de convivência, e pela oportunidade de realizar esse trabalho.

Aos professores doutores José Roberto Kfoury Junior, Maria Angélica Miglino e Francisco Javier Hernandez-Blazquez, por sempre manterem as portas de seus laboratórios abertas a todos os alunos de pós graduação deste setor, nos concedendo alguns materiais e equipamentos complementares indispensáveis ao nosso estudo.

Aos meus amigos queridos, André L. V. Conrado, Camila Ercolini, Cristiane Cagnoni, Diogo Nader Palermo, Eduardo Malavasi Bruno, Fernanda Bastianello, Fernanda Cardoso, Joana Mona, João Leonardo Mendonça, Marcos Y. Nakagawa, Renata Gabriel Fontinele, Simone Palmeira, Thierry Salmon, por todo apoio, pela amizade e carinho, pelos conselhos e companheirismo. Muito obrigada.

Aos colegas de laboratório, Adriana Brasil, Ana Paula Cardoso Miskulin, Antenor Pereira Bonfim Neto, Gabriela Pacheco Mendes, Giuliano Gustavo Lesnau, Liza Margareth Medeiros de Carvalho Sousa, Rafael Cisne de Paula, Renata Santos Silva, por todas as trocas de experiências, pelo companheirismo e pela paciência, e aos colegas Carolina Dutra Queiroz Flumignan, Luciana Alves de Fátima, Vanessa Uemura da Fonseca, Valdir Pavanelo Junior, por todas as trocas de experiências, pelo companheirismo e pela paciência.

À equipe do setor de Anatomia da FMVZ-USP, em especial: Ronaldo Agostinho da Silva, Jacqueline Martins de Santana e Maicon Silva por toda a colaboração nestes anos.

À todos com os quais convivi durante este período, por todos os momentos compartilhados.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, por financiar grandes projetos que possibilitaram a execução deste estudo, por auxiliar e participar da realização de grandes sonhos.

RESUMO

FERRÃO, J. S. P. **Tratamento com VEGFC para revascularização linfática em membros pélvicos de camundongos.** [VEGFC treatment for lymphatic revascularization of mice hindlimb]. 2013. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A revascularização linfática é um desafio e o estabelecimento de novas estratégias terapêuticas podem melhorar a qualidade de vida de pessoas que sofrem de distúrbios linfáticos. O objetivo deste estudo foi verificar a capacidade de tratamento com VEGFC exógeno na melhoria da vascularização linfática de uma maneira dependente do tempo em membros pélvicos (MP) de camundongos após a remoção do linfonodo inguinal. O linfonodo inguinal esquerdo foi removido cirurgicamente para mimetizar patologias com diminuição da vascularização linfática. Densidade vascular linfática (Vv) e de comprimento (Lv) foram avaliadas por imunohistoquímica, seguidas de estereologia, após a cirurgia com ou sem o tratamento com VEGFC exógeno. O grupo controle não foi manipulado, mas recebeu soro fisiológico em vez de tratamento com VEGFC exógeno. As expressões do VEGFC e FLT4 local foram avaliadas por qPCR. Houve efeito do tempo sobre Vv e Lv no Grupo Cirurgia e diferença significativa entre os grupos Controle e Cirurgia nas três regiões estudadas (região proximal, média e distal) do MP esquerdo (MPE). A Lv mostrou diferença significativa entre os grupos Controle e Cirurgia somente na região média do MPE. A Vv e a Lv para o Grupo Tratamento foram maiores do que os outros grupos em todas as regiões do MPE. A expressão gênica do VEGFC e do FLT4 apresentou efeito do tempo em todas as regiões do MPE para os grupos Cirurgia e Tratamento. Ambas as expressões gênicas do VEGFC e do FLT4 apresentaram diferença significativa entre os grupos Controle e Cirurgia, entre os grupos Cirurgia e Tratamento e entre os grupos Controle e Tratamento. Os resultados mostraram que os camundongos são bons modelos experimentais para o uso de VEGFC exógeno como terapia de revascularização linfática, e o tratamento com VEGFC exógeno aumenta vascularização linfática já após 3 dias de dano linfático.

Palavras-chave: Camundongos. Fator de Crescimento. Endotelial Vascular C. Revascularização. Sistema Linfático. Membros Pélvicos.

ABSTRACT

FERRÃO, J. S. P. **VEGFC treatment for lymphatic revascularization of mice hindlimb.** [Tratamento com VEGFC para revascularização linfática em membros pélvicos de camundongos]. 2013. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Lymphatic revascularization is a challenge and the establishment of new therapeutic strategies may improve quality of life from those suffering from lymphatic disorders. The objective of this study was to verify the VEGFC treatment capacity in improving lymphatic vascularization in a time-dependent manner in mouse hind limb (HL) after removal of inguinal lymphnode. The left inguinal lymphnode was surgically removed to mimetize pathologies with decreased lymphatic vascularization. Lymphatic vascular density (Vv) and length (Lv) were evaluated by immunohistochemistry followed by stereology after surgery and/or VEGFC treatment. Control group was not manipulated but received saline instead of VEGFC treatment. VEGFC and FLT4 local expression were assessed by qPCR. There was effect of time over Vv and Lv in the SG and significant difference between CG and SG in the three studied regions (proximal, medium and distal region) of the left HL (LHL). The Lv showed significant difference between CG and SG only in the medium region. The Vv and the Lv for TG were higher than the other groups in all regions of LHL. VEGFC and FLT4 gene expression presented time effect in all regions of the LHL for SG and TG. Both VEGFC and FLT4 gene expression presented significant difference between CG and SG, between SG and TG, and between CG and TG. The results show that mice are good experimental models for VEGFC use as therapy for lymphatic revascularization, and VEGFC treatment increased the lymphatic vasculature already after 3 days of lymphatic damage.

Keywords: Mouse. Vascular Endothelial Growth Factor C. Revascularization. Lymphatic System. Hind limbs.

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

%	porcentagem
µg	microgramas
µl	microlitros
µm ²	micrometros quadrados
A _T	área teste
cm ²	centímetros quadrados
DAB	diaminobenzidina
FLT4	<i>Fms-like tyrosine kinase</i> – 4
L _v	densidade de comprimento
mg	miligrama
ml	mililitro
mM	milimolar
mm	milímetros
mm ³	milímetros cúbicos
°C	graus Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
P _p	número de pontos teste
P _T	número total de pontos teste contidos no sistema teste
Q _A	densidade numérica por área
S _v	densidade de superfície
VEGFC	fator de crescimento vascular endotelial C
V _v	densidade de volume

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Pele da região inguinal esquerda sendo retirada após eutanásia do animal.....	37
Figura 2-	Músculos do Membro Pélvico do camundongo, vista lateral esquerda.....	37
Figura 3-	Músculos do Membro Pélvico Esquerdo do camundongo, vista lateral.....	38
Figura 4-	Músculos do Membro Pélvico Direito do camundongo, vista medial.....	39
Figura 5-	Representação de uma área teste (A_T) com 100 pontos teste e a esquematização de contagem dos vasos marcados com anticorpo VEGFC que tocam estes pontos.....	41
Figura 6-	Representação de uma área teste (A_T) com as linhas de proibição e permissão e a esquematização de contagem dos vasos linfáticos marcados com anticorpo VEGFC dentro da A_T na interface do programa Stepanizer.....	42
Figura 7-	Imunohistoquímica para VEGFC (diluição 1:400) em musculatura de membros pélvicos esquerdos de camundongos, representando 5 animais de 4 dos grupos experimentais, sendo do grupo eutanasiado 3 dias após a cirurgia e do grupo eutanasiado 9 dias após a cirurgia tratados ou não com VEGFC.....	50
Figura 8-	Imunohistoquímica para VEGFC (diluição 1:400) em musculatura de membros pélvicos esquerdos de camundongos, representando 5 animais de 4 dos grupos experimentais, sendo do grupo eutanasiado 15 dias após a cirurgia e do grupo eutanasiado 30 dias após a cirurgia tratados ou não com VEGFC.....	52
Figura 9-	Imunohistoquímica para FLT4 (diluição 1:200) em musculatura de membros pélvicos esquerdos de camundongos, representando 5 animais de 4 dos grupos experimentais, sendo do grupo eutanasiado 3 dias após a cirurgia e do grupo eutanasiado 9 dias após a cirurgia.....	54
Figura 10-	Imunohistoquímica para FLT4 (diluição 1:200) em musculatura de membros pélvicos esquerdos de camundongos, representando 5 animais de 4 dos grupos experimentais, sendo do grupo eutanasiado 15 dias após a cirurgia e do grupo eutanasiado 30 dias após a cirurgia.....	56

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Animais utilizados durante o experimento.....	34
Gráfico 2-	Densidade volumétrica linfática e Densidade de Comprimento Vascular Linfático na pele da região inguinal esquerda de camundongos.....	58
Gráfico 3-	Densidade volumétrica linfática no membro pélvico esquerdo de camundongos.....	60
Gráfico 4-	Densidade de comprimento vascular linfático no membro pélvico esquerdo de camundongos.....	62
Gráfico 5-	Expressão gênica para VEGFC e FLT4 no membro pélvico esquerdo de camundongos.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Primers para VEGFC, FLT4, e beta-actina murino para PCR em tempo real.....	45
-----------	--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 SISTEMA LINFÁTICO	20
2.2 MECANISMOS DE TRANSPORTE LINFÁTICO.....	21
2.2.1 Absorção de fluido e células pelos capilares linfáticos	21
2.2.2 Transporte de linfa através de vasos coletores.....	21
2.2.3 Células hematopoiéticas e desenvolvimento vascular linfático	22
2.3 MORFOGÊNESE VASCULAR LINFÁTICA PATOLÓGICA	23
2.3.1 Linfedema	23
2.3.2 Tumores de mama e linfedema em cadelas	24
2.4 ANGIOGÊNESE	25
2.5 LINFANGIOGÊNESE	26
2.6 FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGF)	27
2.6.1 Administração de VEGFC como agente terapêutico	28
3 OBJETIVOS.....	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 MODELO EXPERIMENTAL	33
4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	33
4.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	35
4.4 MARCAÇÃO DE VEGFC E FLT4 POR IMUNOHISTOQUÍMICA	35
4.5 ESTEREOLOGIA DE VASOS LINFÁTICOS	40
4.6 AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO DE RNAm	42
4.6.1 Extração e purificação do RNA total	42
4.6.2 Transcrição reversa	43
4.6.3 Avaliação da expressão gênica pelo PCR em tempo real.....	44

4.6.4 Reação de PCR em tempo real	44
4.6.5 Determinação da eficiência dos <i>primers</i>	45
4.6.6 Determinação do <i>threshold</i>	46
4.6.7 Quantificação relativa do gene alvo no PCR em tempo real	47
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5 RESULTADOS	49
6 DISCUSSÃO	68
7 CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS.....	81
APÊNDICE A	98
APÊNDICE B.....	100

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O sistema linfático é indispensável para o recolhimento e ciclagem de fluidos extravasados de tecidos, macromoléculas e células imunológicas para a corrente sanguínea (MARCHIÒ; ASTANINA; BUSSOLINO, 2013). O sistema vascular linfático atende funções fisiológicas importantes: mantém a homeostase dos fluidos através da absorção de água e macromoléculas do interstício, permite a absorção de lipídios e vitaminas da dieta no intestino, e serve como rota de tráfego para as células do sistema imunológico (SCHULTE-MERKER; SABINE; PETROVA, 2011).

Devido à alta pressão, água e substâncias de alto peso molecular, como proteínas, estão continuamente saindo de capilares sanguíneos. A principal função do sistema linfático é remover esse fluido intersticial para prevenir edema tecidual (SAHARINEN; PETROVA, 2004). O sistema linfático é uma via acessória da circulação sanguínea, permitindo que os líquidos dos espaços intersticiais possam fluir para o sangue sob a forma de linfa (ANDRADE, M., 2008). Do ponto de vista estrutural, funcional e patogenético, o conhecimento amplo do sistema linfático é fundamental para compreender as diversas manifestações clínicas e perspectivas terapêuticas de suas disfunções (WITTE et al., 2005).

Vasos sanguíneos e linfáticos são física e funcionalmente relacionados ao longo da vida dos animais vertebrados. No entanto, apesar de características morfológicas e organização geral muito similares, o seu desenvolvimento é sintonizado por estímulos diferentes em diferentes momentos do desenvolvimento embrionário (MARCHIÒ; ASTANINA; BUSSOLINO, 2013).

A vascularização linfática consiste de uma rede altamente ramificada de tubos capilares e que está presente na maioria dos órgãos, com exceção do sistema nervoso central e tecidos avasculares, tal como a cartilagem. Ao contrário da vascularização sanguínea, a vascularização linfática possui fundos de sacos: seus pequenos capilares desembocam primeiro em vasos pré-coletores e vasos coletores maiores e, em seguida, no ducto torácico ou no tronco linfático direito, que drena a linfa para as veias subclávias (SCHULTE-MERKER; SABINE; PETROVA, 2011).

A vascularização linfática e sanguínea são difíceis de diferenciar quando a histologia dos dois sistemas é a única base sobre a qual é feita a sua distinção. A caracterização de diversos marcadores que apresentam diferentes perfis de expressão entre a vascularização sanguínea e linfática facilitou a identificação dos vasos linfáticos (OASHI et

al., 2012). A descoberta chave que possibilitou o avanço do estudo sobre linfangiogênese foi o reconhecimento da família dos fatores de crescimento vascular endotelial (VEGF - “Vascular Endothelial Growth Factor”) e de seus receptores (VEGFR – “Vascular Endothelial Growth Receptor”). Até agora cinco membros dessa família foram identificados: VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD e o PIGF. O fator de crescimento endotelial vascular C (VEGFC) é um ligante específico, que induz a linfangiogênese (FAUSTINO, 2007). O receptor-3 do fator de crescimento vascular endotelial (também conhecido como Fms-tipo tirosina quinase 4 [FLT4]), VEGFC, LYVE-1 e podoplanina foram também identificados como marcadores específicos linfáticos. Em camundongos, comparados com ratos ou cães, consideravelmente mais anticorpos estão disponíveis para a coloração imunohistoquímica, o que torna a identificação e avaliação histológica dos vasos linfáticos possíveis (OASHI et al., 2012).

O mau funcionamento da vascularização linfática resulta na formação de linfedema e compromete a função imunológica. Na última década, um grande progresso foi alcançado na compreensão dos mecanismos que regulam a morfogênese da vascularização linfática, realizado principalmente por modelos de camundongos geneticamente modificados e da descoberta de mutações responsáveis por síndromes de linfedema em humanos (SCHULTE-MERKER; SABINE; PETROVA, 2011).

Os avanços na compreensão do crescimento e desenvolvimento dos vasos linfáticos devem trazer novas alternativas terapêuticas nas linfangiodisplasias e no controle da disseminação linfática dos tumores. A regulação da linfangiogênese envolve mecanismos complexos e multiformes, dependendo da integração perfeita de várias proteínas sinalizadoras e do adequado funcionamento de receptores celulares, proporcionando diversas possibilidades de linfangiogênese imperfeita e heterogeneidade fenotípica, ligadas aos diferentes mecanismos alterados (ANDRADE, M., 2008).

Assim sendo, este projeto de pesquisa teve como objetivo avaliar a atuação do VEGFC na revascularização linfática pós-cirúrgica. Trabalhos sobre revascularização linfática são de extrema importância para que tragam novas alternativas para aqueles que sofrem com algum tipo de desordem no sistema linfático, assim contribuindo para um melhor entendimento do estudo sobre VEGFC no processo de linfangiogênese.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SISTEMA LINFÁTICO

Em humanos, sistema linfático surge na 6ª ou 7ª semana do desenvolvimento embrionário, cerca de quatro semanas após o aparecimento dos primeiros componentes da circulação sanguínea (ANDRADE, M., 2008). Em camundongos, o sistema linfático surge por volta do 11º dia de gestação (JUSZYŃSKI et al., 2008).

Os linfonodos são órgãos encapsulados constituídos por tecido linfóide e que aparecem distribuídos pelo corpo, sempre no trajeto de vasos linfáticos. São encontrados nas regiões axilar, inguinal, ao longo dos grandes vasos do pescoço e, em grande quantidade, no tórax e no abdome, especialmente no mesentério. A circulação da linfa nos linfonodos é unidirecional. Ela atravessa os linfonodos penetrando pelos vasos linfáticos que desembocam na margem convexa do órgão (vasos aferentes) e saindo pelos vasos linfáticos do hilo (vasos eferentes). Os linfonodos atuam como “filtros” da linfa, removendo partículas estranhas antes que a linfa retorne ao sistema circulatório sanguíneo. Como os linfonodos estão distribuídos por todo o organismo, a linfa atravessa pelo menos um linfonodo antes de ser devolvida ao sangue. Cada linfonodo recebe a linfa de uma determinada região do corpo, da qual ele é chamando de linfonodo sentinela. Os vasos linfáticos eferentes que deixam o linfonodo confluem com outros vasos linfáticos até se formarem os grandes linfáticos, que desembocam em veias (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

O sistema linfático normal, assim como todos os órgãos, trabalha com uma reserva funcional bastante grande, significando que a capacidade total de transporte linfático é bem superior às necessidades fisiológicas. No estado de equilíbrio, o débito linfático (volume de linfa transportado por unidade de tempo) é igual à carga linfática, que é a quantidade de líquidos e substâncias de transporte linfático presente nos tecidos. Quando aumenta a carga linfática, o débito linfático cresce paralelamente até que seja atingido o nível máximo de transporte. A partir desse ponto, ocorre o edema (ANDRADE, M. F. C., 2003).

2.2 MECANISMOS DE TRANSPORTE LINFÁTICO

A estrutura dos diferentes compartimentos vasculares linfáticos, tais como capilares, vasos pré-coletores, e os vasos linfáticos coletores, refletem a sua dupla função de absorção de fluídos e de transporte de linfa (DEJANA et al., 2009; ZAWIEJA, 2009).

2.2.1 Absorção de fluido e células pelos capilares linfáticos

O endotélio capilar linfático possui uma organização juncional única (BALUK et al., 2007; DEJANA et al., 2009). Células endoteliais são conectadas por junções tipo botão descontínuas. Margens celulares livres sobrepostas são ancoradas em cada lado por estas junções formam valvas em forma de "flaps", através das quais o fluido flui unidirecionalmente ao longo de gradientes de pressão do interstício para o lume capilar. Ativamente, os brotos de capilares linfáticos têm junções célula-célula contínuas, sugerindo junções tipo botão como características do endotélio linfático capilar quiescente e funcional (BALUK et al., 2007). Capilares linfáticos não possuem células murais e se conectam à Matrix Extracelular (MEC) através de filamentos de ancoragem (LEAK; BURKE, 1968), que impedem o colapso dos capilares sob o aumento da pressão intersticial (SCHULTE-MERKER; SABINE; PETROVA, 2011).

2.2.2 Transporte de linfa através de vasos coletores

A linfa dos capilares linfáticos é primeiramente drenada para vasos linfáticos pré-coletores que possuem características tanto de capilares linfáticos (células endoteliais linfáticas [CEL] em forma de folha de carvalho) quanto de vasos linfáticos coletores (válvulas). Vasos linfáticos coletores consistem de uma série de unidades funcionais, chamadas linfangions, separadas por válvulas intraluminais, que asseguram o fluxo de linfa unidirecional. Vasos linfáticos coletores estão envoltos por uma membrana basal contínua e células musculares lisas (CML). Células endoteliais em vasos linfáticos coletores são

alongadas e conectadas por junções contínuas. Junções contínuas e a membrana basal previnem o vazamento de linfa durante o seu transporte (SCHULTE-MERKER; SABINE; PETROVA, 2011).

Válvulas linfáticas contêm dois folhetos semilunares, que são cobertos em ambos os lados por endotélio especializado ancoradas ao núcleo da MEC (LAUWERYNS; BOUSSAUW, 1973). Alta pressão linfática a montante de uma válvula abre a mesma e permite o fluxo de linfa, enquanto o fluxo inverso empurra os folhetos uns contra os outros e fecha a válvula. Portanto, a abertura e o fechamento da válvula dependem de mudanças periódicas na pressão de fluido no interior dos vasos coletores. O número de válvulas por segmento de vaso varia dependendo do tipo de tecido, sendo geralmente mais elevado em órgãos de pressão hidrostática elevada, como por exemplo, as pernas de humanos (FÖLDI; FÖLDI, 2006).

2.2.3 Células hematopoiéticas e desenvolvimento vascular linfático

Nos mamíferos, as vascularizações linfática e sanguínea estão conectadas apenas em alguns locais definidos, onde a linfa é devolvida para a circulação sanguínea. As plaquetas se agregam em locais de comunicação entre a veia cardinal e sacos linfáticos e "sela" os vasos linfáticos da veia cardinal, separando os dois vasos (SCHULTE-MERKER; SABINE; PETROVA, 2011). As plaquetas são importantes para manter esses dois sistemas vasculares separados: a depleção de plaquetas ou defeito de agregação plaquetária leva à conexões linfovenosas anormais e à vasos linfáticos cheios de sangue (ICHISE et al., 2009; BERTOZZI et al., 2010; CARRAMOLINO et al., 2010; SUZUKI-INOUE et al., 2010; UHRIN et al., 2010).

Além de plaquetas, as células mielóides regulam a morfogênese vascular linfática. Camundongos com macrófagos deficientes em *PU.1*^{-/-} e *Csfr1*^{-/-} exibem capilares linfáticos com hiperplasia dérmica, sugerindo que os macrófagos restringem a proliferação de CELs (GORDON et al., 2010). Por outro lado, o acúmulo anormal de células mielóides induz a formação de desvios dérmicos linfaticovenosos em camundongos *Syk*^{-/-} (BÖHMER et al., 2010).

2.3 MORFOGÊNESE VASCULAR LINFÁTICA PATOLÓGICA

Dada a importância dos vasos linfáticos para as funções normais do organismo, não é surpreendente que defeitos da vascularização linfática estejam implicados em uma variedade de patologias humanas. Papéis dos vasos linfáticos na metástase tumoral e na inflamação foram recentemente descritos em vários estudos (GUO et al., 2009; SLEEMAN; SCHMID; THIELE, 2009; TAMMELA; ALITALO, 2010).

2.3.1 Linfedema

O linfedema é caracterizado por um acúmulo anormal de fluído intersticial com alto teor protéico, resultando em um inchaço incapacitante e desfigurante de extremidades. Com o tempo, pacientes também adquirem fibrose tecidual, acúmulo anormal de gordura, e maior susceptibilidade a infecções (MAYALL, 2000; ANDRADE, M. F. C., 2003; SAHARINEN; PETROVA, 2004).

De acordo com (COHEN; PAYNE; TUNKEL, 2001), após a cirurgia de mastectomia, as mulheres evoluem, normalmente, com certo grau de edema, pois a capacidade de absorção do excesso de líquido e de células do espaço intersticial fica reduzida. Diversos autores definem o edema ocorrido nos primeiros seis meses após a cirurgia como uma reação transitória (edema agudo), considerando que este não se constitui em linfedema (edema crônico), uma vez que sua regressão representa o sucesso na adaptação anatômica do sistema linfático, inicialmente prejudicado (BERGMANN; MATTOS, 2007).

Segundo Andrade (2003) e Casley-Smith Jr (1994), o volume do membro com linfedema aumenta progressivamente se não tratado, assim como aumenta a frequência das complicações relacionadas. Para os linfedemas de aparecimento recente, é usual observar progressão espontânea nos cinco primeiros anos de seguimento, ocorrendo relativa estabilização após este período. O linfedema pós-mastectomia, curiosamente, apresenta uma taxa de crescimento volumétrico cerca de três vezes maior que os linfedemas dos membros inferiores, para um dado período de tempo. Uma complicação temível dos linfedemas é sua malignização. Linfedemas de longa duração podem ser sede de linfangiossarcomas que, se

são infrequêntes (menos de 1% dos casos humanos), apresentam altíssima taxa de mortalidade independente do tratamento.

2.3.2 Tumores de mama e linfedema em cadelas

Tumor mamário é o segundo tumor mais comum em todos os cães e o mais comum em cadelas, sendo de modo geral de duas a três vezes mais freqüente que na mulher (SILVA, 2006). Na espécie canina, os tumores de pele são os mais comuns, seguidos pelos mamários, mas se considerarmos somente as fêmeas, essa taxa sobe para 50% das neoplasias (SLATTER, 1998). Eles ocorrem em animais mais velhos (média de idade de 10 anos), usualmente naqueles animais que são inteiros ou foram castrados após inúmeros ciclos estrais, sendo que todas as raças podem ser afetadas. O segundo par abdominal e o inguinal de glândulas mamárias são freqüentemente mais afetados em cães. Os tumores mamários podem ser únicos ou múltiplos, sendo geralmente palpáveis como nódulos discretos ou massas dentro das glândulas mamárias (DOBSON, 2007).

O tratamento para a maioria dos tumores mamários é a excisão cirúrgica. Em cães, os primeiros três pares de glândulas drenam cranialmente e os quarto e quinto pares caudalmente, embora possa haver comunicação linfática entre glândulas adjacentes. Teoricamente, isso faz necessária a remoção das glândulas adjacentes para a maioria dos tumores e ampla remoção para tumores em ramificações glandulares. A mastectomia unilateral compreende a remoção de todas as mamas da mesma cadeia e dos linfonodos correspondentes. A ressecção em bloco envolve a retirada da mama neoplásica, das mamas com as quais possui conexões linfáticas e dos linfonodos correspondentes (SILVA, 2006).

O estudo de formação de linfedema nas cadelas após a mastectomia ainda não possui dados conclusivos, mas o que se pode observar é que a formação de linfedema após procedimento cirúrgico é bastante freqüente quando visto em diferentes animais (ANDRADE, M. F. C., 2003).

2.4 ANGIOGÊNESE

Vasculogênese refere-se à formação de vasos sanguíneos por progenitores endoteliais; angiogênese e arteriogênese referem-se ao brotamento e subsequente estabilização desses “brotos” por células murais e, crescimento colateral denota o crescimento expansivo de vasos pré-existentes, formando pontes colaterais entre redes arteriais. Tanto a angiogênese capilar e o crescimento arterial são alvos de terapias, assim como capilares distais distribuem o fluxo, enquanto arteríolas proximais fornecem o fluxo maciço ao tecido (CARMELIET, 2003).

Evidências recentes indicam que progenitores endoteliais contribuem com o crescimento vascular tanto em embriões quanto em tecidos adultos isquêmicos, malignos ou inflamados, e podem até mesmo ser utilizados em terapias para estimular crescimento vascular em tecidos isquêmicos, um processo chamado “vasculogênese terapêutica” (ASAHARA; ISNER, 2002; LUTTUN; CARMELIET; CARMELIET, 2002; RAFII et al., 2002). Células endoteliais (CE) diferenciam-se a partir de angioblastos nos embriões (MIKKOLA; ORKIN, 2002) e a partir de células progenitoras endoteliais (CPE), mesoangioblastos, células progenitoras adultas multipotentes, ou de células na medula óssea de adultos (ASAHARA; ISNER, 2002; LUTTUN; CARMELIET; CARMELIET, 2002; MIKKOLA; ORKIN, 2002; RAFII et al., 2002; REYES et al., 2002). CPEs podem também contribuir com crescimento vascular pela liberação de fatores de crescimento angiogênicos (REHMAN et al., 2003).

O VEGF estimula a angiogênese fisiológica e patológica de uma maneira dose-dependente e, portanto, está sendo avaliado para terapia pró e anti-angiogênese (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003). Ele possui importante papel na angiogênese e permeabilidade vascular no período de implantação embrionária. Portanto, reconhecer o mecanismo molecular que regula a formação de vasos patológicos, sanguíneos e linfáticos é de extrema importância (ALMEIDA, 2008).

Há mais de trinta anos, Folkman em 1971, propôs o conceito de controle do leito vascular – estimulação ou inibição do crescimento de novos vasos, como uma alternativa terapêutica para diversas condições clínicas.

Em pouco tempo, o controle da angiogênese passou a ser considerado como um dos pontos estratégicos na luta contra o câncer e inúmeras pesquisas voltaram-se nesta direção (LUCENA; YAMANE, 2008).

Em humanos, a angiogênese ocorre tanto em situações fisiológicas, como a embriogênese e o processo de reparação tecidual, quanto patológicas (CARMELIET, 2003). O crescimento tumoral e metastático, a degeneração macular relacionada à idade, a artrite reumatóide e a retinopatia diabética são exemplos de doenças em que a angiogênese é parte fundamental do mecanismo fisiopatológico (LUCENA; YAMANE, 2008).

O processo de angiogênese sanguínea e linfática é muito bem regulado por vários fatores angiogênicos chave. Esses fatores, incluindo FGF (fator de crescimento fibroblástico), VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) e famílias de angiopoetinas, modulam tanto o crescimento vascular linfático quanto o crescimento vascular sanguíneo (CAO et al., 2004).

2.5 LINFANGIOGÊNESE

É a formação de novos vasos linfáticos junto a vasos linfáticos pré-existent, em que se pensa ser um método semelhante ao desenvolvimento dos vasos sanguíneos ou angiogênese (ALMEIDA, 2008).

O desenvolvimento do sistema linfático do embrião foi estudado em animais vivos através de secções seriadas e métodos de injeção. Esses estudos demonstraram que os sacos linfáticos são a origem do sistema nas aves e mamíferos (incluindo seres humanos) e que o seu desenvolvimento acontece em íntima associação com o sistema venoso. De acordo com a sua localização específica, os sacos linfáticos denominam-se como jugulares, subclávicos, posterior e retroperitoneal, além da cisterna do quilo (ANDRADE, M., 2008).

Somente na década de 1950 foram feitos avanços em relação ao envolvimento linfático em diversos tipos de câncer. Iniciou-se o uso de radioisótopos para mapear e entender qual era a drenagem linfática do órgão acometido pela neoplasia (LALONI, 2008). A técnica de identificação dos vasos linfáticos possibilitou a confirmação de que estes são fundamentais para o desenvolvimento das metástases e de outros processos patológicos. A partir dessa descoberta intensificou-se a pesquisa clínica e científica em relação à importância e à busca de alvos terapêuticos em oncologia.

Quando um linfonodo é ressecado, ocorre um processo de linfangiogênese e, em muitos casos, a capacidade de transporte dos novos vasos formados parece suficiente para prevenir a manifestação clínica do edema (LALONI, 2008). A questão é conhecer se os

parâmetros normais acompanham ou não tal processo. Essa resposta pode ser importante, sendo presumível que qualquer alteração sutil de transporte linfático pode alterar a drenagem linfática do tecido e, conseqüentemente, aumentar o risco de desenvolvimento do linfedema (LOPRINZI et al., 1999).

A regeneração dos vasos linfáticos interrompidos através das anastomoses linfolinfáticas é sensível à alterada formação cicatricial, seroma pós-operatório, radioterapia e exercícios precoces inadequados para a reabilitação do ombro, sendo fatores de prejuízo a esse processo de neoformação (ALMEIDA, 2008). Tecidos menos prejudicados em cirurgias menos agressivas permitem novas conexões linfolinfáticas. A restauração do fluxo linfático é beneficiada pela boa cicatrização tecidual, pela imobilização do ombro ipsilateral à cirurgia, pela drenagem linfática manual e pela contração muscular.

A regulação do desenvolvimento dos sistemas linfático e sanguíneo é feita por uma série de sinalizadores e receptores celulares. Os sinalizadores mais importantes pertencem a uma família de glicoproteínas: o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF).

2.6 FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGF)

O Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF) é um potente indutor de proliferação e migração de células endoteliais (CE) *in vitro* assim como de inflamação *in vivo* (BERNATCHEZ; SOKER; SIROIS, 1999).

Os VEGF são os reguladores primários da proliferação endotelial, angiogênese, vasculogênese e permeabilidade vascular (FERRARA; ALITALO, 1999). São subdivididos em VEGF A, B, C, D e E, que se ligam a receptores tirosina e quinase específicos de membrana, os *vascular endothelial growth factor receptor* 1 (VEGFR-1/Flt1), 2 (VEGFR-2/Flk1/KDR) e 3 (VEGFR-3/Flt4). A ativação do VEGFR-2 pelo VEGF é considerada a principal via para a angiogênese e a mitogênese das células endoteliais (DUMONT et al., 1998).

Experimentalmente observa-se que a expressão exagerada destas vias de sinalizadores e receptores se traduz em hiperplasia do sistema linfático, enquanto que a sua inibição leva a hipoplasia linfática (JUSSILA; ALITALO, 2002).

Em tecidos adultos, a expressão de VEGFR-3 ocorre principalmente no endotélio linfático. O VEGFR-3 se liga a dois membros conhecidos da família dos sinalizadores VEGFC e VEGFD e tem função crítica na remodelação dos vasos de embriões. Mais tarde, durante o desenvolvimento, o VEGFR-3 regula o crescimento e a manutenção dos vasos linfáticos. A estimulação isolada do VEGFR-3 estimula o crescimento e a migração do endotélio linfático (KAIPAINEN et al., 1995; CHILOV et al., 1997).

Evidências diretas sobre o papel do VEGFC na promoção da linfangiogênese ocorrem em estudos com camundongos transgênicos com super-expressão de VEGFC sob o controle do promotor queratina 14 (K14), que dirige a expressão transgênica aos queratinócitos basais da pele. Camundongos K14-VEGFC demonstram uma hiperplasia pronunciada de vasos linfáticos cutâneos, enquanto que o crescimento de vasos sanguíneos não é afetado (SAHARINEN; PETROVA, 2004).

2.6.1 Administração de VEGFC como agente terapêutico

Abordagens terapêuticas existentes para o linfedema não têm a capacidade de lidar com a fisiopatologia molecular subjacente (NAKAMURA; ROCKSON, 2008); como consequência, a prática atual de tratamento pode introduzir apenas atrasos modestos na evolução de seqüelas em fase terminal da doença.

Nos últimos anos, tem havido um interesse crescente na aplicação dos princípios moleculares para terapêutica de linfedema (AN; ROCKSON, 2004; NAKAMURA; ROCKSON, 2008; SHIN; ROCKSON, 2008). Em particular, a identificação dos componentes moleculares do desenvolvimento linfático tornou viável gerar modelos moleculares para a linfangiogênese (AN; ROCKSON, 2004). Assim como terapias com fator de crescimento Karkkainen et al. (2001) demonstraram reversão do linfedema em camundongos Chy, modelando a insuficiência linfática hereditária do tipo Milroy. O aumento terapêutico de ligantes de fatores de crescimento também tem sido descrito em situações experimentais de incompetência linfática adquirida e linfedema secundário (SZUBA; ROCKSON, 1998; YOON et al., 2003; CHEUNG et al., 2006; SAITO et al., 2006).

Embora o papel contributivo da linfangiogênese induzida por fatores de crescimento permaneçam controversos (GOLDMAN et al., 2005), Jin et al. (2009) e outros (SZUBA; ROCKSON, 1998; KARKKAINEN et al., 2001; YOON et al., 2003; SAARISTO

et al., 2004; CHEUNG et al., 2006; SAARISTO et al., 2006; TAMMELA et al., 2007) demonstram o benefício terapêutico do aumento de VEGFC em uma variedade de pequenos modelos animais de deficiências anatômica e funcional dos vasos linfáticos.

Estudos moleculares recentes começaram a elucidar a base para a linfangiogênese, que pode ser estimulada por várias citocinas, incluindo VEGFC (LEAK; JONES, 1994; OH et al., 1997). VEGFC, o primeiro ligante a ser descoberto para o VEGFR3 (FLT4), é um membro da família VEGF de fatores de crescimento polipeptídicos. VEGFC se liga a receptores de células endoteliais VEGFR2 (Flk1) e VEGFR3 (APRELIKOVA et al., 1992; GALLAND et al., 1992; JOUKOV et al., 1996; LEE et al., 1996). Apesar do VEGFR3 desempenhar um papel fundamental para o desenvolvimento celular endotelial vascular e linfático, sua expressão fica limitada ao endotélio linfático nos estágios finais de desenvolvimento (KAIPAINEN et al., 1995; KUKK et al., 1996; BAUMGARTNER et al., 1998). A superexpressão do cDNA de VEGFC na pele de camundongos transgênicos induziu a proliferação de células endoteliais linfáticas e hiperplasia da vascularização linfática e o VEGFC recombinante estimulou especificamente a linfangiogênese na membrana corioalantóide (OH et al., 1997; JELTSCH et al., 1997). Recentemente, evidências diretas da ligação entre VEGFR3 e linfedema foram encontradas: foi relatado que o linfedema hereditário humano está associado com uma mutação heterozigótica do gene do FLT4, o que conduz a uma sinalização insuficiente de VEGFC (FERRELL et al., 1998; KARKKAINEN et al., 2000). Além disso, foi demonstrado que a injeção subcutânea de adenovírus que codifica VEGFC poderia gerar vasos linfáticos na pele de camundongos normais (ENHOLM et al., 2001) e em um modelo de camundongos (Chy) de linfedema primário (KARKKAINEN et al., 2001).

3 Objetivos

3 OBJETIVOS

Analisar o efeito da cirurgia de retirada do linfonodo inguinal esquerdo na pele da mesma região e no membro pélvico esquerdo na formação de vasos linfáticos e a revascularização *in vivo*.

Comparar o tempo de revascularização com e sem o tratamento com VEGFC exógeno.

Determinar um modelo animal para tratamento com VEGFC exógeno pós-cirúrgico.

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MODELO EXPERIMENTAL

Para a realização deste trabalho foram utilizados 52 camundongos machos de 2 meses de idade, da linhagem Balb/C, alojados sob condições de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura, ciclo claro:escuro de 12 h:12 h (luz 7 h - 19 h), água e alimentação *ad libitum*. Os animais foram divididos em três grupos, sendo que um grupo não foi submetido ao procedimento cirúrgico de retirada do linfonodo inguinal esquerdo (Grupo Controle), um grupo que passou pelo procedimento cirúrgico para a retirada do linfonodo inguinal esquerdo (Grupo Cirurgia) e um grupo que passou pelo mesmo procedimento cirúrgico, mas que recebeu tratamento com VEGFC (Grupo Tratamento).

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Após a cirurgia, os grupos Controle, Cirurgia e Tratamento foram comparados três (03), nove (09), quinze (15) e trinta (30) dias para avaliar o número de vasos linfáticos utilizando-se imunohistoquímica, seguida de contagem estereológica. Também foi realizado o PCR em tempo real para análise da expressão gênica do VEGFC e seu receptor FLT4. O detalhamento do número de animais por grupo avaliados nos 4 momentos do estudo encontra-se a seguir e no gráfico 1.

Três (03) dias após cirurgia:

- Grupo Controle - animais que não passaram pela cirurgia (n=3)
- Grupo Cirurgia - animais que passaram pela cirurgia (n=5)
- Grupo Tratamento - animais que passaram pela cirurgia e receberam tratamento com VEGFC (n=5)

Nove (09) dias após cirurgia:

- Grupo Controle - animais que não passaram pela cirurgia (n=3)

- Grupo Cirurgia - animais que passaram pela cirurgia (n=5)
- Grupo Tratamento - animais que passaram pela cirurgia e receberam tratamento com VEGFC (n=5)

Quinze (15) dias após cirurgia:

- Grupo Controle - animais que não passaram pela cirurgia (n=3)
- Grupo Cirurgia - animais que passaram pela cirurgia (n=5)
- Grupo Tratamento - animais que passaram pela cirurgia e receberam tratamento com VEGFC (n=5)

Trinta (30) dias após cirurgia:

- Grupo Controle - animais que não passaram pela cirurgia (n=3)
- Grupo Cirurgia - animais que passaram pela cirurgia (n=5)
- Grupo Tratamento - animais que passaram pela cirurgia e receberam tratamento com VEGFC (n=5).

Gráfico 1 - Animais utilizados durante o experimento

Fonte: Ferrão, J. S. P. (2013)

Legenda: Barras pretas: Grupo Cirurgia; barras brancas: Grupo Tratamento; barras cinzas: Grupo Controle.

4.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os camundongos foram anestesiados intraperitonealmente com uma mistura de 0,67mg/kg de xilazina e 0,33mg/kg de quetamina, diluídos em água MiliQ. Em seguida, foi feita uma incisão vertical na região inguinal esquerda, onde o linfonodo inguinal esquerdo, vasos linfáticos e sanguíneos adjacentes foram identificados. Eles foram, então retirados sem danificar grandes vasos sanguíneos periféricos, como a artéria e veia ilíaca circunflexa superficial (LIU et al., 2008). Durante o período pós-operatório foi ministrado sulfato de morfina subcutâneo, na dose de 5mg/kg como analgésico, a cada 8 horas, durante 24 horas.

Após 03 (três), 09 (nove), 15 (quinze) e 30 (trinta) dias decorridos da cirurgia, os animais foram eutanasiados com anestesia profunda (1 ml da mesma mistura de xilazina e quetamina) e foi feita a coleta de material (pele adjacente à região onde se localizava o linfonodo inguinal, tanto do lado direito quanto do lado esquerdo; e ambos os membros pélvicos).

Durante o período pós-operatório até o dia da eutanásia, os animais foram observados para detecção da formação de linfedema na região do membro pélvico.

O material obtido após a eutanásia dos animais foi coletado em formol tamponado, para realizar imunohistoquímica, e em nitrogênio líquido, passando em seguida para congelamento em -80°C, para a realização do PCR em tempo real.

4.4 MARCAÇÃO DE VEGFC E FLT4 POR IMUNOHISTOQUÍMICA

O material obtido da intervenção cirúrgica consistiu de tecido fibroadiposo, onde estavam inclusos os vasos linfáticos e o linfonodo inguinal. Já o material obtido após a eutanásia dos animais era composto por pele e tecido adiposo da região adjacente ao linfonodo retirado e da região contralateral, e a musculatura e tecido adjacente de ambos os membros pélvicos (Figuras 01 a 04). O material coletado foi conservado em formol tamponado, permanecendo nele por vinte e quatro horas. Em seguida, foi realizado procedimento de desidratação em sequência crescente de etanol (70%, 90% e absoluto) e xilol (etanol/xilol, xilol I e II), sendo então o material incluso em parafina. Os cortes teciduais (4 µm) já nas lâminas foram desparafinizados em xilol (I e II), reidratados em uma série de

etanol em concentrações decrescentes (absoluto I e II, 90%, 70%) e água destilada. Em seguida incubados em tampão citrato à temperatura ambiente (5 minutos) e em microondas (3 vezes de 5 minutos) para exposição de epítomos. Para estabilização dos epítomos, as lâminas com os cortes teciduais permaneceram em temperatura ambiente (em tampão citrato) por 20 minutos, para resfriamento. Em seguida, as lâminas foram montadas em suportes de modo a permanecerem em posição vertical, levemente inclinadas para trás. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com 4 gotas de Peroxidase Block 3% (DAKO®) em cada lâmina no suporte por 15 minutos à temperatura ambiente em câmara úmida. Para redução das ligações inespecíficas, as lâminas foram lavadas três vezes com ICC (solução tampão fosfato com Triton X-100) e, então, incubadas com 4 gotas de solução bloqueadora de proteínas Protein Block (DAKO®) por 15 minutos à temperatura ambiente em câmara úmida, também utilizando-se o suporte. Em seguida, as secções foram incubadas por 16 horas à 4°C com anticorpos contra as proteínas em estudo, VEGFC (Bioss Inc., Woburn, MA, EUA) e FLT4 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, EUA). Após as 16 horas de incubação, as lâminas no suporte foram novamente lavadas 3 vezes com ICC e, então, foram aplicadas 4 gotas do anticorpo secundário (DAKO®) por 15 minutos à temperatura ambiente em câmara úmida, utilizando-se o suporte. Em seguidas, as lâminas foram novamente lavadas 3 vezes com ICC e posteriormente foram aplicadas 4 gotas do complexo peroxidase-estreptavidina-biotina (DAKO®) para amplificação da reação, por 15 minutos à temperatura ambiente em câmara úmida. As lâminas foram mais uma vez lavadas 3 vezes com ICC e, então retiradas do suporte, uma a uma, e colocadas sobre a bancada na posição horizontal. A reação foi evidenciada por incubação com Diaminobenzidina (DAKO®) por 1,5 minuto, aproximadamente. Após 3 lavagens com água destilada (5 minutos cada), as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina durante 10 segundos, lavadas em água corrente durante 5 minutos, novamente desidratadas em ordem crescente de etanol e montadas com solução selante *Permount* e lamínula.

Figura 1 - Pele da região inguinal esquerda sendo retirada após eutanásia do animal

Fonte: Ferrão, J. S. P. (2013)

Legenda: Seta: tela subcutânea, onde pode ser visualizado tecido adiposo e vasos sanguíneos; os vasos linfáticos não são visíveis.

Figura 02 - Músculos do Membro Pélvico do camundongo, vista lateral esquerda

Fonte: POPESKO, P. A Colour Atlas of The Anatomy of Small Laboratory Animals, 2002, p. 109.

Legenda: 32. Músculo Glúteo Superficial; 33. Músculo Tensor da Fáscia Lata; 34. Músculo Reto Femoral; 35. Músculo Bíceps Femoral; 36. Músculo Semitendíneo; 37. Cabeça Lateral do Músculo Gastrocnêmio; 38. Músculo Flexor Longo do Dígito I; e 39. Músculo Extensor Digital Longo.

Figura 3 - Músculos do Membro Pélvico Esquerdo do camundongo, vista lateral

Fonte: POPESKO, P. A Colour Atlas of The Anatomy of Small Laboratory Animals, 2002, p. 162.

Legenda: 1. Músculo Glúteo Superficial; 2. Músculo Glúteo Médio; 3. Músculo Reto Femoral; 4. Músculo Vasto Lateral; 5. Músculo Tensor da Fáscia Lata; 6. Fáscia Lata; 7. Músculo Bíceps Femoral; 8. Fáscia Crural; 9. Músculo Adutor; 10. Músculo Semimembranáceo; 11. Músculo Semitendíneo; 12. Cabeça Lateral do Músculo Gastrocnêmio; 13. Tendão do Músculo Tríceps; 14. Músculo Flexor Longo do Dedo I; 15. Músculo Extensor Digital Lateral; 16. Músculo Extensor Digital Longo; 17. Músculo Tibial Cranial; 18. Tendão do Músculo Fibular Longo; 19. Nervo Tibial e Veia Femoral Caudal; 20. Ramos Craniais da Veia Safena Lateral; 21. Ramos ascendentes da Veia Femoral Caudal; 22. Ramos musculares para o M. Semimembranáceo e Linfonodo Poplíteo; 23. Veia Isquiática; 24. Veia Safena Lateral; 25. Ramos Caudais da Veia Safena Lateral; 26. Ramos musculares do Nervo Isquiático; 27. Nervo Isquiático; 28. Nervo Cutâneo Caudal e Artéria Femoral Caudal; 29. Veia Caudal Lateral.

Figura 4 - Músculos do Membro Pélvico Direito do camundongo, vista medial

Fonte: POPESKO, P. A Colour Atlas of The Anatomy of Small Laboratory Animals, 2002, p. 163.

Legenda: 1. Músculo Coccígeo Dorsal; 2. Músculo Coccígeo Ventral; 3. Porção Intrapélvica do Músculo Obturador Externo; 4. Músculo Psoas Menor; 5. Músculo Psoas Maior; 6. Músculo Tensor da Fáscia Lata; 7. Músculo Reto Femoral; 8. Músculo Pectíneo; 9. Músculo Vasto Medial; 10. Músculo Adutor; 11. Músculo Grácil; 12. Músculo Semimembranáceo; 13. Músculo Semitendíneo; 14. Cabeça Medial do Músculo Gastrocnêmio; 15. Músculo Tibial Caudal; 16. Músculo Flexor Longo do Dedo I; 17. Tíbia e Músculo Flexor Longo dos Dedos; 18. Artéria e Veia Ilíaca Externa direita; 19. Tronco Pudendoepigástrico e Veia Pudendoepigástrica; 20. Nervo, Artéria e Veia Femorais; 21. Veia Femoral Caudal e Ramo muscular do Nervo Femoral; 22. Inserção do Músculo Sartório; 23. Nervo Safeno e Artéria Safena, Veia Safena Medial; 24. Artéria, Veia e Nervo Obturador; 25. Artéria e Veia Pudenda Interna; 26. Artéria e Veia Perineal Ventral, Nervo Perineal Superficial; 27. Músculo Lombossacro Ventral; 28. Músculo Lombossacro Dorsal Lateral; 29. Linfonodos Ilíacos laterais.

4.5 ESTEREOLOGIA DE VASOS LINFÁTICOS

A estereologia é baseada nas considerações geométricas e estatísticas e permite a obtenção de estimativas de volumes, superfícies, comprimentos e o número das estruturas de interesse a partir de cortes bidimensionais (TSCHANZ; BURRI; WEIBEL, 2011).

Para que fossem realizadas as análises estereológicas, foram retiradas amostras de pele e membro pélvico (MP) de cada animal, que foram fixadas em solução de formol 4% tamponado em PBS por 24 horas e processadas por imunohistoquímica para detecção do VEGFC para a visualização dos vasos linfáticos, conforme descrito anteriormente.

A estereologia é um método que obtém informações quantitativas em estudo tridimensional, de largura, comprimento e espessura. Os sistemas testes empregados na estereologia são constituídos de linhas teste, pontos teste e áreas teste, de comprimento (L_T), número (P_T) e área (A_T) conhecidos. Estes sistemas são empregados para a obtenção de informações necessárias para a estimativa de variáveis estereológicas como a densidade de volume (V_v) e a densidade de comprimento (L_v) (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003).

As imagens obtidas foram analisadas após sobreposição da área teste pelo programa Stepanizer (TSCHANZ; BURRI; WEIBEL, 2011). Desta forma, os vasos linfáticos foram contados dentro de uma área conhecida, chamada área teste (A_T). De forma a evitar a superestimação dos vasos, foram consideradas 2 linhas de proibição (contínuas) para contagem dos vasos que tocam estas linhas, e 2 linhas de permissão (pontilhadas) (Figuras 05 e 06).

A variável densidade de volume vascular linfático (V_v), expressa em porcentagem (%), foi estimada segundo a fórmula:

$$V_v = P_p / P_T$$

Onde,

P_p - número de pontos teste que tocam vasos linfáticos

P_T - número total de pontos teste contidos no sistema teste (100)

A variável densidade de comprimento vascular linfático (L_v), expressa em mm/mm^3 , foi estimada segundo a fórmula:

$$Lv = 2^{(N/A_T)}$$

Onde,

N - número de vasos dentro da área teste

A_T - área teste (99.404,4586µm²)

Figura 5 - Representação de uma área teste (A_T) com 100 pontos teste e a esquematização de contagem dos vasos marcados com anticorpo VEGFC que tocam estes pontos

Fonte: Ferrão, J. S. P. (2013)

Figura 6 - Representação de uma área teste (A_T) com as linhas de proibição e permissão e a esquematização de contagem dos vasos linfáticos marcados com anticorpo VEGFC dentro da A_T na interface do programa Stepanizer

Fonte: Ferrão, J. S. P. (2013)

4.6 AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO DE RNAm

4.6.1 Extração e purificação do RNA total

Fragmentos de aproximadamente 10 mg foram obtidos das diferentes regiões (proximal, média e distal) dos membros pélvicos esquerdos dos camundongos, que foram imediatamente submersos em nitrogênio líquido. Para extração do RNA total as amostras foram colocadas em 1 ml de Trizol[®] (Life Technologies, EUA) em cada tubo de polipropileno de 1,5 ml e homogeneizados vigorosamente com uso do homogeneizador de tecidos (Polytron[®], EUA). As amostras foram então centrifugadas durante 10 minutos, a 11500 rpm e

temperatura de 4°C. Foi retirada a parte líquida (sobrenadante), sendo descartado o pellet formado. As amostras foram então mantidas por 5 minutos a temperatura ambiente (15 °C a 30°C). Após este período, foram acrescidas de 200 µl de clorofórmio e agitadas em vórtex durante 10 segundos. A agitação foi seguida de uma nova incubação à temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugação a 11500 rpm por 15 minutos à temperatura de 4°C. O clorofórmio é responsável pela separação da amostra em duas fases, sendo uma orgânica ou aquosa e outra inorgânica. O RNA total permaneceu solubilizado exclusivamente na fase aquosa, representada pelo sobrenadante transparente resultante da centrifugação.

Na etapa de precipitação do RNA total, a fase aquosa obtida anteriormente foi transferida para um novo tubo de polipropileno e acrescida de álcool isopropílico na proporção de 0,5 ml de isopropanol para cada 1 ml de Trizol utilizado na homogeneização. Esta mistura foi incubada à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugada à 11500 rpm durante 10 minutos à temperatura de 4°C. O álcool isopropílico é o responsável pela precipitação do RNA total. Desta forma, dependendo da quantidade de RNA total contido na amostra, pode-se observar um pellet no fundo do tubo após a centrifugação.

Na etapa de lavagem do RNA total, o sobrenadante foi removido e descartado, sendo em seguida acrescido de 1 ml de etanol a 75% por tubo para cada 1ml de Trizol[®] utilizado na homogeneização. O tubo contendo etanol foi invertido algumas vezes para lavagem da amostra seguida de centrifugação à 9000 rpm durante 5 minutos à temperatura de 4°C.

4.6.2 Transcrição reversa

Para a construção de cDNA foi utilizado o *kit Sensiscript RT*[®] (Qiagen, cat205213, EUA), cujo protocolo iniciou-se pela adição de 1µg de RNA total e água deionizada livre de RNases para um volume final de 7 µl em microtubo estéril. Em seguida adicionou-se 1 µl de tampão DNase 10X e 1 µl de DNase I[®] (Life Technologies, cat18068-015, EUA). As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, para a inativação da atividade DNase foi acrescido 1 µl de EDTA 25mM e a solução foi incubada a 65°C durante 10 minutos.

Após a última incubação adicionou-se à solução 2 µl de Oligo dT¹⁸ 10µM (IDT, EUA), 2 µl de dNTP 5mM, 2 µl de água deionizada livre de RNases, 1 µl de RNase Out[®]

40U/ μ l (Life Technologies, cat10777-019, EUA), 2 μ l de tampão para atividade da sensiscript e 1 μ l da enzima sensiscript. As reações foram homogeneizadas e incubadas à 37°C durante 60 minutos. Após este processo as amostras foram armazenadas a -20°C para posterior análise de expressão gênica.

4.6.3 Avaliação da expressão gênica pelo PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real (qPCR) foram realizadas em um fluorometro automatizado (ABI PRISM™ 7500, Life Technologies, USA), usando placas ópticas de 96 poços. O sistema adotado para a detecção da expressão gênica do VEGFC e seu receptor FLT4 foi o sistema Taqman, que por utilizar uma sonda fluorescente possibilita a detecção de um produto específico da PCR conforme esse se acumula durante os ciclos da reação. Uma sonda (oligonucleotídeo) é construída no sistema Taqman contendo um corante *reporter* fluorescente na extremidade 5' e um corante *quencher* (silenciador) na extremidade 3'. Se a sequência alvo estiver presente, a sonda se anela logo após a sequência de um dos *primers* e é clivada através da atividade da nuclease 5' da Taq DNA polimerase enquanto o *primer* é estendido. Esta clivagem da sonda separa o corante *reporter* do corante *quencher*, aumentando o sinal do corante *reporter*. Moléculas adicionais do corante *reporter* são clivadas de suas respectivas sondas em cada ciclo, resultando em um aumento na intensidade de fluorescência, que é proporcional à quantidade de *amplicon* produzido.

4.6.4 Reação de PCR em tempo real

Todas as amostras foram analisadas em duplicata. Inicialmente, os cDNAs foram diluídos em água livre de RNases na proporção de 1:16. Em seguida, foi preparado um mix para cada gene estudado, sendo acrescentados 6,25 μ l de TaqMan® PCR MasterMix (Life Technologies, EUA), 3,25 μ l de água deionizada livre de RNases e 0,5 μ l conjunto de primer e sonda. Foram pipetados 10 μ l deste mix em cada poço correspondente na placa e acrescentados 2,5 μ l da respectiva amostra de cDNA. Após pipetar todas as amostras nos poços, a placa foi coberta por um adesivo óptico específico, submetida à centrifugação rápida

(inferior a 10 segundos) e levada ao aparelho de PCR. A reação de amplificação foi iniciada por 2 minutos à 50°C ativando a uracil N- glicosilase que degrada os resíduos de RNA e 10 minutos à 95°C para ativação da polimerase, seguida por 40 ciclos de denaturação das fitas de cDNA à 95°C por 15 segundos e extensão à 60°C por 1 minuto.

4.6.5 Determinação da eficiência dos *primers*

Os *primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real para VEGFC (Mm01202432_m1), FLT4 (Mm00433354_m1), e o gene de referência beta-actina (Mm00607939_s1) foram comprados e listados na tabela 1.

Tabela 1 - Primers para VEGFC, FLT4, e beta-actina murino para PCR em tempo real

Gene	Seqüência	Genbank	Tamanho Amplicon (pb)
VEGFC	Senso não fornecida	AK047844.1	80
	Antisenso CACCATCAAACATGCAGTTGTTACA		
FLT4	Senso não fornecida	BC138346.1	78
	Antisenso TCCACCTCCATGTTTGAGGACTATC		
Beta-actina	Senso não fornecida	AK078935.1	115
	Antisenso ACTGAGCTGCGTTTTACACCCTTTC		

A eficiência dos *primers* foi testada para verificar se os pares de primers apresentavam eficiência próxima a 100%. A eficiência de amplificação da PCR é a taxa na qual um *amplicon* de PCR é gerado, se este dobrar em quantidade a cada ciclo durante a fase geométrica da amplificação da PCR, então a PCR apresentou 100% de eficiência. O *slope* de

uma curva padrão é comumente usado para estimar a eficiência de amplificação de uma reação de PCR em tempo real. Uma curva padrão de PCR em tempo real é representada como um gráfico de regressão linear semi-log do valor CT em comparação ao log da quantidade inicial do ácido nucléico. Um *slope* da curva padrão de $-3,32$ indica uma reação de PCR com 100% de eficiência, ou seja, produziu um aumento de 10 vezes no *amplicon* da PCR a cada 3,32 ciclos durante a fase exponencial de amplificação ($\log_2 10 = 3,3219$).

Uma curva padrão foi construída com cDNA, sendo os pontos da curva 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, representando respectivamente as quantidades de cDNA, 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625, 0,03125 μg . As reações foram otimizadas conforme descritas no item 4.6.4.

Após obtido o *slope* da curva, foi calculada a estimativa de eficiência (E, em %) do ensaio:

$$E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$$

A partir deste cálculo foi possível confirmar eficiências de todos os primers entre de 98% a 100%.

4.6.6 Determinação do *threshold*

O *threshold* é o ponto de sinal *reporter* que é usado para determinação dos ciclos *threshold* nos ensaios de Real Time. O threshold deve ser ajustado dentro da região de crescimento exponencial de uma curva de amplificação. O número do ciclo no qual o sinal fluorescente associado a um acúmulo de *amplicon* cruza o *threshold* é referido como ciclo *threshold*.

Para determinação dos *thresholds* que possibilitaram a comparação entre todos os grupos, a primeira reação de PCR em tempo real foi realizada utilizando amostras dos grupos Controle e Cirurgia nos diferentes períodos do estudo. A análise do ciclo *threshold* médio de cada amostra foi realizado por meio do programa LingReg PCR (RAMAKERS et al., 2003a; b). Em seguida, foi obtida a média de todos os ciclos *threshold* de um mesmo grupo para cada gene.

Os *thresholds* do VEGFC e FLT4 foram respectivamente, 0,0854708; 0,1333521. Eles foram utilizados para a obtenção dos valores de CT de todas as amostras com a utilização do programa ABI PRISM™ 7500 (Life Technologies, USA).

4.6.7 Quantificação relativa do gene alvo no PCR em tempo real

Para determinar a quantificação relativa do gene alvo em comparação com um gene de referência foi utilizada a expressão relativa *ratio* (R). Ela é calculada com base na eficiência (E) e no CP de um gene alvo versus um gene controle e é expressa em comparação com um gene de referência:

$$ratio = \frac{(E_{alvo})^{\Delta CP_{alvo}(controle-amostra)}}{(E_{ref})^{\Delta CP_{ref}(controle-amostra)}}$$

Onde,

E_{alvo} - Eficiência do gene alvo

E_{ref} - Eficiência do gene de referência

ΔCP_{alvo} - CT do controle menos o CT da amostra do gene alvo

ΔCP_{ref} - CT do controle menos o CT da amostra do gene de referência

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente os dados foram analisados quanto à normalidade de sua distribuição pelo teste de normalidade Anderson-Darling (InStat, Califórnia, EUA). Os dados apresentaram distribuição normal, portanto paramétrica, e conseqüentemente foi aplicado o teste One Way ANOVA seguido do pós teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer (GraphPad Prism 5 Software Inc., San Diego, EUA) para comparações entre mais de 3 grupos. Para a comparação entre 2 médias fez-se uso do teste t de Student (InStat, Califórnia, EUA). Os resultados foram apresentados por média $\pm$ desvio padrão, sendo considerados resultados significativos quando $p < 0.05$.

5 Resultados

5 RESULTADOS

As proteínas VEGFC e FLT4 foram detectadas por meio de imunohistoquímica nas diferentes regiões do membro pélvico esquerdo de camundongos submetidos à cirurgia, com e sem tratamento com VEGFC, e seus respectivos controles, ao longo do período de estudo (03, 09, 15 e 30 dias). As imunohistoquímicas dos grupos Controle podem ser observadas no Apêndice A (Figura 11).

Quando comparadas as imunohistoquímicas com marcação do anticorpo VEGFC dos grupos Cirurgia e Tratamento dos dias 03 e 09, pode-se observar uma menor marcação dos vasos linfáticos nas regiões média e distal do membro pélvico esquerdo dos animais do grupo do dia 03 em relação às mesmas regiões do grupo do dia 09, porém essa diferença não foi observada na região proximal do membro pélvico esquerdo (Figura 7). No entanto, quando se observam os sinais positivos para VEGFC nas mesmas regiões no grupo que recebeu tratamento com VEGFC, pode-se notar um aumento na intensidade da marcação, tanto para o grupo do dia 03 quanto para o grupo do dia 09.

Figura 7 - Imunohistoquímica para VEGFC (diluição 1:400) em musculatura de membros pélvicos esquerdos de camundongos, representando 5 animais de 4 dos grupos experimentais, sendo do grupo eutanasiado 3 dias após a cirurgia e do grupo eutanasiado 9 dias após a cirurgia tratados ou não com VEGFC

Fonte: Ferrão, J. S. P. (2013)

Legenda: (A) Região Proximal do Membro Pélvico Esquerdo, 3 dias após a cirurgia, sendo o músculo Glúteo Médio presente na imagem; (B) Região Média do Membro Pélvico Esquerdo, 3 dias após a cirurgia, sendo o músculo Vasto Medial presente na imagem; (C) Região Distal do Membro Pélvico Esquerdo, 3 dias após a cirurgia, sendo o músculo Flexor Longo dos Dedos presente na imagem; (D) Região Proximal do Membro Pélvico Esquerdo, 3 dias após cirurgia e tratamento com VEGFC, sendo o músculo Glúteo Médio presente na imagem; (E) Região Média do Membro Pélvico Esquerdo, 3 dias após cirurgia e tratamento com VEGFC, sendo o músculo Vasto Medial presente na imagem; (F) Região Distal do Membro Pélvico Esquerdo, 3 dias após cirurgia e tratamento com VEGFC, sendo o músculo Flexor Longo dos Dedos presente na imagem; (G) Região Proximal do Membro Pélvico Esquerdo, 9 dias após a cirurgia, sendo o músculo Reto Femoral presente na imagem; (H) Região Média do Membro Pélvico Esquerdo, 9 dias após a cirurgia, sendo o músculo Vasto Medial presente na imagem; (I) Região Distal do Membro Pélvico Esquerdo, 9 dias após a cirurgia, sendo a Cabeça Lateral do Músculo Gastrocnêmio presente na imagem; (J) Região Proximal do Membro Pélvico

Esquerdo, 9 dias após cirurgia e tratamento com VEGFC, sendo o músculo Reto Femoral presente na imagem; (K) Região Média do Membro Pélvico Esquerdo, 9 dias após cirurgia e tratamento com VEGFC, sendo o músculo Vasto Medial presente na imagem; (L) Região Distal do Membro Pélvico Esquerdo, 9 dias após cirurgia e tratamento com VEGFC sendo a Cabeça Lateral do Músculo Gastrocnêmio presente na imagem. As setas indicam os vasos linfáticos; As setas pontilhadas indicam Tecido Muscular. Insert na figura L corresponde ao controle negativo. Contracoloração com Hematoxilina. Barras de 50 ou 100µm.

Quando comparadas as imunohistoquímicas com marcação do anticorpo VEGFC dos grupos dos dias 03 e 15, pode-se também observar uma menor marcação dos vasos linfáticos em todas as regiões do membro pélvico esquerdo dos animais do grupo do dia 03 em relação ao grupo do dia 15, ambos sem tratamento. Esse fato também pode ser observado quando comparados resultados das imunohistoquímicas dos grupos do dia 03 e do dia 30, ambos sem tratamento.

Quando é feita a comparação em relação aos grupos sem tratamento dos dias 09 e dia 15, não é possível notar uma diferença significativa na marcação do anticorpo VEGFC nas imunohistoquímicas referentes a esses dias. No entanto, quando é feita a comparação entre os grupos sem tratamento dos dias 09 e 30, pode-se observar um aumento na marcação da região distal do membro pélvico do dia 30 em relação ao dia 09.

Quando comparadas as imunohistoquímicas com marcação do anticorpo VEGFC dos grupos sem tratamento dos dias 15 e 30, pode-se observar um aumento da marcação dos vasos linfáticos na região distal do membro pélvico esquerdo dos animais do grupo do dia 30 em relação à mesma região do grupo do dia 15, porém essa diferença não foi observada na região proximal e distal do membro pélvico esquerdo (Figura 8). Assim como acontece nos grupos com tratamento com VEGFC dos dias 03 e 09, a marcação nos grupos tratados dos dias 15 e 30 também é mais intensa quando comparados com os grupos que sofreram a cirurgia e não foram tratados com o VEGFC.

Figura 8 - Imunohistoquímica para VEGFC (diluição 1:400) em musculatura de membros pélvicos esquerdos de camundongos, representando 5 animais de 4 dos grupos experimentais, sendo do grupo eutanasiado 15 dias após a cirurgia e do grupo eutanasiado 30 dias após a cirurgia tratados ou não com VEGFC

Fonte: Ferrão, J. S. P. (2013)

Legenda: (A) Região Proximal do Membro Pélvico Esquerdo, 15 dias após a cirurgia, sendo o músculo Reto Femoral presente na imagem; (B) Região Média do Membro Pélvico Esquerdo, 15 dias após a cirurgia, sendo o músculo Adutor presente na imagem; (C) Região Distal do Membro Pélvico Esquerdo, 15 dias após a cirurgia, sendo o músculo Flexor Longo dos Dedos presente na imagem; (D) Região Proximal do Membro Pélvico Esquerdo, 15 dias após a cirurgia e tratamento com VEGFC, sendo o músculo Reto Femoral presente na imagem; (E) Região Média do Membro Pélvico Esquerdo, 15 dias após a cirurgia e tratamento, sendo o músculo Adutor presente na imagem; (F) Região Distal do Membro Pélvico Esquerdo, 15 dias após a cirurgia e tratamento, sendo o músculo Flexor Longo dos Dedos presente na imagem; (G) Região Proximal do Membro Pélvico Esquerdo, 30 dias após a cirurgia, sendo o músculo Vasto Lateral presente na imagem; (H) Região Média do Membro Pélvico Esquerdo, 30 dias após a cirurgia, sendo o músculo Vasto Medial presente na imagem; (I) Região Distal do Membro Pélvico Esquerdo, 30 dias após a cirurgia, sendo o músculo Flexor Longo do Dedo presente na imagem; (J) Região Proximal do Membro Pélvico Esquerdo, 30 dias após a cirurgia e

tratamento, sendo o músculo Vasto Lateral presente na imagem; (K) Região Média do Membro Pélvico Esquerdo, 30 dias após a cirurgia e tratamento, sendo o músculo Vasto Medial presente na imagem; (L) Região Distal do Membro Pélvico Esquerdo, 30 dias após a cirurgia e tratamento. As setas indicam os vasos linfáticos, sendo o músculo Flexor Longo do Dedo presente na imagem. (VS) Vasos Sanguíneos; As setas pontilhadas indicam Tecido Muscular. Insert na figura L corresponde ao controle negativo. Contracoloração com Hematoxilina. Barras de 50 ou 100µm.

Quando comparadas as imunohistoquímicas com marcação do anticorpo FLT4 dos grupos sem tratamento dos dias 03 e 09, pode-se observar que não há uma distinção na marcação dos vasos linfáticos nas regiões estudadas do membro pélvico esquerdo dos animais do grupo do dia 03 em relação às mesmas regiões do grupo do dia 09 (Figura 9). No entanto, ao se comparar a região distal do membro pélvico dos animais dos grupos sem tratamento dos dias 03 e 15, pode-se observar que a marcação é mais intensa no grupo do dia 15. Esse fato também pode ser observado quando comparadas as imunohistoquímicas entre os animais dos grupos sem tratamento do dia 03 e do dia 30.

Quando é feita a comparação em relação aos grupos sem tratamento dos dias 09 e 15, é possível notar uma diferença na marcação do anticorpo FLT4 nas imunohistoquímicas referentes às regiões média e distal do membro pélvico, sendo que as marcações referentes ao grupo sem tratamento do dia 09 apresentam-se menos intensas em relação às do grupo sem tratamento do dia 15. Essa mesma diferença também pode ser observada quando comparadas as imunohistoquímicas dos grupos sem tratamento dos dias 09 e 30.

Figura 9 - Imunohistoquímica para FLT4 (diluição 1:200) em musculatura de membros pélvicos esquerdos de camundongos, representando 5 animais de 4 dos grupos experimentais, sendo do grupo eutanasiado 3 dias após a cirurgia e do grupo eutanasiado 9 dias após a cirurgia

Fonte: Ferrão, J. S. P. (2013)

Legenda: (A) Região Proximal do Membro Pélvico Esquerdo, 3 dias após a cirurgia, sendo o músculo Glúteo Médio presente na imagem; (B) Região Média do Membro Pélvico Esquerdo, 3 dias após a cirurgia, sendo o músculo Adutor presente na imagem; (C) Região Distal do Membro Pélvico Esquerdo, 3 dias após a cirurgia, sendo o músculo Flexor Longo dos Dedos presente na imagem; (D) Região Proximal do Membro Pélvico Esquerdo, 3 dias após a cirurgia e tratamento com VEGFC, sendo o músculo Glúteo Médio presente na imagem; (E) Região Média do Membro Pélvico Esquerdo, 3 dias após a cirurgia e tratamento com VEGFC, sendo o músculo Adutor presente na imagem; (F) Região Distal do Membro Pélvico Esquerdo, 3 dias após a cirurgia e tratamento com VEGFC, sendo o músculo Flexor Longo dos Dedos presente na imagem; (G) Região Proximal do Membro Pélvico Esquerdo, 9 dias após a cirurgia, sendo o músculo Reto Femoral presente na imagem; (H) Região Média do Membro Pélvico Esquerdo, 9 dias após a cirurgia, sendo o músculo Vasto Medial presente na imagem; (I) Região Distal do Membro Pélvico Esquerdo, 9 dias após a cirurgia, sendo o músculo Semimembranáceo presente na imagem; (J) Região Proximal do Membro Pélvico Esquerdo, 9 dias

após a cirurgia e tratamento com VEGFC, sendo o músculo Reto Femoral presente na imagem; (K) Região Média do Membro Pélvico Esquerdo, 9 dias após a cirurgia e tratamento, sendo o músculo Vasto Medial presente na imagem; (L) Região Distal do Membro Pélvico Esquerdo, 9 dias após a cirurgia e tratamento, sendo o músculo Semimembranáceo presente na imagem. As setas indicam os vasos linfáticos. As setas pontilhadas indicam Tecido Muscular. Insert na figura L corresponde ao controle negativo. Contracoloração com Hematoxilina. Barras de 50 e 100µm.

Quando comparadas as imunohistoquímicas com marcação do anticorpo FLT4 dos grupos sem tratamento dos dias 15 e 30, pode-se observar um aumento da marcação dos vasos linfáticos na região distal do membro pélvico esquerdo dos animais do grupo do dia 30 em relação à mesma região do grupo do dia 15, porém essa diferença não foi observada na região proximal e média do membro pélvico esquerdo (Figura 10).

Ao se comparar as imunohistoquímicas para FLT4 dos grupos que receberam tratamento com VEGFC, todos os grupos apresentaram uma marcação mais intensa nas regiões do membro pélvico esquerdo dos camundongos em relação aos grupos que não receberam o tratamento com a mesma proteína.

Figura 10 - Imunohistoquímica para FLT4 (diluição 1:200) em musculatura de membros pélvicos esquerdos de camundongos, representando 5 animais de 4 dos grupos experimentais, sendo do grupo eutanasiado 15 dias após a cirurgia e do grupo eutanasiado 30 dias após a cirurgia

Fonte: Ferrão, J. S. P. (2013)

Legenda: (A) Região Proximal do Membro Pélvico Esquerdo, 15 dias após a cirurgia, sendo o músculo Vasto Medial presente na imagem; (B) Região Média do Membro Pélvico Esquerdo, 15 dias após a cirurgia, sendo o músculo Adutor presente na imagem; (C) Região Distal do Membro Pélvico Esquerdo, 15 dias após a cirurgia, sendo o músculo Flexor Longo dos Dedos presente na imagem; (D) Região Proximal do Membro Pélvico Esquerdo, 15 dias após a cirurgia e tratamento com VEGFC, sendo o músculo Vasto Medial presente na imagem; (E) Região Média do Membro Pélvico Esquerdo, 15 dias após a cirurgia e tratamento com VEGFC, sendo o músculo Adutor presente na imagem; (F) Região Distal do Membro Pélvico Esquerdo, 15 dias após a cirurgia e tratamento com VEGFC, sendo o músculo Flexor Longo dos Dedos presente na imagem; (G) Região Proximal do Membro Pélvico Esquerdo, 30 dias após a cirurgia, sendo o músculo Reto Femoral presente na imagem; (H) Região Média do Membro Pélvico Esquerdo, 30 dias após a cirurgia, sendo o músculo Vasto Medial presente na imagem; (I) Região Distal do Membro Pélvico Esquerdo, 30 dias após a cirurgia, sendo o músculo Semimembranáceo presente na imagem; (J) Região Proximal do Membro Pélvico Esquerdo, 30 dias após a cirurgia e tratamento com VEGFC, sendo o músculo Reto Femoral presente na imagem; (K)

Região Média do Membro Pélvico Esquerdo, 30 dias após a cirurgia e tratamento com VEGF, sendo o músculo Vasto Medial presente na imagem; (L) Região Distal do Membro Pélvico Esquerdo, 30 dias após a cirurgia e tratamento com VEGFC, sendo o músculo Semimembrâneo presente na imagem. As setas indicam os vasos linfáticos; (VS) Vasos Sanguíneos. As setas pontilhadas indicam Tecido Muscular. Insert na figura L corresponde ao controle negativo. Contracoloração com Hematoxilina. Barras de 50 e 100 μ m.

As variáveis estereológicas Densidade Volumétrica Linfática (Vv) e Densidade de Comprimento Vascular Linfático (Lv) foram estimadas na pele e membro pélvico esquerdo dos animais de todos os grupos (Controle, Cirurgia e Tratamento), sendo os resultados visíveis nos gráficos 2 a 5.

Quando comparados os grupos em relação à Vv na pele (Gráfico 2), pode-se observar não houve efeito do tempo de estudo sobre a Vv dos grupos controle e cirurgia, porém a Vv é menor nos grupos Cirurgia em relação aos Controle na maioria dos momentos estudados ($p=0,0473$; $p=0,0002$; $p=0,0053$, para os dias 03, 15 e 30 respectivamente). Quando comparados os grupos Cirurgia e Tratamento em relação à Vv, observa-se que a mesma é maior para os grupos Tratamento em todos os momentos estudados ($p<0,0001$ para os dias 03, 09, 15 e 30), sendo que os grupos Tratamento também sofrem efeito do tempo ao longo do estudo (dia 03 vs dia 09 com $p<0,05$; dia 03 vs dia 15 com $p<0,05$; dia 03 vs dia 30 com $p<0,01$). Quando comparados os grupos Controle e Tratamento em relação à Vv, observa-se também que a mesma é maior para os grupos Tratamento em todos os momentos estudados ($p=0,0049$ para o dia 03; $p<0,0001$ para os dias 09, 15 e 30).

Gráfico 2 - Densidade volumétrica linfática e Densidade de Comprimento Vascular Linfático na pele da região inguinal esquerda de camundongos

Fonte: Ferrão, J. S. P. (2013)

Legenda: O gráfico mostra a comparação da densidade volumétrica linfática (Vv) e da densidade de comprimento vascular linfático (Lv) entre os grupos Controle (colunas pretas), Cirurgia (colunas brancas) e Tratamento (colunas cinzas) de animais eutanasiados nos dias 03, 09, 15 e 30 após a cirurgia e tratamento com VEGFC, juntamente com seus respectivos animais controles (que não passaram pela cirurgia de retirada do linfonodo inguinal). As barras representam a média $\pm$ desvio padrão. Asterisco (*) indica diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos Controle e com Cirurgia no mesmo tempo de observação, (**) indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos Cirurgia e Tratamento no mesmo tempo de observação, (#) indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos Controle e Tratamento no mesmo tempo de observação e letras diferentes indicam o efeito do tempo sobre a Vv nos grupos Tratamento com VEGFC.

Quando comparados os grupos em relação à Vv na região proximal do membro pélvico esquerdo (Gráfico 3), pode-se observar que os grupos Cirurgia apresentam efeito do tempo na Vv (dia 03 vs dia 09 com $p < 0,05$; dia 03 vs dia 30 com $p < 0,001$, dia 09 vs dia 30 com $p < 0,001$ e dia 15 vs dia 30 com $p < 0,001$). No entanto, para os grupos Controle e Tratamento não ocorre o efeito do tempo na Vv ($p > 0,05$). A comparação das médias de Vv entre os grupos Controle e Cirurgia foi diferente para o dia 03 ($p = 0,0038$) e para o dia 15 ($p = 0,0361$). Quando comparados os grupos Cirurgia e Tratamento para a mesma região, pode-se observar que as Vv dos grupos Tratamento são maiores em relação aos grupos Cirurgia em todos os momentos estudados ($p < 0,0001$ para os dias 03, 09, 15 e 30). Quando comparados os grupos Controle e Tratamento, pode-se observar que as Vv dos grupos Tratamento são maiores em relação aos grupos Controle em todos os momentos estudados ($p < 0,0001$ para os dias 03, 09, 15 e 30).

Quando comparados os grupos em relação à Vv na região média do membro pélvico esquerdo (Gráfico 3), pode-se observar que os grupos Cirurgia apresentam efeito do tempo na Vv (dia 03 vs dia 09 com $p < 0,001$; dia 03 vs dia 15 com $p < 0,01$, dia 03 vs dia 30 com $p < 0,01$; dia 09 vs dia 30 com $p < 0,001$ e dia 15 vs dia 30 com $p < 0,001$). No entanto, para os grupos Controle e Tratamento não ocorre o efeito do tempo na Vv ($p > 0,05$). A comparação das médias de Vv entre os grupos Controle e Cirurgia foi diferente para o dia 15 ($p = 0,0022$). Quando comparados os grupos Cirurgia e Tratamento em relação à Vv, observa-se que a mesma é maior para os grupos Tratamento em todos os momentos estudados ($p < 0,0001$; $p = 0,006$; $p < 0,0001$; $p = 0,002$, para os dias 03, 09, 15 e 30 respectivamente). Quando comparados os grupos Controle e Tratamento, observa-se que a Vv dos grupos Tratamento é maior em todos os momentos estudados ($p = 0,0002$; $p = 0,0003$; $p = 0,0002$; $p = 0,0001$, para os dias 03, 09, 15 e 30 respectivamente).

Quando comparados os grupos em relação à Vv na região distal do membro pélvico esquerdo (Gráfico 3), pode-se observar que os grupos Cirurgia apresentam efeito do tempo na Vv (dia 03 vs dia 15 com $p < 0,05$; dia 03 vs dia 30 com $p < 0,05$, dia 09 vs dia 30 com $p < 0,001$; e dia 15 vs dia 30 com $p < 0,001$). Também é possível observar o efeito do tempo no grupo Tratamento (dia 03 vs dia 09 com $p < 0,01$; dia 03 vs dia 15 com $p < 0,05$; dia 03 vs dia 30 com $p = 0,001$). No entanto, para os grupos Controle não ocorre o efeito do tempo na Vv ($p > 0,05$). A comparação das médias de Vv entre os grupos Controle e Cirurgia foi diferente para o dia 03 ($p = 0,018$), para o dia 15 ($p = 0,0024$) e para o dia 30 ($p = 0,0107$). Quando comparados os grupos Cirurgia e Tratamento, observa-se que a Vv é maior para os grupos Tratamento em todos os momentos estudados ($p = 0,001$ para o dia 03 e $p < 0,0001$ para

os dias 09, 15 e 30). Quando comparados os grupos Controle e Tratamento, observa-se que a Vv é maior para os grupos Tratamento em todos os momentos estudados ($p=0,0012$ para o dia 03; $p<0,0001$ para os demais momentos).

Gráfico 3 - Densidade volumétrica linfática no membro pélvico esquerdo de camundongos

Fonte: Ferrão, J. S. P. (2013)

Legenda: Os gráficos mostram a comparação da Vv entre os grupos Controle (colunas pretas), Cirurgia (colunas brancas) e Tratamento (colunas cinzas) de animais eutanasiados nos dias 03, 09, 15 e 30 após a cirurgia, com e sem tratamento com VEGFC, juntamente com seus respectivos animais controles (que

não passaram pela cirurgia de retirada do linfonodo inguinal). As barras representam a média $\pm$ desvio padrão. Asterisco (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos Controle e com Cirurgia no mesmo tempo de observação, (**) indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos Cirurgia e Tratamento com VEGFC no mesmo tempo de observação, (#) indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos Controle e Tratamento no mesmo tempo de observação, letras minúsculas diferentes indicam o efeito do tempo sobre a Vv nos grupos Cirurgia e letras maiúsculas diferentes indicam o efeito do tempo sobre a Vv nos grupos Tratamento.

Quando comparados os grupos em relação à Densidade de Comprimento Vascular Linfático (Lv) na pele (Gráfico 2), pode-se observar que o grupo Controle e o grupo Cirurgia não apresentam variação da Lv ao longo do período de estudo ($p > 0,05$) e quando comparados entre si ($p > 0,05$). No entanto, quando comparados os grupos Cirurgia e Tratamento com VEGFC, pode-se observar diferença significativa ($p = 0,0003$ para o dia 03 e $p < 0,0001$ para os dias 09, 15 e 30) em todos os momentos de estudo. Além disso, também é possível observar o efeito do tempo para o grupo Tratamento (dia 3 vs dia 30 com $p < 0,01$; dia 9 vs dia 30 com $p < 0,001$ e dia 15 vs dia 30 com $p < 0,01$). Quando comparados os grupos Controle e Tratamento, observa-se que a Lv é maior para o grupos Tratamento em todos os momentos estudados ($p < 0,0001$ para o dia 03; $p = 0,0002$ para o dia 09; $p < 0,0001$ para os dias 15 e 30).

Quando comparados os grupos em relação à Lv na região proximal do membro pélvico esquerdo (Gráfico 4), pode-se observar que existe efeito do tempo na Lv dos grupos Cirurgia (dia 03 vs dia 15 com $p < 0,05$; dia 09 vs dia 15 com $p < 0,01$, dia 09 vs dia 30 com $p < 0,01$) e Tratamento (dia 03 vs dia 09 com $p < 0,001$; dia 03 vs dia 30 com $p < 0,001$; dia 09 vs dia 15 com $p < 0,001$; dia 15 vs dia 30 com $p < 0,001$). No entanto, para os grupos Controle não ocorre o efeito do tempo na Lv ($p > 0,05$). A comparação das médias de Lv entre os grupos Controle e Cirurgia não foi diferente ($p > 0,05$) em nenhum momento estudado. Quando comparados os grupos Cirurgia e Tratamento com VEGFC, pode-se observar diferença significativa ($p < 0,0001$; $p = 0,0002$; $p = 0,002$; $p < 0,001$; para os dias 03, 09, 15 e 30, respectivamente) entre os mesmos nos diferentes momentos do estudo. Quando comparados os grupos Controle e Tratamento, pode-se observar diferença significativa entre os mesmos nos diferentes momentos do estudo ($p = 0,0004$; $p < 0,0001$; $p = 0,0015$; $p < 0,0001$; para os dias 03, 09, 15 e 30 respectivamente).

Gráfico 4 - Densidade de comprimento vascular linfático no membro pélvico esquerdo de camundongos

Fonte: Ferrão, J. S. P. (2013)

Legenda: O gráfico mostra a comparação da Lv entre os grupos Controle (colunas pretas), Cirurgia (colunas brancas) e Tratamento (colunas cinzas) de animais eutanasiados nos dias 03, 09, 15 e 30 após a cirurgia e com tratamento, juntamente com seus respectivos animais controles (que não passaram pela cirurgia de retirada do linfonodo inguinal). As barras representam a média $\pm$ desvio padrão. Asterisco (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos Controle e com Cirurgia no mesmo tempo de observação, (**) indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos Cirurgia e Tratamento com VEGFC no mesmo tempo de observação, (#) indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos Controle e Tratamento no mesmo tempo de observação, letras minúsculas diferentes indicam o

efeito do tempo sobre a Lv nos grupos Cirurgia e letras maiúsculas diferentes indicam o efeito do tempo sobre a Lv nos grupos Tratamento.

Quando comparados os grupos em relação à Lv na região média do membro pélvico esquerdo (Gráfico 4), pode-se observar que existe efeito do tempo na Lv para os grupos Cirurgia (dia 03 vs dia 09 com $p < 0,05$; e dia 09 vs dia 30 com $p < 0,05$). No entanto, para os grupos Controle e Tratamento não ocorre o efeito do tempo na Lv ($p > 0,05$). A comparação das médias de Lv entre os grupos Controle e Cirurgia foi diferente para o dia 30 ($p = 0,0302$). Quando comparados os grupos Cirurgia e Tratamento, observa-se que a Lv para os grupos Tratamento é superior ($p = 0,028$; $p = 0,017$; $p = 0,036$; $p = 0,0085$; para os dias 03, 09, 15 e 30 respectivamente) durante todo o período do estudo. Quando comparadas as Lv entre os grupos Controle e Tratamento, pode-se observar que as mesmas são maiores nos grupos Tratamentos durante todo o período do estudo ($p = 0,0015$; $p = 0,0072$; $p = 0,01$; $p = 0,0002$; para os dias 03, 09, 15 e 30 respectivamente).

Quando comparados os grupos em relação à Lv na região distal do membro pélvico esquerdo (Gráfico 4), pode-se observar que existe efeito do tempo na Lv para os grupos Cirurgia (dia 03 vs dia 15 com $p < 0,01$; dia 03 vs dia 30 com $p < 0,001$, dia 09 vs dia 15 com $p < 0,001$; e dia 09 vs dia 30 com $p < 0,001$). No entanto, para os grupos Controle não ocorre o efeito do tempo na Lv ($p > 0,05$). A comparação das médias de Lv entre os grupos Controle e Cirurgia não foi diferente para nenhum dos períodos estudados ($p = 0,5122$). Quando comparados os grupos Cirurgia e Tratamento com VEGFC, pode-se observar que os valores de Lv são maiores para os grupos Tratamento ($p = 0,005$; $p = 0,0009$; $p = 0,0027$; $p < 0,0001$; para os dias 03, 09, 15 e 30 respectivamente) ao longo de todo o período do estudo. Também é possível observar que os grupos Tratamento sofrem o efeito do tempo ao longo do estudo (dia 03 vs dia 09 com $p < 0,01$; dia 03 vs dia 15 com $p < 0,05$; dia 03 vs dia 30 com $p < 0,001$; dia 15 vs dia 30 com $p < 0,001$). Quando comparados os grupos Controle e Tratamento, pode-se observar que os valores de Lv são maiores para o grupo Tratamento ao longo de todo o período do estudo ($p = 0,0007$; $p = 0,0006$; $p = 0,0012$; $p < 0,0001$; para os dias 03, 09, 15 e 30 respectivamente).

Ao realizar o PCR em tempo real (qPCR), quando comparados os grupos em relação à expressão gênica para VEGFC na região proximal do membro pélvico esquerdo (Gráfico 5), pode-se observar que existe diferença significativa entre os grupos Controle e Cirurgia para os dias 03, 15 e 30. Também é possível observar diferença significativa entre os grupos Cirurgia e Tratamento para os dias 03, 15 e 30, além de haver diferença significativa

entre os grupos Controle e Tratamento para o dia 30. Foi observado efeito do tempo ao longo do estudo apenas para o grupo Cirurgia, não sendo observado o mesmo efeito para os demais grupos estudados. Todos os valores de "p" podem ser encontrados no Quadro 1 (Apêndice B).

Quando comparados os grupos em relação à expressão gênica para VEGFC na região média do membro pélvico esquerdo (Gráfico 5), pode-se observar que existe diferença significativa entre os grupos Controle e Cirurgia para os dias 09 e 15. Também é possível observar diferença significativa entre os grupos Cirurgia e Tratamento para os dias 09 e 15. No entanto, não se observa diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos Controle e Tratamento. Pode-se observar, porém, que somente o grupo Cirurgia sofreu efeito do tempo ao longo do estudo. Todos os valores de "p" podem ser encontrados no Quadro 2 (Apêndice B).

Quando comparados os grupos em relação à expressão gênica para VEGFC na região distal do membro pélvico esquerdo (Gráfico 5), pode-se observar que existe diferença significativa entre os grupos Controle e Cirurgia para os dias 09 e 30. Também é possível observar diferença significativa entre os grupos Cirurgia e Tratamento para os dias 03, 09 e 15. Quando comparados os grupos Controle e Tratamento, é possível observar diferença significativa para os dias 03 e 09. Foi observado efeito do tempo ao longo do estudo para os grupos Cirurgia e Tratamento. Todos os valores de "p" podem ser encontrados no Quadro 3 (Apêndice B).

Quando comparados os grupos em relação à expressão gênica para FLT4 na região proximal do membro pélvico esquerdo (Gráfico 5), pode-se observar que existe diferença significativa entre os grupos Controle e Cirurgia para os dias 03 e 30. Ao se comparar os grupos Cirurgia e Tratamento, pode-se observar diferença significativa para todos os momentos estudados, ocorrendo o mesmo fato na comparação entre os grupos Controle e Tratamento. Foi observado efeito do tempo ao longo do estudo para os grupos Cirurgia e Tratamento. Todos os valores de "p" podem ser encontrados no Quadro 4 (Apêndice B).

Quando comparados os grupos em relação à expressão gênica para FLT4 na região média do membro pélvico esquerdo (Gráfico 5), pode-se observar que não existe diferença significativa entre os grupos Controle e Cirurgia. No entanto, pode-se observar que existe diferença significativa entre os grupos Cirurgia e Tratamento com VEGFC para os dias 09, 15 e 30. Também pode-se observar diferença significativa quando comparados os grupos Controle e Tratamento, para os dias 09, 15 e 30. Somente o grupo Tratamento sofreu o efeito

do tempo ao longo do estudo. Todos os valores de "p" podem ser encontrados no Quadro 5 (Apêndice B).

Quando comparados os grupos em relação à expressão gênica para FLT4 na região distal do membro pélvico esquerdo (Gráfico 5), pode-se observar que existe diferença significativa entre os grupos Controle e Cirurgia para os dias 03 e 30. Quando comparados os grupos Cirurgia e Tratamento, pode-se observar diferença significativa para os dias 03, 15 e 30. Já quando comparados os grupos Controle e Tratamento, pode-se observar diferença significativa para os dias 03, 09 e 30. Também é possível observar o efeito do tempo nos grupos Cirurgia e Tratamento. Todos os valores de "p" podem ser encontrados no Quadro 6 (Apêndice B).

Gráfico 5 - Expressão gênica para VEGFC e FLT4 no membro pélvico esquerdo de camundongos

Fonte: Ferrão, J. S. P. (2013)

Legenda: O gráfico mostra a comparação entre os grupos Controle (colunas pretas), Cirurgia (colunas brancas) e Tratamento com VEGFC (colunas cinzas) nos dias 03, 09, 15 e 30 após a cirurgia sem e com tratamento, juntamente com seus respectivos animais controles (que não passaram pela cirurgia de retirada do linfonodo inguinal). As barras representam a média $\pm$ desvio padrão. Asterisco (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos Controle e com Cirurgia no mesmo tempo de observação, (**) indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos Cirurgia e Tratamento no mesmo tempo de observação, (#) indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos Controle e Tratamento no mesmo tempo de observação. As letras minúsculas indicam efeito do tempo no grupo Cirurgia ao longo do período de estudo e as letras maiúsculas indicam efeito do tempo no grupo Tratamento ao longo do período de estudo.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

O presente estudo estabeleceu um modelo experimental em camundongo para avaliação da revascularização linfática com e sem tratamento utilizando-se VEGFC. Tal modelo consistiu na retirada do linfonodo inguinal, sem lesar vasos adjacentes, coloração por imunohistoquímica do tecido muscular e cutâneo para verificação de vasos linfáticos seguida finalmente da observação do processo de revascularização via contagem da densidade de volume e de comprimento de vasos linfáticos. Foi também realizada a técnica de qPCR para avaliação da expressão gênica para VEGFC e seu receptor FLT4.

A escolha da retirada do linfonodo inguinal para causar o linfedema baseou-se no fato da drenagem linfática dirigir-se em mais de 50% para os linfonodos poplíteo e inguinal (HARRELL; IRITANI; RUDELL, 2008). Ao contrário, o membro pélvico de ratos drena a linfa principalmente através do linfonodo poplíteo para o ilíaco, com menor drenagem para o linfonodo inguinal. Liu et al. (2008) desenvolveram um modelo de linfedema secundário em ratos Wistar através da retirada de vasos linfáticos femorais e dos linfonodos em região próxima ao membro pélvico direito, demonstrando não só a formação do linfedema, mas também a formação de novos vasos linfáticos no membro pélvico dos animais em um período de estudo de quatro semanas. Neste estudo, os animais foram tratados com terapia gênica (pcDNA3.1-VEGFC). Já Oashi et al. (2012) desenvolveram um modelo de linfedema agudo em camundongos ddY e C57BL/6N através da exposição à radiação ionizante dos membros pélvicos esquerdos, seguida de cirurgia para a ligadura em três pontos distintos em vasos linfáticos profundos (próximos à veia isquiática esquerda) do mesmo membro desses animais, além da retirada dos linfonodos poplíteo e subilíaco, caracterizando a formação de linfedema em membro pélvico, em um período de estudo de seis meses. No entanto, no estudo de Jin et al. (2009) foi realizado um modelo de linfedema pós-cirúrgico em cauda de camundongos SKH-1, onde a pele da cauda era incisada circunferencialmente e os vasos linfáticos principais cauterizados, caracterizando o linfedema em cauda, em um período de estudo de 2 semanas. Jin et al. (2009) trataram os animais com VEGFC exógeno recombinante de humano na presença de anticorpo monoclonal anti-FLT4. Os resultados obtidos no presente estudo mostram que é possível utilizar a terapia protéica com VEGFC exógeno em áreas com insuficiência linfática, pois o tratamento com o mesmo mostrou-se eficaz para a revascularização linfática em um curto período de tempo. O modelo estabelecido no presente estudo representa o linfedema secundário humano, que consiste, na maioria dos casos, em

linfedema resultante da remoção cirúrgica de vasos linfáticos e linfonodos, principalmente em casos de câncer de mama. Assim sendo, ele pode ser utilizado para o estudo e melhor entendimento do linfedema e da revascularização linfática, para que cada vez mais, técnicas inovadoras possam trazer conforto e bem estar a pacientes, animais e humanos, que sofrem desse mal. Essas observações podem ter implicações diretas para abordagens terapêuticas futuras tanto para doenças vasculares linfáticas como para metástases de câncer (ROCKSON, 2009).

No presente estudo, o processo de neoformação de vasos linfáticos pode ser corroborado ao se observar os resultados obtidos para as diferentes regiões dos membros pélvicos dos camundongos, tanto para a Densidade Vascular Linfática (Vv) como para a Densidade de Comprimento Vascular Linfática (Lv). A lei básica da estereologia relata que a quantidade relativa de pontos que tocam a estrutura é comparável à quantidade de área dessa estrutura contida na área-teste, ou a quantidade de volume dessa estrutura no volume-teste (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003). Conseqüentemente, a partir de análises bidimensionais em sistema de pontos em área teste é possível determinar qual é o volume de determinada estrutura dentro de um órgão. A avaliação da variável estereológica Vv, que representa o espaço ocupado pelos vasos linfáticos na pele e no membro pélvico esquerdo dos camundongos, indica que houve diminuição na vascularização linfática nas diferentes regiões do membro pélvico ao longo do estudo quando comparados nos animais submetidos à cirurgia e aumento naqueles tratados com VEGFC. Desta forma, é possível afirmar que a retirada do linfonodo inguinal afetou o volume vascular linfático. Já a variável Lv nos fornece informação complementar, estimando o comprimento vascular linfático (em milímetros por cada milímetro cúbico da pele e do membro pélvico), não sendo considerado seu calibre, mas sim seu comprimento (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003). A avaliação da variável estereológica Lv, que representa o comprimento dos vasos linfáticos na pele e no membro pélvico esquerdo dos camundongos, indicou que houve aumento na vascularização linfática nas diferentes regiões do membro pélvico e na pele ao longo do estudo para os animais tratados com VEGFC, mas não entre animais submetidos à cirurgia e controle. Desta forma, é possível afirmar que a variável Lv pode também ser um indicativo de alteração linfática para tratamento com VEGFC.

Ao analisar as variáveis Vv e Lv para a pele da região inguinal, pode-se observar que não houve diferença significativa para ambas as variáveis entre os grupos controle e submetidos à cirurgia em nenhum momento estudado (GOLDMAN et al., 2005; RUTKOWSKI; BOARDMAN; SWARTZ, 2006). Porém, com a realização do tratamento

com VEGFC, pode-se observar um aumento significativo em ambas essas variáveis para a pele, indicando que o tratamento com VEGFC causou mudanças significativas na revascularização linfática nesta região (CHEUNG et al., 2006; PAN et al., 2006). De acordo com Oliver (2004), no sistema linfático maduro, a densidade de capilares linfáticos varia de acordo com a região do corpo, com grande representação de capilares linfáticos superficiais nas regiões cutâneas. A administração terapêutica de VEGFC exógeno pode influenciar favoravelmente a melhora da função linfática, incluindo redução do volume do edema de maneira acelerada e sustentada, reversão de arquitetura tecidual anormal, melhoramento da função vascular linfática e restauração do fluxo linfático (LOPRINZI et al., 1999; LALONI, 2008; JIN et al., 2009). A restauração do fluxo linfático é beneficiada pela boa cicatrização tecidual, pela drenagem linfática manual e pela contração muscular (ALMEIDA, 2008), além da utilização do VEGFC, como comprovado pelo presente estudo.

Observou-se diferença significativa para as variáveis Vv e Lv na região proximal do membro pélvico entre os animais controle e os animais que passaram pelo procedimento cirúrgico nos dias 3 e 15, mas não nos dias 09 e 30 depois da cirurgia. Com exceção do dia 30, os grupos Cirurgia sempre mantiveram as suas Vv e Lv menores que seus respectivos grupos Controle, indicando que durante o período de 15 dias após a cirurgia, os animais não obtiveram uma revascularização linfática suficiente para se igualar aos animais que não passaram por tal procedimento. No entanto, ao comparar os grupos Cirurgia entre si, pode-se observar que houve diferença significativa entre os grupos, principalmente em relação ao grupo do dia 30, que obteve uma Vv e Lv similar ao seu grupo Controle, podendo ser esse fato indicativo de que nesse momento do estudo já houve revascularização linfática (linfangiogênese), uma vez que esse mesmo grupo também supera as Vv e as Lv dos grupos dos dias 03, 09 e 15, indicando aumento do volume de vasos linfáticos nessa região de forma espontânea (RUTKOWSKI et al., 2006; KUWAHARA et al., 2013), uma vez que a capacidade regenerativa de tecidos animais é muito grande (LIU et al., 2008). Jeltsch et al. (1997), ao estudarem camundongos transgênicos durante três semanas, demonstraram em um de seus grupos que os animais apresentaram proliferação endotelial linfática (através da mensuração de diâmetro, comprimento e densidade vascular) e hiperplasia dos vasos linfáticos *in vivo*, mesmo sem a utilização de VEGFC exógeno. No entanto, os grupos que receberam tratamento com VEGFC mantiveram o valor de suas Vv e Lv maiores que os grupos Controle e Cirurgia, ao longo do estudo, indicando uma boa ação do VEGFC para a realização de linfangiogênese (JELTSCH et al., 1997). Já o grupo Controle não apresentou diferença em relação aos diferentes dias de eutanásia, não demonstrando, então, efeito do

tempo, o que é de se esperar, uma vez que estes animais não foram manipulados (YOON et al., 2003).

Quando comparadas as regiões proximal, média e distal do membro pélvico (MP) esquerdo, pode-se observar que as mesmas apresentam um mesmo padrão para a variável Vv ao longo do período de estudo para todos os grupos estudados (Controle, Cirurgia e Tratamento), indicando que não há diferença entre essas regiões em relação ao sistema linfático e ao processo de linfangiogênese (LIU et al., 2008). No entanto, a região proximal apresenta valores de Vv superiores às outras regiões do MP para os grupos tratados com VEGFC, indicando que nessa região a linfangiogênese pode ter sido mais efetiva, ou ainda, que nessa região a necessidade da presença de vasos linfáticos seja maior que nas demais regiões (RUTKOWSKI et al., 2006; SCHULTE-MERKER; SABINE; PETROVA, 2011).

Na comparação das regiões proximal, média e distal do MP esquerdo para a variável Lv, pode-se observar que ocorreu um padrão semelhante ao longo do período de estudo para os grupos estudados. No entanto, como ocorreu para a variável Vv, os grupos que receberam o tratamento com VEGFC apresentaram na região proximal valores de Lv superiores aos grupos tratados das demais regiões do MP esquerdo. Essa diferença pode ser atribuída ao fato de que a região proximal do MP possuir maior aporte sanguíneo e linfático, uma vez que toda a linfa presente no membro deve ser transportada para e através dessa região (OASHI et al., 2012; KUWAHARA et al., 2013; OASHI et al., 2013). Outra possibilidade pode ser o fato da proximidade dessa região com o local de aplicação do VEGFC exógeno, uma vez que a aplicação foi realizada intraperitonealmente próxima à região da cicatriz cirúrgica (YOON et al., 2003).

Embora o linfedema seja uma condição clínica comum, o tratamento para esta doença incapacitante permanece limitado e ineficaz. Recentemente, tem sido relatado que a super-expressão de VEGFC (JIN et al., 2009; OASHI et al., 2012) se correlaciona com um aumento do crescimento de vasos linfáticos (a linfangiogênese). No entanto, o efeito da linfangiogênese induzido pelo VEGFC no linfedema ainda deve ser melhor caracterizado.

A maioria dos relatos anteriores de terapia de linfedemas com fator de crescimento é baseada em modelos de camundongo, os quais têm várias limitações quando se considera a sua tradução em clínica para o tratamento de pacientes humanos (RUTKOWSKI et al., 2006; LALONI, 2008; WADA et al., 2011). Primeiramente, as condições hidrostáticas são dramaticamente diferentes em camundongos porque os seres humanos são consideravelmente mais altos (SCHULTE-MERKER; SABINE; PETROVA, 2011; OASHI et al., 2012; MARCHIÒ; ASTANINA; BUSSOLINO, 2013). Isto também significa que a área

linfática absoluta danificada em humanos é maior, e os vasos linfáticos em regeneração devem abranger uma distância mais longa, para formar anastomoses com ambas as extremidades distal e proximal da árvore vascular linfática (RUTKOWSKI; BOARDMAN; SWARTZ, 2006; SCHULTE-MERKER; SABINE; PETROVA, 2011; MARCHIÒ; ASTANINA; BUSSOLINO, 2013). A falta de modelos animais de grande porte que recapitulam melhor condições em linfedema humano tem limitado a pesquisa experimental de linfedema (YOON et al., 2003; RUTKOWSKI; BOARDMAN; SWARTZ, 2006; RUTKOWSKI et al., 2006; LALONI, 2008; JIN et al., 2009; OASHI et al., 2012). Anteriormente utilizados, modelos caninos eram complexos e seriam considerados antiéticos nos dias atuais (LÄHTEENVUO et al., 2011).

A diferenciação da vascularização linfática em relação à vascularização sanguínea pode ser feita imunohistoquimicamente (SAARISTO; KARKKAINEN; ALITALO, 2002; JIN et al., 2009), como realizado no presente estudo. As imunohistoquímicas com marcação para VEGFC e FLT4 mostraram, a partir da inspeção dos cortes histológicos em microscópio óptico, algumas diferenças entre os vasos linfáticos dos animais dos grupos Controle, Cirurgia e Tratamento. Em alguns cortes histológicos das regiões do membro pélvico dos animais do grupo Cirurgia, foram observados de maneira qualitativa, no tecido intermuscular, alguns vasos linfáticos de calibre maior que os encontrados no grupo controle (YOON et al., 2003; WIRZENIUS et al., 2007; JIN et al., 2009), sugerindo uma adaptação do organismo à inicial diminuição de filtragem e retirada de líquido intersticial devido à cirurgia de retirada do linfonodo inguinal e vasos linfáticos adjacentes (LIU et al., 2008; OASHI et al., 2012). Já em alguns cortes histológicos das regiões do membro pélvico dos animais do grupo tratado com VEGFC observa-se de maneira qualitativa, no tecido intermuscular, alguns vasos linfáticos de calibre maior que os encontrados nos grupos controle e cirurgia, sugerindo o efeito positivo da utilização do VEGFC na linfangiogênese (CHEUNG et al., 2006; LIU et al., 2008; OASHI et al., 2012; KUWAHARA et al., 2013). Nakao et al. (2013) e colaboradores demonstraram em seus estudos que o VEGFC é responsável pela linfangiogênese, porém, os novos vasos surgem a partir de vasos linfáticos já existentes, não havendo neolinfangiogênese em áreas que não possuam vasos linfáticos pré-existent.

A análise de expressão gênica para VEGFC permite observar que nas diferentes regiões do membro pélvico esquerdo, os grupos Cirurgia apresentam aumento da expressão gênica ao longo do período de estudo, enquanto que a expressão gênica para os grupos tratados com VEGFC dessas regiões apresentam uma pequena diminuição. Isso pode ser um indício de que os animais que passaram pela cirurgia, ao longo do período de estudo,

começaram a expressar essa proteína, de maneira gradativa, no intuito de aumentar quantitativamente sua vascularização linfática (revascularização) para poder suprir a demanda de drenagem que foi diminuída devido à cirurgia de retirada do linfonodo inguinal e vasos linfáticos adjacentes (SHIN; ROCKSON, 2008; JIN et al., 2009; OASHI et al., 2012; HÄGERLING et al., 2013; KUWAHARA et al., 2013). Segundo Kazenwadel et al. (2012), o VEGFC endógeno possui efeitos em funções celulares importantes para a linfangiogênese, promovendo a formação de tubos vasculares linfáticos. No entanto, apesar da expressão gênica do VEGFC exógeno induzir uma rede linfática mais pronunciada, não ocorre alteração vascular sanguínea (LIERSCH et al., 2012). Esse fato pode ser percebido quando, ao serem analisados os dados da estereologia para a mesma região, observa-se inicialmente uma menor quantidade de vasos linfáticos no grupo Cirurgia em relação ao grupo Controle e, quando observados ao final do período de estudo, não há diferença significativa entre esses dois grupos. Já em relação aos grupos Tratamento, o efeito observado na expressão gênica para VEGFC pode indicar que, como os animais estavam recebendo VEGFC exógeno, seu organismo não produziu essa proteína com tanta eficácia como os grupos Cirurgia (YOON et al., 2003; JIN et al., 2009), sugerindo inibição de produção endógena de VEGFC pelos animais tratados com VEGFC exógeno (BOARDMAN; SWARTZ, 2003; GOLDMAN et al., 2005; RUTKOWSKI et al., 2006).

Quando analisada a expressão gênica para FLT4 nas diferentes regiões do MP esquerdo pode-se observar um efeito similar à expressão gênica para VEGFC, onde os grupos Cirurgia apresentam um aumento da expressão gênica ao longo do período de estudo quando comparados com os grupos Controles. Os grupos Tratamento também apresentam o mesmo padrão para a expressão gênica para FLT4 e para VEGFC, apresentando-se maior no início do período de estudo, e diminuindo até o final do período de estudo. Assim como para o VEGFC, isso pode ser um indicativo de inibição da produção de FLT4 endógeno pelos animais, uma vez que ele é o receptor para o VEGFC (KAZENWADEL et al., 2012; OASHI et al., 2012). Ao estudarem o bloqueio da sinalização VEGFC/VEGFR-3 pela neutralização do VEGFR-3 (FLT4), Guo (2009) e colaboradores descreveram o aumento da formação de vasos linfáticos demonstrando a diminuição da linfangiogênese e da drenagem linfática. Esses perfis de expressão gênica sugerem que a expressão de VEGFC e FLT4 seja mais importante no início do que no final do período de estudo para a linfangiogênese (CARMELIET, 2005; OLIVER; ALITALO, 2005).

O VEGFC humano, mas não de camundongos, é conhecido por ser clivado pela plasmina (MCCOLL et al., 2003), pela furina e convertases pró-protéicas chamadas PC5 e

PC7 (SIEGFRIED et al., 2003). O processamento do VEGFC aumenta sua afinidade pela ligação com VEGFR3 (também denominado FLT4), mas também permite sua ligação com VEGFR2 (ACHEN; MCCOLL; STACKER, 2005). VEGFC é expresso por células mesenquimais adjacentes a vasos linfáticos (MCCOLL et al., 2007). Analogamente com o que se é conhecido para os outros fatores de crescimento, a expressão do VEGFC é regulada durante processos fisiológicos e patológicos. Foi demonstrado que o VEGFC é regulado por citocinas pró-inflamatórias (RISTIMÄKI et al., 1998). VEGFC e FLT4 são ainda expressos em macrófagos (SCHMEISSER et al., 2006) e a expressão do VEGFC promove o recrutamento de macrófagos para regiões com inflamação (SKOBE et al., 2001). FLT4 é marcadamente suprarregulado em células endoteliais vasculares em resposta à ativação de membros da família Notch, proteínas altamente conservadas que regulam a determinação do destino celular (SHAWBER et al., 2007). *In vivo*, Notch é coexpressa com FLT4 tanto na vascularização sanguínea quanto na linfática. A inativação genética do VEGFC resulta na interrupção do desenvolvimento de vasos linfáticos e morte pré-natal devido ao acúmulo de fluido tissular (KARKKAINEN et al., 2004). Já a inativação gênica do FLT4 resulta em insuficiência cardíaca e morte embrionária (DUMONT et al., 1998). Interessantemente, FLT4 é o único receptor (VEGFR) para o qual já foram identificadas mutações naturais (IRRTHUM et al., 2000; KARKKAINEN et al., 2000). Tais mutações invariavelmente levam à perda da atividade quinase do FLT4 e ao linfedema. Fisiologicamente, a sinalização pelo FLT4 é fundamental na regulação das funções dos vasos linfáticos (BAHRAM; CLAEISSON-WELSH, 2010). *In vivo*, a migração e surgimento de células precursoras linfoendoteliais induzidos pelo VEGFC de áreas restritas da veia cardinal é fundamental para o desenvolvimento do sistema linfático (KARKKAINEN et al., 2004).

Três categorias de moléculas transdutoras de sinal estão associadas à organização e separação da vascularização linfática da vascularização sanguínea, nomeadas Spred1/2 (proteínas relacionadas ao surgimento dos vasos linfáticos), Slp76 (proteína leucocitária de 76 kDa) e Syk (tirosina quinase do baço) (ABTAHIAN et al., 2003; TANIGUCHI et al., 2007). Veikkola et al. (2001) utilizou um ligante específico de FLT4 (VEGFC156S) para demonstrar que a sinalização via FLT4 é suficiente para ocorrer a linfangiogênese em camundongos transgênicos. Além disso, VEGFC possui funções únicas na mediação do surgimento de vasos linfáticos através do FLT4. O bloqueio da função do VEGFC por um domínio extracelular solúvel do FLT4 leva ao linfedema (MÄKINEN et al., 2001a, b). Matsumura (2003) e colaboradores utilizaram anticorpos neutralizadores de FLT4 para mostrar que o FLT4 pode modular a função do VEGFR2 e sugeriram que um equilíbrio entre a sinalização do FLT4 e

do VEGFR2 é fundamental. VEGFC, quando superexpressado na pele de camundongos, pode contribuir para o aumento do calibre, tortuosidade e permeabilidade de vasos sanguíneos, mas não o seu surgimento (SAARISTO; KARKKAINEN; ALITALO, 2002). O efeito relativo do VEGFC na angiogênese versus a linfangiogênese pode ser dependente da disponibilidade relativa de diferentes receptores (VEGFR2 e FLT4, respectivamente) (BAHRAM; CLAESSION-WELSH, 2010). A especificidade da transdução de sinal dependente da ativação do ligante e o contexto celular podem oferecer a possibilidade de uma terapia direcionada altamente especializada e, dessa maneira, é importante identificar as moléculas que participam dessas sinalizações (BENEST et al., 2008).

Como VEGFC e FLT4 são biologicamente fundamentais tanto para a angiogênese quanto para a linfangiogênese e complicações severas ocorrem tanto por perda da função (por exemplo, linfedema) como por ganho de função (por exemplo, metástases), é de vital importância descobrir ferramentas que ajustem a atividade e a sinalização do VEGFC e do FLT4 (BAHRAM; CLAESSION-WELSH, 2010).

De acordo com Jin et al. (2009), a administração terapêutica de VEGFC exógeno pode ser vista por afetar favoravelmente a maioria das medidas de desfechos substitutos quantificáveis de melhora da função linfática, incluindo a redução acelerada e sustentada do volume de edema, a reversão da arquitetura do tecido anormal e a melhora na função vascular linfática (RUTKOWSKI et al., 2006). Jin et al. (2009) confirmaram em seu estudo o papel central do mecanismo do FLT4 e do VEGFC na mediação da remodelação adaptativa microvascular linfática.

O entendimento emergente dos mecanismos moleculares das diferentes formas de linfedemas e a descoberta de fatores de crescimento linfangiogênicos e seus marcadores agora nos permitem desenvolver terapias específicas para doenças que envolvem disfunção dos vasos linfáticos. A administração da proteína VEGFC pode também revelar-se eficaz no tratamento desta doença. De acordo com Liu et al. (2008), a terapia com VEGFC é eficiente na remissão do linfedema de tecidos, incluindo o membro pélvico, e a capacidade de transporte de linfa em tecidos é restaurada após a injeção com VEGFC. O tratamento da fase tardia do linfedema pode ser difícil, pois os linfedemas crônicos resultam na acumulação de alterações secundárias nos tecidos, tais como a fibrose dérmica e deposição de gordura. No entanto, métodos avançados de diagnóstico, tais como linfocintigrafia, permitem o diagnóstico de linfedema, numa fase mais precoce (SLAVIN et al., 1997; KO et al., 1998; SZUBA; ROCKSON, 1998).

Com o modelo experimental em camundongos estabelecido no presente estudo é possível observar o papel fundamental que o VEGFC e seu receptor FLT4 possuem para a formação de novos vasos linfáticos, assim como o sistema linfático íntegro e funcional é de fundamental importância para uma boa qualidade de vida para os animais e humanos.

Um grande progresso já foi alcançado na última década à respeito da biologia vascular linfática, mas muitas questões ainda permanecem sem solução. Características específicas de órgãos e doenças e respostas do endotélio linfático ainda não foram estudadas em detalhes, mas esse conhecimento pode ter um impacto crítico para o desenvolvimento de tratamentos para patologias humanas, incluindo linfedema, câncer e inflamação (SCHULTE-MERKER; SABINE; PETROVA, 2011). O VEGFC foi caracterizado não só por promover a linfangiogênese em tumores primários, mas também por induzir a linfangiogênese em linfonodos, o que pode facilitar a propagação metastática do tumor por todo o sistema linfático e para órgãos (MANDRIOTA et al., 2001; SKOBE et al., 2001; PADERA et al., 2002; KRISHNAN et al., 2003; HIRAKAWA et al., 2007; SLEEMAN; SCHMID; THIELE, 2009; CHRISTIANSEN; DETMAR, 2011). Suspeita-se que a capacidade do VEGFC de induzir linfangiogênese em linfonodos promova metástases através de linfonodos distantes, do ducto torácico e do sistema vascular sanguíneo para órgãos distantes (HIRAKAWA et al., 2007). Oashi et al. (2013) demonstrou que camundongos com linfedema são mais propensos a desenvolver metástases pulmonares e em linfonodos distantes do tumor primário. A imunidade tumoral foi afetada pela retirada do linfonodo regional seguida pela estase da linfa, o que facilitou a disseminação tumoral. Os vasos linfáticos são um caminho importante para o tráfego de células imunes (por exemplo, linfócitos, células de Langerhans e macrófagos), entrega de antígenos para os linfonodos e depuração de antígenos estranhos (OLSZEWSKI et al., 1990). A ocorrência de malignidade no estabelecimento de linfedema é uma suspeita de consequência da vigilância imunológica local prejudicada devido ao comprometimento do tráfego de células imunocompetentes na região edematosa (RUOCCO, V.; SCHWARTZ; RUOCCO, 2002; RUOCCO, E. et al., 2007). Apesar de não havermos observado a ocorrência de tumores ao longo dos 30 dias de tratamento com VEGFC, seriam necessários estudos adicionais com camundongos nud (YOON et al., 2003) para podermos descartar a possibilidade de formação de tumores por meio deste tratamento.

A linfangiogênese terapêutica tem sido vista como uma estratégia de tratamento com o potencial de reverter os estigmas da insuficiência linfática primária e secundária. Embora a capacidade do VEGFC para aumentar a linfangiogênese pós-natal não tenha sido observada universalmente, tanto a terapia gênica quanto a terapia mediada pela proteína

VEGFC parecem potencialmente promissoras (JIN et al., 2009). Apesar de novos estudos em diferentes espécies ainda serem necessários para um melhor entendimento da ação e eficácia neolinfangiogênica do VEGFC, este estudo oferece perspectivas sobre novos métodos para promover a linfangiogênese, focando o VEGFC como novo alvo, estes resultados podem contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

7 Conclusão

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- a) Os camundongos são bons modelos experimentais, pois são de fácil acesso, fácil manipulação e fácil cuidado, além de possuírem uma boa resposta na utilização do VEGFC como recurso para a revascularização linfática.
- b) O tratamento com VEGFC mostrou diminuir a transcrição e a expressão gênica do VEGFC e seu receptor FLT4 nos locais afetados pelo procedimento cirúrgico e aumentar a quantidade de vascularização linfática na região comprometida pela cirurgia.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABTAHIAN, F.; GUERRIERO, A.; SEBZDA, E.; LU, M. M.; ZHOU, R.; MOCSAI, A.; MYERS, E. E.; HUANG, B.; JACKSON, D. G.; FERRARI, V. A.; TYBULEWICZ, V.; LOWELL, C. A.; LEPORE, J. J.; KORETZKY, G. A.; KAHN, M. L. Regulation of blood and lymphatic vascular separation by signaling proteins SLP-76 and Syk. **Science**, v. 299, n. 5604, p. 247-251, 2003. Acesso em 11/06/2013.
- ACHEN, M. G.; MCCOLL, B. K.; STACKER, S. A. Focus on lymphangiogenesis in tumor metastasis. **Cancer Cell**, v. 7, n. 2, p. 121-127, 2005. Acesso em 11/06/2013.
- ALMEIDA, A. S. **Significado clínico da expressão VEGF-C e de podoplanina em carcinomas espinocelulares de boca.**: secondary title. São Paulo: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2008. Acesso em 10/06/2013.
- AN, A.; ROCKSON, S. G. The potential for molecular treatment strategies in lymphatic disease. **Lymphat Res Biol**, v. 2, n. 4, p. 173-181, 2004. Acesso em 11/06/2013.
- ANDRADE, M. **Lymphangiogenesis and genetics in lymphedemas: a review of the literature.**: secondary title: **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 7, p. 256-261, 2008. Acesso em 10/06/2013.
- ANDRADE, M. F. C. **Linfedema. Angiologia e cirurgia vascular: guia ilustrado.** Maceió, 2003. Acesso em 10/06/2013.
- APRELIKOVA, O.; PAJUSOLA, K.; PARTANEN, J.; ARMSTRONG, E.; ALITALO, R.; BAILEY, S. K.; MCMAHON, J.; WASMUTH, J.; HUEBNER, K.; ALITALO, K. FLT4, a novel class III receptor tyrosine kinase in chromosome 5q33-qter. **Cancer Res**, v. 52, n. 3, p. 746-748, 1992. Acesso em 11/06/2013.
- ASAHARA, T.; ISNER, J. M. Endothelial progenitor cells for vascular regeneration. **J Hematother Stem Cell Res**, v. 11, n. 2, p. 171-178, 2002. Acesso em 11/06/2013.

BAHRAM, F.; CLAEISSON-WELSH, L. VEGF-mediated signal transduction in lymphatic endothelial cells. **Pathophysiology**, v. 17, n. 4, p. 253-261, 2010. Acesso em 12/06/2013.

BALUK, P.; FUXE, J.; HASHIZUME, H.; ROMANO, T.; LASHNITS, E.; BUTZ, S.; VESTWEBER, D.; CORADA, M.; MOLENDINI, C.; DEJANA, E.; MCDONALD, D. M. Functionally specialized junctions between endothelial cells of lymphatic vessels. **J Exp Med**, v. 204, n. 10, p. 2349-2362, 2007. Acesso em 10/06/2013.

BAUMGARTNER, I.; PIECZEK, A.; MANOR, O.; BLAIR, R.; KEARNEY, M.; WALSH, K.; ISNER, J. M. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. **Circulation**, v. 97, n. 12, p. 1114-1123, 1998. Acesso em 11/06/2013.

BENEST, A. V.; HARPER, S. J.; HERTTUALA, S. Y.; ALITALO, K.; BATES, D. O. VEGF-C induced angiogenesis preferentially occurs at a distance from lymphangiogenesis. **Cardiovasc Res**, v. 78, n. 2, p. 315-323, 2008. Acesso em 12/06/2013.

BERGMANN, A.; MATTOS, I. E. **Incidência e prevalência de linfedema após tratamento cirúrgico do câncer de mama: revisão de literatura.**: secondary title: Revista Brasileira de Cancerologia, 2007. 53, 461-470 p. Acesso em 10/06/2013.

BERNATCHEZ, P. N.; SOKER, S.; SIROIS, M. G. Vascular endothelial growth factor effect on endothelial cell proliferation, migration, and platelet-activating factor synthesis is Flk-1-dependent. **J Biol Chem**, v. 274, n. 43, p. 31047-31054, 1999. Acesso em 10/06/2013.

BERTOZZI, C. C.; SCHMAIER, A. A.; MERICKO, P.; HESS, P. R.; ZOU, Z.; CHEN, M.; CHEN, C. Y.; XU, B.; LU, M. M.; ZHOU, D.; SEBZDA, E.; SANTORE, M. T.; MERIANOS, D. J.; STADTFELD, M.; FLAKE, A. W.; GRAF, T.; SKODA, R.; MALTZMAN, J. S.; KORETZKY, G. A.; KAHN, M. L. Platelets regulate lymphatic vascular development through CLEC-2-SLP-76 signaling. **Blood**, v. 116, n. 4, p. 661-670, 2010. Acesso em 10/06/2013.

BOARDMAN, K. C.; SWARTZ, M. A. Interstitial flow as a guide for lymphangiogenesis. **Circ Res**, v. 92, n. 7, p. 801-808, 2003. Acesso em 11/06/2013.

BÖHMER, R.; NEUHAUS, B.; BÜHREN, S.; ZHANG, D.; STEHLING, M.; BÖCK, B.; KIEFER, F. Regulation of developmental lymphangiogenesis by Syk(+) leukocytes. **Dev Cell**, v. 18, n. 3, p. 437-449, 2010. Acesso em 10/06/2013.

CAO, R.; ERIKSSON, A.; KUBO, H.; ALITALO, K.; CAO, Y.; THYBERG, J. Comparative evaluation of FGF-2-, VEGF-A-, and VEGF-C-induced angiogenesis, lymphangiogenesis, vascular fenestrations, and permeability. **Circ Res**, v. 94, n. 5, p. 664-670, 2004. Acesso em 10/06/2013.

CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nat Med**, v. 9, n. 6, p. 653-660, 2003. Acesso em 11/06/2013.

CARMELIET, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. **Nature**, v. 438, n. 7070, p. 932-936, 2005. Acesso em 10/06/2013.

CARRAMOLINO, L.; FUENTES, J.; GARCÍA-ANDRÉS, C.; AZCOITIA, V.; RIETHMACHER, D.; TORRES, M. Platelets play an essential role in separating the blood and lymphatic vasculatures during embryonic angiogenesis. **Circ Res**, v. 106, n. 7, p. 1197-1201, 2010. Acesso em 10/06/2013.

CASLEY-SMITH; JR, C.-S. **How can lymphedema be treated?**
www.lymphoedema.org.au, 1994. Acesso em 10/06/2013.

CHEUNG, L.; HAN, J.; BEILHACK, A.; JOSHI, S.; WILBURN, P.; DUA, A.; AN, A.; ROCKSON, S. G. An experimental model for the study of lymphedema and its response to therapeutic lymphangiogenesis. **BioDrugs**, v. 20, n. 6, p. 363-370, 2006. Acesso em 11/06/2013.

CHILOV, D.; KUKK, E.; TAIRA, S.; JELTSCH, M.; KAUKONEN, J.; PALOTIE, A.; JOUKOV, V.; ALITALO, K. Genomic organization of human and mouse genes for vascular endothelial growth factor C. **J Biol Chem**, v. 272, n. 40, p. 25176-25183, 1997. Acesso em 10/06/2013.

CHRISTIANSEN, A.; DETMAR, M. Lymphangiogenesis and cancer. **Genes Cancer**, v. 2, n. 12, p. 1146-1158, 2011. Acesso em 11/06/2013.

COHEN, S. R.; PAYNE, D. K.; TUNKEL, R. S. Lymphedema: strategies for management. **Cancer**, v. 92, n. 4 Suppl, p. 980-987, 2001. Acesso em 10/06/2013.

DEJANA, E.; ORSENIGO, F.; MOLENDINI, C.; BALUK, P.; MCDONALD, D. M. Organization and signaling of endothelial cell-to-cell junctions in various regions of the blood and lymphatic vascular trees. **Cell Tissue Res**, v. 335, n. 1, p. 17-25, 2009. Acesso em 10/06/2013.

DOBSON, J., MORRIS, J. **Oncologia em Pequenos Animais**: Editora Roca, 2007. Acesso em 11/06/2013.

DUMONT, D. J.; JUSSILA, L.; TAIPALE, J.; LYMBOUSSAKI, A.; MUSTONEN, T.; PAJUSOLA, K.; BREITMAN, M.; ALITALO, K. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. **Science**, v. 282, n. 5390, p. 946-949, 1998. Acesso em 10/06/2013.

ENHOLM, B.; KARPANEN, T.; JELTSCH, M.; KUBO, H.; STENBACK, F.; PREVO, R.; JACKSON, D. G.; YLA-HERTTUALA, S.; ALITALO, K. Adenoviral expression of vascular endothelial growth factor-C induces lymphangiogenesis in the skin. **Circ Res**, v. 88, n. 6, p. 623-629, 2001. Acesso em 11/06/2013.

FAUSTINO, S. E. S. **Expressão de VEGFC em carcinomas espinocelulares de boca: correlação com as metástases ocultas e com prognóstico dos pacientes.**: secondary title. Bauru - SP: Faculdade de Odontologia de Bauru - USP, 2007, 131 p. Acesso em 10/06/2013.

FERRARA, N.; ALITALO, K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. **Nat Med**, v. 5, n. 12, p. 1359-1364, 1999. Acesso em 10/06/2013.

FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nat Med**, v. 9, n. 6, p. 669-676, 2003. Acesso em 10/06/2013.

FERRELL, R. E.; LEVINSON, K. L.; ESMAN, J. H.; KIMAK, M. A.; LAWRENCE, E. C.; BARMADA, M. M.; FINEGOLD, D. N. Hereditary lymphedema: evidence for linkage and genetic heterogeneity. **Hum Mol Genet**, v. 7, n. 13, p. 2073-2078, 1998. Acesso em 11/06/2013.

FÖLDI, M., E.; FÖLDI, R. H. K. **Földi's Textbook of Lymphology: For Physicians and Lymphedema Therapists**. Munich: Urban and Fischer, 2006. Acesso em 11/06/2013.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **N Engl J Med**, v. 285, n. 21, p. 1182-1186, 1971. Acesso em 10/06/2013.

GALLAND, F.; KARAMYSHEVA, A.; MATTEI, M. G.; ROSNET, O.; MARCHETTO, S.; BIRNBAUM, D. Chromosomal localization of FLT4, a novel receptor-type tyrosine kinase gene. **Genomics**, v. 13, n. 2, p. 475-478, 1992. Acesso em 11/06/2013.

GOLDMAN, J.; LE, T. X.; SKOBE, M.; SWARTZ, M. A. Overexpression of VEGF-C causes transient lymphatic hyperplasia but not increased lymphangiogenesis in regenerating skin. **Circ Res**, v. 96, n. 11, p. 1193-1199, 2005. Acesso em 11/06/2013.

GORDON, E. J.; RAO, S.; POLLARD, J. W.; NUTT, S. L.; LANG, R. A.; HARVEY, N. L. Macrophages define dermal lymphatic vessel calibre during development by regulating lymphatic endothelial cell proliferation. **Development**, v. 137, n. 22, p. 3899-3910, 2010. Acesso em 10/06/2013.

GUO, R.; ZHOU, Q.; PROULX, S. T.; WOOD, R.; JI, R. C.; RITCHLIN, C. T.; PYTOWSKI, B.; ZHU, Z.; WANG, Y. J.; SCHWARZ, E. M.; XING, L. Inhibition of lymphangiogenesis and lymphatic drainage via vascular endothelial growth factor receptor 3 blockade increases the severity of inflammation in a mouse model of chronic inflammatory arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 60, n. 9, p. 2666-2676, 2009. Acesso em 10/06/2013.

HÄGERLING, R.; POLLMANN, C.; ANDREAS, M.; SCHMIDT, C.; NURMI, H.; ADAMS, R. H.; ALITALO, K.; ANDRESEN, V.; SCHULTE-MERKER, S.; KIEFER, F. A novel multistep mechanism for initial lymphangiogenesis in mouse embryos based on ultramicroscopy. **EMBO J**, v. 32, n. 5, p. 629-644, 2013. Acesso em 10/06/2013.

HARRELL, M. I.; IRITANI, B. M.; RUDDALL, A. Lymph node mapping in the mouse. **J Immunol Methods**, v. 332, n. 1-2, p. 170-174, 2008. Acesso em 10/06/2013.

HIRAKAWA, S.; BROWN, L. F.; KODAMA, S.; PAAVONEN, K.; ALITALO, K.; DETMAR, M. VEGF-C-induced lymphangiogenesis in sentinel lymph nodes promotes tumor metastasis to distant sites. **Blood**, v. 109, n. 3, p. 1010-1017, 2007. Acesso em 11/06/2013.

ICHISE, H.; ICHISE, T.; OHTANI, O.; YOSHIDA, N. Phospholipase Cgamma2 is necessary for separation of blood and lymphatic vasculature in mice. **Development**, v. 136, n. 2, p. 191-195, 2009. Acesso em 10/06/2013.

IRRTHUM, A.; KARKKAINEN, M. J.; DEVRIENDT, K.; ALITALO, K.; VIKKULA, M. Congenital hereditary lymphedema caused by a mutation that inactivates VEGFR3 tyrosine kinase. **Am J Hum Genet**, v. 67, n. 2, p. 295-301, 2000. Acesso em 12/06/2013.

JELTSCH, M.; KAIPAINEN, A.; JOUKOV, V.; MENG, X.; LAKSO, M.; RAUVALA, H.; SWARTZ, M.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K.; ALITALO, K. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. **Science**, v. 276, n. 5317, p. 1423-1425, 1997. Acesso em 10/06/2013.

JIN, D. P.; AN, A.; LIU, J.; NAKAMURA, K.; ROCKSON, S. G. Therapeutic responses to exogenous VEGF-C administration in experimental lymphedema: immunohistochemical and molecular characterization. **Lymphat Res Biol**, v. 7, n. 1, p. 47-57, 2009. Acesso em 10/06/2013.

JOUKOV, V.; PAJUSOLA, K.; KAIPAINEN, A.; CHILOV, D.; LAHTINEN, I.; KUKK, E.; SAKSELA, O.; KALKKINEN, N.; ALITALO, K. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. **EMBO J**, v. 15, n. 7, p. 1751, 1996. Acesso em 11/06/2013.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara - koogan, 2008. Acesso em 11/06/2013.

JUSSILA, L.; ALITALO, K. Vascular growth factors and lymphangiogenesis. **Physiol Rev**, v. 82, n. 3, p. 673-700, 2002. Acesso em 10/06/2013.

JUSZYŃSKI, M.; CISZEK, B.; STACHURSKA, E.; JABŁOŃSKA, A.; RATAJSKA, A. Development of lymphatic vessels in mouse embryonic and early postnatal hearts. **Dev Dyn**, v. 237, n. 10, p. 2973-2986, 2008. Acesso em 10/06/2013.

KAIPAINEN, A.; KORHONEN, J.; MUSTONEN, T.; VAN HINSBERGH, V. W.; FANG, G. H.; DUMONT, D.; BREITMAN, M.; ALITALO, K. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 8, p. 3566-3570, 1995. Acesso em 10/06/2013.

KARKKAINEN, M. J.; FERRELL, R. E.; LAWRENCE, E. C.; KIMAK, M. A.; LEVINSON, K. L.; MCTIGUE, M. A.; ALITALO, K.; FINEGOLD, D. N. Missense mutations interfere with VEGFR-3 signalling in primary lymphoedema. **Nat Genet**, v. 25, n. 2, p. 153-159, 2000. Acesso em 11/06/2013.

KARKKAINEN, M. J.; SAARISTO, A.; JUSSILA, L.; KARILA, K. A.; LAWRENCE, E. C.; PAJUSOLA, K.; BUELER, H.; EICHMANN, A.; KAUPPINEN, R.; KETTUNEN, M. I.; YLA-HERTTUALA, S.; FINEGOLD, D. N.; FERRELL, R. E.; ALITALO, K. A model for gene therapy of human hereditary lymphedema. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 22, p. 12677-12682, 2001. Acesso em 11/06/2013.

KARKKAINEN, M. J.; HAIKO, P.; SAINIO, K.; PARTANEN, J.; TAIPALE, J.; PETROVA, T. V.; JELTSCH, M.; JACKSON, D. G.; TALIKKA, M.; RAUVALA, H.; BETSHOLTZ, C.; ALITALO, K. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. **Nat Immunol**, v. 5, n. 1, p. 74-80, 2004. Acesso em 11/06/2013.

KAZENWADEL, J.; SECKER, G. A.; BETTERMAN, K. L.; HARVEY, N. L. In vitro assays using primary embryonic mouse lymphatic endothelial cells uncover key roles for FGFR1 signalling in lymphangiogenesis. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e40497, 2012. Acesso em 10/06/2013.

KO, D. S.; LERNER, R.; KLOSE, G.; COSIMI, A. B. Effective treatment of lymphedema of the extremities. **Arch Surg**, v. 133, n. 4, p. 452-458, 1998. Acesso em 10/06/2013.

KRISHNAN, J.; KIRKIN, V.; STEFFEN, A.; HEGEN, M.; WEIH, D.; TOMAREV, S.; WILTING, J.; SLEEMAN, J. P. Differential in vivo and in vitro expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D in tumors and its relationship to lymphatic metastasis in immunocompetent rats. **Cancer Res**, v. 63, n. 3, p. 713-722, 2003. Acesso em 11/06/2013.

KUKK, E.; LYMBOUSSAKI, A.; TAIRA, S.; KAIPAINEN, A.; JELTSCH, M.; JOUKOV, V.; ALITALO, K. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. **Development**, v. 122, n. 12, p. 3829-3837, 1996. Acesso em 11/06/2013.

KUWAHARA, G.; NISHINAKAMURA, H.; KOJIMA, D.; TASHIRO, T.; KODAMA, S. Vascular endothelial growth factor-C derived from CD11b+ cells induces therapeutic improvements in a murine model of hind limb ischemia. **J Vasc Surg**, v. 57, n. 4, p. 1090-1099, 2013. Acesso em 10/06/2013.

LÄHTEENVUO, M.; HONKONEN, K.; TERVALA, T.; TAMMELA, T.; SUOMINEN, E.; LÄHTEENVUO, J.; KHOLOVÁ, I.; ALITALO, K.; YLÄ-HERTTUALA, S.; SAARISTO, A. Growth factor therapy and autologous lymph node transfer in lymphedema. **Circulation**, v. 123, n. 6, p. 613-620, 2011. Acesso em 10/06/2013.

LALONI, M. T. **Predição do risco individual de metástase linfática e hematogênica em função da intensidade de linfangiogênese no tumor carcinóide típico broncopulmonar.: secondary title.** São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2008, 171 p. Acesso em 10/06/2013.

LAUWERYNS, J. M.; BOUSSAUW, L. The ultrastructure of lymphatic valves in the adult rabbit lung. **Z Zellforsch Mikrosk Anat**, v. 143, n. 2, p. 149-168, 1973. Acesso em 10/06/2013.

LEAK, L. V.; BURKE, J. F. Ultrastructural studies on the lymphatic anchoring filaments. **J Cell Biol**, v. 36, n. 1, p. 129-149, 1968. Acesso em 10/06/2013.

LEAK, L. V.; JONES, M. Lymphangiogenesis in vitro: formation of lymphatic capillary-like channels from confluent monolayers of lymphatic endothelial cells. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**, v. 30A, n. 8, p. 512-518, 1994. Acesso em 11/06/2013.

LEE, J.; GRAY, A.; YUAN, J.; LUOH, S. M.; AVRAHAM, H.; WOOD, W. I. Vascular endothelial growth factor-related protein: a ligand and specific activator of the tyrosine kinase receptor Flt4. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 5, p. 1988-1992, 1996. Acesso em 11/06/2013.

LIERSCH, R.; HIRAKAWA, S.; BERDEL, W. E.; MESTERS, R. M.; DETMAR, M. Induced lymphatic sinus hyperplasia in sentinel lymph nodes by VEGF-C as the earliest premetastatic indicator. **Int J Oncol**, v. 41, n. 6, p. 2073-2078, 2012. Acesso em 10/06/2013.

LIU, Y.; FANG, Y.; DONG, P.; GAO, J.; LIU, R.; TIAN, H.; DING, Z.; BI, Y.; LIU, Z. Effect of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) gene transfer in rat model of secondary lymphedema. **Vascul Pharmacol**, v. 49, n. 1, p. 44-50, 2008. Acesso em 10/06/2013.

LOPRINZI, C. L.; KUGLER, J. W.; SLOAN, J. A.; ROOKE, T. W.; QUELLA, S. K.; NOVOTNY, P.; MOWAT, R. B.; MICHALAK, J. C.; STELLA, P. J.; LEVITT, R.; TSCHETTER, L. K.; WINDSCHITL, H. Lack of effect of coumarin in women with lymphedema after treatment for breast cancer. **N Engl J Med**, v. 340, n. 5, p. 346-350, 1999. Acesso em 10/06/2013.

LUCENA, D.; YAMANE, R. **Antiangiogênicos no glaucoma**: secondary title: **Revista Brasileira Oftalmologia**, 2008. 67, 313-320 p. Acesso em 11/06/2013.

LUTTUN, A.; CARMELIET, G.; CARMELIET, P. Vascular progenitors: from biology to treatment. **Trends Cardiovasc Med**, v. 12, n. 2, p. 88-96, 2002. Acesso em 11/06/2013.

MÄKINEN, T.; VEIKKOLA, T.; MUSTJOKI, S.; KARPANEN, T.; CATIMEL, B.; NICE, E. C.; WISE, L.; MERCER, A.; KOWALSKI, H.; KERJASCHKI, D.; STACKER, S. A.; ACHEN, M. G.; ALITALO, K. Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. **EMBO J**, v. 20, n. 17, p. 4762-4773, 2001a. Acesso em 12/06/2013.

MÄKINEN, T.; JUSSILA, L.; VEIKKOLA, T.; KARPANEN, T.; KETTUNEN, M. I.; PULKKANEN, K. J.; KAUPPINEN, R.; JACKSON, D. G.; KUBO, H.; NISHIKAWA, S.; YLÄ-HERTTUALA, S.; ALITALO, K. Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. **Nat Med**, v. 7, n. 2, p. 199-205, 2001b. Acesso em 12/06/2013.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **An Acad Bras Cienc**, v. 75, n. 4, p. 469-486, 2003. Acesso em 10/06/2013.

MANDRIOTA, S. J.; JUSSILA, L.; JELTSCH, M.; COMPAGNI, A.; BAETENS, D.; PREVO, R.; BANERJI, S.; HUARTE, J.; MONTESANO, R.; JACKSON, D. G.; ORCI, L.; ALITALO, K.; CHRISTOFORI, G.; PEPPER, M. S. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. **EMBO J**, v. 20, n. 4, p. 672-682, 2001. Acesso em 11/06/2013.

MARCHIÒ, S.; ASTANINA, E.; BUSSOLINO, F. Emerging lymphae for the fountain of life. **EMBO J**, v. 32, n. 5, p. 609-611, 2013. Acesso em 10/06/2013.

MATSUMURA, K.; HIRASHIMA, M.; OGAWA, M.; KUBO, H.; HISATSUNE, H.; KONDO, N.; NISHIKAWA, S.; CHIBA, T. Modulation of VEGFR-2-mediated endothelial-cell activity by VEGF-C/VEGFR-3. **Blood**, v. 101, n. 4, p. 1367-1374, 2003.

MAYALL, R. **Linfângipatias e histopatologia: Linfangites e erisipelas**. Rio de Janeiro: Revinter, 2000. Acesso em 10/06/2013.

MCCOLL, B. K.; BALDWIN, M. E.; ROUFAIL, S.; FREEMAN, C.; MORITZ, R. L.; SIMPSON, R. J.; ALITALO, K.; STACKER, S. A.; ACHEN, M. G. Plasmin activates the

lymphangiogenic growth factors VEGF-C and VEGF-D. **J Exp Med**, v. 198, n. 6, p. 863-868, 2003. Acesso em 12/06/2013.

MCCOLL, B. K.; PAAVONEN, K.; KARNEZIS, T.; HARRIS, N. C.; DAVYDOVA, N.; ROTHACKER, J.; NICE, E. C.; HARDER, K. W.; ROUFAIL, S.; HIBBS, M. L.; ROGERS, P. A.; ALITALO, K.; STACKER, S. A.; ACHEN, M. G. Proprotein convertases promote processing of VEGF-D, a critical step for binding the angiogenic receptor VEGFR-2. **FASEB J**, v. 21, n. 4, p. 1088-1098, 2007. Acesso em 12/06/2013.

MIKKOLA, H. K.; ORKIN, S. H. The search for the hemangioblast. **J Hematother Stem Cell Res**, v. 11, n. 1, p. 9-17, 2002. Acesso em 11/06/2013.

NAKAMURA, K.; ROCKSON, S. G. Molecular targets for therapeutic lymphangiogenesis in lymphatic dysfunction and disease. **Lymphat Res Biol**, v. 6, n. 3-4, p. 181-189, 2008. Acesso em 11/06/2013.

NAKAO, S.; ZANDI, S.; KOHNO, R.; SUN, D.; NAKAMA, T.; ISHIKAWA, K.; YOSHIDA, S.; ENAIDA, H.; ISHIBASHI, T.; HAFEZI-MOGHADAM, A. Lack of lymphatics and lymph node-mediated immunity in choroidal neovascularization. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 54, n. 6, p. 3830-3836, 2013. Acesso em 10/06/2013.

OASHI, K.; FURUKAWA, H.; OYAMA, A.; FUNAYAMA, E.; HAYASHI, T.; SAITO, A.; YAMAMOTO, Y. A new model of acquired lymphedema in the mouse hind limb: a preliminary report. **Ann Plast Surg**, v. 69, n. 5, p. 565-568, 2012. Acesso em 10/06/2013.

OASHI, K.; FURUKAWA, H.; NISHIHARA, H.; OZAKI, M.; OYAMA, A.; FUNAYAMA, E.; HAYASHI, T.; KUGE, Y.; YAMAMOTO, Y. Pathophysiological characteristics of melanoma in-transit metastasis in a lymphedema mouse model. **J Invest Dermatol**, v. 133, n. 2, p. 537-544, 2013. Acesso em 10/06/2013.

OH, S. J.; JELTSCH, M. M.; BIRKENHÄGER, R.; MCCARTHY, J. E.; WEICH, H. A.; CHRIST, B.; ALITALO, K.; WILTING, J. VEGF and VEGF-C: specific induction of angiogenesis and lymphangiogenesis in the differentiated avian chorioallantoic membrane. **Dev Biol**, v. 188, n. 1, p. 96-109, 1997. Acesso em 11/06/2013.

OLIVER, G. Lymphatic vasculature development. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 1, p. 35-45, 2004. Acesso em 10/06/2013.

OLIVER, G.; ALITALO, K. The lymphatic vasculature: recent progress and paradigms. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 21, n., p. 457-483, 2005. Acesso em 11/06/2013.

OLSZEWSKI, W. L.; ENGESET, A.; ROMANIUK, A.; GRZELAK, I.; ZIOLKOWSKA, A. Immune cells in peripheral lymph and skin of patients with obstructive lymphedema. **Lymphology**, v. 23, n. 1, p. 23-33, 1990. Acesso em 11/06/2013.

PADERA, T. P.; STOLL, B. R.; SO, P. T.; JAIN, R. K. Conventional and high-speed intravital multiphoton laser scanning microscopy of microvasculature, lymphatics, and leukocyte-endothelial interactions. **Mol Imaging**, v. 1, n. 1, p. 9-15, 2002. Acesso em 11/06/2013.

PAN, D.; SUZUKI, Y.; YANG, P. C.; ROCKSON, S. G. Indirect magnetic resonance lymphangiography to assess lymphatic function in experimental murine lymphedema. **Lymphat Res Biol**, v. 4, n. 4, p. 211-216, 2006. Acesso em 11/06/2013.

RAFII, S.; LYDEN, D.; BENEZRA, R.; HATTORI, K.; HEISSIG, B. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 11, p. 826-835, 2002. Acesso em 11/06/2013.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J. M.; DEPREZ, R. H.; MOORMAN, A. F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neurosci Lett**, v. 339, n. 1, p. 62-66, 2003. Acesso em 10/06/2013.

REHMAN, J.; LI, J.; ORSCHELL, C. M.; MARCH, K. L. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. **Circulation**, v. 107, n. 8, p. 1164-1169, 2003. Acesso em 11/06/2013.

REYES, M.; DUDEK, A.; JAHAGIRDAR, B.; KOODIE, L.; MARKER, P. H.; VERFAILLIE, C. M. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. **J Clin Invest**, v. 109, n. 3, p. 337-346, 2002. Acesso em 11/06/2013.

RISTIMÄKI, A.; NARKO, K.; ENHOLM, B.; JOUKOV, V.; ALITALO, K.

Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor-C. **J Biol Chem**, v. 273, n. 14, p. 8413-8418, 1998. Acesso em 12/06/2013.

ROCKSON, S. G. The lymphaticovenous spectrum of edema. **Lymphat Res Biol**, v. 7, n. 3, p. 125, 2009. Acesso em 12/06/2013.

RUOCCO, E.; PUCA, R. V.; BRUNETTI, G.; SCHWARTZ, R. A.; RUOCCO, V.

Lymphedematous areas: privileged sites for tumors, infections, and immune disorders. **Int J Dermatol**, v. 46, n. 6, p. 662, 2007. Acesso em 11/06/2013.

RUOCCO, V.; SCHWARTZ, R. A.; RUOCCO, E. Lymphedema: an immunologically vulnerable site for development of neoplasms. **J Am Acad Dermatol**, v. 47, n. 1, p. 124-127, 2002. Acesso em 11/06/2013.

RUTKOWSKI, J. M.; BOARDMAN, K. C.; SWARTZ, M. A. Characterization of lymphangiogenesis in a model of adult skin regeneration. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 291, n. 3, p. H1402-1410, 2006a. Acesso em 10/06/2013.

RUTKOWSKI, J. M.; MOYA, M.; JOHANNES, J.; GOLDMAN, J.; SWARTZ, M. A.

Secondary lymphedema in the mouse tail: Lymphatic hyperplasia, VEGF-C upregulation, and the protective role of MMP-9. **Microvasc Res**, v. 72, n. 3, p. 161-171, 2006b. Acesso em 10/06/2013.

SAARISTO, A.; KARKKAINEN, M. J.; ALITALO, K. Insights into the molecular pathogenesis and targeted treatment of lymphedema. **Ann N Y Acad Sci**, v. 979, n., p. 94-110, 2002. Acesso em 10/06/2013.

SAARISTO, A.; TAMMELA, T.; TIMONEN, J.; YLA-HERTTUALA, S.; TUKIAINEN, E.; ASKO-SELJAVAARA, S.; ALITALO, K. Vascular endothelial growth factor-C gene therapy restores lymphatic flow across incision wounds. **FASEB J**, v. 18, n. 14, p. 1707-1709, 2004. Acesso em 11/06/2013.

SAARISTO, A.; TAMMELA, T.; FARKKILÄ, A.; KÄRKKÄINEN, M.; SUOMINEN, E.; YLA-HERTTUALA, S.; ALITALO, K. Vascular endothelial growth factor-C accelerates diabetic wound healing. **Am J Pathol**, v. 169, n. 3, p. 1080-1087, 2006. Acesso em 11/06/2013.

SAHARINEN, P.; PETROVA, T. V. Molecular regulation of lymphangiogenesis. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1014, n., p. 76-87, 2004. Acesso em 10/06/2013.

SAITO, Y.; NAKAGAMI, H.; MORISHITA, R.; TAKAMI, Y.; KIKUCHI, Y.; HAYASHI, H.; NISHIKAWA, T.; TAMAI, K.; AZUMA, N.; SASAJIMA, T.; KANEDA, Y. Transfection of human hepatocyte growth factor gene ameliorates secondary lymphedema via promotion of lymphangiogenesis. **Circulation**, v. 114, n. 11, p. 1177-1184, 2006. Acesso em 11/06/2013.

SCHMEISSER, A.; CHRISTOPH, M.; AUGSTEIN, A.; MARQUETANT, R.; KASPER, M.; BRAUN-DULLAEUS, R. C.; STRASSER, R. H. Apoptosis of human macrophages by Flt-4 signaling: implications for atherosclerotic plaque pathology. **Cardiovasc Res**, v. 71, n. 4, p. 774-784, 2006. Acesso em 12/06/2013.

SCHULTE-MERKER, S.; SABINE, A.; PETROVA, T. V. Lymphatic vascular morphogenesis in development, physiology, and disease. **J Cell Biol**, v. 193, n. 4, p. 607-618, 2011. Acesso em 10/06/2013.

SHAWBER, C. J.; FUNAHASHI, Y.; FRANCISCO, E.; VORONTCHIKHINA, M.; KITAMURA, Y.; STOWELL, S. A.; BORISENKO, V.; FEIRT, N.; PODGRABINSKA, S.; SHIRAISHI, K.; CHAWENGSAKSOPHAK, K.; ROSSANT, J.; ACCILI, D.; SKOBE, M.; KITAJEWSKI, J. Notch alters VEGF responsiveness in human and murine endothelial cells by direct regulation of VEGFR-3 expression. **J Clin Invest**, v. 117, n. 11, p. 3369-3382, 2007. Acesso em 12/06/2013.

SHIN, W. S.; ROCKSON, S. G. Animal models for the molecular and mechanistic study of lymphatic biology and disease. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1131, n., p. 50-74, 2008. Acesso em 11/06/2013.

SIEGFRIED, G.; BASAK, A.; CROMLISH, J. A.; BENJANNET, S.; MARCINKIEWICZ, J.; CHRÉTIEN, M.; SEIDAH, N. G.; KHATIB, A. M. The secretory proprotein convertases furin, PC5, and PC7 activate VEGF-C to induce tumorigenesis. **J Clin Invest**, v. 111, n. 11, p. 1723-1732, 2003. Acesso em 12/06/2013.

SILVA, J. R. S. **Variações da Técnica Segundo a Drenagem Linfática em Cadeia Mamária – Revisão de Literatura.**: secondary title. Rio de Janeiro, 2006. Acesso em 11/06/2013.

SKOBE, M.; HAWIGHORST, T.; JACKSON, D. G.; PREVO, R.; JANES, L.; VELASCO, P.; RICCARDI, L.; ALITALO, K.; CLAFFEY, K.; DETMAR, M. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. **Nat Med**, v. 7, n. 2, p. 192-198, 2001. Acesso em 11/06/2013.

SLATTER, D. E. A. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**: Editora Manole Ltda, 1998. Acesso em 11/06/2013.

SLAVIN, S. A.; UPTON, J.; KAPLAN, W. D.; VAN DEN ABBEELE, A. D. An investigation of lymphatic function following free-tissue transfer. **Plast Reconstr Surg**, v. 99, n. 3, p. 730-741; discussion 742-733, 1997. Acesso em 10/06/2013.

SLEEMAN, J.; SCHMID, A.; THIELE, W. Tumor lymphatics. **Semin Cancer Biol**, v. 19, n. 5, p. 285-297, 2009. Acesso em 10/06/2013.

SUZUKI-INOUE, K.; INOUE, O.; DING, G.; NISHIMURA, S.; HOKAMURA, K.; ETO, K.; KASHIWAGI, H.; TOMIYAMA, Y.; YATOMI, Y.; UMEMURA, K.; SHIN, Y.; HIRASHIMA, M.; OZAKI, Y. Essential in vivo roles of the C-type lectin receptor CLEC-2: embryonic/neonatal lethality of CLEC-2-deficient mice by blood/lymphatic misconnections and impaired thrombus formation of CLEC-2-deficient platelets. **J Biol Chem**, v. 285, n. 32, p. 24494-24507, 2010. Acesso em 10/06/2013.

SZUBA, A.; ROCKSON, S. G. Lymphedema: classification, diagnosis and therapy. **Vasc Med**, v. 3, n. 2, p. 145-156, 1998. Acesso em 10/06/2013.

TAMMELA, T.; SAARISTO, A.; HOLOPAINEN, T.; LYYTIKKÄ, J.; KOTRONEN, A.; PITKONEN, M.; ABO-RAMADAN, U.; YLÄ-HERTTUALA, S.; PETROVA, T. V.; ALITALO, K. Therapeutic differentiation and maturation of lymphatic vessels after lymph node dissection and transplantation. **Nat Med**, v. 13, n. 12, p. 1458-1466, 2007. Acesso em 11/06/2013.

TAMMELA, T.; ALITALO, K. Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. **Cell**, v. 140, n. 4, p. 460-476, 2010. Acesso em 10/06/2013.

TANIGUCHI, K.; KOHNO, R.; AYADA, T.; KATO, R.; ICHIYAMA, K.; MORISADA, T.; OIKE, Y.; YONEMITSU, Y.; MAEHARA, Y.; YOSHIMURA, A. Spreds are essential for embryonic lymphangiogenesis by regulating vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. **Mol Cell Biol**, v. 27, n. 12, p. 4541-4550, 2007. Acesso em 12/06/2013.

TSCHANZ, S. A.; BURRI, P. H.; WEIBEL, E. R. A simple tool for stereological assessment of digital images: the STEPanizer. **J Microsc**, v. 243, n. 1, p. 47-59, 2011. Acesso em 10/06/2013.

UHRIN, P.; ZAUJEC, J.; BREUSS, J. M.; OLCAYDU, D.; CHRENEK, P.; STOCKINGER, H.; FUERTBAUER, E.; MOSER, M.; HAIKO, P.; FÄSSLER, R.; ALITALO, K.; BINDER, B. R.; KERJASCHKI, D. Novel function for blood platelets and podoplanin in developmental separation of blood and lymphatic circulation. **Blood**, v. 115, n. 19, p. 3997-4005, 2010. Acesso em 10/06/2013.

VEIKKOLA, T.; JUSSILA, L.; MAKINEN, T.; KARPANEN, T.; JELTSCH, M.; PETROVA, T. V.; KUBO, H.; THURSTON, G.; MCDONALD, D. M.; ACHEN, M. G.; STACKER, S. A.; ALITALO, K. Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. **EMBO J**, v. 20, n. 6, p. 1223-1231, 2001. Acesso em 11/06/2013.

WADA, H.; URA, S.; KITAOKA, S.; SATOH-ASAHARA, N.; HORIE, T.; ONO, K.; TAKAYA, T.; TAKANABE-MORI, R.; AKAO, M.; ABE, M.; MORIMOTO, T.; MURAYAMA, T.; YOKODE, M.; FUJITA, M.; SHIMATSU, A.; HASEGAWA, K. Distinct

characteristics of circulating vascular endothelial growth factor- α and C levels in human subjects. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e29351, 2011. Acesso em 10/06/2013.

WIRZENIUS, M.; TAMMELA, T.; UUTELA, M.; HE, Y.; ODORISIO, T.; ZAMBRUNO, G.; NAGY, J. A.; DVORAK, H. F.; YLÄ-HERTTUALA, S.; SHIBUYA, M.; ALITALO, K. Distinct vascular endothelial growth factor signals for lymphatic vessel enlargement and sprouting. **J Exp Med**, v. 204, n. 6, p. 1431-1440, 2007. Acesso em 10/06/2013.

WITTE, M. H.; OHKUMA, M.; ANDRADE, M.; CAMPISI, C.; BOCCARDO, F. Nature's historic gap: the 20th century of lymphology. **Lymphology**, v. 38, n. 4, p. 157-158, 2005. Acesso em 10/06/2013.

YOON, Y. S.; MURAYAMA, T.; GRAVEREAUX, E.; TKEBUCHAVA, T.; SILVER, M.; CURRY, C.; WECKER, A.; KIRCHMAIR, R.; HU, C. S.; KEARNEY, M.; ASHARE, A.; JACKSON, D. G.; KUBO, H.; ISNER, J. M.; LOSORDO, D. W. VEGF-C gene therapy augments postnatal lymphangiogenesis and ameliorates secondary lymphedema. **J Clin Invest**, v. 111, n. 5, p. 717-725, 2003. Acesso em 10/06/2013.

ZAWIEJA, D. C. Contractile physiology of lymphatics. **Lymphat Res Biol**, v. 7, n. 2, p. 87-96, 2009. Acesso em 10/06/2013.

APÊNDICE A

Figura 11 - Imunohistoquímica para VEGFC (diluição 1:400) e para FLT4 (diluição 1:200) em musculatura de membros pélvicos esquerdos de camundongos, representando 5 animais dos grupos controles, sendo eutanasiados 3, 9, 15 e 30 dias.

Fonte: Ferrão, J. S. P., (2013)

Legenda: (A) Imunohistoquímica para VEGFC de membro pélvico esquerdo, 03 dias após a cirurgia; (B) Imunohistoquímica para VEGFC de membro pélvico esquerdo, 09 dias após a cirurgia; (C)

Imunohistoquímica para VEGFC de membro pélvico esquerdo, 15 dias após a cirurgia; (D) Imunohistoquímica para VEGFC de membro pélvico esquerdo, 30 dias após a cirurgia; (E) Imunohistoquímica para FLT4 de membro pélvico esquerdo, 03 dias após a cirurgia; (F) Imunohistoquímica para FLT4 de membro pélvico esquerdo, 09 dias após a cirurgia; (G) Imunohistoquímica para FLT4 de membro pélvico esquerdo, 15 dias após a cirurgia; (H) Imunohistoquímica para FLT4 de membro pélvico esquerdo, 30 dias após a cirurgia. As setas indicam os vasos linfáticos, as setas pontilhadas indicam Tecido Muscular. Contracoloração com Hematoxilina. Barras de 50, 100 e 200 μ m.

APÊNDICE B

Quadro 1 - Valores de "p" para expressão gênica para VEGFC em Região Proximal de membros pélvicos esquerdos de camundongos quando comparados os grupos Controle, Cirurgia e Tratamento.

MEMBRO PÉLVICO ESQUERDO - REGIÃO PROXIMAL				
Efeito da Cirurgia e Efeito do Tratamento nos Grupos Experimentais				
	Dia 03	Dia 09	Dia 15	Dia 30
Controle vs Cirurgia	p=0,0066	p=0,7697	p=0,0043	p=0,0405
Controle vs Tratamento	p=0,3200	p=0,6501	p=0,1333	p=0,0180
Cirurgia vs Tratamento	p=0,0005	p=0,4044	p=0,0002	p=0,0002
Efeito do Tempo sobre os Grupos Experimentais				
	Controle	Cirurgia	Tratamento	
dia 03 vs dia 09	p=0,1696	p<0,01	p=0,0641	
dia 03 vs dia 15		p<0,001		
dia 03 vs dia 30		p<0,001		
dia 09 vs dia 15		p<0,001		
dia 09 vs dia 30		p<0,001		
dia 15 vs dia 30		p<0,05		

Quadro 2 - Valores de "p" para expressão gênica para VEGFC em Região Média de membros pélvicos esquerdos de camundongos quando comparados os grupos Controle, Cirurgia e Tratamento.

MEMBRO PÉLVICO ESQUERDO - REGIÃO MÉDIA				
Efeito da Cirurgia e Efeito do Tratamento nos Grupos Experimentais				
	Dia 03	Dia 09	Dia 15	Dia 30
Controle vs Cirurgia	p=0,8212	p=0,0002	p=0,0087	p=0,6667
Controle vs Tratamento	p=0,6407	p=0,8609	p=0,2941	p=0,8771
Cirurgia vs Tratamento	p=0,7404	p=0,0003	p=0,0160	p=0,7510
Efeito do Tempo sobre os Grupos Experimentais				
	Controle	Cirurgia	Tratamento	
dia 03 vs dia 09	p=0,1302	p<0,01	p=0,6271	
dia 03 vs dia 15		p>0,05		
dia 03 vs dia 30		p>0,05		
dia 09 vs dia 15		p>0,05		
dia 09 vs dia 30		p<0,05		
dia 15 vs dia 30		p>0,05		

Quadro 3 - Valores de "p" para expressão gênica para VEGFC em Região Distal de membros pélvicos esquerdos de camundongos quando comparados os grupos Controle, Cirurgia e Tratamento.

MEMBRO PÉLVICO ESQUERDO - REGIÃO DISTAL				
Efeito da Cirurgia e Efeito do Tratamento nos Grupos Experimentais				
	Dia 03	Dia 09	Dia 15	Dia 30
Controle vs Cirurgia	p=0,2855	p=0,0018	p=0,2523	p=0,0415
Controle vs Tratamento	p=0,0143	p=0,0239	p=0,4534	p=0,1882
Cirurgia vs Tratamento	p<0,0001	p=0,0139	p=0,0413	p=0,0917
Efeito do Tempo sobre os Grupos Experimentais				
	Controle	Cirurgia	Tratamento	
dia 03 vs dia 09	p=0,0995	p<0,01	p<0,001	
dia 03 vs dia 15		p<0,01	p<0,001	
dia 03 vs dia 30		p<0,001	p<0,05	
dia 09 vs dia 15		p>0,05	p>0,05	
dia 09 vs dia 30		p>0,05	p>0,05	
dia 15 vs dia 30		p>0,05	p<0,01	

Quadro 4 - Valores de "p" para expressão gênica para FLT4 em Região Proximal de membros pélvicos esquerdos de camundongos quando comparados os grupos Controle, Cirurgia e Tratamento.

MEMBRO PÉLVICO ESQUERDO - REGIÃO PROXIMAL				
Efeito da Cirurgia e Efeito do Tratamento nos Grupos Experimentais				
	Dia 03	Dia 09	Dia 15	Dia 30
Controle vs Cirurgia	p=0,0006	p=0,4275	p=0,4684	p=0,0002
Controle vs Tratamento	p=0,0232	p=0,0041	p=0,0017	p<0,0001
Cirurgia vs Tratamento	p=0,0007	p=0,0059	p<0,0001	p<0,0001
Efeito do Tempo sobre os Grupos Experimentais				
	Controle	Cirurgia	Tratamento	
dia 03 vs dia 09	p=0,0935	p<0,001	p<0,001	
dia 03 vs dia 15		p<0,001	p<0,001	
dia 03 vs dia 30		p<0,01	p<0,001	
dia 09 vs dia 15		p>0,05	p>0,05	
dia 09 vs dia 30		p>0,05	p>0,05	
dia 15 vs dia 30		p>0,05	p>0,05	

Quadro 5 - Valores de "p" para expressão gênica para FLT4 em Região Média de membros pélvicos esquerdos de camundongos quando comparados os grupos Controle, Cirurgia e Tratamento.

MEMBRO PÉLVICO ESQUERDO - REGIÃO MÉDIA				
Efeito da Cirurgia e Efeito do Tratamento nos Grupos Experimentais				
	Dia 03	Dia 09	Dia 15	Dia 30
Controle vs Cirurgia	p=0,9856	p=0,7336	p=0,5344	p=0,3497
Controle vs Tratamento	p=0,7630	p=0,0005	p=0,0406	p=0,0390
Cirurgia vs Tratamento	p=0,7163	p=0,0005	p=0,0054	p=0,0268
Efeito do Tempo sobre os Grupos Experimentais				
	Controle	Cirurgia	Tratamento	
dia 03 vs dia 09	p=0,1049	p=0,2678	p<0,0001	
dia 03 vs dia 15			p>0,05	
dia 03 vs dia 30			p>0,05	
dia 09 vs dia 15			p<0,05	
dia 09 vs dia 30			p>0,05	
dia 15 vs dia 30			p>0,05	

Quadro 6 - Valores de "p" para expressão gênica para FLT4 em Região Distal de membros pélvicos esquerdos de camundongos quando comparados os grupos Controle, Cirurgia e Tratamento.

MEMBRO PÉLVICO ESQUERDO - REGIÃO DISTAL				
Efeito da Cirurgia e Efeito do Tratamento nos Grupos Experimentais				
	Dia 03	Dia 09	Dia 15	Dia 30
Controle vs Cirurgia	p<0,0001	p=0,3225	p=0,5096	p=0,0289
Controle vs Tratamento	p=0,0036	p=0,0447	p=0,3185	p=0,0004
Cirurgia vs Tratamento	p<0,0001	p=0,0672	p<0,0001	p<0,0001
Efeito do Tempo sobre os Grupos Experimentais				
	Controle	Cirurgia	Tratamento	
dia 03 vs dia 09	p=0,2474	p<0,001	p<0,001	
dia 03 vs dia 15		p<0,001	p<0,001	
dia 03 vs dia 30		p<0,001	p<0,001	
dia 09 vs dia 15		p>0,05	p>0,05	
dia 09 vs dia 30		p<0,001	p>0,05	
dia 15 vs dia 30		p<0,001	p>0,05	