FERNANDA RODRIGUES AGRESTE

**Expressão espaço-temporal do sistema VEGF e do EG-VEGF
no timo de cães**

São Paulo
2010

FERNANDA RODRIGUES AGRESTE

Expressão espaço-temporal do sistema VEGF e do EG-VEGF no timo de cães

Tese 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 Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Pedro Primo Bombonato

São Paulo

2010

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.2289
FMVZ

Agrete, Fernanda Rodrigues
Expressão espaço-temporal do sistema VEGF e do EG-VEGF no timo de cães /
Fernanda Rodrigues Agreste. -- 2010.
167 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2010.

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

Orientador: Prof. Dr. Pedro Primo Bombonato.

1. Timo. 2. Vascularização. 3. Sistema VEGF. 4. EG-VEGF. 5. Cães I. Título.

ERRATA

AGRESTE. F. R. **Expressão espaço-temporal do sistema VEGF e do EG-VEGF no timo de cães.** [Spatio-temporal expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) system and EG-VEGF in the thymus of dogs]. 2010. 169 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Folha	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
Resumo	1	169 f.	167 f.
Abstract	1	169 f.	167 f.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Expressão espaço-temporal do sistema VEGF e do EG-VEGF no timo de cães", protocolado sob o nº995/2006, utilizando 24 (vinte e quatro) cadáveres de cão doméstico, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Pedro Primo Bombonato, 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 12/12/2006.

We certify that the Research "Spatio-temporal expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) system and EG-VEGF in thymus of dogs", protocol number 995/2006, utilizing 24 (twenty for) dogs, under the responsibility of Prof. Dr. Pedro Primo Bombonato, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 12/12/2006.

São Paulo, 6 de maio de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: AGRESTE, Fernanda Rodrigues

Título: Expressão espaço-temporal do sistema VEGF e do EG-VEGF no timo de cães

Tese 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 Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca examinadora

Prof.Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

**Esta pesquisa foi financiada pela FUNDAÇÃO DE APOIO À PESQUISA DO ESTADO DE
SÃO PAULO - FAPESP, sob os processos
07/50578-8 e 06/61294-8.**

“...não duvidou da promessa de Deus, por incredulidade; mas, pela fé, se fortaleceu, dando glória a Deus, estando plenamente convicto de que êle era poderoso para cumprir o que prometera.”

(Rm 4:20-21)

“Não conheço o caminho pelo qual Ele me guia, mas conheço muito bem o meu guia.”

(Martinho Lutero)

“Do meu telescópio, eu via Deus caminhar! A maravilhosa disposição e harmonia do universo só pode ter tido origem segundo o plano de um Ser que tudo sabe e tudo pode. Isto fica sendo a minha última e mais elevada descoberta.”

(Isaac Newton)

Dedico esta tese a toda minha família e amigos cada fase deste trabalho é resultado do estímulo, apoio e compreensão de todos. Muito obrigado a todos!

Agadeço a Deus pela oportunidade de viver e poder, mesmo que de forma ingênua e diminuta, deixar minha marca e minha contribuição.

À benção de ter a família que tenho e ao grande amor que sinto por eles...

Ao meu orientador Prof. Dr. Pedro Bombonato, por ter me deixado voar com minhas próprias asas, mas sempre com um ninho seguro para voltar. Entusiasta e idealizador deste tema, que me concedeu a oportunidade ímpar de partilhar de sua companhia e me ensinou de maneira contagiante, cordial e terna o verdadeiro valor de se ter um conhecimento científico: passá-lo adiante!

À Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa por ter me acompanhado durante todo esse período, pela paciência e doçura com as quais sempre me tratou e por toda confiança que depositou em mim. Muito obrigado por tudo e pelas grandes oportunidades que me proporcionou.

À CAPES e ao DAAD pela bolsa de estudos concedida durante a duração do meu doutorado sanduíche na Alemanha.

Agradeço a todos os professores, funcionários, colegas e amigos da “Tierärztliche Hochschule Hannover – Ti-Ho”

Agradeço à Prof. Dr. Christiane Pfarrer por todo o período que passamos juntas e por todo o aprendizado, Danke schön!

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) por ser um dos pilares da minha formação.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda, pela receptividade no Laboratório de Morfologia e Morfometria Cardiovascular (LMMC) da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), bem como por toda a atenção e paciência dispensadas por ele, alunos e funcionários, mas principalmente pela oportunidade de experiência com a Estereologia.

Ao Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez, pelos ensinamentos, paciência, atenção e disposição em me atender quando precisei.

À Profª. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli por ter me recebido no Laboratório de Oncologia Experimental do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e por toda ajuda concedida. Em especial a técnica Cyntia Esteves pelos primeiros passos na Biologia Molecular.

Ao Prof. Dr. Hildebrando Gomes Benedicto pela amizade e apoio no decorrer de todos esses anos.

A todos os professores de Pós-Graduação, pelo profissionalismo e pelo conhecimento compartilhado.

À clínica veterinária Hipopet, seus funcionários e aos veterinários Gustavo Sato e Viviane Benvenga, hoje grandes amigos.

À amiga Cintia Monteiro de Araújo pela amizade e companhia durante todas as cirurgias e coletas.

À amiga e “orientada” Patricia Rossi Moriconi sempre prestativa e compreensiva, mesmo com minha ausência.

Aos amigos, pós-graduandos de sala e orientador: Camila Ercolini Barroso, Marcello Machado, Rafael Senos, Caio Biase, Yuri Karacas, Miler Rodrigo Pereira e Rafael Agopian, pela prazerosa

convivência durante todos esses anos, como também pelo compartilhamento de conhecimento experiências técnico-científicas, proporcionando momentos inesquecíveis.

Aos amigos do Laboratório para Estudos Morfofuncionais e Endocrinologia (LEME), pós-graduandos e alunos de iniciação científica, pelo companheirismo e extraordinária cooperação durante todo o período.

À amiga Camila Ercolini Barroso grande amiga forever...

Às amigas Elizângela dos Anjos Silva e Ana Paula da Silva por todo o tempo que passamos juntas, as conversas e risadas, que foram fundamentais durante este tempo.

À amiga Gisele Saviane por tantos momentos de alegria, por tantos sorrisos que demos durante todo o tempo de convivência (e que não foram poucos!). Agradeço por todo o tempo europeu compartilhado.

À amiga Tereza Cristina da Silva pelos ensinamentos e amizade, como também pelos valiosos apontamentos e sugestões na ocasião do Exame de Qualificação. E ao Bruno Cogliati, mais que um amigo, sempre presente compartilhando todas as dificuldades, serei eternamente grata.

Às amigas do laboratório LTIAM, em especial a Janaína Munuera Monteiro, Maria Letícia Salvadori, Rosemary Viola Bosch e Ana Rita Lima pelo companheirismo e trocas de informações.

Ao amigo Edinaldo Ribas Farias, técnico do Laboratório de Anatomia Macroscópica (LAM) e um ser humano fora de sério, e ao amigo Ronaldo Agostinho da Silva, técnico do Laboratório de Histologia e Embriologia. Obrigado por toda a dedicação, prontidão, auxílio, paciência e confiança durante todos esses anos em que precisei, usei e abusei dos laboratórios e dos serviços. Agradeço por tornarem as muitas horas de trabalho menos “penosas” devido prazerosas prosas e cômicos acontecimentos.

Aos funcionários do Museu de Anatomia Veterinária (MAV) Prof. Dr. Plínio Pinto e Silva, João Carmo Freitas e Raimundo Leal de Sousa, Branca, Fatima de Lourdes Minari, por toda a atenção, dedicação, prontidão e auxílio nas atividades curriculares e extra-curriculares, como também pelas valiosas trocas de experiências técnico-anatômicas.

Às amigas Sandra e Maíse, técnicas do Laboratório de Microscopia Eletrônica, por todo o suporte e apoio.

Ao amigo, Diogo Palermo Neto, técnico do Laboratório de Anatomia Microscópica e Imuno-histoquímica, sempre prestativo nos momentos de necessidade, proporcionando grandes momentos de descontração extra-laboratoriais e pelos sempre empolgantes debates gerais.

Aos amigos Jaqueline Martins de Santana e Maicon Silva, secretários do Setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da FMVZ-USP, por toda a prestatividade e paciência que dispuseram durante esses anos que tiveram seus serviços intensamente por mim requisitados.

Aos funcionários da Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice, pela prestatividade, profissionalismo, paciência e amizade, especialmente à Helena, Elza Faquim e Solange A. Santana.

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação da FMVZ-USP.

Aos meus animais e todos os animais, os que já passaram e os que passarão em minha vida, que são a grande razão da existência dessa profissão, pelo amor sincero e incondicional que nos dão. Animais que até agora têm sido minha escola. Àqueles que de alguma forma cederam suas vidas em prol do avanço da ciência e de meus conhecimentos, minha eterna dívida. Obrigado por vocês existirem!

A todos que direta ou indiretamente auxiliaram na realização deste trabalho.

RESUMO

AGRESTE, F. R. **Expressão espaço-temporal do sistema VEGF e do EG-VEGF no timo de cães.** [Spatio-temporal expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) system and EG-VEGF in the thymus of dogs]. 2010. 167 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão de fatores de crescimento responsáveis pelo processo vasculogênico durante o desenvolvimento e involução do timo em cães. Para este propósito, timos de fetos de cães (30, 40 50 e 60 dias de desenvolvimento), cães jovens (6 meses de idade) e cães adultos (1 ano de idade) foram coletados. Os tecidos foram analisados estereologicamente e submetidos à imunohistoquímica, PCR tempo real e western blot para os componentes do sistema VEGF (VEGF-A, VEGF-C, Flt-1, KDR e Flt-4) e endocrine gland-derived (EG)-VEGF. Pela estereologia, observamos um aumento no número dos vasos durante o desenvolvimento do órgão e uma diminuição durante a involução ($p<0.05$). Todos os componentes do sistema VEGF e do EG-VEGF foram detectados em todos os estágios durante o desenvolvimento e involução. As proteínas correspondentes foram localizadas nas células endoteliais e células epiteliais da região cortical e medular, sendo que o EG-VEGF foi observado apenas nas células epiteliais da região medular. A expressão do RNAm do sistema VEGF e do EG-VEGF apresentou um perfil tempo-dependente durante o desenvolvimento e involução. O sistema VEGF apresentou uma expressão constante durante o desenvolvimento e um aumento progressivo durante a involução, com exceção do KDR que se mostrou crescente durante todo o período de desenvolvimento e involução e do VEGF-C que apresentou alta expressão durante a involução. A expressão do RNAm do EG-VEGF foi crescente durante as fases estudadas, já a expressão da sua proteína foi alta no início do desenvolvimento do timo e diminui na involução, onde permanece praticamente constante durante todo o período. Nossos resultados sugerem que o sistema VEGF e o EG-VEGF possuem atividades biológicas similares nas glândulas endócrinas e diferentes papéis durante o desenvolvimento e involução, o qual pode ser especificado em estudos futuros. Possíveis funções incluem um efeito modulatório na vasculogênese tímica e microambiente, influenciando na diferenciação e proliferação de timócitos, maturação de células T, interação célula-célula e secreção de hormônios tímicos.

Palavras-chave: Timo. Vascularização. Sistema VEGF. EG-VEGF. Cães.

ABSTRACT

AGRESTE, F. R. **Spatio-temporal expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF system and EG-VEGF in the thymus of dogs.** [Expressão Espaço-Temporal do sistema VEGF e do EG-VEGF no timo de cães]. 2010. 167 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The aim this study was therefore to evaluate the expression of growth factors responsible for the vasculogenic process throughout development and initial involution of the canine thymus. For that purpose, thymuses from fetuses (30, 40, 50 and 60 days), juvenile (6 months) and adult (1 year) dogs were collected. The tissues were examined stereologically and subjected to immunohistochemistry, Real Time PCR and western blot for components of the VEGF-system (VEGF-A, VEGF-C, Flt-1, KDR and Flt-4) and endocrine gland-derived (EG)-VEGF. By means of stereology, the total number of blood vessels increased during development and decreased during involution. These changes were statistically significant ($p < 0.05$). All components of the VEGF-system and EG-VEGF were detected in all stages during development and involution. The corresponding proteins were localized in endothelial and epithelial cells of cortical and medullar regions, and EG-VEGF was detected only in epithelial cells of medullar region. The VEGF-system and EG-VEGF protein and mRNA expression showed a specific time-dependent profile during development and involution. The VEGF system showed a constant expression during development and a progressive increase during involution, except KDR that showed increased during all development and involution and VEGF-C that showed high expression during involution. The EG-VEGF RNA expression was increased during development and involution, but protein expression was high in early thymus development and decreased in involution, and remains constant during all period. Our results suggest that VEGF-system and EG-VEGF have similar biological activities in endocrine glands and different roles during thymus development and involution which have to be specified in further studies. Possible functions include a modulatory effect on thymic vasculogenesis and microenvironment, influencing thymocyte proliferation and differentiation, T-cell maturation, cell-cell interaction and thymic hormonal secretion.

Key words: Thymus. Vascularization. VEGF System. EG-VEGF. Dogs.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a	- área
ANOVA	- análise de variância
APES	- 3-aminopropiltriethoxi-silano
At	- área teste
AUI	- Aleatórios e Uniformemente Isotrópicos
β	- beta
B	- bridge
°C	- Graus Celsius
cDNA	- ácido desoxirribonucleico complementar
CE	- coeficiente de erro
CEp	- célula epitelial
cm	- centímetro
cm ³	- centímetro cúbico
CT	- corpúsculo tímico
Ct	- ciclo de amplificação
<i>d</i>	- distância para cortes macroscópicos
DAB	- Diaminobenzidina
DEPC	- dietil pirocarbonato
DNase	- desoxirribonuclease
dNTP	- desoxirribonucleotídeo fosfato
DP	- desvio padrão
DTT	- ditioneitol

Flt-1	- <i>Fms-like tyrosine kinase 1</i>
Flt-4	- <i>Fms-like tyrosine kinase 4</i>
g	- grama
GAHP	- glicerídeo fosfato desidrogenase
h	- altura
H	- <i>hole</i>
I	- <i>island</i>
I _L	- número de intersecções
INF- γ	- interferon gama
IUR	- <i>Isotropic Uniform Random</i>
k	- distância para cortes microscópicos
kDa	- quilodalton
KDR	- <i>Kinase insert domain containing receptor</i>
L	- comprimento do vaso
Ig	- imunoglobulina
IL-1	- interleucina 1
LSAB	- <i>Labeled streptavidin-biotin complex</i>
LSH	- hormônio estimulante dos linfócitos
LPS	- lipopolissacarídeo
Lv	- densidade de comprimento do vaso
M	- molar
mA	- miliamperagem
mix	- mistura
ml	- mililitro

μl	- microlitro
μm	- micrômetro
mm	- milímetro
mm^2	- milímetro quadrado
mRNA	- ácido ribonucleico mensageiro
n	- número de amostras
$N_{v(\text{vasc})}$	- densidade numérica vascular
$N_{(\text{vasc})}$	- número de vasos
p	- número de pontos
PBS	- solução salina tamponada com fosfato
PCR	- reação em cadeia de polimerase
pH	- potencial hidrogenioiônico
Qa	- número de perfis por área
RNase	- ribonuclease
RT	- transcrição reversa
S	- superfície de área
SDS	- Sódio-Dodecil-Sulfato
SNA	- sistema nervoso autônomo
SRD	- sem raça definida
S_v	- Densidade de superfície de área
$\text{TNF-}\alpha$	- Fator de necrose tumoral alfa
$\text{TGF-}\beta$	- fator transformante do crescimento beta
Tween 20	- Polioxietilinosorbitan monolaurato
V	- voltagem

$V_{(dis)}$	- volume do disector
$V_{(ref)}$	- Volume Referência
VEGF	- fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR-1	- receptor 1 do fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR-2	- receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR-3	- receptor 3 do fator de crescimento endotelial vascular
X_v	- número de Euler
Φ	- seno
θ	- co-seno
Σa	- somatória das áreas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Timo de cão (filhote com 1 dia de idade). Vista ventral. 1, 2 – timo; 1- lobo direito; 2- lobo esquerdo; a-f – pulmão; a- lobo pulmonar direito porção cranial; b- lobo pulmonar direito porção média; c- lobo pulmonar direito porção caudal; d- lobo acessório (pulmão direito); e- porção cranial e e'- porção caudal do lobo pulmonar cranial esquerdo; f- lobo pulmonar caudal esquerdo. Linhas pontilhadas representando o primeiro par de costelas (NICKEL et al., 1981).....	34
Figura 2	Sistemas testes com diferentes ângulos utilizados no método orientador. A - relógio Φ (seno) ou Φ -clock. B - relógio θ (co-seno) ou θ -clock. Fonte: adaptado de Mandarin-de-Lacerda (2003).....	78
Figura 3	Em A, a “reference section” é delimitada por uma área teste com linhas de inclusão (linhas pontilhadas) e de exclusão (linhas cheias). Em B, a “look-up section” é delimitada por uma área teste rígida. Fonte: adaptado Mandarin-de-Lacerda (2003).....	82
Figura 4	Amostragem do disector e estimação dos planos tangenciais. Em A, a superfície convexa do capilar é mostrado na “reference section” e não na “Look-up section”, estruturas chamadas de “Hole”. Em B, uma irregularidade da parede do capilar é observada conferindo uma nova parte isolada chamada de “Island”. Em C, na “reference section” a curvatura é côncava, e na “look-up section” a curvatura é do tipo convexa formando uma divisão do lúmen capilar em dois ou mais lumens, chamadas também de “Bridge”. Fonte: adaptado Kroustrup e Gundersen (2001).....	84
Figura 5	Evolução dos parâmetros macroscópicos e microscópicos no timo de cães em diferentes faixas etárias, machos e fêmeas, obtidos com a análise estereológica comparando as variáveis: volume referência, comprimento, espessura, largura, densidade de comprimento do vaso (L_v), comprimento do vaso (L), densidade de superfície de área (S_v), superfície de área (S), estimação da densidade numérica vascular (N_v), número total de vasos no órgão (N) entre as faixas etárias e o sexo. A: comprimento do timo. B: largura do timo. C espessura do timo. D: Volume referência (V_{ref}). E: densidade de comprimento do vaso (L_v). F: comprimento do vaso (L). G: densidade de superfície de área (S_v). H: superfície de área (S). I: estimação da densidade numérica vascular (N_v). J: número total de vasos no órgão (N). São Paulo, 2010.....	107
Figura 6	Fotomicrografia da localização da proteína VEGF-A em timo de cães. A: feto com 30 dias de desenvolvimento. B: feto com 40 dias de	

	desenvolvimento. C: feto com 50 dias de desenvolvimento. D: recém-nato com 60 dias. E: animal com 6 meses de idade. F: animal com 1 ano de idade. CE: célula epitelial; M: medula; V: vaso sanguíneo.....	112
Figura 7	Fotomicrografia da localização da proteína VEGF-C em timo de cães. A: feto com 30 dias de desenvolvimento. B: feto com 40 dias de desenvolvimento. C: feto com 50 dias de desenvolvimento. D: recém-nato com 60 dias. E: animal com 6 meses de idade. F: animal com 1 ano de idade. M: medula; FT: Formação tímica; RCM: Região cortiço medular; V: vaso; CE: célula epitelial; CT: corpúsculo tímico.....	113
Figura 8	Fotomicrografia da localização da proteína Flt-1 em timo de cães. A: feto com 30 dias de desenvolvimento. B: feto com 40 dias de desenvolvimento. C: feto com 50 dias de desenvolvimento. D: recém-nato com 60 dias. E: animal com 6 meses de idade. F: animal com 1 ano de idade. M: medula; V: vaso; CE: célula epitelial; CT: corpúsculo tímico.....	114
Figura 9	Fotomicrografia da localização da proteína KDR em timo de cães. A: feto com 30 dias de desenvolvimento. B: feto com 40 dias de desenvolvimento. C: feto com 50 dias de desenvolvimento. D: recém-nato com 60 dias. E: animal com 6 meses de idade. F: animal com 1 ano de idade. M: medula; CE: célula epitelial; CT: corpúsculo tímico; FT: Formação Tímica; V: Vaso.....	115
Figura 10	Fotomicrografia da localização da proteína Flt-4 em timo de cães. A: feto com 30 dias de desenvolvimento. B: feto com 40 dias de desenvolvimento. C: feto com 50 dias de desenvolvimento. D: recém-nato com 60 dias. E: animal com 6 meses de idade. F: animal com 1 ano de idade. CE: célula epitelial; CT: corpúsculo tímico; FT: Formação Tímica; VL: Vaso Linfático.....	116
Figura 11	Fotomicrografia da localização da proteína EG-VEGF em timo de cães. A: feto com 30 dias de desenvolvimento. B: feto com 40 dias de desenvolvimento. C: feto com 50 dias de desenvolvimento. D: recém-nato com 60 dias. E: animal com 6 meses de idade. F: animal com 1 ano de idade. CE: célula epitelial; CH: corpúsculo tímico; FT: Formação Tímica; V: Vaso; *: Célula migratória.....	118
Figura 12	Expressão relativa do mRNA (UA) do VEGF-A, VEGF-C, Flt-1, KDR, Flt-4 e EG-VEGF no timo de cães em diferentes fases do desenvolvimento e involução (fetos com 30 dias, fetos com 60 dias, cães jovens com 6 meses de idade e cães adultos com 12 meses de idade). As barras representam a média $\pm$ desvio padrão. Letras (a; b; c) correspondem a diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).....	120
Figura 13	Imunoblot correspondente ao VEGF-A e densidade do VEGF-A em	

	relação à beta-actina no timo de cães durante o desenvolvimento e involução (fetos com 30, 40, 50 e 60 dias, cães jovens com 6 meses de idade e cães adultos com 1 ano de idade). * ($p<0.05$).....	121
Figura 14	Imunoblot correspondente ao VEGF-C e densidade do VEGF-C em relação à beta-actina no timo de cães durante o desenvolvimento e involução (fetos com 30, 40, 50 e 60 dias, cães jovens com 6 meses de idade e cães adultos com 1 ano de idade). * ($p<0.05$).....	122
Figura 15	Imunoblot correspondente ao Flt-1 e densidade do Flt-1 em relação à beta-actina no timo de cães durante o desenvolvimento e involução (fetos com 30, 40, 50 e 60 dias, cães jovens com 6 meses de idade e cães adultos com 1 ano de idade). * ($p<0.05$).....	123
Figura 16	Imunoblot correspondente ao KDR e densidade do KDR em relação à beta-actina no timo de cães durante o desenvolvimento e involução (fetos com 30, 40, 50 e 60 dias, cães jovens com 6 meses de idade e cães adultos com 1 ano de idade). * ($p<0.05$).....	124
Figura 17	Imunoblot correspondente ao Flt-4 e densidade do Flt-4 em relação à beta-actina no timo de cães durante o desenvolvimento e involução (fetos com 30, 40, 50 e 60 dias, cães jovens com 6 meses de idade e cães adultos com 1 ano de idade). * ($p<0.05$).....	125
Figura 18	Imunoblot correspondente ao EG-VEGF e densidade do EG-VEGF em relação à beta-actina no timo de cães durante o desenvolvimento e involução (fetos com 30, 40, 50 e 60 dias, cães jovens com 6 meses de idade e cães adultos com 1 ano de idade). * ($p<0.05$).....	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Tamanho do timo em filhotes de cães (NICKEL et al., 1981).....	35
Tabela 2 -	Descrição dos anticorpos utilizados na imunoistoquímica.....	90
Tabela 3 -	Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação do GAPDH, VEGF-A, VEGF-C, Flt-1, KDR, Flt-4 e EG-VEGF. S= sense, A = anti-sense e P = probe.....	97
Tabela 4 -	Descrição dos anticorpos primários utilizados no western blot.....	100
Tabela 5 -	Valores dos parâmetros macroscópicos obtidos com a análise estereológica do timo de cães nos diferentes grupos etários, machos e fêmeas. (*) diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os sexos, teste Mann-Whitney. São Paulo, 2010.....	104
Tabela 6 -	Valores dos parâmetros microscópicos obtidos com a análise estereológica das variáveis: densidade de comprimento do vaso (L_v), comprimento do vaso (L), densidade de superfície de área (S_v), superfície de área (S), estimação da densidade numérica vascular (N_v), número total de vasos no órgão (N), do timo de cães nos diferentes grupos etários, machos e fêmeas. (*) diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os sexos, teste Mann-Whitney. São Paulo, 2010.....	105

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	24
2 OBJETIVOS.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	29
3.1 HISTÓRICO.....	30
3.2 TOPOGRAFIA DO TIMO.....	32
3.3 FORMAÇÃO DOS DERIVADOS BRANQUIAIS.....	35
3.4 DESENVOLVIMENTO DO TIMO.....	36
3.5 VASCULARIZAÇÃO.....	39
3.6 HISTOLOGIA.....	42
3.7 ORIGEM DOS LINFÓCITOS E DIFERENCIAÇÃO DOS LINFÓCITOS T.....	46
3.8 FUNÇÕES DO TIMO.....	47
3.9 HIPERPLASIA E ATROFIA TÍMICA.....	49
3.10 TIMECTOMIA.....	50
3.11 INFLUÊNCIA DO SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO (SNA).....	51
3.12 INVOLUÇÃO TÍMICA.....	53
3.13 ANGIOGÊNESE E VASCULOGÊNESE.....	56
3.14 VEGF.....	57
3.15 RECEPTORES PARA VEGF.....	62
3.16 AS INTERAÇÕES CELULARES E A MODULAÇÃO DO AMBIENTE TÍMICO PELO VEGF.....	67
3.17 EG-VEGF.....	68
3.18 RECEPTORES PARA EG-VEGF.....	70
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	72
4.1 LOCAL DO EXPERIMENTO.....	73
4.2 COLETA DOS TIMOS.....	73
4.3 ESTEREOLOGIA.....	74
4.3.1 Processamento do material para técnica estereológica.....	75

4.3.2 Volume do órgão ou Volume Referência ($V_{(ref)}$) – Método de Cavalieri.	76
4.3.3 Método Orientador.....	77
4.3.4 Microscopia de luz de cortes semi-finos.....	79
4.3.5 Análise Estereológica.....	79
4.3.5.1 Método Disector Físico – Quantificação vascular.....	80
4.3.5.2 Determinação do Número de Euler no Método de Disector – Número de Estruturas.....	82
4.3.5.3 Estimação da Densidade Numérica Vascular ($N_{v(vasc)}$).....	85
4.3.5.4 Número Total de Vasos no Órgão ($N_{(vasc)}$).....	86
4.3.5.5 Estimação da densidade de comprimento do vaso (L_v), comprimento do vaso (L), densidade de superfície de área (S_v), superfície de área (S).....	86
4.3.6 Análise Estatística.....	87
4.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA O SISTEMA VEGF (VEGF-A, VEGF-C, FLT-1, KDR E FLT-4) E EG-VEGF.....	88
4.4.1 Inclusão em Paraplast.....	88
4.4.2 Reação de imuno-histoquímica.....	89
4.5 REAL TIME PCR.....	91
4.5.1 Extração do RNA Total.....	91
4.5.2 Quantificação do RNA total.....	92
4.5.3 Transcrição Reversa (construção da fita DNA complementar – cDNA).	93
4.5.4 Real Time PCR - ABIPRIMS® 7500 Sequence Detections Systems (Applied Biosystems®).....	94
4.5.5 Primers.....	96
4.6 WESTERN BLOT.....	98
4.6.1 Extração de proteína.....	98
4.6.2 Técnica Western Blot.....	98
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	100
5 RESULTADOS.....	101
5.1 ESTEREOLOGIA.....	102
5.2 IMUNOLOCALIZAÇÃO.....	108
5.2.1 VEGF-A, VEGF-C, Flt-1, KDR e Flt-4.....	110

5.2.2 EG-VEGF.....	117
5.3 EXPRESSÃO DO mRNA DO VEGF-A, VEGF-C, Flt-1, KDR, Flt-4 E EG-VEGF NO TIMO DE CÃES.....	119
5.4. WESTERN BLOT.....	121
6 DISCUSSÃO.....	127
7 CONCLUSÃO.....	140
REFERÊNCIAS.....	142

Introdução

1 INTRODUÇÃO

As respostas imunes são condições que devem e precisam ser reguladas e para tanto, vários mecanismos são impostos. Assim, os linfócitos devem ser selecionados de maneira que, uma vez produzidos, somente reajam a antígenos estranhos e não a antígenos próprios.

Os órgãos do sistema linfóide podem, portanto, ser classificados com base nas suas funções, na geração de linfócitos e na regulação da produção de linfócitos, proporcionando um ambiente adequado para a interação entre o antígeno processado e as células sensíveis a antígenos. Com isso, as respostas imunológicas naturais ou induzidas que estão de diferentes formas relacionadas às estruturas do sistema linfático, muitas vezes são intermediadas e coordenadas pelo timo.

Na vida fetal e no período neonatal o timo é o órgão com maior importância imunológica e, anatomicamente é o maior órgão linfático com maior atividade linfopoética, constando como precursor da linfopoese, demonstrando também relações com o sistema endócrino, principalmente com a função gonadal (DRUMMOND, 1996).

Estudos confirmam a importância do timo no desenvolvimento e manutenção do sistema imunológico e endócrino, particularmente no que tange as gônadas, as quais se tornam comprometidas em animais recém-nascidos submetidos à timectomia (MACHADO, 1989; APPOLINÁRIO, 1998).

O significativo papel do timo na imunidade é demonstrado em algumas espécies pela timectomia neonatal. Isso causa o enfraquecimento da reação de hipersensibilidade retardada. A habilidade para produzir respostas mediadas por anticorpos também fica prejudicada, uma vez que a produção de anticorpos requer a colaboração das células T (BANKS, 1991).

Mas desde a primeira descrição do timo, feita possivelmente por Aristóteles, muito tempo se passou para que os pesquisadores se voltassem para o estudo do timo. Apesar dos esforços, muitas das funções não foram totalmente esclarecidas, tampouco as bases morfológicas que respondem por tais funções, além daquelas relativas ao processo de desenvolvimento e involução, que ainda não estão adequadamente respondidas.

O estudo da vascularização do timo nas diferentes espécies, em especial nas que podem ser utilizadas como modelo experimental é de real necessidade, já que irrigação e drenagem sanguíneas são elementos importantes na funcionalidade e na preservação tecidual de qualquer órgão.

A caracterização dos processos de formação, manutenção e involução dos órgãos é fundamental para a compreensão de como o sistema imune se desenvolve, quais mecanismos estão prontos para proteger o neonato quando da primeira invasão microbiana e o que pode ser feito para aumentar a resistência neonatal a patógenos (SINKORA et al., 2002). Sendo o timo modulador da atividade dos demais órgãos linfóides, o conhecimento dos mecanismos que desencadeiam o seu desenvolvimento, maturação e involução, é imprescindível para o entendimento da atividade de todo o sistema linfóide.

Fatores angiogênicos como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) são essenciais para a formação do leito vascular tecidual (PLENDL, 2000) e para a modulação de funções não diretamente relacionadas à vascularização como migração e proliferação celular (YOSHIDA et al., 1996), produção hormonal (YAMASHITA et al., 2008) e, ainda, a mais recente função atribuída a este fator de crescimento, a imunomodulação (KISELEVA et al., 2005), que torna o conhecimento de sua expressão no timo um passo fundamental em direção ao entendimento das interações célula-célula no órgão.

A expressão de fatores angiogênicos, como o VEGF (vascular endothelial growth factor) e o bFGF (basic fibroblast growth factor) na placenta já está bem estabelecida, o contrário ocorre no timo. No entanto, outro fator de crescimento vascular endotelial denominado de EG (endocrine gland derived)-VEGF, expresso em glândulas endócrinas, parece desempenhar papel importante na vasculogênese placentária e tímica.

O conhecimento do comportamento vascular, de sua estrutura, das interferências que ocorrem na angiogênese, no desenvolvimento e na involução do timo, bem como os reflexos que tais eventos determinam sobre a marcação imunológica dos animais podem esclarecer diversas entidades ainda não caracterizadas adequadamente como doenças auto-imunes, tumores tímicos, persistência tímica e outras ligadas ao comprometimento imunitário, auxiliando assim, na clínica veterinária.

Diante desses aspectos, torna-se justificável a importância do estudo da relação do comportamento vascular do timo durante o seu desenvolvimento e involução, com a expressão de fatores angiogênicos como o sistema VEGF e do EG-VEGF.

Objetivos

2 OBJETIVOS

Realizar a curva de crescimento vascular do timo de cães durante o desenvolvimento e involução, comparando a expressão temporal do sistema VEGF e do EG-VEGF nas diferentes faixas etárias (fetos com 30, 40, 50 e 60 dias, e cães filhotes e adultos com 6 meses e 12 meses de idade).

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a curva de desenvolvimento vascular durante o desenvolvimento e involução do timo entre cães machos e fêmeas utilizando parâmetros estereológicos;
- Determinar, por meio de imuno-histoquímica, a localização tecidual do sistema VEGF (VEGF-A, VEGF-C, VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/KDR e VEGFR-3/Flt-4) e do EG-VEGF no timo de cães em diferentes faixas etárias durante o desenvolvimento e involução;
- Estudar a expressão temporal gênica e protéica do sistema VEGF e do EG-VEGF no timo de cães.

Revisão de Literatura

3 REVISÃO DE LITERATURA

As respostas imunes são condições que devem e precisam ser reguladas, e para tanto vários mecanismos são impostos. Assim, os linfócitos devem ser selecionados de maneira que, uma vez produzidos, somente reajam a antígenos estranhos e não a antígenos próprios. Semelhantemente, a resposta de cada linfócito deve ser regulada de forma que seja suficiente, mas não excessiva, para as necessidades do corpo.

Os órgãos do sistema linfóide podem, portanto, ser classificados com base nas suas funções, na geração de linfócitos e na regulação da produção de linfócitos, proporcionando um ambiente adequado para a interação entre o antígeno processado e as células sensíveis a antígenos. Com isso, as respostas imunológicas naturais ou induzidas que estão de diferentes formas relacionadas às estruturas do sistema linfático, muitas vezes são intermediadas e coordenadas pelo timo.

Mas desde a primeira descrição do timo, feita possivelmente por Aristóteles, muito tempo se passou para que os pesquisadores se voltassem para o estudo do timo. Apesar dos esforços, muitas das funções não foram totalmente esclarecidas, tampouco as bases morfológicas que respondem por tais funções, além daquelas relativas ao processo de desenvolvimento e involução, que ainda não estão adequadamente respondidas.

Com o intuito de oferecer um melhor entendimento, estão compilados e apresentados os informes propostos pelos tratadistas e trabalhos específicos referentes ao timo.

3.1 HISTÓRICO

Por séculos, o timo permaneceu como um órgão enigmático e com funções desconhecidas, tendo sido o último dos grandes órgãos do corpo a ter as funções reveladas. A origem da palavra timo (thymus, em latim e em inglês) parece incerta: alguns alegam que é proveniente do latim, pela semelhança notável do órgão com a folha da planta *Thymus vulgaris*, outros acreditam que deriva do grego antigo - θυμὸς - que é traduzida amplamente como alma,

coração, coragem, mente, vontade ou propósito. Os gregos antigos, que faziam rituais com sacrifícios de animais muito jovens, notaram uma grande massa de tecido no tórax, logo acima do coração, que se estendia até o pescoço, e, então, concluíram que este órgão seria a sede da alma (LIMA; CARNEIRO-SAMPAIO, 2007).

Até as primeiras décadas do século 20, o timo na infância não foi destacado, as autópsias realizadas em crianças mortas por doenças tais como a difteria, geralmente apresentavam o timo reduzido de tamanho como resultado do estresse durante a doença, esse tamanho era, então, considerado normal. Quando mortes infantis ocorriam por outros motivos, como durante cirurgias, a fatalidade era atribuída ao grande timo, que se pensava interferir na respiração, condição denominada de *status thymolymphaticus*. Alguns médicos passaram, então, a recomendar a irradiação para diminuir o tamanho do timo, desconhecendo que alguns dos pacientes poderiam vir a desenvolver adenocarcinoma da glândula tireóide (MILLER, 2002).

Na década de 1950, o timo foi reconhecido como um sítio de produção de linfócitos, e a competência imunológica de linfócitos circulantes foi demonstrada por Billingham e Growans no final da década de 1950 e início de 1960, respectivamente (BILLINGHAM; BRENT; MEDAWAR, 1956; GOWANS; GESNER; MCGREGOR, 1961).

Entretanto, embora soubesse que o timo era um órgão produtor de linfócitos, os imunologistas não acreditavam que este tivesse alguma função imunológica, pois as principais características de resposta imune, como a plasmocitopoiese e a formação de centros germinativos, não eram observadas no timo de animais normais após a imunização. Além disso, os linfócitos do timo, ao contrário das células de outros tecidos linfóides, não eram capazes de iniciar ou transferir uma resposta imune ao antígeno em receptores apropriados; e os animais timectomizados na vida adulta produziam resposta celular e humoral tão eficientemente quanto os animais jovens. Muitas questões a respeito da embriologia, anatomia, fisiologia, patologia e significado clínico do timo persistiram até 1961, quando Miller demonstrou pela primeira vez o papel fundamental do timo para o estabelecimento e desenvolvimento do sistema imune normal. Utilizou experimentos com camundongos timectomizados imediatamente após o nascimento. Como resultado da timectomia neonatal os animais apresentaram tecido linfóide pobremente desenvolvido, resposta imune prejudicada e maior suscetibilidade a infecções recorrentes (MILLER, 1961; LIMA; CARNEIRO-SAMPAIO, 2007).

Em 1967, Miller e Mitchel demonstraram que os linfócitos desenvolvidos no timo, até então tidos como imunocompetentes, podiam responder à antígenos com proliferação, dando origem a uma progênie de células não produtoras de anticorpos, porém com outras habilidades, como auxiliar as células produtoras de anticorpos no desempenhar de seu papel. Em outros experimentos, os mesmos, observaram o efeito do estímulo antigênico e concomitante injeção de células provenientes do timo, da medula óssea, ou coletadas no ducto torácico, em camundongos irradiados ou timectomizados logo após o nascimento. Foi a primeira demonstração inequívoca da existência, em espécies mamíferas, de dois grupos de linfócitos interativos, as células T e B. Estes dados provocaram uma evolução no conhecimento dos fenômenos imunológicos, como a tolerância, memória e autoimunidade.

O desenvolvimento neste campo teve a destacada contribuição do brasileiro Mendes e seus colaboradores (1973), que observaram pela primeira vez a capacidade de ligação das hemácias de carneiro aos linfócitos T, mas não aos linfócitos B, e padronizaram uma técnica simples e de baixo custo para identificar e diferenciar linfócitos T e B no sangue periférico e nos tecidos. Este método foi largamente utilizado até o advento dos anticorpos monoclonais no começo da década de 80.

Alguns dos mais recentes avanços nas diversas áreas da biologia do timo, especialmente nos últimos 5 anos, incluem a organogênese do timo, a regulação transcricional que induz à escolha/decisão do tipo celular que se desenvolverá no ambiente intratímico, e a migração, regulada por quimicinas, de precursores de células T através dos diferentes micro-ambientes tímicos (LIMA; CARNEIRO-SAMPAIO, 2007).

3.2 TOPOGRAFIA DO TIMO

O timo é encontrado no espaço mediastinal cranial. Entretanto, nos bovinos, ovinos, suínos e aves ele se estende pelo pescoço até próximo da glândula tireóide. O tamanho do timo pode variar consideravelmente, sendo que seu tamanho relativo máximo ocorre em animais recém-nascidos, e seu tamanho absoluto máximo durante a puberdade. Após a puberdade ocorre atrofia do parênquima tímico e o córtex é substituído por tecido adiposo, mas resquícios do timo

torácico podem persistir em muitos animais até a idade avançada. Além desta relação idade-involução, o timo também sofre rápida atrofia em resposta ao estresse, de modo que o timo de animais que morrem após doença prolongada pode ser anormalmente pequeno (TIZARD, 2000).

Classicamente, o timo é descrito como um órgão de coloração cinza amarelado pálido que no cão localiza-se no espaço mediastínico cranial, entre os dois pulmões, e sua extremidade caudal é moldada na superfície cranial do pericárdio (EVANS; CHRISTENSEN, 1979).

Em cães jovens o timo apresenta coloração rósea e discretas lobulações. Apresenta apenas a parte torácica, sendo esta dividida incompletamente em um largo lobo direito e um pequeno lobo esquerdo (*lobus dexter et sinister*). Quando atinge seu desenvolvimento máximo o timo apoia-se sobre o esterno. Seu pólo cranial localiza-se abaixo da traquéia e estende-se além do primeiro par de costelas (cerca de 5 mm). Esta protusão não pode ser interpretada como parte cervical. Seu limite caudal estende próximo a quinta e sexta cartilagem costal, onde termina com o pericárdio tendo uma separação distinta dos lobos direito e esquerdo. O volumoso lobo direito estende-se dorsalmente ao longo da superfície cranial do pericárdio, enquanto o lobo esquerdo tendo menor proporção deita-se, com uma larga base, contra o esterno. O lobo esquerdo ventralmente na cavidade torácica aparenta ser mais largo (Figura 1). A parte cranial de ambos os lobos é fusionada medialmente com tecido conjuntivo.

O timo relaciona-se dorsalmente com a traquéia, ventralmente com o nervo frênico e veia cava. A superfície lateral possui discretas depressões dos lobos pulmonares. Ventralmente a artéria e veia torácica interna penetram no tecido tímico (NICKEL et al., 1981).

Figura 1 – Timo de cão (filhote com 1 dia de idade). Vista ventral. 1, 2 – timo; 1- lobo direito; 2- lobo esquerdo; a-f – pulmão; a- lobo pulmonar direito porção cranial; b- lobo pulmonar direito porção média; c- lobo pulmonar direito porção caudal; d- lobo acessório (pulmão direito); e- porção cranial e e'- porção caudal do lobo pulmonar cranial esquerdo; f- lobo pulmonar caudal esquerdo. Linhas pontilhadas representando o primeiro par de costelas (NICKEL et al., 1981)

Nos cães, até o nascimento o timo é relativamente largo, mas seu crescimento continua durante as próximas semanas depois do nascimento. Após a quarta semana de vida seu peso diminui gradativamente (NICKEL et al., 1981). O tamanho e a espessura do timo varia com o tempo de vida e o tamanho da raça dos cães (Tabela 1).

Tabela 1 – Tamanho do timo em filhotes de cães (NICKEL et al., 1981)

	Raças de pequeno porte		Raças de grande porte	
	Comprimento	Espessura	Comprimento	Espessura
Logo após o nascimento	1,02 - 2,22 cm	0,66 - 1,09 cm	1,40 - 2,23 cm	0,66 - 1,20 cm
Primeira e segunda semana de vida	1,32 - 2,73 cm	0,41 - 1,32 cm	1,53 - 3,68 cm	0,78 - 1,99 cm
Terceira e oitava semana de vida	Não há dados		4,53 - 6,00 cm	1,85 - 2,60 cm

3.3 FORMAÇÃO DOS DERIVADOS BRANQUIAIS

O timo deriva de invaginações do ectoderma no pescoço e tórax do embrião em desenvolvimento que formam estruturas chamadas de arcos branquiais (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

As cinco bolsas faríngeas existentes no embrião humano são anexos do intestino faríngeo, que originam estruturas, pela maior parte, independentes do aparelho digestivo (COSTA, 1957).

A primeira bolsa faríngea origina o epitélio da orelha média, caixa timpânica e tuba auditiva (COSTA, 1957).

O epitélio da segunda bolsa faríngea corresponde ao das criptas da amígdala faríngea. No mesênquima que o rodeia formam-se os folículos linfóides deste órgão, entre o terceiro e o quarto mês no humano (COSTA, 1957).

A terceira bolsa faríngea ramifica-se em parte dorsal e parte ventral. A parte dorsal origina um gomo epitelial maciço do qual provém a glândula tireóidea externa; a parte ventral origina um grande gomo, canaliculado ao princípio, depois maciço que cresce em direção ao tórax, passa pela linha média onde se encontra com o do lado oposto e vem constituir um órgão epitelial mediano. Este órgão é o timo. Os seus esboços provenientes da terceira bolsa faríngea são conhecidos por

thymus III. Tanto o esboço paratireoideo, como o tímico, isolam-se da faringe desde o segundo mês no humano (COSTA, 1957).

A quarta bolsa faríngea também se divide em parte dorsal, matriz da paratiroideia interna e parte ventral, muito reduzida no humano. Seria o esboço tímico acessório (*thymus IV*), considerado, por outros, como esboço tireoideu lateral. Qualquer destes esboços também cedo se isola da faringe (COSTA, 1957).

A quinta bolsa faríngea, órgão rudimentar, dá no embrião o chamado *corpo último-branquial* que, segundo alguns, se incorpora no esboço tireóideo, mas cujo destino ulterior é ainda discutido (COSTA, 1957).

De todos estes órgãos somente a trompa de Eustáquio e a amígdala faríngea conservam ligações anatômicas com a faringe. Paratireóide e timo tornam-se independentes do aparelho digestivo. O timo *torácico*, derivado da terceira bolsa faríngea, desenvolve-se muito e no homem vem a ocupar o mediastino, por detrás da fúrcula esternal. O timo *cervical*, que fica no pescoço, provém ou de uma porção indiferenciada da terceira bolsa, ou da quarta bolsa faríngea (timo IV). A participação epiblastica na formação do timo, descrita em certas espécies, não é admitida por todos. O timo perde a sua estrutura epitelial para adquirir a estrutura *sui-generis*, parecida com a dos órgãos linfóides, que faz muitos histologistas o classificarem no grupo destes órgãos (COSTA, 1957).

3.4 DESENVOLVIMENTO DO TIMO

O timo tem origem a partir das terceiras bolsas faríngeas, embora haja certa dúvida sobre a exata contribuição feita pelo endoderma e pelo mesoderma subjacente e mesmo sobre a suposta contribuição ectodérmica em algumas espécies. As formações tímicas descem pelo pescoço ao lado da traquéia e invadem o mediastino, no qual se estendem até o pericárdio. A parte cervical regride prematuramente em muitas espécies (incluindo o cão) e o timo aparece, então, como um órgão mediano único, cuja natureza bilateral é tudo, menos óbvia. Em seu apogeu, é uma estrutura lobulada (com algumas semelhanças a uma glândula salivar) que ocupa a parte ventral do mediastino cranial, ajustando-se ao redor dos outros conteúdos deste espaço (DYCE, 2004).

Estruturalmente o timo distingue-se dos demais órgãos linfóides por apresentar um estroma primariamente epitelial, constituído por elementos endo e ectodérmicos. Nos roedores estes elementos derivam da 3ª bolsa faríngeana, em associação com componentes mesodérmicos (CORDIER; HAUMONT, 1980; PICKER; SIEGELMAN, 1993). Uma interação entre os diferentes epitélios e os derivados da crista neural é necessária para o completo desenvolvimento tímico.

Segundo Didio (2002), embriologicamente, o timo é uma glândula par, porém, as faces mediais das suas primitivas estruturas direita e esquerda estão em contato íntimo, semelhante a um órgão ímpar bilobulado. Assim, as partes do timo são denominadas lobos direito e esquerdo, constituídos por lóbulos parciais ou totalmente envolvidos por cápsulas finas de tecido conjuntivo.

O epitélio do timo é derivado da camada endodérmica, com possíveis contribuições do ectoderma. Uma série de diferenciações dependentes do controle de interações celulares aperfeiçoa o desenvolvimento e a função do timo (BOCKMAN, 1997).

O timo desenvolve-se da região faríngea do embrião. A faringe embriológica é importante para origem de muitos órgãos, incluindo a glândula tireóide e a paratireóide, como também o timo. Os estudos destes desenvolvimentos ajudam no esclarecimento de defeitos que estão associados com as alterações no desenvolvimento do timo (BOCKMAN, 1997).

Estudos mostram que durante o contato das células do endoderma com as células do ectoderma na membrana faríngea, o ectoderma incorpora-se no epitélio primitivo (CORDIER; HAUMONT, 1980). Inclusões de células no desenvolvimento do timo esclarecem algumas heterogenicidades das células epiteliais que ocupam o timo maturo, estes subtipos celulares são identificados por marcadores antigênicos (DESOUZA; SAVINO, 1993; DESOUZA et al., 1993; PAZ et al., 1993).

A 3ª bolsa faríngea prolifera e sua parte dorsal forma uma massa celular formando a glândula tireóide. As demais células formam o epitélio primordial do timo. A parte ventral continua o desenvolvimento conduzindo para a separação da bolsa (BOCKMAN, 1997).

A massa celular que forma o epitélio primordial do timo atrai células precursoras de linfócitos que chegam pelos vasos sanguíneos e migram através do mesênquima para o epitélio do órgão primitivo (BOCKMAN, 1997).

A influência das células mesenquimais é necessária para a proliferação e diferenciação de células epiteliais que abrangem o timo primordial. Esta interação entre o endoderma da 3ª bolsa faríngea e o mesênquima da crista neural foi verificada por Auerbach (1960). Auerbach, estudando o desenvolvimento do timo em ratos, observou após 12 dias de gestação alta proliferação no timo, este fato não ocorre quando se remove o mesênquima comum, o que está presente no desenvolvimento de demais órgãos, inclusive no desenvolvimento do timo. Quando se usa o mesênquima do pulmão ou da glândula submandibular ocorre retardo no desenvolvimento do timo.

A contribuição do ectoderma da fenda da 3ª bolsa faríngea tem sido sugerido através de estudos histológicos que comparam o desenvolvimento do timo em várias espécies de embriões, verificando um contato entre o endoderma e o ectoderma. Entretanto, Gordon et al. (2004) não observaram este contato em ratos, sugerindo assim, a origem apenas do endoderma sendo suficiente para estabelecer uma organização e função do timo.

O mesênquima que compõe o arco faríngeo, a região da faringe, é derivado da crista neural. A crista neural origina-se da proliferação de um grupo de células que migram ventrolateralmente da parte dorsal do tubo neural. Alguns agregados, como os gânglios simpáticos, originam componentes neurais (BOCKMAN, 1997).

Para o desenvolvimento do timo são necessárias a migração e proliferação das células da crista neural para o interior da região faríngea. Elas interagem por contato ou através de secreções moleculares, com o epitélio do endoderma faríngeo, induzindo proliferação, migração e diferenciação da massa epitelial. Quando se torna competente, o timo primordial adquire um microambiente competente, propício para maturação de timócitos e diferenciação de células T (GORDON et al., 2004).

Diante destes achados, a hipótese de origem do timo que prevalece é a de “origem dual”, a qual diz que forma-se um rudimento tímico de natureza reticuloepitelial e de origem endo-ectodérmica derivadas das terceiras bolsas faríngeas e fenda branquial. O retículo do epitélio cortical tímico é de origem ectodérmica, enquanto o retículo do epitélio medular tímico é de origem endodérmica. Nesta bolsa se formam tubos de células epiteliais que vão crescendo em forma de cordões caudalmente até o tórax. Os cordões perdem a comunicação com sua origem e se transformam na medula do timo. Durante sua migração, decorrente de sua aderência ao pericárdio visceral, o rudimento tímico é invadido por vasos sanguíneos que serão os portadores

dos precursores de timócitos, células dendríticas, macrófagos e mastócitos. As células reticulares epiteliais emitem prolongamentos e formam septos, corpúsculos de Hassal e as áreas corticais que serão ocupadas pelos linfócitos T em maturação. Posteriormente, inicia-se a tração pelo pericárdio, que leva o timo até sua posição anatômica no mediastino anterior na maioria dos animais, sendo que o timo se mantém no extramediastino cervical nas aves e branquial nos peixes (VAN EWIJK et al., 2000; GRAY et al., 2005).

Embora num primeiro momento estudos relatem que o timo tenha derivado das células epiteliais de ambas as origens endodérmica e ectodérmica, recentemente experimentos em aves e camundongos, via transplante ectópico, demonstraram conclusivamente que as células epiteliais tímicas são exclusivamente de origem endodérmica, deste modo, refutando o modelo de “origem dual” de ontogenia epitelial tímica e aceitando um novo modelo de “origem única” (ANDERSON; JENKINSON, 2001; BLACKBURN; MANLEY, 2004; BARTBLOTT et al., 2006).

3.5 VASCULARIZAÇÃO

Quanto à irrigação do timo maduro, esta apresenta características peculiares; nas quais os capilares e pequenos vasos destinados ao órgão não apresentam poros, mas sim uma membrana basal espessa, envolvida por uma camada de células epiteliais com prolongamentos finos que perfuram a lâmina basal e podem entrar em contato com as células reticulares epiteliais, porém, esta membrana não é totalmente contínua, mas atua como uma barreira hematotímica dificultando, embora não impedindo totalmente, a passagem de antígenos ou macromoléculas do sangue para o interior do parênquima e, conseqüentemente, o seu contato com os linfócitos do órgão (SILVA et al., 2001). Segundo Junqueira e Carneiro (1999), esta barreira só existe na região cortical do timo.

Durante o desenvolvimento embriológico do timo, os vasos sanguíneos penetram no interior do parênquima acompanhando o tecido conjuntivo derivado da cápsula, formando espaços perivasculares ao redor dos vasos (KATO, 1997).

O timo não possui vasos linfáticos aferentes e não constitui um filtro para a linfa, como ocorre nos linfonodos. Os poucos vasos linfáticos encontrados no timo são todos eferentes e localizam-se nas paredes dos vasos sanguíneos e no tecido conjuntivo dos septos e da cápsula do órgão, formando uma rede linfática de capilares (JDANOV, 1960) que sofrem uma involução com o órgão (KATO, 1997; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

As vênulas da região medular confluem para formar veias que penetram nos septos conjuntivos e saem do timo pela cápsula do órgão. Já, as artérias penetram no timo pela cápsula, se ramificam, seguindo os septos conjuntivos onde originam arteríolas que penetram no parênquima seguindo os limites entre a cortical e a medular. Estas arteríolas formam capilares que entram na cortical, se ramificam e se anastomosam, dirigindo-se para a medular, onde desembocam em vênulas. A medular recebe outros capilares diretamente das arteríolas do limite córtico-medular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

Os vasos no timo apresentam uma arquitetura típica caracterizada por grandes vasos localizados na junção córtico-medular, estes por sua vez, se ramificam e promovem anastomoses formando uma rede vascular no córtex. As bases moleculares para a formação dessa arquitetura vascular é desconhecida (MÜLLER et al., 2005).

Tratadistas clássicos como Martin (1902); Martin e Schauder (1938) e Ellenberger e Baum (1977) descrevem o suprimento sanguíneo do timo pelos ramos das artérias carótida comum, subclávia e torácica interna; Koch (1963) acrescenta a estas o tronco braquiocefálico. Entretanto o fazem supostamente para os ruminantes, visto não fazerem alusão direta à espécie.

Bradley e Grahame (1948) relatam a irrigação do timo a partir das artérias torácicas internas, enquanto outros autores como Bruni e Zimmerl (1951); Schwarze e Schroder (1972); Ellenberg e Baum (1977) e Dyce et al. (2004), referem-se de forma genérica à irrigação do timo, onde não especificam o animal ou não abordam o assunto relativo aos cães, tratando principalmente da irrigação do timo em bovinos e equinos.

Bruni e Zimmerl (1977) citam como responsáveis para a nutrição do órgão ramos oriundos das artérias torácica interna e pericárdica e para a parte cervical do timo, colaterais das artérias tireoidea caudal e carótida comum. Estes autores se referem ainda, à existência de corpúsculos tímicos acessórios, afirmando que são corpúsculos minúsculos das paratireóides, independentes do timo, tendo deste a mesma estrutura, sendo encontrados frequentemente nos

ruminantes, gato e coelho, às vezes também no cavalo. Nas condições típicas, são em número de quatro, dois para cada antímero.

Evans e Christensen (1979) citam ramos tímicos oriundos das artérias torácicas internas (direita e esquerda) como sendo as principais artérias responsáveis pela irrigação do timo. Ocasionalmente o timo recebe ramos do tronco braquiocefálico do lado direito e subclávia do lado esquerdo.

Evans e Delahunta (1980) afirmam que o suprimento sanguíneo do timo de cães é feito através de ramos tímicos das artérias torácicas internas direita e esquerda, pericardicofrênica, primeira intercostal e troncos costocervical e braquiocefálico.

Schummer et al. (1981) descrevem as artérias responsáveis pela irrigação do timo em várias espécies animais: nos carnívoros a artéria torácica interna penetram o tecido tímico; nos ruminantes o timo torácico é irrigado por um ramo de maior calibre emitido do tronco braquiocefálico e um ramo menos calibroso da artéria torácica interna esquerda, e em algumas ocasiões é nutrido por um ramo procedente da artéria vertebral. Quanto aos suínos e equinos mencionam que o suprimento arterial e nervoso não havia sido bem estudado até aquela data, mas provavelmente é semelhante ao do bovino.

Para Venzke (1986) o timo em ruminantes, equinos e suínos é nutrido principalmente por ramos das artérias carótida comum, torácica interna e pericardicofrênica; no cão a irrigação procede de ramos das artérias torácicas interna e timopericárdica, um ramo que nem sempre está presente emitido do tronco braquiocefálico, e, na ausência deste vaso o timo recebe suprimento sanguíneo da artéria torácica interna esquerda; no gato a nutrição deste órgão deve-se a ramos da artéria pericardicofrênica.

Outros autores que dedicaram seus estudos especificamente ao timo, e em especial ao dos carnívoros, entre eles Santos et al. (1988), que realizaram suas pesquisas em fetos de gatos, afirmam que nestes animais o órgão recebe ramos oriundos das artérias torácica interna direita, torácica interna esquerda, subclávia esquerda e tronco braquiocefálico.

Evans (1993) relata que no cão o principal aporte arterial do órgão deve-se a um ou dois ramos tímicos, originados da artéria torácica interna direita e esquerda destinados respectivamente a cada lobo tímico e, ocasionalmente podem estar presentes um ramo tímico emitido do tronco braquiocefálico do lado direito e da artéria subclávia do lado esquerdo.

Dentre os carnívoros, os caninos apresentam o timo proporcionalmente maior que os felinos, conseqüentemente apresentam também uma vascularização mais diversificada (SILVA et al., 1994).

Ao analisar o suprimento arterial do timo em 30 fetos e natimortos de cães sem raça definida, Silva et al. (1994) verificou que o órgão é irrigado por ramos diretos e indiretos das artérias torácicas interna direita e esquerda, tronco braquiocefálico, pericardiofrênicas direita e esquerda, troncos costocervical direito e esquerdo, subclávias direita e esquerda; identificando modalidades de vascularização próprias para cada peça.

Agreste (2005) em estudo sobre a vascularização do timo em fetos de cães machos e fêmeas, com 30, 40, 50 e 60 dias de desenvolvimento observou que os timos das fêmeas apresentaram maior volume (V_{ref}) e dimensões de tamanho, e menor densidade numérica vascular - $N_{v(vasc)}$ e número total de vasos - $N_{(vasc)}$ que nos machos. Todas as variáveis estereológicas estudadas (densidade de comprimento do vaso - L_v , comprimento do vaso - L , densidade de superfície de área - S_v , superfície de área - S , densidade numérica vascular - $N_{v(vasc)}$, número total de vasos no órgão - $N_{(vasc)}$) mostraram aumento gradativo de acordo com as faixas etárias, sendo que nas fêmeas os valores eram maiores do que machos, com exceção da densidade de comprimento do vaso (L_v), densidade numérica vascular ($N_{v(vasc)}$) e número total de vasos no órgão ($N_{(vasc)}$), onde os valores nos machos eram maiores. Os vasos observados na microscopia de luz de cortes semi-finos, aumentaram de tamanho gradativamente, assim como a densidade numérica vascular ($N_{v(vasc)}$) e número total de vasos no órgão ($N_{(vasc)}$), sendo mais evidente nos animais com 60 dias de gestação, próximo ao nascimento. Com esses dados encontrados e com a proximidade do nascimento, acredita-se que ocorram alterações mediadas por hormônios de fatores angiogênicos provocando um aumento não somente no número e densidade vascular, como também no tamanho dos vasos nos recém-natos com 60 dias.

3.6 HISTOLOGIA

Histologicamente a cápsula e o septo do timo consistem de tecido conjuntivo areolar frouxo e tecido adiposo (MELO; LAGE, 1987). O tecido intersticial do parênquima contém

poucas fibras de tecido conjuntivo reticular, muitas das quais parecem estar concentradas ao redor dos vasos sanguíneos (VENZKE, 1986).

O tecido conjuntivo que constitui a cápsula apresenta uma preponderância de fibras colágenas sobre fibras elásticas e tanto umas como outras, podem surgir em quantidade aumentada, formando espessamentos, em pontos de junção da cápsula com a veia jugular ou outros vasos (FIRTH, 1977).

O timo do animal adulto apresenta-se dividido em lóbulos que variam de tamanho dependendo da espécie, em cada um dos quais evidenciam-se dois compartimentos: um córtex bem desenvolvido e a medula, contendo elementos linfóides e não-linfóides imunofenotipicamente distintos. Um grande número de lóbulos pode estar interligado através da continuidade de suas porções medulares (VENZKE, 1986; DIJKSTRA; SMINIA, 1990; PEARSE, 2006).

O timo é composto por dois compartimentos distintos, um primariamente linfóide, o córtex, e outro periférico, a medula, compreendendo tanto APCs (células apresentadoras de antígenos) como linfócitos maduros, indicando a possibilidade da montagem de uma resposta imune nesse território (DIJKSTRA; SMINIA, 1990). Assim, durante uma resposta imune ou em condições patológicas, linfócitos B e plasmócitos podem ascender ao timo, eventualmente até gerando a formação de folículos, porém restringindo-se à região medular (XAVIER, 1999).

O córtex se caracteriza pela presença de grande número de células semelhantes a pequenos linfócitos, chamados timócitos, e poucas células reticulares primitivas de origem endodérmica que se encontram espalhadas (VENZKE, 1986; VON GAUDECKER, 1991).

O estroma tímico exerce marcante influência sobre a proliferação e diferenciação desses linfócitos T pela secreção de vários hormônios e de interações celulares (VENZKE, 1986; VON GAUDECKER, 1991).

Alguns estágios de maturação requerem contato celular direto mediado por receptores, estabelecendo verdadeiros complexos linfo-estromais ou linfo-epiteliais localizados corticalmente no timo. As células “nurse” tímicas são estruturas multicelulares linfoepiteliais formadas por uma célula epitelial tímica que abriga 20-200 timócitos, carregando primeiramente o fenótipo duplo-positivo CD4/CD8, embora timócitos imaturos duplo negativos, bem como, células maduras simples positivas também possam ser encontradas. Estas células estão presentes em região cortical e promovem um microambiente distinto para a maturação desses timócitos (VAN DE

WIJNGAERT et al., 1984; PHILP et al., 1993; MAGALHÃES, 2007). Macrófagos também participam dessas interações, particularmente na apresentação de antígenos próprios, culminando na geração de tolerância e na fagocitose de corpos apoptóticos (KROEMER, 1995).

Na medula observa-se maior proporção de células epiteliais e poucos linfócitos, identificando-se ainda células interdigitantes, importantes na apresentação de antígenos às células maduras (SUSTER; ROSAI, 1990).

Entre esses compartimentos evidencia-se uma região transicional, a chamada junção córtico-medular, caracterizada por grande número de vasos, em geral arteríolas, circundadas por tecido conjuntivo perivascular, albergando linfócitos B e plasmócitos (SAINT-MARIE et al., 1986).

Estudos ultra-estruturais e imunocitoquímicos têm demonstrado a existência de subtipos de células epiteliais corticais e medulares, refletindo diferenças em relação à sua origem e função (VAN DE WIJNGAERT et al., 1984; VON GAUDECKER, 1991).

Imediatamente abaixo da cápsula identifica-se o epitélio subcapsular perivascular, que delimita toda a superfície e os espaços perivasculares do órgão, apresentando-se achatado e alongado, funcionando, juntamente com as células endoteliais, macrófagos e linfócitos, como uma divisão entre o espaço intratímico e o mesênquima vascularizado, considerado como o substrato morfológico da barreira timo-sangue (DIJKSTRA; SMINIA, 1990). A existência dessa estrutura é controversa devido à demonstração do trânsito antigênico transcapsular (NIEUWENHUIS et al., 1988).

Para o desenvolvimento dos linfócitos T no timo é necessário um íntimo contato entre timócitos e células epiteliais promovido pela expressão do MHC (complexo principal de histocompatibilidade), peptídeos antigênicos e fatores de crescimento. Além disso, as células epiteliais contribuem na organização da especificidade do órgão (MÜLLER et al., 2005).

As células epiteliais tímicas são os componentes celulares principais do microambiente tímico, e influenciam em diferentes aspectos da diferenciação dos timócitos, nas vias de interação célula-célula e nas secreções de fatores solúveis, tais como os hormônios tímicos thymulin, thymopoietin, e thymosin- α 1 (SAVINO, 2006).

As células epiteliais do tipo 1 possuem forma irregular e seu núcleo é bem corado, formam uma camada longa e contínua abaixo da cápsula e ao redor de capilares intra-lobulares. As células epiteliais corticais, tipo 2 e 3, encontram-se em íntimo contato com os timócitos

através de seus prolongamentos. No início do desenvolvimento, as células epiteliais do tipo 1, 2 e 3 são os principais tipos celulares observados. Já, as células epiteliais 4 e 5 são identificadas predominantemente na medula ou na junção córtico-medular, também em associação com os timócitos (VAN DE WIJNGAERT et al., 1984). O epitélio tipo 6 é o constituinte dos corpúsculos de Hassal. Estas são estruturas tubulares complexas derivadas das células epiteliais medulares tímicas. Quando maduras contêm um lúmen central frequentemente povoado por debris celulares, indício de sua atividade relacionada à morte celular. Relacionam-se à secreção de mucina, especificamente mucopolissacarídeo ácido sulfatado, bem como à produção hormonal (HENRY, 1992). Apresentam-se intimamente associados à musculatura estriada ou a células mióides, presentes na região medular, provavelmente derivadas da crista neural (NABARRA; ADRIANARISON, 1995).

A importância dos corpúsculos de Hassal ainda não foi esclarecida. Trata-se de agregados concêntricos de células epiteliais achatadas e fusiformes, que contêm no núcleo elementos reticular em decomposição e que são entremeados por linfócitos e grânulos eosinofílicos. Aparentemente os corpúsculos percorrem um ciclo de neoformação, decomposição e absorção (GURTNER et al., 1984). Segundo Watanabe et al. (2005) os corpúsculos de Hassal são estruturas ativas que participam da seleção e maturação de linfócitos na vida pós natal.

A população linfóide tímica imunofenotipicamente é heterogênea, caracterizando diferentes estágios de maturação na região cortical (PICKER; SIEGELMAN, 1993). O acesso das células progenitoras ao timo de camundongos ocorre através de grandes vênulas medulares e da junção córtico-medular. Seguindo do córtex para a medula identifica-se um gradiente de diferenciação com células de dimensões progressivamente menores e com reduzida atividade mitótica (SUSTER; ROSAI, 1990). Os linfócitos medulares são os mais maduros sendo possível a distinção entre linhagens auxiliares e supressoras (VAN EWIJK, 1984). Apenas uma pequena porcentagem dos linfócitos abandonará o timo, via espaço perivascular ou sanguíneo (AMANO; HAMATANI, 1980).

3.7 ORIGEM DOS LINFÓCITOS E DIFERENCIAÇÃO DOS LINFÓCITOS T

Os linfócitos são as pequenas células redondas que predominam nos órgãos, tais como o baço, os linfonodos e o timo. Os linfócitos possuem receptores para antígenos e podem, portanto, reconhecer e responder ao antígeno apresentado. Os linfócitos são eventualmente responsáveis pela produção de anticorpos e pela destruição de células anormais. Essas respostas ocorrem dentro dos órgãos linfóides, que proporcionam um ambiente para a interação eficiente entre os linfócitos, células apresentadoras de antígenos e antígenos estranhos.

No feto muito jovem, as células precursoras linfóides são inicialmente produzidas no omento primitivo, no fígado e no saco vitelino. Nos fetos mais velhos e nos adultos, a medula óssea é a principal fonte de linfócitos (TIZARD, 2000).

A medula óssea desempenha múltiplas funções nos mamíferos adultos. Em todos os mamíferos, é um órgão hematopoiético que serve como origem de todas as células sanguíneas, incluindo linfócitos e células dendríticas. Em alguns mamíferos, como os primatas, ela também age como órgão linfóide primário no qual alguns linfócitos amadurecem, sendo, portanto, uma fonte de anticorpos. Como o baço, o fígado e os linfonodos, a medula óssea contém muitos macrófagos e conseqüentemente remove partículas de sangue. Em virtude dessas funções múltiplas, a medula óssea se divide em dois compartimentos, um compartimento hematopoiético e um vascular. Esses compartimentos nas áreas em forma de cunha dentro dos ossos longos se alternam como fatias de bolo. O compartimento hematopoiético contém precursores de todas as células sanguíneas, como dos macrófagos, das células dendríticas e dos linfócitos, e encontra-se envolvido por uma camada de células adventícias. Nos animais mais idosos, essas células adventícias podem ficar tão carregadas com gordura que a medula pode ter uma aparência amarela gordurosa. O compartimento vascular consiste em seios sanguíneos revestidos por células endoteliais e atravessados por células reticulares e macrófagos (TIZARD, 2000).

Os resultados da timectomia indicam que o timo neonatal é uma fonte de grande parte dos linfócitos sanguíneos e que esses linfócitos são principalmente responsáveis pela montagem de respostas imunomediadas por células. Esses linfócitos são chamados de linfócitos derivados do timo ou células T. Na verdade, os precursores das células T se originam na medula óssea, mas entram rapidamente no timo e nos folículos linfáticos da lâmina própria do intestino (na bursa de

Fabricius, nas aves). Uma vez dentro do timo, as células (agora chamadas timócitos) se dividem rapidamente. No timo ocorre a multiplicação e especialização dos linfócitos T, que apresentam em sua membrana celular anticorpos específicos firmemente ligados que reconhecem antígenos ou células estranhas. Os linfócitos T do timo em sua totalidade possuem na superfície mais de 1.000.000 de moléculas de proteínas com estrutura de anticorpos diferentes (GURTLE et al., 1984; TIZARD, 2000).

Durante a diferenciação dos prolinfócitos em linfócitos T e B, os polipeptídeos desempenham importante papel. No timo, forma-se a timopoetina, que promove a diferenciação em linfócitos T. A ubiquitina que consiste em 74 aminoácidos, estimula a diferenciação dos pré-linfócitos em linfócitos T e B. Sua ação é bloqueada pelo propanolol, de modo que os receptores β -adrenérgicos aparentemente participam da diferenciação (GURTLE et al., 1984).

Entre as novas células produzidas, a maioria morre logo, enquanto as sobreviventes (cerca de 5% do total nos roedores e cerca de 25% nos bezerros) permanecem por 4 a 5 dias antes de sair e colonizar os órgãos linfóides secundários (SURH; SPRENT, 1994). As células T liberadas do timo para a circulação devem ser capazes de participar de respostas imunes, ainda que respondam fortemente aos constituintes corpóreos normais. Isso é obtido por uma seleção positiva e negativa de células. Assim, a apoptose que ocorre na medula do timo resulta na destruição seletiva daqueles timócitos que reconhecem o complexo de peptídeo - MHC de classe II com alta afinidade e que poderiam potencialmente causar uma doença auto-imune, caso escapassem para a periferia. A seleção de timócitos pode ocorrer, em parte, dentro das células-guardiãs. As células guardiãs tímicas podem englobar até 50 timócitos em um período e eventualmente liberá-los ileso (TIZARD, 2000).

3.8 FUNÇÕES DO TIMO

O timo é um órgão linfoepitelial primariamente envolvido na diferenciação, seleção e maturação dos linfócitos T (VAN EWIJK, 1984; SUSTER; ROSAI, 1990; PICKER; SIEGELMAN, 1993). Discute-se sua participação no processo de maturação sexual e na hematopoiese, influenciando especificamente as linhagens grânulo e eritropoiéticas e seus

mecanismos de integração com o sistema nervoso e o endócrino, situando-o numa posição central dentro da circuitaria neuroimunoendócrina (REICHLIN, 1993; SAVINO; DARDENNE, 1995).

A produção de precursores de células T, sua diferenciação, culminando com a formação das referidas células T, é uma das principais funções do timo (ROSE, 1979; HAM; CORMACK, 1983).

As células T, por sua vez, respondem a fenômenos como a rejeição de enxertos, hipersensibilidade retardada e reações de hospedeiro versus enxerto, tal como comprovariam experiências à base de timectomia (FIRTH, 1977; GLICK, 1977; TIWARI; GOEL, 1985; SHARMA; TIZARD, 2000).

Os linfócitos T não representam uma população homogênea de células timo-derivadas, mas sim uma quantidade de subgrupos que apresentam funções, localizações, graus de maturidade, períodos de vida e marcadores de superfícies distintos: células T citotóxicas, células T de memória, células T ampliadoras (HAM; CORMACK, 1983).

Os linfócitos T citotóxicos, também denominados células T killer, reagem especificamente contra células estranhas que eventualmente penetram no organismo e que possuem o antígeno que por elas é reconhecido (HAM; COMARCK, 1983; POWELL, 1983).

As células T de memória funcionam como instrumento do organismo para enfrentarem, pela segunda vez, um antígeno que já não lhes é completamente estranho, permitindo ao animal, uma defesa mais eficaz (HAM; CORMACK, 1983).

As células T helper interferem na imunidade humoral, pois libertam o fator auxiliar T que, juntamente com o antígeno por elas reconhecido, promovem a ativação dos linfócitos B. Deste modo, o timo, ou concretamente as células T helper, influi indiretamente na produção de anticorpos contra antígenos timo-dependentes. Porém, a timectomia origina uma ligeira redução na produção de anticorpos, podendo também não exercer sobre ela qualquer influencia (COOPER et al., 1965; DROEGE, 1971; FIRTH, 1977; SHARMA; TIZARD, 2000).

Alguns autores comprovaram que embora a IgA não seja produzida no timo, a maturação dos linfócitos em células plasmáticas contendo esta imunoglobulina, depende do auxílio das células T (FIRTH, 1977; HOFFMANN-FEZER; LOSCH, 1983).

Pensa-se que as células T supressoras atuam bloqueando os linfócitos T helper ou interferindo diretamente na proliferação ou diferenciação de linfócitos T e B (FLEISCHER, 1981).

Para além das atividades reguladoras desempenhadas pelos linfócitos T, existem outras em que eles intervêm como a indução celular (pelo fator mitogênico), a perda de motilidade dos macrófagos (pelo fator citotóxico), a inibição da replicação viral (pelo interferon) e até a proliferação prolongada e diferenciação das células progenitoras mielóides (pelo fator estimulador das colônias) (HAM; CORMACK, 1983; POWELL, 1983).

Dos distúrbios da função do timo devem ser citadas a atrofia e a hiperplasia. Na atrofia do timo ocorrem distúrbios de crescimento acompanhado de uma linfopenia e redução da formação de anticorpos. Já a hiperplasia desempenha importante papel no desenvolvimento de doenças auto-imunes, nas quais ocorre a formação de anticorpos frente a ligações próprias do organismo. Tais processos são importantes, por exemplo, na poliartrite crônica. Nas diversas doenças infecciosas crônicas de animais mais jovens, encontra-se eventualmente, além de um aumento geral do sistema linfático, também um aumento do timo (estado timolinfático) (GURTLER et al., 1984).

3.9 HIPERPLASIA E ATROFIA TÍMICA

Dos distúrbios da função do timo devem ser citadas a atrofia e a hiperplasia. Na atrofia ocorrem distúrbios de crescimento acompanhados de uma linfopenia e redução da formação de anticorpos. A hiperplasia desempenha importante papel no desenvolvimento de doenças auto-imunes, nas quais ocorre a formação de anticorpos frente à ligações próprias do organismo. Tais processos são importantes, por exemplo, na poliartrite crônica. Nas diversas doenças infecciosas crônicas de animais mais jovens, encontra-se eventualmente, além de um aumento geral do sistema linfático, também um aumento do timo (estado timolinfático) (GURTLER et al., 1984).

As atrofias tímicas são determinadas por disfunções tímicas e são, usualmente, alterações regressivas reversíveis. Essas são menos severas que as displasias, identificando-se uma depleção linfocitária e um arranjo epitelial, com comprometimento funcional do tecido (NEZELOF, 1992). Uma das causas mais freqüentes de atrofia tímica é o estresse, condição em que a liberação repentina de elevadas concentrações de corticosteróides determina uma rápida depleção de timócitos corticais, evidenciando-se cariorrexia de linfócitos e fagocitose destes por macrófagos

corticais, conferindo um aspecto de céu estrelado ao córtex tímico (HASCHEK; ROUSSEAU, 1998). Com a persistência do estímulo perde-se a distinção entre córtex e medula, acentua-se o desarranjo epitelial e observa-se a dilatação dos corpúsculos de Hassal e a formação de estruturas císticas, posteriormente circundadas por anel conjuntivo (SUSTER; ROSAI, 1990).

Outras condições também desencadeiam atrofia tímica como a infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida humana, a rubéola, a reação hospedeiro x transplante, o câncer e a desnutrição protéica crônica (NEZELOF, 1992).

3.10 TIMECTOMIA

A função do timo pode ser melhor demonstrada por meio de estudos nos quais se verificam os efeitos de sua remoção cirúrgica em roedores de laboratório. As consequências de uma timectomia variam conforme a idade do animal.

A timectomia neonatal resulta um desenvolvimento insuficiente do sistema linfático. Nos nódulos linfáticos falta a formação dos centros germinativos, enquanto as células reticulares endoteliais são mais acentuadamente desenvolvidas. O tecido linfocitário do intestino delgado apresenta uma atrofia, ocorrendo também a diminuição de linfócitos e da capacidade orgânica para a formação de anticorpos (GURTLER et al., 1984).

Camundongos timectomizados ao nascimento não sucumbem à chamada doença debilitante se receberem um implante de tecido do timo; isso ocorre mesmo quando o implante é inserido em um compartimento com pequena capacidade de difusão celular. Propôs-se que, normalmente, um hormônio tímico reage com as células linfóides capazes de reagir com antígenos. Sempre que uma dessas células linfóides capazes, mas não comprometidas, encontra e reage com um antígeno, ela começa a multiplicar-se e dá origem a células plasmáticas que sintetizam os anticorpos apropriados (DICKSON, 1988).

Os camundongos timectomizados com um dia de vida perdem rapidamente a resistência a agentes infecciosos e podem apresentar falhas no crescimento. Esses animais apresentam bem poucos linfócitos circulantes e são incapazes de montar muitos tipos de resposta imune, não podendo rejeitar transplantes de órgãos estranhos decorrentes da perda total da sua resposta

imunomediada por células. Os efeitos da timectomia neonatal na produção de anticorpos variam; conseqüentemente, a resposta dos anticorpos à maioria dos antígenos protéicos, tais como a albumina sérica bovina ou as hemácias ovinas, fica significativamente inibida. Por outro lado, a resposta aos antígenos polissacarídicos não é afetada. Em animais domésticos a timectomia neonatal produz resultados menos drásticos que em roedores de laboratório. Isso ocorre devido ao fato do timo amadurecer precocemente nessas espécies e conseguir assim desempenhar muita das suas funções críticas bem antes de o animal nascer (TIZARD, 2000).

Na timectomia adulta, poucas mudanças são notáveis imediatamente após a remoção do timo. Porém, após vários meses, ocorre a redução no número de linfócitos circulantes e na capacidade de montar uma resposta imunomediada por células. Isso sugere que o timo ainda se mantém funcional nos adultos, em virtude da existência de um reservatório no timo de células de vida longa, as quais são totalmente utilizadas antes de os efeitos da timectomia tornarem-se aparentes (TIZARD, 2000).

Nas aves aparece, além do timo, um outro órgão linfático, a Bursa de Fabricius. Com a bursectomia o desenvolvimento do sistema linfático é discreto e irregularmente reduzido, desde que o timo esteja intacto (GURTLER, 1984).

3.11 INFLUÊNCIA DO SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO (SNA)

O timo é um órgão linfóide central com precursores para diferenciação de células T, que após sofrerem um processo de seleção migram para um órgão linfóide periférico. A diferenciação destas células ocorre ao longo da passagem pelos compartimentos do timo, formado por diferentes tipos celulares, por exemplo, células epiteliais, macrófagos, células dendríticas, fibroblastos e componentes da matriz extracelular. De acordo com os estágios da maturação os timócitos são situados em partes distintas do órgão (LIND et al., 2001). As interações entre os microambientes do timo e o desenvolvimento de células T são controladas pelo sistema nervoso autônomo (SNA) e neuroendócrino (ELENKOV et al., 2000; SAVINO; DARDENNE, 2000).

Os órgãos linfóides, assim como os vasos sanguíneos, são inervados pelo SNA simpático (ELENKOV et al., 2000). Fibras nervosas noradrenérgicas penetram no timo seguindo os vasos

sanguíneos, sendo assim, a maioria destas fibras localizam-se ao redor dos vasos (VIZI et al., 1995).

A inervação noradrenérgica no timo é observada no córtex e algumas fibras na medula e junção córtico medular (LEPOSAVIC et al., 1992; VIZI et al., 1995; KURZ et al., 1997).

Estes fatos sugerem que a noradrenalina pode influenciar diretamente na maturação de células T no timo, e indiretamente as células tímicas não linfóides. Pesquisas *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a diferenciação dos timócitos depende da expressão de β -adrenoreceptores, assim como a proliferação dos timócitos e a apoptose (MADEN; FELTEN, 2001; RAUSKI et al., 2003).

Em ratos, a densidade da inervação simpática diminui no timo durante a vida pós-natal. O crescimento progressivo de fibras noradrenérgicas dentro do parênquima do timo tem sido observado por 7 dias pós-natal, quando estas fibras começam a formar uma rede menos densa. A densidade de nervos noradrenérgicos diminui com 14 dias pós-natal, quando eles assumem distribuição similar à observada em timos de ratos adultos. A concentração intratímica de noradrenalina diminui gradualmente do período neonatal até 60 dias pós-natal. Entretanto, observou-se diminuição da densidade de β_2 -adrenoreceptores no timo de ratos do 4º ao 50º dia de desenvolvimento pós-natal (LEPOSAVIC et al., 1992)

Leposavic et al. (2000) demonstraram que o uso de propranolol por 15 dias bloqueia os β -adrenoreceptores tendo efeito nas características fenotípicas dos timócitos e imaturidade sexual em ratos machos Wistar adultos.

Solarovic et al. (2004), trataram ratos machos Wistar imaturos por 15 dias com propranolol, os resultados indicaram que a indução com propranolol por um longo tempo induziu bloqueio dos β -adrenoreceptores, afetando o tamanho do timo e suas estruturas, apresentando imaturidade sexual. Houve uma diminuição significativa do volume no córtex e medula do timo, refletindo numa diminuição da celularidade de ambos os compartimentos, dados também achados por Leposavic et al. (2000). Considerando o tamanho do timo no início do tratamento (21 dias pós-natal), houve uma significativa desaceleração no crescimento do timo e/ou aceleração da involução durante este estágio de bloqueio dos β -adrenoreceptores (entre 21º e 36º dia). Este fato mostra que o timo de ratos machos tratados com propranolol apresenta seu tamanho máximo na puberdade, e então começa involuir lentamente (MARCHETTI et al., 1990; MORALE et al., 1991), entretanto, nos ratos sem tratamento, ocorre após 36 dias de idade. Mudança do tamanho

do timo na puberdade pode apresentar alterações hormonais (OLSEN; KOVACS, 1996), estes achados estão de acordo com a hipótese de que o sistema nervoso simpático está envolvido na regulação da resposta de estímulos pela ação hormonal na mudança da densidade de receptores dentro do timo (MARCHETTI et al., 1990). Acrescenta-se ainda, que hormônios esteroidais influenciam na expressão de β -adrenoreceptores nas células linfóides, estas alterações hormonais afetam a maturação do eixo hipotálamo-pituitário-gonadal (MARCHETTI et al., 1994).

A redução da população de timócitos nos ratos tratados com propranolol pode ser esclarecida pelo desbalanço da população de timócitos proliferados e a apoptose, processo conhecido que pode ser influenciado por catecolaminas (MARCHETTI et al., 1990; RAUSKI et al., 2003). A estimulação simpática ou administração de catecolaminas aumenta a saída de células da medula óssea, baço e nódulos linfáticos. Desse modo, ratos tratados com propranolol podem reduzir a saída de células precursoras de timócitos da medula óssea (SOLAROVIC et al., 2004).

Estudos sobre o efeito da ação do propranolol no desenvolvimento de células T e células tímicas não linfóides, em ambos observaram a presença da expressão de β -adrenoreceptores. Entretanto, não há dados da expressão de β -adrenoreceptores na musculatura lisa vascular do timo, o propranolol não teve efeito nos vasos tímicos (MARCHETTI et al., 1990; KURZ et al., 1997; SOLAROVIC et al., 2004).

Em ratos adultos tratados com propranolol, Solarovic et al. (2004) observaram apenas diminuição do volume de tecido conjuntivo interlobular, isto pode ser devido à influência inibitória da noradrenalina na atividade fibroblástica e/ou proliferação (VIZI et al., 1995).

3.12 INVOLUÇÃO TÍMICA

O timo é um órgão no qual parece que a senescência é prematura, sendo importante saber o porquê desse fato. Com isso, durante a vida do animal o timo sofre uma involução fisiológica, que pode ser acelerada por uma série de fatores, visto que os timócitos são extremamente sensíveis a variações microambientais, ocorrendo rápida depleção dessa população mediante uma

série de estímulos (NEZELOF, 1992). Anomalias genéticas hereditárias que cursam clinicamente como imunodeficiências, podem gerar um timo displásico, de aspecto embrionário, pobre em linfócitos e com ausência de corpúsculos de Hassal (SUSTER; ROSAI, 1990).

No processo de involução fisiológico o órgão atinge seu tamanho máximo dentro de 12 meses de vida e então inicia uma involução gradual, reduzindo progressivamente o volume do timo durante a vida. Os tecidos fibroso, espaço perivascular e tecido adiposo não sofrem este processo (HALEY, 2003)

Contrariamente a crença de que a involução se inicia na puberdade, a diminuição no tecido tímico começa no primeiro ano de vida e continua numa taxa de aproximadamente 3% ao ano até a adolescência aonde começa a diminuir na taxa de 1% ao ano. Esse processo é controlado e pode ser regulado por um número de hormônios gonadais e hormônios tímicos peptídicos embora exista o controle por parte de outros mecanismos também (HALEY, 2003).

Em geral, as características morfológicas e involucionais relacionadas com a idade são semelhantes em todos os mamíferos, mas devemos reconhecer que a involução tímica varia de acordo com a espécie, raça e sexo (HALEY, 2003). Nos carnívoros o início da involução coincide com o aparecimento dos dentes secundários (NICKEL et al., 1981).

Além disso, a diminuição do tamanho do órgão é acompanhada por alteração na estrutura. Numa criança, por exemplo, os lóbulos são separados por um septo fino de tecido conjuntivo. No timo de uma pessoa idosa, entretanto, o septo expandiu-se muito e comprime células de gordura. Além disso, tecido adiposo adicional se desenvolve abaixo da cápsula e separa esse tecido do tecido tímico verdadeiro. Então, apenas pequenos remanescentes dos lóbulos tímicos permanecem (HALEY, 2003).

Essa perda dramática da estrutura tímica e da função é única no sistema imune. A medula óssea, o sítio de células B e da produção de células mielóides, embora apresente disposição de gordura não mostra essa perda de função com a idade. Além disso, os linfonodos e o baço também não mostram essa associação com a idade embora haja alteração nas células que habitam esses órgãos. Entretanto, ainda não está claro porque o timo sofre esse processo (HALEY, 2003).

É reconhecido que a imunidade celular diminui com a idade, mas é desconhecido até que grau esse fenômeno relaciona-se com a involução tímica, já que sua competência para a proliferação linfóide persiste por toda a vida (KUPER et al., 1990).

Desse modo, a involução do timo tem sido com frequência injustificadamente acentuada, portanto, o órgão adulto permanece funcional. Com efeito, ao se tentar julgar a competência imunológica de suspensões preparadas a partir de timos de aves de alguns dias até nove meses de idade, conclui-se que a capacidade de reação do hospedeiro versus enxerto é ainda maior nos órgãos de roedores adultos atroficos do que nos animais jovens, anteriores à involução, apesar de, em termos de números totais de células imunocompetentes por lobo tímico, pouca diferença se tem registrado entre uns e outros (WARNER, 1964; DROEGE et al., 1974).

Uma explicação para a involução do timo se baseia na teoria do “wear and tear” com a perda da função se devendo a deterioração da maquinaria celular tímica. Essa teoria, entretanto, não leva em consideração a habilidade do timo de se regenerar após uma involução causada por estresse, infecção, gravidez ou tratamento com esteróides ou agentes imunossupressivos como a ciclosporina A. Essa involução aguda, em que predomina a perda dos timócitos corticais, é tão dramática quanto à involução crônica vista com a idade e ainda é totalmente reversível. Conseqüentemente, parece que os mecanismos de reparo do timo devem ser capazes de prevenir e mediar a recuperação da involução com a idade. Além disso, o fato de que a involução é um processo controlado e pode ser retardado através de processos drásticos como a castração contribuem para que se veja que ela não é apenas uma consequência da teoria do uso e desgaste (GEORGE; RITTER, 1996).

Uma segunda explicação para a involução crônica do timo refere-se ao fato de que ela é diretamente adaptativa. Desse modo, um tecido que encara uma alta taxa de proliferação e reorganização deve estar sob um alto risco de se transformar malignamente. Assim, a involução do timo deve ser um mecanismo para diminuir a incidência de timomas. Entretanto, como já dito, não existe um mecanismo semelhante para a diminuição da produção de células B. Alternativamente, a produção de células T deve diminuir porque é diretamente benéfica ao animal no sentido de que ele passa a exportar menos células para a periferia. Esta teoria supõe que existe uma desvantagem direta na produção continuada de células imunes pela vida do animal, como o risco aumentado de desenvolver doenças auto-imunes ou um efeito deletério direto da presença de células T em outros órgãos do corpo. Entretanto, não existe evidências claras para indicar que este é o certo e certamente, é a remoção do timo tanto no adulto quanto no rato neonatal que levam ao aumento da chance do animal desenvolver doenças autoimunes (GEORGE; RITTER, 1996).

Por fim, mais uma hipótese tem sido sugerida e desta vez por Kirkwood. Chamada de *disposable-soma* em analogia com *disposable goods* (bens descartáveis) os quais são feitos para durar por um período limitado de tempo e de uso, o processo de involução com a idade é visto como o resultado do aperfeiçoamento do organismo no investimento em manutenção. O reparo do uso e desgaste de um órgão requer uma quantidade de energia a qual é requerida para a produção de progenitores, que asseguram a passagem de genes de um indivíduo para a próxima geração. A seleção natural, por sua vez, favorece os indivíduos mais eficientes. Desta forma o organismo deve então balancear aonde aloca sua energia e recursos requeridos para manutenção de um órgão contrariamente a contribuição daquele órgão para a sobrevivência, com o objetivo de otimizar seu uso de energia e maximizar sua habilidade de reprodução. Os organismos mais eficientes estarão em vantagem e sobreviverão e seus genomas serão representados nas próximas gerações. Para as células não germinativas, o organismo economiza em manutenção tentando manter um balanço entre economia e aptidão. Em contraste, o máximo esforço deve ser feito nas células germinativas as quais são vitais para a propagação; conseqüentemente, elas não apresentam senescência e são passadas de uma a outra geração (GEORGE; RITTER, 1996).

3.13 ANGIOGÊNESE E VASCULOGÊNESE

A formação de vasos sanguíneos ocorre por meio de dois processos distintos e consecutivos: vasculogênese e angiogênese. O primeiro destes processos, vasculogênese, corresponde à formação de capilares sanguíneos primitivos, desencadeada pela diferenciação *in situ* de células-tronco hemangiogênicas, derivadas de células mesenquimais pluripotentes, as células progenitoras hemangiogênicas (DEMIR, 2009). Posteriormente as células-tronco hemangiogênicas se diferenciam em células-tronco hemangioblásticas que, por sua vez, originam células angioblásticas, progenitoras de células endoteliais (HANAHAHAN, 1997; RIBATTI et al., 2002; DEMIR, 2007) e células hemangioblásticas, progenitoras de células hematopoiéticas (DEMIR, 2007).

O processo subsequente, angiogênese, corresponde à formação de novos vasos a partir dos vasos já existentes (PLENDL, 2000) e acontece por meio de quebra de membrana basal dos

capilares por secreção e migração de proteases, além da indução da proliferação de células endoteliais, eventos estes estimulados pelo VEGF, o mais potente indutor da vasculogênese e da angiogênese (REYNOLDS; REDMER, 2001).

O processo de vasculogênese no timo ocorre durante o desenvolvimento embriológico, quando vasos sanguíneos penetram no interior do parênquima do órgão, acompanhando o tecido conjuntivo derivado da cápsula e formando espaços perivasculares ao redor dos vasos (KATO, 1997).

O papel do endotélio vascular tímico tem sido considerado como limitado à função de via de acesso ao órgão para células precursoras de linfócitos originadas da medula óssea e pouca atenção têm sido dada aos possíveis mecanismos de interação que podem regular o compartimento vascular tímico e o papel do endotélio no desenvolvimento do órgão (CUDDIHY et al., 2009).

Agreste (2005), em um estudo que quantificou a vascularização tímica de fetos de cães em diferentes fases de desenvolvimento, sugere que o processo de angiogênese no timo destes animais esteja relacionado com a proximidade ao nascimento, período no qual foi detectado um aumento da rede vascular do órgão.

3.14 VEGF

A complexidade do desenvolvimento da célula endotelial indica que sua regulação deve envolver muitos fatores de crescimento e diferenciação de tecidos específicos que podem se ligar e ativar receptores endoteliais (ACHEN et al., 1998).

Os principais fatores de crescimento estimuladores do processo angiogênico são o Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF), Fator de Crescimento Fibroblástico básico (bFGF), Fator de Crescimento Placentário (PIGF) e Fator de Necrose Tumoral (TNF) (ZYGMUNT et al., 2003).

O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) recebeu essa denominação no final da década de 1980. Inicialmente descrito como fator de permeabilidade vascular, ele foi isolado pela primeira vez em líquido ascítico de cobaias em 1983. Além dos efeitos angiogênicos e de

permeabilidade vascular, outras pesquisas sugerem que o VEGF tem efeitos pró- inflamatório e neuroprotetor, além de seu efeito mitótico sobre células do endotélio vascular (SENGER et al., 1983; FERRARA et al., 1992).

O VEGF-A é uma molécula chave na indução de angiogênese e vasculogênese, consiste em um fator de sobrevivência para as células endoteliais, causa proliferação, brotamento, migração e formação tubular das células do endotélio vascular. O gene do VEGF-A está localizado no cromossomo 6p21.3 em humanos e codificados por 8 éxons separados por 7 introns (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003). Pertence a uma família de mitógenos estruturalmente denominados VEGF-fatores de crescimentos derivados de plaquetas PDGF (Platelet-derived Growth Factor) (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997; CAMELIET, 2005; SHIBUYA; CLAESSON-WELSH, 2006).

Em seres humanos, existem pelo menos oito isoformas do VEGF-A (VEGF121, VEGF145, VEGF148, VEGF165, VEGF165b, VEGF183, VEGF189 e VEGF206) que são geradas por derivação alternativa de um único gene. A nomenclatura utilizada para nomear as diferentes isoformas baseia-se na quantidade de aminoácidos que cada molécula de proteína secretada possui (BATES; HARPER, 2002; LANGE et al., 2003). A quantidade de aminoácidos define características de cada molécula como, por exemplo, a capacidade de ligação a heparina e sua solubilidade (PARK; KELLER; FERRARA, 1993; POLTORAK et al., 1997).

O VEGF induz angiogênese em uma variedade de condições fisiológicas e patológicas, incluindo embriogênese, formação do corpo lúteo, crescimento tumoral, cicatrização de ferimentos, crescimento vascular placentário e angiogênese compensatória do coração (REYNOLDS; REDMER, 1995, 2001; REYNOLDS et al., 2002, 2005).

Durante a embriogênese, o VEGF atua como mediador autócrino e parácrino, associado à angiogênese que ocorre durante os estágios embrionários iniciais, o desenvolvimento do cérebro, rim, músculo esquelético e diversos compartimentos mesodérmicos (AITKENHEAD et al., 1998).

A família VEGF é composta por glicoproteínas com ligação dimérica à citeína que apresentam um peso molecular aproximado de 40 kDa. (CÉBE-SUAREZ; ZEHNDER-FJÄLLMAN; BALLMER-HOFER, 2006). Nos humanos esta família é composta pelos membros VEGF-A, que é o primeiro e melhor descrito membro da família dos VEGFs, inicialmente isolado e purificado a partir de meio de cultura de células da pituitária bovina (FERRARA;

HENZEL, 1989). Além desta, a família do VEGF contém diversas proteínas como o VEGF-B (PAVONEN et al., 1996), VEGF-C (JOUKOV et al., 1996), VEGF-D, VEGF-E (ACHEN et al., 1998) e fator de crescimento placentário (PIGF – Placental Growth Factor) (CÉBE-SUAREZ; ZEHNDER-FJÄLLMAN; BALLMER-HOFER, 2006). O VEGF-E é um fator angiogênico não-humano presente no Orf parapoxvírus semelhante ao VEGF-A que estimula a migração e brotamento de células endoteliais vasculares *in vitro* e *in vivo* por meio do VEGFR-2 (MEYER et al., 1999).

Algumas das isoformas do VEGF identificadas possuem 120, 121, 145, 148, 162, 165, 165b, 183, 188, 189 e 206 aminoácidos (BASTES; HARPER, 2002; LANGE et al., 2003; MÜLLER et al., 2005). Essas isoformas possuem funções distintas, mas complementares na angiogênese devido às suas diferentes ligações com sulfato de heparina e neurofilinas (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003; TAMMELA et al., 2005).

A expressão do gene de VEGF é aumentada por fatores de crescimento como PDGF, FGF, EGF (fator de crescimento epitelial), TGF- β (fator de crescimento de transformação- β), TNF (fator de necrose tumoral), IL-1 (interleucina-1) e hipóxia (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997; CARMELIET, 2005).

O timo é um órgão fisiologicamente hipóxico, que apresenta uma concentração média de O₂ (PO₂) de menos de 10 mmHg, a qual chega a ser, no mínimo, quatro vezes menor que a PO₂ do sangue arterial periférico. Os timócitos e células epiteliais apresentam uma adaptação peculiar a esta condição hipóxica, que parece ser fundamental para processos fisiológicos tímicos como a seleção, maturação e diferenciação de timócito. Genes comumente responsivos à hipóxia como os genes COX-2, HMOX-1 e BNIP3, não são ativados quando células do timo são submetidas a concentrações baixas de O₂ (ar ambiente) em relação a concentrações altas (100%), o que ocorre em qualquer tecido ou linhagem celular exposto a estas condições. Mesmo diante de um aumento da PO₂, as células de diferentes regiões anatômicas do timo não deixam de apresentar reação positiva para pimonidazol (um marcador de células em hipóxia) mesmo quando situadas nas proximidades de vasos sanguíneos, o que indica a ativação de mecanismos intrínsecos de manutenção do estado hipóxico (HALE et al., 2002).

Na placenta, o VEGF₁₆₅ é a isoforma predominante, embora também sejam identificadas as proteínas com 121, 145, 189 e 206 aminoácidos (SHARKEY et al., 1993; CHEUNG et al., 1995; CHEUNG, 1997; FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003; TAMMELA et al., 2005). A

localização da proteína, no tecido placentário, indica seu papel autócrino e parácrino na modulação da angiogênese coordenada e progressiva presente na placenta durante a gestação. Também participa na manutenção da integridade e do estado diferenciado dos vasos e regulação da permeabilidade capilar (SHARKEY et al., 1993; CHEUNG et al., 1995; WINTHER; DANTZER, 2001).

Estudos knockout na visão têm sugerido que o VEGF₁₆₅ é provavelmente a maior isoforma responsável pelas ações do VEGF-A (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003; TAMMELA et al., 2005).

VEGFs se ligam à receptores tirosina-quinase de alta afinidade, induzindo a atividade intrínseca enzimática destes receptores: fosforilação dos resíduos de tirosina, bem como de outros substratos das quinases, que estimulam atividades celulares como proliferação, motilidade e diferenciação (WILLIAMS, 1996).

O VEGF é um mitógeno específico para células endoteliais, estimulando a proliferação e migração (FERRARA, 1999; DULL et al., 2001; LANG et al., 2001); além de estar envolvido na modulação da linfogênese normal e anormal nos tecidos (NAGY et al., 2002; CAO et al., 2004). É o estimulador específico da permeabilidade vascular bem como da produção e migração das proteases produzidas pelas células endoteliais, passos críticos no processo de angiogênese (REYNOLDS; REDMER, 2001).

O VEGF induz vasodilatação no caso de hipotensão, o que proporciona uma maior sobrevivência em caso de doenças isquêmicas. Inativação do gene do VEGF em ratos pode resultar em letalidade dos embriões mesmo heterozigotos, além de acarretar retardam o crescimento e desenvolvimentos de anomalias, significativos defeitos na vascularização dos tecidos e órgãos, incluindo a placenta e sistema nervoso (FERRARA; DAVIS-SMITH, 1997).

Cao (2008) estudando estímulos linfangiogênicos em tumores observou um aumento da expressão do VEGF-A e VEGF-C durante períodos de hipóxia.

Müller et al. (2005) detectaram a expressão do gene do fator de crescimento vascular, VEGF-A, em células epiteliais do timo de camundongos no período fetal e em adultos. Em análise por RT-PCR evidenciaram a expressão de isoformas do VEGF (VEGF₁₂₀, VEGF₁₆₄ e VEGF₁₈₈). Em timo fetal de camundongos com 15.5 dias de desenvolvimento a expressão foi observada em todo o timo, exceto nos timócitos. Nos camundongos em fases mais avançadas do

desenvolvimento, sugere-se uma expressão mais intensa nas células epiteliais da região cortical do que as células da região medular.

Na placenta canina e bovina, Marques Jr. (2006) analisou a expressão do sistema VEGF pela técnica do western blot, concluindo que a expressão do VEGF-A e seus receptores variam ao longo da gestação em ambas as placentas. Além disso, o perfil de expressão das proteínas ao longo da gestação pode ser considerado o mesmo para ambas as espécies.

Ohm et al. (2006) descrevem o efeito inibitório do alto nível do VEGF que interfere no desenvolvimento de linfócitos, estabelecendo um link entre a atrofia tímica e o VEGF.

A expressão do sistema VEGF-A no timo murino foi demonstrada em células epiteliais de animais neonatos (CUDDIHY et al., 2009) e jovens (PARK et al., 2007), como também em timócitos de neonatos (CUDDIHY et al., 2009). Nestes, ambos os receptores (Flt-1 e KDR) foram localizados em células epiteliais, enquanto que no endotélio apenas o KDR (CUDDIHY et al., 2009). Os mesmos autores demonstraram que a inibição deste fator provocou perda rápida da densa rede de capilares do timo e acentuada redução do número de timócitos, o que sugere um papel determinante do VEGF na timopoiese em estágios iniciais do desenvolvimento neonatal. No timo humano adulto normal o VEGF foi localizado em células epiteliais da região subcapsular e também nos corpúsculos tímicos (CIMPEAN et al., 2008). Atualmente se atribui a este fator o papel de imunoregulador e modulador do microambiente tímico (KISELEVA et al., 2005). O VEGF-C, indutor primário da linfangiogênese, não foi localizado em tecido tímico humano (JOORY et al., 2006), apesar de relatos consistentes sobre a vascularização linfática deste tecido (KATO, 1997).

O VEGF-C executa um papel crítico no estabelecimento dos primeiros vasos linfáticos durante o desenvolvimento embrionário e na mediação de tumores metastáticos e processos inflamatórios. Uma correlação entre a expressão do VEGF-C e VEGF-D, linfangiogênese tumoral e formação de metástase na região dos nódulos linfáticos tem sido relatado em uma série de tumores em animais e humanos, incluindo melanoma maligno, pulmão, mama, tireóide, útero, próstata e carcinoma coloretal. Entretanto, a expressão regulada do VEGF-C/D é suficiente para induzir um link molecular entre linfangiogênese e recrutamento de leucócitos para os sítios inflamatórios. A contribuição das células inflamatórias para linfangiogênese é mostrada em várias desordens linfáticas associadas, como por exemplo, transplantes. A inflamação pode induzir a expressão do VEGF-C/D e do Flt-4 em células dendríticas e macrófagos, talvez através do intermédio de citocinas próinflamatórias, promovendo assim a linfangiogênese (JI, 2009).

3.15 RECEPTORES PARA VEGF

Três receptores para VEGF pertencentes à família de receptores tirosina quinase foram identificados e clonados: VEGFR-1/Flt-1 (Fms-like tyrosine kinase 1), VEGFR-2/KDR (Kinase insert domain containing receptor) e VEGFR-3/Flt-4 (Fms-like tyrosine kinase 4) (SHIBUYA; CLAEISSON-WELSH, 2006). Estes receptores necessitam de dimerização para induzirem a sinalização intracelular, e são caracterizados pela presença de sete alças semelhantes à imunoglobulina em sua porção extracelular, uma região transmembrânica e um domínio tirosina quinase interrompido pela inserção da seqüência quinase em sua porção intracelular (ROBINSON; STRIGER, 2001; TAKEDA et al., 2002).

Os receptores Flt-1 e KDR são predominantemente expressos em células endoteliais (FERRARA, 1999) e de maneira semelhante ao observado em relação ao VEGF, alterações na tensão de oxigênio tecidual podem modular a expressão de seus genes. Estudos demonstram que a expressão dos receptores é estimulada em condições de hipóxia *in vivo*, enquanto estudos *in vitro* demonstram que devido a uma regulação transcricional distinta, somente a expressão do Flt-1 é estimulada em condições de hipoxia. A expressão do KDR é regulada por diversos fatores: é estimulada pelo VEGF e bFGF e inibida pelo TNF- α e TGF- β (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997).

Os receptores podem ser ativados por outros membros da família VEGF, sendo o Flt-1 ativado pelo VEGF-A e PlGF, e o KDR pelo VEGF-C, VEGF-D e pelo homólogo viral VEGF-E (KARKKAINEN; PETROVA, 2000).

Após a ativação dos receptores, diversas são as vias e substratos que podem ser fosforilados. Estudos demonstram que nas várias ações mediadas pelo VEGF, proteínas da família Src podem ser ativadas, além da fosfolipase C γ 1, óxido nítrico sintetase e MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno), proteína quinase C e fosfatidilinositol 3'-quinase (GILLE et al., 2001; HUANG et al., 2001).

A maior parte das respostas das células endoteliais ao VEGF, incluindo mitogênese, migração, apoptose, alterações na forma, reorganização do citoesqueleto e indução da permeabilidade vascular são mediadas pela ativação do KDR (GILLE et al., 2001; GÓMEZ et al., 2002; MUÑOZ-CHÁPULI; QUESADA; MEDINA, 2004).

Flt-1 ou Flt-1 de 180kDa foi o primeiro receptor tirosina quinase identificado como receptor para VEGF. Este receptor é expresso por células endoteliais, monócitos, macrófagos, células dendríticas, osteoclastos, pericitos e trofoblastos na placenta. As funções e propriedades de sinalização do Flt-1 podem ser diferentes de acordo com o estágio de desenvolvimento do animal e do tipo celular (CLAUSS et al., 1996; FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997; TAKAHASHI; SHIBUYA, 2005).

O Flt-1 tem sido relacionado à migração celular sendo um regulador negativo da angiogênese durante o desenvolvimento em fases precoces, mas tem papel importante na angiogênese em condições patológicas. Este receptor liga-se ao VEGF-A, VEGF-B e PlGF com alta afinidade, e sua sinalização em células endoteliais pulmonares tem sido atribuída à indução de metaloproteinase-9 sendo relacionada à facilitação de metástase pulmonar (TAKEDA, et al., 2002; FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003).

A atividade quimiotática para macrófagos induzidas pelo VEGF em tumores malignos tem sido investigada. Em um estudo realizado com monócitos humanos, Barleon et al. (1996), demonstrou que a resposta quimiotática induzida pelo VEGF para estas células, contribui, juntamente com o PlGF, na angiogênese de tumores e tecidos inflamatórios por ação direta nas células endoteliais, bem como indiretamente, favorecendo o recrutamento de macrófagos, que segundo os autores, pode aumentar a expressão do Flt-1. Sendo assim, o Flt-1 é associado à quimiotaxia de monócitos assim como recrutamento e sobrevivência de células progenitoras derivadas da medula óssea (MAYNARD et al., 2003).

Ainda existem consideráveis controvérsias quanto às ações desempenhadas pelo Flt-1. Segundo Shibuya (2001), a ativação de um dos produtos do gene Flt-1 também pode induzir sinais que controlam a proliferação celular e permeabilidade vascular, no entanto, devido à baixa atividade tirosina quinase deste receptor, estes sinais são cerca de um décimo do sinal observado após a ativação do KDR-2. A ativação de um segundo produto do gene, a forma solúvel do receptor, desencadeia uma potente atividade negativa relacionada aos fenômenos de crescimento das células endoteliais e permeabilidade vascular induzida pelo VEGF. Assim o gene Flt-1 exercendo duas atividades biológicas opostas na angiogênese e pode ser fundamental para uma fina regulação da formação e manutenção dos vasos sanguíneos.

As propriedades do sinal de tradução do Flt-1 são afetadas pela dimerização com o KDR-2. A transfosforilação com o receptor 2 parece fazer com que aumente a eficiência da atividade

quinase do receptor 1 (HUANG et al., 2001). Recentes estudos demonstram que a ativação de receptores heterodímeros determina ações biológicas específicas não determinadas pela ativação de receptores homodímeros, como por exemplo, a síntese de PGI₂ (prostaciclina) pelas células endoteliais (NEAGOE; LEMIEUX; SIROIS, 2005).

O KDR (*kinase domain region*) ou Flk-1 ou VEGFR-2, de 200-230 kDa, consiste no marcador mais precoce no desenvolvimento de células endoteliais, sendo o maior mediador dos efeitos do VEGF na mitogênese, angiogênese e permeabilidade vascular (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003; TAKAHASHI; SHIBUYA, 2005; SHIBUYA; CLAEISSON-WELSH, 2006). Esse receptor sofre dimerização e fosforilação dependente da ligação com a tirosina em células intactas, resultando em sinalização mitogênica, quimiotática e de sobrevivência (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003). Liga-se ao VEGF-A, VEGF-C e VEGF-D. É o receptor primário do VEGF nas células do endotélio vascular (WISE et al., 1999; ZACHARI; GLIKI, 2001). É ativado pelas isoformas contendo 121, 145 e 165 aminoácidos (POLTORAK et al., 1997) e pela isoforma 189, essa última pode ser liberada de maneira lenta após a exposição à heparina e heparinases ou de modo rápido através de clivagem pela plasmina ou pela uroquinase na Carboxila-Terminal (PLOUET et al., 1997).

Em estudo realizado por Takahashi et al. (2001), foi sugerido que a autofosforilação de uma região do KDR denominada Y1175 pode ser crucial para a proliferação de células endoteliais via MAP quinase. O KDR também atua na indução de permeabilidade vascular e proliferação da célula endotelial (TAKEDA et al., 2002). Além das células endoteliais, células-tronco hematopoéticas, células neuronais, osteoblastos, células do ducto pancreático, células progenitoras da retina e megacariócitos também expressão KDR (SHIBUYA; CLAEISSON-WELSH, 2006). A ativação do KDR, e não do Flt-1, é necessária para o efeito não apoptótico nas células endoteliais venosas umbilicais humanas (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003). O KDR liga-se principalmente ao VEGF e formas processadas do VEGF-C e VEGF-D (TAKAHASHI; SHIBUYA, 2005).

Na placenta, a localização dos receptores 1 e 2 tem sido observada em diversos tipos celulares, indicando que, além das propriedades angiogênicas, o VEGF apresenta funções adicionais, podendo atuar de maneira parácrina e autócrina em eventos ocorridos durante o estabelecimento e desenvolvimento placentário (CHEUNG et al., 1995; WINTER; AHMED; DANTZER, 1999; WINTER; DANTZER, 2001).

O terceiro receptor para VEGF (VEGFR-3 ou Flt-4, com 195 kDa), cujos ligantes específicos são VEGF-C, VEGF-D e VEGF-protein related, é altamente correlato aos receptores Flt-1 e KDR (YAN et al., 1998). O Flt-4 está presente em todo o endotélio durante o desenvolvimento, mas em adultos ele se torna restrito às células do endotélio vascular linfático e a certas células do endotélio vascular fenestradas dos vasos sanguíneos (KAIPAINEN et al., 1995; WITMER et al., 2001). Além disso, o receptor é essencial para o desenvolvimento cardiovascular embrionário. Sua localização em diversos tecidos onde ocorre o processo de angiogênese sugere também o papel do receptor na modulação das respostas angiogênicas no indivíduo adulto (ACHEN et al., 1998; WITMER et al., 2001). Dunk e Ahmed (2001) descrevem a expressão deste receptor em células endoteliais e trofoblásticas.

O Flt-4 (receptor do VEGF-C e D) tem sido encontrado na maior parte do endotélio durante a embriogênese, mais tarde, no desenvolvimento a expressão desta molécula se restringe ao endotélio linfático na maioria dos tecidos. Recentemente, a expressão do Flt-4 mostra ser sempre regulada pelas células endoteliais da área de neovascularização tumoral e esta molécula é expressa pelo neoplasma vascular (SABATTINI; BETTINI, 2009).

Odaka et al. (2006) observaram a expressão do Flt-4 no timo de camundongos em pequenos vasos na cápsula que se ramificavam para o córtex e continuavam em direção à região medular.

Mesmo com alto grau de homologia nos domínio quinase, a sinalização difere muito entre os receptores de VEGF. Por exemplo, o Flt-1 tem um grau de afinidade 10 a 40 vezes maior para VEGF quando comparado ao KDR. O Flt-1 e o KDR têm sete domínios extracelulares imunoglobina-*like*, além de uma região transmembrana simples e uma sequência tirosina quinase intracelular que é interrompida por um domínio quinase. A sinalização dos receptores Flt-1 e KDR devem ser coordenadas para a expansão e a diferenciação equilibrada do precursor endotelial durante a embriogênese (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997; FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003; KOWANETZ; FERRARA, 2006; SHIBUYA; CLAESSEON-WELSH, 2006).

Camundongos que não apresentam os genes codificadores dos receptores para VEGF (Flt-1 e KDR) apresentaram defeitos na vasculogênese fetal e placentária e morreram antes da metade da gestação (FONG et al., 1995). Da mesma forma, embriões de camundongos “knockout” homozigóticos para o gene do VEGF morreram na metade da gestação apresentando sérias alterações cardiovasculares, além do desenvolvimento anormal da vascularização extra-

embrionária, inclusive placenta e saco amniótico (FERRARA et al., 1996). Estudos de desenvolvimento e “knockout” sugerem que a sinalização do VEGFR-3 é essencial para o desenvolvimento de vasos durante o estágio de embrião.

O VEGF-C e VEGF-D têm ação angiogênica via KDR e Flt-4, e linfangiogênica via Flt-4. Os níveis de expressão absoluto ou relativo desses receptores nas células endoteliais parecem determinar se VEGF-C/D exercem efeito angiogênico ou linfangiogênico. A expressão do Flt-4 restringe-se a células endoteliais linfáticas, capilares fenestrados e veias de órgãos endócrinos, monócitos e macrófagos (TAKAHASHI et al., 2001; SHIBUYA; CLAESSEON-WELSH, 2006; RIBATTI et al., 2007).

A hipóxia tem sido considerada a maior indutora da expressão local do gene VEGF em tumores, exercendo um papel importante na regulação dos VEGFRs (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997).

Além destes receptores, há outro nível de controle exercido por uma forma solúvel do VEGFR (sVEGF receptor-1 – sVEGFR-1) que não possui o domínio intracelular quinase. O sVEGFR-1 tem alta afinidade por VEGF que inibi a mitogênese induzida por este fator, provavelmente pelo seu seqüestro. Além dessa ação, o sVEGFR-1 parece inibir a sinalização mediada pelo VEGF por meio de heterodimerização, o que impediria os sinais de tradução do KDR pois o sVEGFR-1 não possui o domínio tirosina quinase intracelular. O VEGF encontra-se em níveis plasmáticos elevados em pacientes com câncer, isquemia e pré-eclâmpsia (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997; TAKAHASHI; SHIBUYA, 2005).

Arnold et al. (2001) em estudos realizados com ovelhas jovens, demosntrou uma variação na expressão do sistema VEGF relaciona à dieta alimentar, no qual foi observado uma queda de 50% na expressão do mRNA do Flt-1 e do KDR em animais que tiveram sua dieta reduzida em 60% dos níveis recomendados pelo NRC durante o segundo e terceiro terço de gestação. Em outro estudo realizado com ovelhas jovens, Redmer et al. (2005) demonstrou uma menor expressão do VEGF e do Flt-1 na placenta de animais que receberam uma dieta de elevado valor energético, quando estas foram analisadas aos 81 dias de gestação. Além desses trabalhos, há outros que demonstram a influência de outros fatores, como estresse térmico (REGNAULT et al., 2002, 2003), idade materna (BOROWICZ et al., 2005), alta altitude e consequência de hipóxia crônica (WHEELER et al., 2002; MAYHEW et al., 2004).

Cimpean et al. (2008) estudaram o padrão e a localização da expressão do VEGF-A, Flt-1 e do KDR em timos normais e com timomas em humanos, estabelecendo assim uma correlação do VEGF-A e seus receptores com a densidade microvascular. Observaram reação positiva para o VEGF-A e seus receptores com uma marcação citoplasmática e granular em todos os casos estudados. Células epiteliais na região medular, subcapsular e algumas na região do córtex apresentaram marcação positiva, assim como os corpúsculos de Hassal ou tímico. Em timos na fase de involução, as regiões positivas foram correlacionadas com os vasos sanguíneos dilatados e regiões com poucos linfócitos.

Portanto, o VEGF é um mediador importante na angiogênese uma vez que facilita o processo de crescimento e remodelação de vasos sanguíneos, e atua como estímulo para a mitogênese e sobrevivência das células endoteliais (CAMELIET, 2005).

3.16 AS INTERAÇÕES CELULARES E A MODULAÇÃO DO AMBIENTE TÍMICO PELO VEGF

O timo, órgão linfóide central para o desenvolvimento de células T, originadas de células precursoras da medula óssea, pode ser o local de integração de diferentes redes auto-imunes que estão potencialmente envolvidas na regulação do desenvolvimento dessas células. Além disso, o estroma tímico provê um microambiente especializado na sobrevivência, proliferação, diferenciação e maturação das células T (LEE et al., 2007).

O timo é dividido em compartimentos morfológica e funcionalmente distintos. O córtex apresenta alta celularidade e contém timócitos inicialmente CD4⁻ CD8⁻ (duplo negativo, DN) e também CD4⁺ CD8⁺ (duplo positivo, DP) imaturos, sujeitos à seleção positiva pelo epitélio cortical. A medula, de celularidade mais baixa, apresenta timócitos em estágio de maturação mais avançado, os quais são submetidos à seleção negativa pelas células dendríticas e epitélio medular. As células DN apresentam pelo menos 4 estágios de desenvolvimento, sendo que o VEGF é expresso nos estágios intermediários nos animais neonatos, mas não nos estágios inicial e final (CUDDIHY et al., 2009). Ao final da maturação, na medula, há a perda de um ou outro marcador, o que torna o timócito CD4⁻ CD8⁺ ou CD4⁺ CD8⁻ (PROCKOP; PETRIE, 2000).

Outras populações celulares tímicas em neonatos também apresentam expressão do VEGF, como é o caso das células epiteliais, estromais e hematopoiéticas. Animais adultos, por outro lado, não apresentaram reação positiva para VEGF em nenhum dos tipos celulares mencionados e testes de expressão de mRNA também falharam ao tentar detectar VEGF em timos de camundongos adultos (CUDDIHY et al., 2009).

A importância do VEGF para manutenção do padrão vascular no adulto e no neonato também varia. No neonato, não apenas o arranjo vascular tímico é determinado pela expressão de VEGF como também a quantidade de timócitos. No entanto, a proliferação e a apoptose celular são eventos independentes da expressão deste fator de crescimento. Em neonatos o endotélio tímico e os timócitos interagem por meio da secreção do VEGF e influenciam um ao outro, o que acontece em menor escala no animal adulto. Ainda em neonatos, o receptor KDR é expresso nas células endoteliais em 33% e epiteliais em 11% dos casos, porém em adultos é expresso, respectivamente, em 5% e 1% dos casos. Os timócitos não apresentam evidências da expressão de KDR, o que aponta para uma ação indireta do VEGF sobre estas células. Ao contrário, os timócitos são capazes de influenciar as células endoteliais para que, em resposta ao VEGF, aumentem sua fenestração e possibilitem a migração de linfócitos T. Esta resposta diminui em função do amadurecimento do órgão, que passa a apresentar vasos menos responsivos ao VEGF, além de maior quantidade de pericitos ao redor dos mesmos (CUDDIHY et al., 2009).

3.17 EG-VEGF

EG-VEGF (endocrine gland derived endothelial growth factor) é um fator angiogênico recentemente identificado, cuja expressão de mRNA e proteína é restrita a glândulas endócrinas (LECOUTER et al., 2001). Outros órgãos, como o intestino Delgado, podem apresentar níveis baixos deste fator (LI et al., 2001). Também conhecido como prokinectina 1 (PK-1), o EG-VEGF se liga a dois receptores homólogos (PK-R1 e PK-R2), acoplados à proteína G, e induz aumento da proliferação e sobrevivência celular (KISLIOUK et al., 2005). Foi demonstrado que o EG-VEGF facilita o desenvolvimento de fenestras, aumentando a permeabilidade vascular (LE COULTER et al., 2001). Este efeito promove o transporte de LDLs (low density lipoproteins)

para as células luteínicas, as quais secretam progesterona na corrente sanguínea (FRASER et al., 2005) e colaboram com a hipótese de que este fator esteja ligado à sobrevivência celular.

Ademais, o EG-VEGF é capaz de induzir o aumento do mRNA do VEGF afetando a angiogênese direta e indiretamente (KISLIOUK et al., 2005). Fraser e colaboradores (2005) demonstraram no corpo lúteo cíclico de humanos que a expressão do mRNA do EG-VEGF apresenta um pico na metade da fase luteínica, exatamente quando diminui a expressão do mRNA do VEGF. No primeiro trimestre da gestação o EG-VEGF e o VEGF apresentam pico de expressão na nona e sétima semana, respectivamente. O VEGF permanece elevado até o final do primeiro terço. A expressão do mRNA dos dois receptores do EG-VEGF não se correlaciona entre si: o PK-R1 apresenta perfil de expressão semelhante ao do EG-VEGF e o PK-R2 apresenta o máximo de expressão ao final do primeiro trimestre gestacional (HOFFMANN et al., 2006). A expressão da proteína do EG-VEGF reflete a do mRNA e testes imuno-histoquímicos foram capazes de localizar o EG-VEGF principalmente no sinciciotrofoblasto na sexta e no citotrofoblasto nas oitava e nona semanas gestacionais (HOFFMANN et al., 2006). Foi demonstrado que a localização celular do VEGF é adjacente, porém distinta daquela do EG-VEGF, o que indica que ambos os fatores possuam ações biológicas complementares na placenta (HOFFMANN et al., 2006) e corpo lúteo (CHUNG et al., 2004) humanos.

Placentas humanas de segundo e terceiro terços provenientes de pacientes com pré-eclampsia foram analisadas para a expressão das isoformas de VEGF e seus receptores bem como para expressão do EG-VEGF. Foi demonstrado que o VEGF e o VEGFR1 apresentam-se aumentados nesta condição patológica enquanto o EG-VEGF não apresenta alteração de expressão (CHUNG et al., 2004). A pré-eclampsia é caracterizada por distúrbios na dinâmica vascular, como aumento da vasoconstrição e permeabilidade vascular induzidas pelo endotélio e também hipertensão materna (ROBERTS; LAIN, 2002). O desbalanço entre o VEGF e seus receptores, VEGFR1 e VEGFR2, provavelmente leva a alterações da permeabilidade vascular, o que não pode ser atribuído a falta de alterações descrita para a expressão EG-VEGF (CHUNG et al., 2004). No entanto, o estudo acima mencionado utilizou placentas de segundo e terceiro terços de gestação, nas quais alterações vasculares já estão estabelecidas e a expressão da proteína e mRNA do EG-VEGF e seus receptores já atingiram os níveis mínimos (HOFFMANN et al., 2006). Estudos adicionais são necessários para caracterizar o papel do EG-VEGF no estabelecimento de desordens vasculares placentárias que poderiam evoluir para a pré-eclampsia.

Após estudar a expressão do EG-VEGF na placenta humana, Hoffmann e colaboradores (2007) estudaram a expressão deste fator e seus receptores em todas as fases gestacionais e em idades gestacionais críticas para o desenvolvimento de pré-eclâmpsia em camundongos. Observaram que o EG-VEGF e o VEGF apresentam diferentes padrões de expressão e localização na placenta de camundongos. O EG-VEGF foi localizado na área do labirinto enquanto que o VEGF foi localizado nas células gigantes. Além disso, o nível de proteína e RNAm do EG-VEGF foi alto no início da gestação, enquanto que o VEGF apresentou uma expressão estável por toda a gestação. Em resumo, esses dados sugerem que o EG-VEGF pode ter um efeito direto tanto nas células endoteliais quanto nas trofoblásticas, sendo importante na placentação de camundongos.

Um elemento responsivo à hipóxia (TACGTGCGGC) foi localizado na região promotora do gene do EG-VEGF humano (LE COUTER et al., 2001), o que levou Hoffmann e colaboradores (2006) a investigar a expressão do mRNA e da proteína do EG-VEGF em células trofoblásticas humanas cultivadas em atmosfera de 3% O₂. Foi demonstrado que a transcrição do gene e tradução da proteína são reguladas sob condições de hipóxia. Outro potencial regulador do gene do EG-VEGF é o hormônio luteotrófico (LH), gonadotrofina coriônica humana e progesterona, especificamente para o endométrio (FRASER et al., 2005). Entretanto, outros fatores que apresentem pico de expressão no primeiro trimestre gestacional podem ser potenciais reguladores da expressão gênica e protéica do EG-VEGF (HOFFMANN et al., 2006).

3.18 RECEPTORES PARA EG-VEGF

PK-R1 e PK-R2 ou EG-VEGFR1 e EG-VEGFR2 são receptores acoplados a proteína G, que apresentam 85% de homologia entre si em relação à sequência de aminoácidos. Ambos foram descritos em células endoteliais luteínicas de origem humana e bovina, enquanto células luteínicas esteroidogênicas expressam apenas PK-R1, o qual desempenha um papel importante para a sobrevivência destas células (KISLIOUK et al., 2003). A placenta humana expressa ambos os receptores e as células trofoblásticas gigantes expressam grandes quantidades de PK-R1 entre a 8^a e 10^a semanas gestacionais, exatamente durante o período no qual a placenta apresenta

hipóxia fisiológica de desenvolvimento. Como o EG-VEGF, o PK-R1 parece ser modulado pela hipóxia, no entanto, o PK-R2 não apresenta alterações (HOFFMANN; FEIGE; ALFAIDY, 2006). A localização exata do PK-R1 e PK-R2 nos vilos placentários ainda não foi completamente elucidada uma vez que não existem anticorpos comerciais disponíveis contra estas proteínas (KISLIOUK et al., 2006).

Estes receptores também foram isolados de diversos compartimentos do organismo, como intestino, sistema nervoso e glândulas endócrinas, o que aponta para uma flexibilidade funcional deste sistema. PK-R1 e PK-R2 são ativados por concentrações nanomoleculares do EG-VEGF recombinante, induzindo uma mobilização de cálcio e ativação do IP3 e MAPK (LIN et al., 2002a,b; MASUDA et al., 2002).

Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O detalhamento pertinente aos materiais e aos métodos empregados neste estudo está disposto nas seções que se seguem no decorrer deste capítulo.

4.1. LOCAL DO EXPERIMENTO

O processamento do material para imuno-histoquímica, PCR em tempo real e western blot foi realizado no Laboratório para Estudos Morfofuncionais e Endocrinologia (LEME) do Setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), com a colaboração e sob a supervisão da Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa. A quantificação vascular por meio de técnica estereológica foi realizada no Laboratório de Histologia e Microscopia Eletrônica de Varredura e Transmissão do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

4.2. COLETA DOS TIMOS

Foram coletados 36 timos provenientes de fetos e recém-natos (com 30, 40, 50 e 60 dias), filhotes e adultos (com 6 meses e 12 meses de idade), formando assim 6 grupos etários, de cães domésticos (*Canis familiaris*), sem raça definida (SRD), machos e fêmeas em igual número, oriundos do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (HOVET-FMVZ-USP), Centro de Controle de Zoonoses – CCZ-SP e campanhas de castrações realizadas na cidade de São Paulo. Os animais considerados nesta pesquisa foram de cadelas prenhez e cães que não apresentaram sinais clínicos compatíveis com qualquer patologia, além disso, os cães não apresentaram nenhum grau de consangüinidade.

- Grupo I - fetos com 30 dias.
- Grupo II - fetos com 40 dias.
- Grupo III - fetos com 50 dias.
- Grupo IV - recém-natos com 60 dias.
- Grupo V - filhotes até 6 meses de idade.
- Grupo VI - adultos com 1 ano de idade.

Após o óbito dos animais, a cavidade torácica foi exposta através de uma incisão nas articulações costo-vertebrais visando à localização dos principais vasos arteriais e venosos do tórax. A artéria torácica interna foi isolada nos animais do grupo V e VI, enquanto que nos animais dos Grupos I ao IV a parte torácica da aorta é que foi isolada. Em seguida, foi introduzida na luz do vaso, em sentido cranial, uma cânula com calibre compatível ao diâmetro do vaso e fixada por meio de um fio de algodão e, posteriormente a veia cava caudal e veia cava cranial foram seccionadas. Sendo assim, realizado a lavagem do sistema arterial e venoso do timo com água milliQ autoclavada, tendo como finalidade a remoção de parte do sangue contido no interior do órgão, reduzindo possíveis interferências nos resultados.

Os timos foram retirados dos animais, fragmentados e separados para a realização da imuno-histoquímica, extração de proteína para a técnica de Western Blot e extração de mRNA para a técnica de Real Time PCR. Para os grupos dos cães filhotes e adultos (V e VI) foi separado uma amostra para a realização da análise estereológica, uma vez que a análise nos fetos já foi realizada.

4.3 ESTEREOLOGIA

A estereologia provê formas minuciosas, perspicazes e altamente eficientes de caracterizar uma gama completa de estruturas biológicas (DOCKERY; FRAHER, 2007) e o seu objetivo é determinar parâmetros quantitativos tridimensionais de estruturas anatômicas, a partir de

cortes bidimensionais. Para isso vale-se da geometria e da estatística (MANDARIM-DE-LACERDA, 1995).

4.3.1 Processamento do material para técnica estereológica

Após a retirada dos timos dos animais dos grupos V e VI, os órgãos foram mensurados em seu eixo longitudinal e transversal (tanto na região cranial e caudal). Demarcou-se o eixo longitudinal em cada timo com a passagem de um fio de algodão estéril orientado no sentido crânio-caudal do mesmo. Em seguida, foram seccionados transversalmente com a utilização de uma lâmina cortante estéril, originando fatias, com distância média de 3 mm, para obtermos a estimativa do volume pelo método de Cavalieri. As fatias escolhidas aleatoriamente permaneceram imersas no fixador Karnovsky por um período mínimo de 24 horas, e em seguida obedeceram ao método “orientator” modificado (MATTFELDT et al., 1990).

Posteriormente, os fragmentos tímicos foram lavados em solução de cacodilato de sódio (EMS[®]) a 0,125M e pH 7,4 e imersos em uma solução de tetróxido de ósmio (EMS[®]) a 2%. As amostras permaneceram nesta solução durante 60 minutos, no escuro e sob agitação constante. Em seguidas, foram lavadas na mesma solução tampão de cacodilato anteriormente referida, seguido de água destilada. Após foram imersas em solução aquosa de acetato de uranila (Reagen[®]) a 3%, durante 60 minutos, sob agitação constante e em recipiente escuro.

Os fragmentos foram lavados em água destilada e desidratados em série crescentes de etanóis, sendo depois desidratados em óxido de propileno (EMS[®]) por 10 minutos.

A seguir, as amostras foram embebidas com uma solução de óxido de propileno (EMS[®]) e resina araldite pura (502 Polyscience Inc.[®]), em constante agitação e em diferentes proporções. Após estas etapas, os fragmentos foram transferidos para resina araldite pura (502 Polyscience Inc.[®]) e levados à estufa (60°C), permanecendo durante um período mínimo de 48 horas.

4.3.2 Volume do órgão ou Volume Referência ($V_{(ref)}$) – Método de Cavalieri

Segundo o matemático Bonaventura Cavalieri (1635) o volume de qualquer objeto pode ser estimado através de uma exaustiva série de secções paralelas separadas por uma distância conhecida (HOWARD; REED, 1998). A estimativa se dá pela distância entre as secções (d ou k , sendo d a nomenclatura utilizada para cortes macroscópicos e k para cortes microscópicos) multiplicado pela somatória das áreas (Σa) de cada secção (Equação 1).

$$V_{(ref)} = d \text{ (ou } k) \times \Sigma a$$

Equação 1

Após a retirada dos animais, os timos foram seccionados transversalmente, com o auxílio de uma lâmina cortante, por meio de planos macroscópicos paralelos e seriados, como descritos no trabalho de Henery e Mayhew (1989); Mayhew e Olsen (1991); Mayhew, Mwamengele e Dantzer (1990); Mayhew (1992) e Wulfsohn et al. (2004). Cada timo originou em média 4 faixas, que constitui uma estimativa eficiente para o cálculo do volume tímico pelo método de Cavalieri (GUNDERSEN; JENSEN, 1987; HENERY; MAYHEW, 1989; MAYHEW, 1992; MAYHEW; OLSEN, 1991). À distância entre as fatias (d) não são precisas, então, como proposto por Gundersen et al. (1988b) e Mayhew e Olsen (1991), uma distância média (d) entre as fatias foi estimada através da mensuração do comprimento total do timo, com o auxílio de um paquímetro digital (Starrett®), dividida pelo número total de fatias. A distância média utilizada na maioria dos timos foi de 3,0 mm.

A área das fatias de apenas uma das faces foi calculada, isto é, apenas na face caudal de cada fatia, com o auxílio de um sistema teste, logo, o volume referência dos timos foi obtido através da análise macroscópica.

A acurácia dos resultados obtidos pelo método de Cavalieri foi verificada pelo coeficiente de erro (Equação 2). Este foi calculado pela equação proposta inicialmente por Gundersen e Jensen (1987), e descrita posteriormente em outros trabalhos como Pakkenberg et al. (1989); Mayhew e Olsen (1991) e Duerstock et al. (2003).

$$CE = 1/\Sigma A \times [1/12 (3a + c - 4b)]^{1/2}$$

Equação 2

Onde:

ΣA – Somatório de todas as áreas das secções a

a – Somatório dos produtos de $a \times a$

b – Somatório dos produtos de $a \times (a+1)$

c – Somatório dos produtos de $a \times (a+2)$

4.3.3 Método Orientator

O tecido ou órgão isotrópico é aquele onde a estrutura aparece homogeneamente, com as mesmas características em todas as direcções, diferente dos cortes anisotrópicos onde há uma orientação na apresentação do material (MANDARIM, 1994).

A estimativa de muitos parâmetros estereológicos necessita de secções isotrópicas, ou seja, de cortes AUI (Aleatórios e Uniformemente Isotrópicos) ou IUR (Isotropic Uniform Random) como pré-requisito. Para obtermos cortes AUI ou IUR de qualquer tecido ou órgão utilizamos o método orientator (MATTFELDT et al., 1990).

O método do orientator é usado para estimar o comprimento (L_v), densidade de superfície (S_v) e outros parâmetros estereológicos em secções isotrópicas. Para esta pesquisa usou-se o método “orientator” modificado segundo Mattfeldt et al. (1990).

Segundo este método um fragmento de tecido (ou órgão) deve ser seccionado em dois cortes consecutivos. O primeiro corte deve ser realizado num ângulo determinado aleatoriamente, codificado conforme uma tabela de números aleatórios. Depois a face de corte deve ser apoiada no plano da mesa e novamente o tecido deve ser seccionado segundo um ângulo aleatório. Assim, podemos admitir que os fragmentos obtidos contêm tecido de modo isotrópico, mas o procedimento pode ser repetido outras vezes para maior segurança nos casos em que o material for altamente isotrópico (MATTFELDT et al., 1990).

Selecionou-se aleatoriamente uma proporção de fatias cortadas de cada timo, que permitiram a amostragem do órgão como um todo (WEIBEL, 1979).

Para tornar cada fatia isotrópica, as mesmas foram orientadas de acordo com seu eixo longitudinal e submetidas à sistemas com diferentes ângulos. Cada sistema foi adaptado para o tamanho de cada fatia original e para a amostra formada. Estes sistemas são denominados relógio Φ (seno) ou Φ -clock (Figura 2A), e relógio θ (co-seno) ou θ -clock (Figura 2B). O primeiro sistema a ser utilizado foi o Φ -clock, a fatia foi colocada com seu eixo longitudinal no sentido do ângulo 0° , escolheu-se um ângulo aleatório e a fatia foi seccionada. Um dos dois pedaços formado foi escolhido e colocado no θ -clock com a face do corte para baixo e novamente era seccionado em um novo ângulo aleatório. Para a escolha dos valores foi utilizada uma tabela de números aleatórios ("Random Numbers"). Os fragmentos foram seccionados até atingirem o tamanho ideal (cerca de 1 mm^2) e serem processados para microscopia de luz de cortes semi-finos.

Fonte: adaptado de Mandarin-de-Lacerda (2003)

Figura 2 - Sistemas testes com diferentes ângulos utilizados no método orientador. A - relógio Φ (seno) ou Φ -clock. B - relógio θ (co-seno) ou θ -clock.

4.3.4 Microscopia de luz de cortes semi-finos

Todos os blocos proveniente do material processado, foram trimados para evidenciar as regiões de interesse e seccionados seriadamente com 1 μm de espessura. As secções foram obtidas com o auxílio do ultra-micrótomo MT-XL[®] equipado com um contador de secções e usando navalha de vidro. As secções foram coletadas sobre lâminas e secas em placa térmica (Leica[®]), e em seguida coradas com uma solução de azul de toluidina alcoólica. Posteriormente foram cobertas com uma gota de araldite (502 Polyscience Inc.[®]) e montadas sob lamínula.

4.3.5 Análise Estereológica

O objetivo da estereologia é determinar parâmetros quantitativos tridimensionais de estruturas anatômicas a partir de cortes bidimensionais. Para isso vale-se da geometria e da estatística (MANDARIM, 1994).

Geometricamente os vasos, são estruturas tubulares ideais para um eficiente transporte e distribuição de fluídos por todo o organismo. Formam uma rede complexa e ramificada, conectados de forma única, a reconstrução física desta rede é baseada em secções seriadas. O número de capilares na rede equivale com a conectividade, com isso, na prática estereológica o número de capilares é igual à estimação da conectividade (NYENGAARD; BENDTSEN; GUNDERSEN, 1988).

A área de superfície vascular é o produto do seu comprimento e circunferência, sendo importante para a descrição quantitativa dos vasos (NYENGAARD; BENDTSEN; GUNDERSEN, 1988).

4.3.5.1 Método Disector Físico – Quantificação vascular

A quantificação vascular do timo dos cães nos diferentes grupos etários foi realizada utilizando o método estereológico do disector físico, descrito inicialmente por Sterio (1984) e por Pakkenberg e Gundersen (1988, 1989), associado ao volume referência. O método do disector permite contar partículas independentemente do tamanho, forma, distribuição ou orientação, em um volume conhecido, utilizando pares de secções provenientes de cortes seriados (PAKKENBERG; GUNDERSEN, 1988; POVER; COGGESHALL, 1991; COGGESHALL, 1992; MAYHEW, 1992; COGGESHALL; LEKAN, 1996; MAYHEW; GUNDERSEN, 1996).

O disector permite a composição das estruturas em três dimensões utilizando um sistema teste com uma área (a) conhecida, número de pontos (p), e um plano paralelo com uma altura (h) (STERIO, 1984).

Cada disector é constituído por duas secções idênticas separadas por uma altura conhecida, sendo estas secções denominadas de “reference-section” e “look-up section”, e as partículas encontradas na “reference-section”, mas não na “look-up section”, são chamadas de “transects” (GAGLIARDO, 2003).

A observação do material e a captura da imagem foram realizadas com o auxílio do microscópio Olympus® BX 60 e de uma câmara digital AxioCam HRC Zeiss®, na qual a imagem da “reference section” e da “look-up section” eram capturadas e transferida para a tela de um computador. Sobre a tela do computador, era aplicada uma área teste (com linhas de inclusão e exclusão), e os perfis vasculares presentes na “reference-section” eram comparados com os perfis da “look-up section”. Os perfis identificados em cada secção mudam entre os planos seccionais em três possibilidades para estimar a conectividade.

Os disectors foram aplicados por toda extensão do timo, para permitir que todas as regiões apresentassem as mesmas chances de serem amostradas, obedecendo a um sistema de amostragem denominado “systematic random sampling scheme” (MAYHEW; GUNDERSEN, 1996), mencionado de maneira similar por Gundersen et al. (1988a); Gundersen et al. (1999); Pakkenberg e Gundersen (1988, 1989) e Pover e Coggeshall (1991). Para isso, fez-se necessário

estabelecer um intervalo (k) entre as “reference section” ao longo dos disectors utilizados, sendo que a primeira “reference section” analisada foi escolhida aleatoriamente, dentro do intervalo pré-estabelecido, que vai de 1 a k , como preconizado por Gundersen et al. (1988a); Pakkenberg e Gundersen (1988) e Pover e Coggeshall (1991).

De acordo com Gundersen et al. (1988a) e Mayhew e Gundersen (1996) uma população de 100 a 200 perfis devem ser contados para estimar a densidade numérica. Assim sendo, é imperativa a necessidade de um estudo piloto para se estabelecer a quantidade de disectors utilizada para atingir este número populacional. Neste trabalho, foi determinado que em torno de 20 disectors, nos forneciam uma contagem ideal, isto é, uma quantidade mínima de 100 perfis.

Sabendo da quantidade de disectors necessária e o tamanho da amostra do timo, este mensurado com a utilização de um paquímetro digital (Starret®), foi possível delimitar um intervalo de secções no qual permitiu que todas as regiões dos timos fossem amostradas. Desta forma, foi utilizado um $k = 300$ para os timos. A primeira secção de análise do disector, em todos os grupos, foi escolhida de maneira aleatória como descrito anteriormente.

A área teste (A_t) utilizada foi definida por um conjunto de linhas (retas) e pontos, além de linhas de inclusão e exclusão (Figura 3), onde os perfis que tocam as linhas de exclusão não são considerados, permitindo uma igual chance de amostragem dos perfis, independente do tamanho destes, em uma abordagem imparcial. Este foi sobreposto à imagem morfológica para a contagem estereológica.

Fonte: adaptado Mandarin-de-Lacerda (2003)

Figura 3 - Em A, a “reference section” é delimitada por uma área teste com linhas de inclusão (linhas pontilhadas) e de exclusão (linhas cheias). Em B, a “look-up section” é delimitada por uma área teste rígida

No disector com área = a , e com a distância entre as secções = h , o volume do disector ($v_{(dis)}$) é calculado de acordo com a equação 3.

$$v_{(dis)} = a \cdot h$$

Equação 3

4.3.5.2 Determinação do Número de Euler no Método de Disector – Número de Estruturas

O princípio de ConnEulor ou de conectividade, é uma extensão do método de disector para a estimação do número de estruturas. Cada estrutura tem um número de Euler ou

conectividade que é obtido com exaustivas secções seriadas da amostra (DEHOFF, 1972; KROUSTRUP; GUNDERSEN, 2001).

O número de Euler é um valor inteiro, específico, que pode ser definido por algumas estruturas em alguma dimensão (DEHOFF et al., 1972; ZHAO; MACDONALD, 1993; KROUSTRUP; GUNDERSEN, 2001). Sua estimação é independente da direção e orientação da leitura.

O conceito de conectividade está intimamente relacionado com a integridade geométrica das curvas de superfície, esta estimação estereológica foi estudada primeiramente por F. Rhine's e R. DeHoff's na Flórida (NYENGAARD; BENDTSEN; GUNDERSEN, 1988).

De acordo com Kroustrup e Gundersen (2001); Nyengaard e Marcussen (1993) e Nyengaard, Bendtsen e Gundersen (1988), para estimar a conectividade deve-se enumerar os chamados planos tangenciais. Em cada ponto de uma superfície lisa no espaço tridimensional pode-se definir a curvatura da superfície, a qual é normalmente de 3 tipos:

- ✓ Superfície do lúmen do capilar convexa, sendo caracterizado por uma saliência externa, o raio da curvatura tem seus eixos na margem luminal da superfície, conferindo partes completamente fechadas chamadas de “Hole”, H, ou fragmentos luminais (Figura 4A).
- ✓ Superfície côncava, sendo o oposto da convexa, conferindo uma nova parte isolada chamada de “Island”, I, da parede interna do lúmen, aparentando um lago luminal (luminal lagoon) (Figura 4B).
- ✓ A superfície em sela ou “Saddle surface” é complexa: em uma direção (desigual ao longo de todo o eixo capilar) a curvatura é côncava com o centro do raio da curvatura saindo do lúmen, na outra direção (do outro lado do capilar) a curvatura é, normalmente, do tipo convexo, é a divisão do lúmen capilar em dois ou mais lumens, uma conexão luminal ou uma nova conexão entre as partes isoladas chamadas também de “Bridge”, B (Figura 4C).

Fonte: adaptado Kroustrup e Gundersen (2001)

Figura 4 - Amostragem do disector e estimação dos planos tangenciais. Em A, a superfície convexa do capilar é mostrada na “reference section” e não na “Look-up section”, estruturas chamadas de “Hole”. Em B, uma irregularidade da parede do capilar é observada conferindo uma nova parte isolada chamada de “Island”. Em C, na “reference section” a curvatura é côncava, e na “look-up section” a curvatura é do tipo convexa formando uma divisão do lúmen capilar em dois ou mais lumens, chamadas também de “Bridge”

Assim, segundo Kroustrup, Gundersen (2001), as “Bridges” contribuem com -1, e as “Islands” e “Holes” contribuem com +1, formando a equação 4.

$$\Sigma X = \frac{\Sigma I - \Sigma B + \Sigma H}{2}$$

Equação 4

Onde:

ΣX = número total de Euler

ΣI = número total de “Islands”

ΣB = número total de “Bridges”

ΣH = número total de “Holes”

A constante 2 no denominador, reflete que a contagem de “Islands”, “Bridges” e “Holes” no disector é representada nas duas direções simultaneamente.

Numa amostra uniforme e randômica do disector a densidade do número de Euler (X_v) é estimada de acordo com a equação 5.

$$X_v = \frac{\Sigma X}{\Sigma_v \text{ (dis)}}$$

Equação 5

Calculando a área do sistema teste (a) e o número de Euler na “reference section” com a respectiva “look-up section”, obtemos a densidade numérica vascular ($N_{v(\text{cap})}$), ou densidade de conectividade (Equação 6) (NYENGAARD; MARCUSSEN, 1993).

4.3.5.3 Estimação da Densidade Numérica Vascular ($N_{v(\text{vasc})}$)

Calculando a área do sistema teste (a) e o número de Euler na “reference section” com a respectiva “look-up section”, obtemos a densidade numérica vascular ($N_{v(\text{cap})}$), ou densidade de conectividade (Equação 6) (NYENGAARD; MARCUSSEN, 1993).

$$N_{v(vasc)} = \frac{-\Sigma X}{2 \cdot h \cdot \Sigma a}$$

Equação 6

Onde:

ΣX = número de Euler

H = altura do disector, distância entre os 2 planos de secções

Σa = total de áreas dos disectors

4.3.5.4 Número Total de Vasos no Órgão ($N_{(vasc)}$)

De acordo com Kroustrup e Gundersen (2001), com a densidade numérica e o volume referência do órgão calculado pelo método de Cavalieri, obtemos o número total de vasos no órgão (Equação 7).

$$N_{(vasc)} = N_{v(vasc)} \cdot V_{(ref)}$$

Equação 7

4.3.5.5 Estimação da densidade de comprimento do vaso (L_v), comprimento do vaso (L), densidade de superfície de área (S_v), superfície de área (S).

A estimação do comprimento requer planos isotrópicos, sendo a estrutura maior que o diâmetro (MATTFELDT et al., 1990).

Segundo Nyengaard e Marcussen (1993) a densidade de comprimento do vaso (L_v) e a densidade de superfície de área (S_v) são estimadas de acordo com as equações 8 e 9 respectivamente.

$$L_v = 2 \cdot Q_a$$

Equação 8

Onde:

Q_a = perfis de vasos por área

$$S_v = 2 \cdot I_L$$

Equação 9

Onde:

I_L = número de intersecções entre os vasos e as linhas do sistema teste

Para obtermos o comprimento do vaso e a área de superfície, basta multiplicarmos a densidade de comprimento (L_v) e a densidade de superfície (S_v) pelo volume de referência do órgão ($V_{(ref)}$) (Equação 10 e 11).

$$L = L_v \cdot V_{(ref)}$$

Equação 10

$$S = S_v \cdot V_{(ref)}$$

Equação 11

4.3.6 Análise Estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo programa BioEstat 3.0 (AYRES et al., 2003).

As variáveis correlacionadas foram: comprimento, largura, espessura do timo, L , L_v , S , S_v , $N_{(vasc)}$, $N_{v(vasc)}$ e $V_{(ref)}$.

Os testes não-paramétricos utilizados foram de Mann-Whitney e Wilcoxon, os quais correlacionaram as variáveis entre si de acordo com a faixa etária dos grupos e o sexo, respectivamente.

Para este estudo foi utilizado um índice de variância significativo $p < 0,05$.

4.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA O SISTEMA VEGF (VEGF-A, VEGF-C, FLT-1, KDR E FLT-4) E EG-VEGF

Os fragmentos dos timos coletados para as análises imuno-histoquímicas foram lavados em solução tampão fosfato (PBS) de pH 7,2, e em seguida, fixados em solução formol 10% tamponado por 24 horas a 4°C. Após o período de fixação, os fragmentos tímicos foram lavados em solução PBS para a retirada do excesso de fixador, e imersos novamente em PBS por 24 horas a 4°C antes do início do processamento de inclusão.

4.4.1 Inclusão em Paraplast

Retirado do PBS a 4°C, o material foi desidratado em uma série crescente de etanol: etanol 70° overnight, etanol 90° por 1 hora, 2 séries de etanol absoluto por 1 hora e 30 minutos cada. Em seguida, as amostras foram diafanizadas em xilol, 2 séries de 1 hora e 30 minutos cada. Após a diafanização, iniciou-se o processo de inclusão em paraplast (Histosec® - Merk – Alemanha), as amostras foram imersas em 2 séries de paraplast por 1 hora, em estufa a 60°C, sendo, após esse período, incluídos em paraplast, com auxílio de suportes de metais, em temperatura ambiente até a completa polimerização. Após a polimerização, os blocos foram mantidos a 4°C até a sua utilização.

4.4.2 Reação de imuno-histoquímica

Cortes de 5µm de espessura foram realizados em micrótomo automático Leica, e colocados em lâminas tratadas com APES (aminopropiltietoxisilano), em seguidas ficaram em estufa a 37°C, por 24 horas.

As lâminas foram desparafinizadas em 2 séries de Xilol por 20 minutos cada, seguidas de reidratação decrescente de etanol, permanecendo 2 séries de 5 minutos cada em etanol absoluto. Após, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena, com uma solução a 3% de peróxido de hidrogênio PA e metanol previamente resfriado, por 20 minutos a 20°C. Em seguida, as lâminas passaram por mais uma série de etanol absoluto por 5 minutos, etanol 90° por 5 minutos, etanol 70° por 5 minutos e água destilada por 5 minutos. Foram imersas em tampão citrato e aquecidas a 96° durante 30 minutos e resfriadas 20 minutos em temperatura ambiente. Após foram lavadas em 3 séries de 5 minutos em PBS. Outro bloqueio de reações cruzadas foi feito utilizando o Protein Block (Dako, Glostrup, Danmark) por 20 minutos em câmara úmida na temperatura ambiente.

Os anticorpos primários foram colocados sobre os cortes e utilizados conforme a tabela abaixo, os cortes controles receberam PBS, a incubação durou 20 horas em câmara úmida a 4°C.

Os anticorpos descritos na tabela 2 foram os que apresentaram reação satisfatória no timo de cães. Para o VEGF-A foram testados 4 anticorpos, 3 policlonais (Santa Cruz® SC-152, Chemicon® CBL42, Abcam® VG76E AB119) e 1 monoclonal (Chemicon® MAB1665), o anticorpo da Santa Cruz® apresentou uma reação clara e homogênea no tecido.

Tabela 2 – Descrição dos anticorpos utilizados na Imunoistoquímica

Anticorpo	Tipo	Hospedeiro	Informações	Diluição
VEGF-A	Policlonal	Coelho	VEGF (A20): sc-152, Santa Cruz Biotechnology® Inc., Santa Cruz, CA, USA	1:100
VEGF-C	Policlonal	Coelho	Zymed laboratories Inc., San Francisco, USA	1:200
Flt-1	Policlonal	Coelho	Flt-1 (C17): sc-316, Santa Cruz Biotechnology® Inc., Santa Cruz, CA, USA	1:50
KDR	Policlonal	Coelho	Flk-1 (C20): sc-315, Santa Cruz Biotechnology® Inc., Santa Cruz, CA, USA	1:200
Flt-4	Policlonal	Coelho	Flt-4 (C20): sc-321, Santa Cruz Biotechnology® Inc., Santa Cruz, CA, USA	1:100
EG-VEGF	Policlonal	Coelho	Invitrogen™ Corporation, Carlsbad, CA, USA	1:1000

Após 20 horas, os cortes foram lavados em PBS por 3 séries de 5 minutos cada, e em seguida foi realizada a incubação do anticorpo secundário universal (Kit Streptavidina-Biotina, LSAB+System-HRP, Dako, Glostrup, Danmark) por 45 minutos em câmara úmida, temperatura ambiente. As lamínas foram lavadas em PBS, 3 séries de 5 minutos cada e incubadas em estreptavidina por 45 minutos em câmara úmida, temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas novamente em PBS, reveladas em DAB (Kit DAB – Diaminobenzidina, DAKO), lavadas em água corrente filtrada, contracoradas em hematoxilina. Após a coloração as lâminas foram lavadas em água corrente filtrada, desidratadas por série crescente de etanol (70°, 90°, absoluto I, absoluto II) por 5 minutos cada, diafanizadas em Xilol (2 séries de 5 minutos cada) e montadas com lamínulas coladas com resina sintética dissolvida em tolueno (Permunt™). Como controles negativos foram utilizados cortes incubados com PBS em substituição ao anticorpo primário. Os controles positivos foram feitos utilizando-se tecido placentário de bovinos e cães com comprovada marcação para os anticorpos utilizados (MARQUES JR., 2006).

Os cortes de tecidos tímicos foram observados em microscópio Nikon Eclipse (E-800) equipado com câmera de vídeo (CoolSNAP-Pro of Color®) e as imagens foram capturadas através do software Image-Pro Plus, versão 4.5 (Media Cybernetics Inc., USA).

4.5 REAL TIME PCR

O RNA é uma molécula mais sensível ao ambiente que o DNA, por isso nos processos de extração e manipulação deve-se ter muito cuidado, ela é facilmente degradada pela temperatura e por enzimas, assim sendo necessário o uso de materiais *RNAse FREE* e banho de gelo na manipulação.

4.5.1 Extração do RNA Total

A extração do RNA total das amostras foi realizada segundo o protocolo do Kit RNA Spin GE®, seguida da transcrição reversa utilizando a **Transcriptase Reversa** (Superscrip III, Invitrogen®, Carlsbad CA – USA) para a confecção do cDNA.

As amostras de timo com tamanho aproximado de 0,5 cm³ foram coletadas em criotubos RNAse-free e mantidas em freezer -80°C até o momento da extração do RNA.

Para a extração, foi pesado aproximadamente 30mg de tecido e colocado em eppendorfs RNAse free com 350 µl de Lysis Buffer RA1 e 3,5 µl de β-Mercaptoetanol.

As amostras foram maceradas com pistilos (para eppendorff), autoclavados e RNAse-free, até a total dissolução do tecido. Durante todo esse processo as amostras foram mantidas no gelo.

O material macerado com o pistilo foi transferido para o interior da coluna RNAse Mini Filter com um tubo coletor, e levado à Centrífuga 5804 *Eppendorf*® refrigerada por 2 minutos, 11.000G à 4°C.

A coluna RNase Mini Filter foi descartada e o material filtrado transferido para um eppendorff RNase-free. Foi adicionado 350 µl de álcool 70° (diluído em DEPC) e passados no vórtex por 5 segundos.

As amostras foram, em seguidas, transferidas para RNase Mini Columns e levadas à Centrífuga 5804 *Eppendorf*[®] refrigerada por 1 minuto, 8.000G e a 4°C, até que todo o conteúdo fosse filtrado, permanecendo o RNA aderido à coluna. O líquido filtrado foi descartado e adicionado 350 µl de MDB sobre a coluna, seguido de centrifugação por 2 minutos, 11.000G a 4°C. Foi adicionado 95 µl de DNase previamente preparada (90 µl de DNase Reaction Buffer + 10 µl de DNase) sobre a coluna. Após 15 minutos em temperatura ambiente, foram adicionados 200 µl de Buffer RA2 sobre a coluna e as amostras foram levadas à Centrífuga 5804 *Eppendorf*[®] refrigerada por 2 minutos, 11.000G e a 4°C. Em seguida, adicionou-se 600 µl de Buffer RA3 sobre a coluna e centrifugadas por 2 minutos, 11.000G e a 4°C. Foi adicionado mais 250 µl de Buffer RA3 sobre a coluna e centrifugados novamente por 2 minutos, 11.000G e a 4°C. A coluna foi transferida para um novo tubo eppendorff RNase-free (1,5 ml) e ao contrário dos 100 µl de H₂O Miliq RNase-free, sugeridos no protocolo do kit, foram adicionados apenas 50 µl com o objetivo de concentrar o RNA. O aumento na concentração de RNA facilita a manipulação no momento do preparo da placa para a leitura no RealTime-PCR. As amostras foram centrifugadas por 2 minutos, 11.000G e a 4°C, as colunas foram descartadas e o RNA presente no eppendorff armazenado no freezer -80°C até o momento da transcrição.

4.5.2 Quantificação do RNA total

Para a quantificação do RNA total as amostras foram diluídas na proporção 1:50 e analisadas no *BioPhotometer Eppendorf*[®], ou seja, 1 µl do RNA para 49 µl de H₂O DEPC. O aparelho foi calibrado utilizando H₂O DEPC.

O *BioPhotometer Eppendorf*[®] utiliza a espectrometria para detecção de concentração das amostras. Ele possui em seu sistema operacional com programas pré-definidos para a característica de cada amostra, como ssDNA, dsDNA, RNA, oligo, proteína pelo método de Lowry e Bradford.

As amostras foram colocadas em cubetas Eppendorf UVette[®] e inserida no interior do aparelho, sendo assim quantificadas a 260/280nm. Os valores considerados ideais foram entre 1,7 – 2,0 ng/μl).

O aparelho além de quantificar as amostras, calcula o grau de pureza, sendo possível constatar e identificar contaminantes, possivelmente provenientes de uma extração de má qualidade.

4.5.3 Transcrição Reversa (construção da fita DNA complementar – cDNA)

Para a transcrição reversa, foi acertada a concentração inicial (Ci) da amostra de RNA para 1μg/μl, utilizando a seguinte fórmula:

$$Vi = 1000/[Ci \text{ amostra RNA}]$$

Sendo assim, aos tubos RNase-free contendo 1 μg de RNA da amostra, foram adicionado 1μl de buffer, 1μl de DNase e completando até o total de 9 μl com H₂O Miliq autoclavada DEPC. Esse Mix I foi incubado por 15 minutos à temperatura ambiente, promovendo assim a destruição do DNA contaminante nas amostras, assegurando que os resultados são oriundos do mRNA e não do DNA genômico. Em seguida, foi adicionado 1 μl de EDTA para inativar a reação da DNase, as amostras foram incubadas durante 10 minutos à 65°C no Termociclador Mastercycler[®] Family Eppendorf[®].

Para que a reação de transcrição ocorra deve haver no meio oligonucleotídeos formados por timina, o Oligo DT. Essa cadeia se hibridiza com a cadeia poli-A presente na extremidade 3' do RNA a ser transcrito, servindo como iniciador da reação da enzima, que por sua vez terminará a fita de DNA. Ao final do processo sobra uma dupla hélice mista, formada por uma de mRNA e outra de DNA. A reação final com RNase H faz com que a fita de mRNA que serviu de molde seja degradada, restando somente o cDNA.

Sendo assim, foram adicionados 2 μl do Mix II (1μl de DNTP + 1μl de OligoDT) em cada amostra, e incubadas durante 5 minutos à 65°C no Termociclador Mastercycler[®] Family Eppendorf[®].

Em seguida, foi adicionado o Mix III (4 µl 5x Buffer + 1 µl DTT + 1 µl RNAout + 1 µl H₂O Miliq autoclavada + 1 µl Superscript III) em cada amostra, sendo incubados durante 50 minutos à 37°C e durante 15 minutos à 70°C no Termociclador Mastercycler® Family Eppendorf®.

Ao término da transcrição, as amostras de cDNA foram mantidas no freezer -20°C até o momento da PCR em tempo real (curva e amostras). Todos os produtos utilizados para a transcrição eram provenientes da Invitrogen Carlsbad – USA.

4.5.4 Real Time PCR - ABIPRIMS® 7500 Sequence Detections Systems (Applied Biosystems®)

Após a transcrição reversa (RT), foi realizado o PCR em Tempo Real (Real Time PCR) no aparelho ABIPrism® 7500 (Applied Biosystems, Foster, USA). Neste sistema, as fases de anelamento, extensão e desnaturação ocorrem durante os ciclos de maneira similar à utilização do termociclador comum, uma vez que o ABIPrism 7500 é um termociclador acoplado a uma câmera CCD. A diferença é que a amplificação da sequência alvo é detectada em tempo real pela emissão de fluorescência, que ocorre quando há formação de dupla fita na região codificada pelo par de primers. A quantificação relativa da amplificação é feita pela fluorescência captada pela unidade óptica do aparelho. A amplificação é detectada onde as condições “ótimas” para o PCR são mantidas, ou seja, na fase exponencial.

Como controle interno das reações de PCR em tempo real foi utilizado a amplificação do gene constitutivamente expresso GAPDH (gliceraldeído fosfato desidrogenase) canino, a fim de normalizar os resultados obtidos para os genes-alvo. O PCR para amplificação de fragmentos dos genes alvo (VEGF-A, Flt-1, KDR, Flt-4 e EG-VEGF) e do GAPDH, utilizado para normalizar estes genes, foi realizado utilizando o sistema TaqMan® (Applied Biosystems, Foster, USA) conforme o protocolo descrito a seguir. Foi preparada uma mistura (Mix) para cada gene estudado. Neste mix foram adicionados, por amostra a ser analisada, 6,25 µl de tampão Universal PCR Máster Mix (Applied Biosystems, Foster, USA), 0.5 µl de primers sense, anti-sense

(concentração final de 900mM) e sonda (concentração final de 250mM) para os genes alvo e 0.5µl de primers sense, 0.5 µl de primers anti-sense e 0.5 µl de sonda (mesma concentração final acima) para o controle endógeno, 2.5µl de cDNA e a quantidade de água miliQ® autoclavada necessária para completar um volume final de 12,5µl.

Para otimização da concentração de cDNA a ser utilizado bem como para cálculo da eficiência da amplificação do controle endógeno, foi construída uma curva padrão com as seguintes quantidades de cDNA: 0,5, 0,25, 0,0625 e 0,03125µg. Estas quantidades foram testadas em duplicata. Duas amostras de cada gene analisado foram utilizadas, uma com expressão esperada alta e outra baixa.

O cálculo da eficiência para os genes alvo foi feito através do programa “LinRegPCR” (RAMAKERS et al., 2003). Para isso, considerou-se a eficiência média com base na curva de amplificação individual de cada amostra. O cálculo da eficiência para GAPDH foi feito pela fórmula $E = 10^{(-1/\text{slope})}$, na qual E= eficiência e slope = valor obtido a partir da curva padrão gerada pelo aparelho ABI 7500.

O cálculo da quantificação relativa dos genes-alvo foi feito através da fórmula de Pfaffl :

$$R = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta CP_{\text{target}}(\text{calibrador} - \text{amostra})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta CP_{\text{ref}}(\text{calibrador} - \text{amostra})}}$$

R (ratio) = expressão relativa do gene alvo

E_{target} = eficiência de amplificação do gene alvo

E_{ref} = eficiência de amplificação do gene de referência (GAPDH)

$\Delta CP_{\text{target}} = CP \text{ do gene alvo} - CP \text{ do gene de referência}$

$\Delta CP_{\text{ref}} = CP \text{ do gene alvo} - CP \text{ do gene de referência}$

Nestes experimentos as condições de amplificação utilizadas foram: 2 minutos a 50°C, 10 minutos à 95°C e 40 ciclos por 15 segundos à 95°C e 60°C por 1 minuto.

4.5.5 Primers

As sequências utilizadas para a confecção dos primers foram aquelas depositadas no banco público do NCBI ([HTTP://www. ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Os primers utilizados nos testes de PCR em tempo real para o sistema VEGF e GAPDH canino estão listados na tabela 3 abaixo.

Tabela 3 - Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação do GAPDH, VEGF-A, VEGF-C, Flt-1, KDR, Flt-4 e EG-VEGF. **S**= sense, **A** = anti-sense e **P** = probe.

<u>Gene alvo</u>	<u>Número da seqüência no GeneBank</u>	<u>Primers</u>
VEGF-A	Nm_001003175	S GCCCACTGAGGAGTTCAACAT A GCTGGCCTTGATGAGGTTTGAT P CACCATGCAGATTATG
VEGF-C	XM_540047	S CTGTAACAGCTGCATGTTT A CAGTCGGTTTGTACACGGTCTT P GTGTACAGAAAATTCACAGAAATGCTTCTTA
Flt-1	AF262963	S GGCCAGACACTGTATCTCAAATGTA A TCCTTTCTCACTGTTTCAGGCAAA P AAGCAGCCCATTCATG
KDR	DQ269018	S GGCTTGACTTCAACTGGGAATACC A GGTTTTTAGGTCCCGGTAAACAAGT P TTTGAAGCATCAGCATAAAA
Flt-4	NM_182925	S ATGCCAGCCAGTGGGAATT A GGAGGCTTCCACCACCTT P CACTCTCCCCAGGTGCAG
EG-VEGF	XM_547234	S CGGGAAGGAGAGGAGTGTCA A TGCTGGCGCTTTCTGAAGA P CAGCCACAAGGTCCCCT
GAPDH	AB038240	S ACGGGAAGTCCATCTCCATCTT A CACCAGCATCACCCATTG P ATGTTGGCAGGATCTC

4.6 WESTERN BLOT

4.6.1 Extração de proteína

Para a determinação do sistema VEGF e do EG-VEGF as amostras foram homogeneizadas através de um pistilo homogenizador em tampão de lise hipotônico contendo 10mM de TRIS/HCl 5mM de EDTA, pH 7.4, na presença de uma mistura de inibidores de proteases, tais como benzamidina (20µg/ml), pepstatina (1µg/ml), leupeptina (0.5µg/ml), apoproteína (0.1µg/ml) e PMSF (phenylmethanesulphonylfluoride, 100µg/ml). Todo o processo foi realizado a 4°C. O homogenato foi centrifugado a 1000g durante dez minutos a 4°C. O sobrenadante foi então transferido para tubos de 1,5ml e armazenados a -20°C.

A concentração de proteína das amostras foi analisada através do método de Bradford (1976) (Protein Assay Kit; Bio-Rad, Califórnia, USA), comparando as medidas obtidas para as amostras com a curva padrão de albumina lida a 595 nm.

4.6.2 Técnica Western Blot

Essa técnica também conhecida como *imunoblotting* trata-se do confronto de proteínas presentes numa membrana com anticorpos específicos, permitindo a identificação visual da banda formada por elas.

O processo foi realizado em duas etapas: primeiramente as amostras foram solubilizadas a uma concentração final de 1% de SDS (*sodium-dodecyl-sulfate*) e em seguida as proteínas presentes nas amostras foram separadas eletroforeticamente em gel de SDS-poliacrilamida em concentrações de 6% para os receptores, 15% para o VEGF e 17% para o EG-VEGF, em uma voltagem de 120V e miliamperagem (mA) aberta. A acrilamida é formada pela polimerização do ácido acrílico na presença da luz e radical livres, fornecidos pelo APS, catalisado pelo TEMED, formando assim uma trama que dificulta a passagem de moléculas, quanto maior o peso

molecular, menor a velocidade de corrida; o SDS (dodecil sulfato de sódio) é um agente desnaturante no processo, rompendo as ligações di-sulfeto entre as cadeias protéicas.

Ao término da corrida, iniciou-se a segunda etapa, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose hybond-ecl (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK), sob corrente constante de 120 mA, voltagem aberta, durante 2 horas, a 4°C, em tampão Tris-HCl (Tris-HCl 12,5 mM, glicina 95 mM, 1% SDS e 20% de metanol). A qualidade da transferência foi verificada corando-se o gel pós-transferência com azul brilhante de coomassie e a membrana com uma solução de Ponceau.

Após a transferência ocorreu o bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos, que foi realizado por meio de uma mistura contendo TBS-T com o detergente tween 20 (TBS-T, 1% tween) e leite desnatado (5%) por 2 horas em temperatura ambiente (20-25°C) com agitação constante. A membrana foi incubada com o anticorpo primário específico (Tabela 4) diluído em TBS-T e 3 % de albumina a 4°C por 12 horas com agitação constante. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada 3 vezes por 5 minutos em solução de TBS-T, e, em seguida, incubada com o anticorpo secundário em TBS-T 1% de albumina por 2 horas em temperatura ambiente com agitação constante.

Como anticorpo secundário foi utilizado o IgG anti-rabbit presente no kit de revelação (ECL, Amersham Biosciences, NJ-USA) conjugado à peroxidase na titulação de 1:5000.

Após 3 lavagens em TBS-T, o sinal foi detectado pela adição de um substrato para peroxidase (ECL, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) por 2 minutos, o qual produziu uma reação de luminescência no local de ligação do segundo anticorpo. As membranas foram expostas a um filme fotográfico (Filme RX_A IBF Filmes do Brasil, São Paulo, Brasil), a temperatura ambiente, durante 30 minutos. O filme foi revelado com solução reveladora e reforçadora GBX e solução fixadora e reforçadora GBX (IBF Filmes do Brasil, São Paulo). A membrana revelada foi escaneada e a intensidade de marcação foi analisada com o auxílio do programa Image J pela comparação entre o volume das bandas formadas com o controle endógeno beta-actina. Como controle positivo foi utilizado uma amostra de corpo lúteo bovino.

Tabela 4 – Descrição dos anticorpos primários utilizados no western blot

Anticorpo	Tipo	Hospedeiro	Informações	Diluição
VEGF-A	Policlonal	Coelho	VEGF (A20): sc-152, Santa Cruz Biotechnology® Inc., Santa Cruz, CA, USA	1:200
VEGF-C	Policlonal	Coelho	Zymed laboratories Inc., San Francisco, USA	1:500
Flt-1	Policlonal	Coelho	Flt-1 (C17): sc-316, Santa Cruz Biotechnology® Inc., Santa Cruz, CA, USA	1:500
KDR	Policlonal	Coelho	Flk-1 (C20): sc-315, Santa Cruz Biotechnology® Inc., Santa Cruz, CA, USA	1:500
Flt-4	Policlonal	Coelho	Flt-4 (C20): sc-321, Santa Cruz Biotechnology® Inc., Santa Cruz, CA, USA	1:100
EG-VEGF	Policlonal	Coelho	Invitrogen™ Corporation, Carlsbad, CA, USA	1:5000

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos, quando não apresentaram distribuição normal, foram transformados em logarítmos e analisados pelo programa estatístico Minitab. Teste ANOVA paramétrico foi utilizado para análise de variância para os sistemas VEGF e do EG-VEGF durante o desenvolvimento e involução o timo. Foram considerados estatisticamente significativos os valores para $p < 0,05$. Os gráficos foram construídos a partir da média das amostras de cada grupo, do desvio e/ou erro padrão. Foi realizado o teste de correlação de Pearson para análise da correlação da expressão gênica e protéica dos fatores estudados e os valores considerados significativos para $p < 0,05$.

Resultados

5 RESULTADOS

Neste capítulo os resultados estão apresentados em seções, de acordo com a metodologia utilizada no presente estudo.

5.1 ESTEREOLOGIA

Os resultados estereológicos dos animais dos grupos I, II, III e IV (fetos e recém-natos) já foram analisados (AGRESTE, 2005). Estes por sua vez foram agora analisados com os animais dos grupos V e VI (filhotes e adultos).

De forma geral, os aspectos macroscópicos como **o comprimento, a espessura, a largura e o volume**, e os aspectos microscópicos como **densidade de comprimento do vaso (Lv), comprimento do vaso (L), densidade de superfície de área (Sv), superfície de área (S), densidade numérica vascular ($N_{v(vasc)}$), número total de vasos ($N_{(vasc)}$)** do timo tiveram um aumento gradativo de acordo com o desenvolvimento dos animais e do órgão, assim, após 6 meses de idade, quando inicia-se a involução do órgão, observamos a diminuição dos valores. Os valores e os gráficos dessas variáveis são observados nas tabelas 5 e 6 e figura 5.

Após análise estatística com o teste de Mann-Whitney, comparando o sexo, foi observado que há diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nas variáveis macroscópicas comprimento (nos grupos III e IV), largura (nos grupos IV e VI), espessura (nos grupos I, II e VI) e volume (nos grupos III e VI), mostrado na tabela 5 e figura 5. Por outro lado, nos parâmetros microscópicos, foi observado a diferença na densidade de comprimento do vaso – Lv - (nos grupos I e VI), comprimento do vaso – L – (no grupo I), densidade de superfície de área – Sv – (no grupo III), superfície de área – S – (nos grupos V e VI), densidade numérica vascular – $N_{v(vasc)}$ – (nos grupos V e VI), número total de vasos – $N_{(vasc)}$ – (no grupo V), mostrado na tabela 6 e figura 5.

Quando os parâmetros macroscópicos foram comparados entre os grupos, segundo o teste de Wilcoxon, foi observada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em todos os

parâmetros, com exceção da variável espessura (entre os grupos I e III, I e VI, II e III, II e VI). Nos parâmetros microscópicos, não foi observada diferença na L_v (entre os grupos I e II, II e III), L (entre os grupos I e II), S_v (entre os grupos I e II, II e III), S (entre os grupos I e II, II e III), $N_{v(vasc)}$ (entre os grupos II e III, II e VI, III e VI) e $N_{(vasc)}$ (entre os grupos IV e VI).

Como resultados obtidos, observou-se que nos fetos com 30, 40, 50 e 60 dias de desenvolvimento, os timos das fêmeas apresentaram maior volume (V_{ref}) e dimensões de tamanho, e menor densidade numérica vascular - $N_{v(vasc)}$ e número total de vasos - $N_{(vasc)}$ que nos machos. Essa proporção é válida para os animais com 6 meses e durante a involução do órgão, nos animais com 1 ano de idade. Todos os parâmetros estereológicos estudados mostraram aumento gradativo de acordo com as faixas etárias, sendo que nas fêmeas os valores eram maiores do que nos machos, tendo um aumento significativo entre o nascimento (grupo IV) e o início da involução (grupo V). Após 6 meses de idade, as variáveis diminuem de acordo com a involução do órgão. Os vasos observados na microscopia de luz de cortes semi-finos, aumentaram de tamanho gradativamente, assim como a densidade numérica vascular ($N_{v(vasc)}$) e número total de vasos no órgão ($N_{(vasc)}$), sendo mais evidente nos animais com 60 dias de gestação, próximo ao nascimento. Estes por sua vez, diminuíram a frequência nos cortes dos animais com 1 ano de idade.

Tabela 5 - Valores dos parâmetros macroscópicos obtidos com a análise estereológica do timo de cães nos diferentes grupos etários, machos e fêmeas. (*) diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os sexos, teste Mann-Whitney. São Paulo, 2007

		Comprimento (cm)	Espessura (cm)	Largura (cm)	Volume (cm ³)
GI (fetos 30 dias)	Machos	0,576	0,3575	0,4325	0,08906
	Fêmeas	0,67	0,445	0,55	0,16398
	Média do grupo	0,623	0,40125*	0,49125	0,1228
GII (fetos 40 dias)	Machos	0,83675	0,385	0,34975	0,11267
	Fêmeas	0,8775	0,4575	0,5075	0,20374
	Média do grupo	0,857125	0,426*	0,503	0,18366
GIII (fetos 50 dias)	Machos	1,65375	0,4475	0,63	1,9125
	Fêmeas	1,913	0,4075	0,675	2,175
	Média do grupo	1,7932*	0,419	0,652	2,06*
GIV (fetos 60 dias)	Machos	2,3775	0,5275	0,965	3,11
	Fêmeas	2,675	0,5675	1,0775	3,24
	Média do grupo	2,522*	0,55	1,014*	3,12
GV (filhotes até 6 meses)	Machos	6,5	0,66	2,45	8,7
	Fêmeas	5,4	0,62	2,43	10,2
	Média do grupo	5,95	0,64	2,44	9,45
GVI (adultos)	Machos	4,93	0,52	1,64	4,2
	Fêmeas	4,78	0,43	1,68	5,2
	Média do grupo	4,85	0,47*	1,66*	4,7*

Tabela 6 - Valores dos parâmetros microscópicos obtidos com a análise estereológica das variáveis: densidade de comprimento do vaso (Lv), comprimento do vaso (L), densidade de superfície de área (Sv), superfície de área (S), estimativa da densidade numérica vascular (N_v), número total de vasos no órgão (N), do timo de cães nos diferentes grupos etários, machos e fêmeas. (*) diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os sexos, teste Mann-Whitney. São Paulo, 2007

		Lv	L (mm)	Sv	S (mm ²)	$N_{v(vasc)}$	$N_{(vasc)}$
GI (fetos 30 dias)	Machos	2,70	5,40	0,85	1,70	3,5	0,31
	Fêmeas	3,90	8,10	1,45	3,05	2,1	0,34
	Média do grupo	3,3*	6,75*	1,15	2,37	2,8	0,32
GII (fetos 40 dias)	Machos	3,80	7,625	1,85	3,675	5,76	0,64
	Fêmeas	2,10	4,40	0,95	2	5,12	1,04
	Média do grupo	2,95	6,01	1,4	2,83	5,44	0,84
GIII (fetos 50 dias)	Machos	3,80	8,70	1,85	3,20	7,36	14,03
	Fêmeas	3,95	8,70	2,80	6,15	3,56	7,74
	Média do grupo	3,87	8,7	2,32*	4,66	5,46	10,88
GIV (fetos 60 dias)	Machos	5,30	16	2,70	8,30	15,36	47,76
	Fêmeas	5,20	16,75	3,15	9,85	5,87	19,01
	Média do grupo	5,25	16,37	2,92	9,07	10,61	33,38
GV (filhotes até 6 meses)	Machos	52	521,03	24	240,8	25,6	258,93
	Fêmeas	46	402,41	21,4	185,6	19,9	173,75
	Média do grupo	49	461,72	22,7	213,20*	22,75*	216,34*
GVI (adultos)	Machos	32,7	136,96	10	44,6	5,7	26,5
	Fêmeas	14,7	77,6	7,3	28	4,8	23,7
	Média do grupo	23,7*	107,28	8,65	36,30*	5,25	25,10

A

B

C

D

E

F

Figura 5 – Evolução dos parâmetros macroscópicos e microscópicos no timo de cães em diferentes faixas etárias, machos e fêmeas, obtidos com a análise estereológica comparando as variáveis: volume referência, comprimento, espessura, largura, densidade de comprimento do vaso (L_v), comprimento do vaso (L), densidade de superfície de área (S_v), superfície de área (S), estimação da densidade numérica vascular (N_v), número total de vasos no órgão (N) entre as faixas etárias e o sexo. A: comprimento do timo. B: largura do timo. C: espessura do timo. D: Volume referência (V_{ref}). E: densidade de comprimento do vaso (L_v). F: comprimento do vaso (L). G: densidade de superfície de área (S_v). H: superfície de área (S). I: estimação da densidade numérica vascular (N_v). J: número total de vasos no órgão (N). São Paulo, 2007

5.2 IMUNOLOCALIZAÇÃO

No timo dos animais de 30 dias, grupo I, seu tecido tímico não se encontrava organizado em região cortical e medular. Foram observadas pequenas estruturas lobulares circundadas por uma cápsula de tecido conjuntivo, formando aglomerados celulares, ou ilhas celulares, não havia emissão de septos para o interior do parênquima. Essas ilhas celulares possuíam diferentes tamanhos, as mais jovens eram irregulares e menores, com células jovens, com o desenvolvimento, essas se tornaram maiores e arredondadas, com uma população celular mais diferenciada. Os grandes vasos foram observados na região do interstício, no tecido conjuntivo que envolvia os aglomerados celulares, não foram observados grandes vasos no interior do parênquima. Foram observadas células pequenas, com coloração densa, sem diferenciação, migrando dos grandes vasos para o interior do parênquima tímico. Esses aglomerados celulares eram compostos, principalmente, por células epiteliais do tipo 1, 2 e 3, e timócitos imaturos em menor número. Em alguns aglomerados celulares, maiores, mais desenvolvidos, foi possível observar o início da formação dos corpúsculos tímicos. Na periferia dos aglomerados observou-se o predomínio das células epiteliais do tipo 1, menores e mais densas do que as do tipo 2 e 3.

Após 40 dias de desenvolvimento, grupo II, foi observado a emissão de septos da cápsula de tecido conjuntivo penetrando no parênquima tímico até próximo à junção cortico-medular, dividindo o tecido em pequenos lóbulos. Junto com os septos, observou-se tecido vascular e neuronal penetrando no interior do parênquima. As regiões medular e cortical apresentavam-se mais definidas. Foi observado a presença de alguns aglomerados celulares, semelhantes aos dos animais do grupo I, entretanto, estes começavam a se organizar em região cortical e medular. Apesar de alguns lóbulos possuírem a divisão cortical e medular, a região da medula ainda era pequena, enquanto a região cortical apresentavam-se maior, com grande população de timócitos. Os corpúsculos tímicos apareciam mais definidos, assim como as células epiteliais. Na periferia dos lóbulos, foi observado uma concentração de células epiteliais do tipo 1. A região cortical e a medular, apresentavam uma densa população de timócitos e linfócitos. Foram observadas células pequenas, indiferenciadas, densas, que migravam dos vasos para o interior do parênquima tímico. Pode-se notar um grande número de pequenos vasos no interior do parênquima, nos lóbulos que possuíam a divisão da região cortical e medular, estes vasos concentravam-se na junção cortico-

medular, e nos lóbulos que não possuíam essa divisão, os mesmo espalhavam-se por todo o parênquima.

Aos 50 dias, grupo III, foi observado que cada lobo tímico era revestido por uma cápsula delgada de tecido conjuntivo. Havia a formação de espessamentos em pontos de junção da cápsula com os vasos que nutriam o timo. O tecido conjuntivo emitia evaginações a partir da cápsula, de onde partiam numerosos septos que dividiam parcialmente o lobo formando a estrutura lobular. Nos pontos de emissão dos septos, predominavam os vasos sanguíneos que por sua vez se ramificavam no percurso dos septos interlobulares e no próprio parênquima tímico. Foi observado a existência de epitélio subcapsular perivascular delimitando toda a superfície e os espaços perivasculares do timo, com aspecto achatado e alongado, formando uma divisão entre o espaço intratímico e o parênquima vascularizado. O tecido tímico apresentava uma a região cortical e medular bem definida, e a população celular mais heterogênea, com muitas divisões mitóticas e maturação dos corpúsculos tímicos. Os vasos do parênquima apresentavam grande calibre. Foram observadas células indiferenciadas que migravam dos vasos do tecido conjuntivo para o interior do parênquima.

Aos 60 dias, grupo IV, as características do timo eram mais definidas do que as dos animais do grupo III, nesse momento o timo apresentava-se totalmente desenvolvido, com todos os tipos celulares e maturação completa dos linfócitos. Os vasos distribuídos no parênquima apresentavam grande calibre. Foram observadas células indiferenciadas que migravam dos vasos do tecido conjuntivo para o interior do parênquima.

Nos animais com 6 meses de idade, grupo V, essas divisões entre cortical e medular são observadas, porém, de forma irregular, além disso, foi evidenciado um aumento do tecido conjuntivo e presença de tecido adiposo, características do tecido em início do estágio de involução. Havia uma diminuição na população celular, inclusive linfócitos, e as células apresentavam-se mais espaçadas, com amplo espaço intercelular. As células do tipo 1 na periferia dos lóbulos, não eram mais evidentes. Os vasos apresentavam-se com menor calibre e não eram tão evidentes no interior do parênquima.

Nos animais com 1 ano de idade, grupo VI, o tecido adiposo tornava-se mais evidente com pequenas ilhas de tecido tímico remanescente. Estas ilhas possuíam todas as populações celulares como em um animal jovem, porém, em menor número. Os corpúsculos tímicos continuavam evidentes.

5.2.1 VEGF-A, VEGF-C, Flt-1, KDR e Flt-4

As proteínas do VEGF-A, VEGF-C e dos receptores Flt-1, KDR e Flt-4 foram identificadas no timo de cães em todas as fases do desenvolvimento e involução estudadas (30 dias, 40 dias, 50 dias, 60 dias, 6 meses e 1 ano), foram localizadas no citoplasma de células epiteliais, endoteliais e no interior dos corpúsculos tímicos (Figuras 6, 7, 8, 9 e 10).

Foi observada uma expressão crescente do sistema durante o desenvolvimento do timo, ocorrendo uma diminuição após o nascimento.

A reação positiva para o VEGF-A foi observada em uma rede de células epiteliais encontradas na região subcapsular, em células epiteliais isoladas na região do córtex e em quase todas as células epiteliais da região medular. Todos os corpúsculos tímicos apresentaram marcação positiva. Na fase involutiva do timo, foi observada a marcação em aglomerados celulares formados por células epiteliais e poucos linfócitos nas proximidades de vasos sanguíneos. As células próximas ao tecido adiposo apresentavam uma marcação menos intensa do que as células próximas aos vasos sanguíneos.

O VEGF-C apresentou uma marcação menos intensa do que o VEGF-A. Foi observada a marcação nas mesmas estruturas que o VEGF-A, com exceção da uma rede de células epiteliais encontradas na região subcapsular, as quais apresentaram-se negativas.

O Flt-1 e o KDR foram expressos em uma rede de células epiteliais na região subcapsular e em todas as células epiteliais da região medular. As nurses cells ou células enfermeiras na região do córtex apresentaram intensa marcação. Todos os corpúsculos tímicos apresentaram marcação, sendo que nos corpúsculos maduros a marcação apresentou maior intensidade na região periférica. As células endoteliais apresentaram-se positivas, com maior intensidade nos grandes vasos. Na fase de involução, observamos uma rede de células epiteliais positivas.

O Flt-4 foi expresso em pequenos vasos na cápsula do timo, alguns no córtex e na região medular. Ramificações dos vasos linfáticos observados na região cortical parecem ter continuidade com a cápsula e tecido conjuntivo extralobular. Na região medular, foi observada marcação em células endoteliais de vasos com pequeno calibre, raramente foi observado marcação em vasos de grande calibre na região medular. Os vasos linfáticos marcados estavam

presentes próximos aos vasos sanguíneos. Assim como os outros receptores, os corpúsculos tímicos e as células epiteliais na região subcapsular e na medula apresentaram marcação positiva.

Não observamos diferenças na imunolocalização entre machos e fêmeas.

Figura 6 – Fotomicrografia da localização da proteína VEGF-A em timo de cães. A: feto com 30 dias de desenvolvimento. B: feto com 40 dias de desenvolvimento. C: feto com 50 dias de desenvolvimento. D: recém-nato com 60 dias. E: animal com 6 meses de idade. F: animal com 1 ano de idade. CE: célula epitelial; M: medula; V: vaso sanguíneo

Figura 7 - Fotomicrografia da localização da proteína VEGF-C em timo de cães. A: feto com 30 dias de desenvolvimento. B: feto com 40 dias de desenvolvimento. C: feto com 50 dias de desenvolvimento. D: recém-nato com 60 dias. E: animal com 6 meses de idade. F: animal com 1 ano de idade. M: medula; FT: Formação tímica; RCM: Região córtico medular; V: vaso; CE: célula epitelial; CT: corpúsculo tímico

Figura 8 - Fotomicrografia da localização da proteína Flt-1 em timo de cães. A: feto com 30 dias de desenvolvimento. B: feto com 40 dias de desenvolvimento. C: feto com 50 dias de desenvolvimento. D: recém-nato com 60 dias. E: animal com 6 meses de idade. F: animal com 1 ano de idade. M: medula; V: vaso; CE: célula epitelial; CT: corpúsculo tímico

Figura 9 - Fotomicrografia da localização da proteína KDR em timo de cães. A: feto com 30 dias de desenvolvimento. B: feto com 40 dias de desenvolvimento. C: feto com 50 dias de desenvolvimento. D: recém-nato com 60 dias. E: animal com 6 meses de idade. F: animal com 1 ano de idade. M: medula; CE: célula epitelial; CT: corpúsculo tímico; FT: Formação Tímica; V: Vaso

Figura 10 - Fotomicrografia da localização da proteína Flt-4 em timo de cães. A: feto com 30 dias de desenvolvimento. B: feto com 40 dias de desenvolvimento. C: feto com 50 dias de desenvolvimento. D: recém-nato com 60 dias. E: animal com 6 meses de idade. F: animal com 1 ano de idade. CE: célula epitelial; CT: corpúsculo tímico; FT: Formação Tímica; VL: Vaso Linfático

5.2.2 EG-VEGF

A proteína do EG-VEGF foi identificada no timo de cães em todas as fases do desenvolvimento e involução estudadas (30 dias, 40 dias, 50 dias, 60 dias, 6 meses e 1 ano), no citoplasma de células epiteliais da região medular, endoteliais e no interior dos corpúsculos tímico (Figura 11).

Foi observada uma expressão crescente do sistema durante o desenvolvimento do timo, tendo uma diminuição após o nascimento e mantendo-se constante até o final.

Figura 11 - Fotomicrografia da localização da proteína EG-VEGF em timo de cães. A: feto com 30 dias de desenvolvimento. B: feto com 40 dias de desenvolvimento. C: feto com 50 dias de desenvolvimento. D: recém-nato com 60 dias. E: animal com 6 meses de idade. F: animal com 1 ano de idade. CE: célula epitelial; CH: corpúsculo tímico; FT: Formação Tímica; V: Vaso; *: Célula migratória

5.3 EXPRESSÃO DO mRNA DO VEGF-A, VEGF-C, Flt-1, KDR, Flt-4 E EG-VEGF NO TIMO DE CÃES

A análise da expressão relativa do sistema VEGF e do EG-VEGF no timo de cães em relação ao controle endógeno GAPDH ao longo do desenvolvimento e involução apresentou modificações significativas ($p < 0,05$) tempo-dependentes (Figura 12).

A expressão do mRNA do VEGF-A manteve-se constante no timo dos fetos durante o desenvolvimento, tendo um aumento gradativo e significativo na fase involutiva ($p < 0,05$).

A expressão do mRNA do VEGF-C manteve-se baixa durante o desenvolvimento, tendo um aumento não significativo após o nascimento ($p > 0,05$).

A expressão do mRNA do Flt-1, assim como o VEGF-A, manteve-se constante durante a fase de desenvolvimento do timo, aumentando a expressão na fase de involução, sendo esse aumento significativo ($p < 0,05$) na fase avançada da involução, nos animais com 1 ano de idade.

A expressão do mRNA do KDR no timo foi crescente durante o período de desenvolvimento e involução, tendo um aumento significativo ($p < 0,05$) nos animais com 1 ano de idade.

A expressão do mRNA do Flt-4 no timo foi a menor comparado com os demais receptores, manteve-se constante no desenvolvimento, tendo um aumento significativo ($p < 0,05$) no início da fase de involução, nos animais com 6 meses de idade, e diminuiu a expressão nos animais com 1 ano de idade, na fase avançada da involução.

Figura 12 - Expressão relativa do mRNA (UA) do VEGF-A, VEGF-C, Flt-1, KDR, Flt-4 e EG-VEGF no timo de cães em diferentes fases do desenvolvimento e involução (fetos com 30 dias, fetos com 60 dias, cães jovens com 6 meses de idade e cães adultos com 12 meses de idade). As barras representam a média $\pm$ desvio padrão. Letras (a; b; c) correspondem a diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$)

5.4 WESTERN BLOT

O VEGF-A foi detectado em todos os estágios do desenvolvimento involução no timo de cães. A quantificação protéica mostrou valores crescentes durante todo o período do desenvolvimento (30 – 60 dias) e involução (6 meses e 12 meses) ($p < 0.05$). A figura 13 apresenta a expressão do VEGF-A, no timo de cães durante o desenvolvimento e involução, em relação ao controle endógeno beta-actina.

Figura 13 – Imunoblot correspondente ao VEGF-A e densidade do VEGF-A em relação à beta-actina no timo de cães durante o desenvolvimento e involução (fetos com 30, 40, 50 e 60 dias, cães jovens com 6 meses de idade e cães adultos com 1 ano de idade). * ($p < 0.05$)

O VEGF-C foi detectado em todos os estágios do desenvolvimento involução no timo de cães. A quantificação protéica mostrou valores crescentes durante o desenvolvimento (30-60 dias) e involução (6-12 meses) ($p<0.05$), sendo que apresentou uma alta expressão no período involutivo. A figura 14 apresenta a expressão do VEGF-C, no timo de cães durante o desenvolvimento e involução, em relação ao controle endógeno beta-actina.

Figura 14 – Imunoblot correspondente ao VEGF-C e densidade do VEGF-C em relação à beta-actina no timo de cães durante o desenvolvimento e involução (fetos com 30, 40, 50 e 60 dias, cães jovens com 6 meses de idade e cães adultos com 1 ano de idade). * ($p<0.05$)

O Flt-1 foi detectado em todos os estágios do desenvolvimento involução no timo de cães. A quantificação protéica mostrou valores crescentes durante todo o período do desenvolvimento (30 – 60 dias) e involução (6 meses e 12 meses) ($p < 0.05$). A figura 15 apresenta a expressão do Flt-1, no timo de cães durante o desenvolvimento e involução, em relação ao controle endógeno beta-actina.

Figura 15 – Imunoblot correspondente ao Flt-1 e densidade do Flt-1 em relação à beta-actina no timo de cães durante o desenvolvimento e involução (fetos com 30, 40, 50 e 60 dias, cães jovens com 6 meses de idade e cães adultos com 1 ano de idade). * ($p < 0.05$)

O KDR foi detectado em todos os estágios do desenvolvimento involução no timo de cães. A quantificação protéica mostrou valores crescentes durante todo o período do desenvolvimento (30 – 60 dias) e involução (6 meses e 12 meses) ($p < 0.05$). A figura 16 apresenta a expressão do KDR, no timo de cães durante o desenvolvimento e involução, em relação ao controle endógeno beta-actina.

Figura 16 – Imunoblot correspondente ao KDR e densidade do KDR em relação à beta-actina no timo de cães durante o desenvolvimento e involução (fetos com 30, 40, 50 e 60 dias, cães jovens com 6 meses de idade e cães adultos com 1 ano de idade). * ($p < 0.05$)

O Flt-4 foi detectado em todos os estágios do desenvolvimento involução no timo de cães. A quantificação protéica mostrou valores crescentes durante o desenvolvimento ($p<0.05$), e uma alta expressão no período involutivo, com uma discreta diminuição no final do período. A figura 17 apresenta a expressão do Flt-4, no timo de cães durante o desenvolvimento e involução, em relação ao controle endógeno beta-actina.

Figura 17 – Imunoblot correspondente ao Flt-4 e densidade do Flt-4 em relação à beta-actina no timo de cães durante o desenvolvimento e involução (fetos com 30, 40, 50 e 60 dias, cães jovens com 6 meses de idade e cães adultos com 1 ano de idade). * ($p<0.05$)

O EG-VEGF foi detectado em todos os estágios do desenvolvimento involução no timo de cães. A quantificação protéica mostrou altos valores ($p<0.05$) durante o desenvolvimento (30 – 60 dias), diminuindo na involução, onde permanece constante durante todo o período. A figura 18 apresenta a expressão do EG-VEGF, no timo de cães durante o desenvolvimento e involução, em relação ao controle endógeno beta-actina.

Figura 18 – Imunoblot correspondente ao EG-VEGF e densidade do EG-VEGF em relação à beta-actina no timo de cães durante o desenvolvimento e involução (fetos com 30, 40, 50 e 60 dias, cães jovens com 6 meses de idade e cães adultos com 1 ano de idade). * ($p<0.05$)

Discussão

6 DISCUSSÃO

A irrigação e a drenagem sanguínea são elementos importantes no processo funcional e na preservação tecidual de qualquer órgão, porém, alguns aspectos destes processos no timo ainda não foram elucidados, como uma possível ligação entre a manutenção da irrigação tímica e sua involução fisiológica. No que diz respeito à irrigação do timo em cães, a literatura é escassa, visto que os autores quando se reportam ao assunto fazem-no de maneira genérica. Já, os especialistas que trabalharam com a irrigação do timo, de forma geral, somente fazem menção aos grandes e pequenos ruminantes.

O conhecimento do comportamento vascular, de sua estrutura, das interferências que ocorrem no desenvolvimento e na involução do timo poderá esclarecer diversas entidades ainda não caracterizadas adequadamente como doenças auto-imunes, tumores tímicos, persistência tímica e outras ligadas ao comprometimento imunitário, auxiliando assim, na clínica veterinária, podendo melhor fundamentar as diferentes propostas para a explicação da involução fisiológica que este órgão sofre nos mamíferos.

Poucos autores estudaram anteriormente a histologia e a microvascularização especificamente do timo de cães, o que obrigou a considerarmos outras espécies de animais em nossas análises comparativas, respeitando as nuances que esta variável apresenta.

Nossos achados macroscópicos em cães foram semelhantes aos observados por Evans e Christensen (1979); Nickel et al. (1981) e Tizard (1985) que descrevem o timo como um órgão de coloração rósea com discretas lobulações nos filhotes, localizado no espaço mediastínico cranial, entre os dois pulmões, e sua extremidade caudal é moldada na superfície cranial do pericárdio, apresenta apenas parte torácica, sendo esta dividida incompletamente em um largo lobo direito e um pequeno lobo esquerdo, seu pólo cranial se localiza abaixo da traquéia e estende-se além do primeiro par de costelas.

Quanto ao desenvolvimento do timo, Bockman (1997); Cordier e Haumont (1980) e Picker e Siegelman (1993) referem que estruturalmente o timo distingue-se dos demais órgãos linfóides por apresentar um estroma primariamente epitelial, constituído por elementos endo e

ectodérmicos derivados, nos roedores, apenas da 3ª bolsa faríngea, em associação com componentes mesodérmicos, dados relatados inicialmente por Auerbach (1960) que observou a interação entre o endoderma da 3ª bolsa faríngea e o mesenquima da crista neural. Entretanto, Gordon et al. (2004) não observaram este contato em ratos, sugerindo assim, a origem apenas do endoderma sendo suficiente para estabelecer uma organização e função do timo. Entretanto, refutando o modelo de “origem dual” de ontogenia epitelial tímica, hoje em dia aceita-se um novo modelo de “origem única”, exclusivamente endodérmica (ANDERSON, JENKINSON, 2001; BLACKBURN, MANLEY, 2004; BARTBLOTT et al., 2006).

Em nosso estudo imunohistoquímico, observamos a relação que as células epiteliais estabelecem com os vasos sanguíneos no timo, permitindo a passagem de células migratórias. Silva et al. (2001) relata que os capilares e pequenos vasos destinados ao timo não apresentam poros, mas sim uma membrana basal espessa, descontínua, envolvida por uma camada de células epiteliais com prolongamentos finos que perfuram a lâmina basal e podem entrar em contato com as células reticulares epiteliais, que atua como uma barreira hematótica dificultando, embora não impedindo totalmente, a passagem de antígenos ou macromoléculas do sangue para o interior do parênquima. Já, Junqueira e Carneiro (1999) descrevem esta barreira somente na região cortical.

A involução dos vasos foi observada em nosso estudo, porém, estes não desaparecem, apenas diminuem o calibre e o número. Kato (1997) e Junqueira e Carneiro (1999) relatam que durante o desenvolvimento embriológico do timo, os vasos sanguíneos penetram no interior do parênquima acompanhando o tecido conjuntivo derivado da cápsula, formando espaços perivasculares ao redor dos vasos, fato este verificado também em nosso material. As vênulas da região medular confluem para formar veias que penetram nos septos conjuntivos e saem do timo pela cápsula do órgão. Já, as artérias penetram no timo pela cápsula, se ramificam, seguindo os septos conjuntivos onde originam arteríolas que penetram no parênquima seguindo os limites entre a cortical e a medular. Além disso, afirmam que o timo não possui vasos linfáticos aferentes, os poucos vasos linfáticos encontrados no timo são todos eferentes e localizam-se nas paredes dos vasos sanguíneos e no tecido conjuntivo dos septos e da cápsula do órgão, estes sofrem uma involução com o órgão.

Assim como Silva et al. (1994) e Solarovis et al. (2005), concordamos que as características vasculares, morfológicas e involução relacionada à idade são similares em todos os

mamíferos, mas é importante lembrarmos que estas podem variar de acordo com a espécie, raça e sexo.

Em nosso estudo observamos a marcação dos vasos linfáticos pela marcação do VEGFR-e/Flt-4, assim como Odaka et al. (2006) que distinguiram imunohistologicamente os vasos linfáticos dos vasos sanguíneos do timo baseados na expressão do VEGFR3/Flt-4, LYVE-1, Prox-1 e neuropilin-2.

Comparado ao órgão do animal adulto, o timo neonatal murino é dominado pelo córtex, ou seja, há pouca área medular e, além disso, apresenta a junção corticomedular pouco definida. Porém, a transição para o padrão adulto ocorre rapidamente, logo na primeira semana de vida pós-natal (CUDDIHY et al., 2009). Já na espécie canina observamos que as características similares ao padrão histológico do timo adulto já estão presentes antes mesmo do nascimento, o que nos faz levantar a hipótese de que tal fato pode inferir em diferenças espécie-específicas nos processos de proliferação, maturação e diferenciação de timócitos, assim como em demais eventos relacionados a interações célula-célula no órgão.

Observamos também, uma aparente menor densidade celular nas fases involutivas. Essa observação pode ser confirmada em estudos futuros por meio de métodos que permitam análise de frequência e identificação celular como citometria de fluxo. Cuddihy et al. (2009) utilizaram o método para confirmarem a quantificação realizada por imuno-histoquímica de fluorescência para citoqueratinas K5 e K8, expressas por CETm e CETc, respectivamente. A fenotipagem de timócitos, CETs e demais células presentes no órgão, como as células de linhagem leucocitária, também seria de grande utilidade, pois no presente estudo constatamos dificuldades na precisa identificação destas células quando expressaram as proteínas estudadas.

Evidenciamos uma população de células tímicas imunofenotipicamente heterogênia em diferentes tamanhos, como relatado por Amano e Hamatani (1980); Van Ewijk (1984); Dijkstra e Sminia (1990); Picker e Siegelman (1993); Suster e Rosai (1990) e Xavier (1999).

Assim como Van de Wijngaert (1984); Savino (2006) e Magalhães (2007), evidenciamos uma camada longa e extensa de células epiteliais do tipo 1, que expressaram fortemente o sistema VEGF em todas as faixas etárias, sendo esta, de forma irregular nos fetos em desenvolvimento. Além dessas, as células epiteliais 2 e 3 foram observadas em íntimo contato com os timócitos, desenvolvendo o papel de nurse cells, promovendo, provavelmente, um microambiente especial para a diferenciação e/ou proliferação de timócitos, e exposição desses ao complexo principal de

hitocompatibilidade (MHC) e aos hormônios tímicos, estas por sua vez também expressavam o sistema VEGF. As células epiteliais do tipo 6 foram evidenciadas formando os corpúsculos de Hassal, estes também apresentaram-se marcados pelo sistema VEGF.

Evidenciamos a expressão do VEGF-A nas células epiteliais tímicas, células estas predominantes na população tímica no início do desenvolvimento (fetos com 30 dias), assim como Müller et al. (2005).

Em nosso estudo observamos um aumento do volume do timo pelo método de Cavalieri durante o desenvolvimento e a diminuição durante a involução, esses achados estão de acordo com a literatura estudada (SOLAROVIC et al., 2005).

Os resultados da análise estereológica indicaram que os vasos no timo acompanham o seu desenvolvimento e involução, assim como o sistema VEGF e o EG-VEGF expresso nas células endoteliais do parênquima do órgão durante todos os períodos estudados, ora expressando-se mais ora menos (AGRESTE, 2005).

O papel do sistema VEGF no timo é abrangente, compreendendo uma atuação que vai desde a formação vascular até a modulação da maturação linfocitária. Neste contexto, Cuddihy et al. (2009) relatam que camundongos neonatos apresentam uma densa e imatura rede vascular VEGF-dependente que consiste de finos ramos capilares, poucos pericitos e altos níveis endoteliais de CD31+, um marcador de adesão celular; relatam ainda que a inibição da sinalização do VEGF durante o período neonatal resulta na perda da densa rede capilar tímica e acentuada redução da timopoiese. Já Cimpeam et al. (2008) afirmam que o desenvolvimento da rede vascular do timo é dependente de altas concentrações de VEGF nas CETs. Ressaltam ainda o papel do VEGF na maturação e diferenciação linfocitária, além da importância na interação entre as células dendríticas apresentadoras de antígeno e os linfócitos. É de consenso comum que tanto as CETc como as CETm apresentam papéis específicos no direcionamento de timócitos à maturação, diferenciação e sobrevivência. Por outro lado, a presença dos timócitos também exerce influência no desenvolvimento e sobrevivência das CETs, e os mecanismos moleculares envolvidos nesta interação podem envolver o VEGF apesar de serem em grande parte desconhecidos (VAN EWIJK et al., 2000; CUDDIHY et al., 2009).

No presente estudo, as descrições de localização das proteínas do VEGF e seus receptores Flt-1 e KDR foram procedidas com base na observação das mesmas tanto em células estromais como em células hematopoiéticas, embora não tenham sido realizadas técnicas de dupla

marcação durante o processamento das amostras, o que possibilitaria a precisa identificação de tipos e subtipos celulares. Células da linhagem leucocitária representaram particular dificuldade de identificação. Apesar disso, essa limitação não nos impediu de identificarmos timócitos e CETs, que constituíram a base de nossas inferências sobre a expressão protéica do sistema VEGF e do EG-VEGF no timo de cães.

De acordo com nossos resultados, a localização dos receptores do VEGF em timócitos indica que o VEGF apresenta um papel direto na função destas células. Corbel et al. (2007) localizou ainda o receptor neurofilina 1 (NP1) em células tímicas concentradas na região subcapsular, receptor este também descrito como mediador das ações do VEGF-A 165 e 121; a junção corticomedular apresentou imunomarcação para o NP1, porém de forma menos evidente. No trabalho destes autores a proteína do VEGF não foi encontrada em linfócitos, apenas em células estromais, o que pode ser devido às condições de cultivo celular às quais as células foram submetidas antes da análise. Os autores sugerem que a interação entre as células do estroma e os linfócitos aconteça via VEGF que, depois de produzidos pelo estroma tímico, se ligam aos receptores NP1 de algumas populações de linfócitos. Outros autores ainda sugerem a possibilidade da ligação do VEGF diretamente a algumas populações de linfócitos que expressam a proteína do KDR. Ademais, sabe-se que os receptores NP1 também aumentam a capacidade de ligação do VEGF ao seu receptor KDR, o que implicaria em uma ação sinérgica no tecido tímico. A migração dos timócitos DN para marcadores como CD4 e CD8, que nesta condição são timócitos em fase inicial de diferenciação, encontrados comumente na região subcapsular, depende de sinais advindos de regiões do córtex (CUDDIHY et al., 2009). A imunomarcação para VEGF descrita no presente trabalho aponta para a maior expressão desta proteína na região subcapsular do córtex dos timos fetais. O trabalho de Corbel et al. (2007) também relata a localização dos receptores NP1 na mesma região, corroborando com nossa hipótese de ação sinérgica entre as proteínas.

A expressão protéica do sistema VEGF e do EG-VEGF foi observada em células epiteliais tímicas e corpúsculos tímicos de todas as fases estudadas. Nossos resultados revelam que a expressão protéica do sistema VEGF-A do timo canino se assemelha aos achados de Cimpean et al. (2008) em humanos, o que corrobora com a hipótese de participação ativa dos corpúsculos tímicos na timopoiese. Cimpean et al. (2008), observaram imunomarcação para VEGF-A e seus receptores Flt-1 e KDR em corpúsculos tímicos de 100% das amostras de um

total de 17 timos humanos de indivíduos com idades que variaram de 1 mês a 50 anos de vida, em condições fisiológicas normais e patológicas. Os referidos autores afirmam que, em condições normais, após o nascimento a expressão de VEGF diminui rapidamente e que a imunomarcagem de corpúsculos tímicos para este fator de crescimento e seus receptores suporta a hipótese de que os corpúsculos tímicos são estruturas ativas no processo de maturação e seleção de linfócitos no período pós-natal (WATANABE et al., 2005).

Timócitos CD4 e CD8 DN presentes no córtex expressam VEGF quando em processo de maturação (CUDDIHY et al., 2009), sendo que o timo murino em período neonatal expressa mais VEGF do que timos de animais adultos, relação também observada entre os timos caninos do presente estudo. É possível que exista uma modificação das populações celulares que expressam VEGF e seus receptores no timo após o nascimento, no entanto, estudos específicos utilizando dupla marcação ainda não foram realizados e não é possível realizar tal inferência com precisão por meio de análise histológica, conforme comentado anteriormente, também em relação ao citado trabalho. No entanto, alguns autores hipotetizam que a timopoiese seja regulada via VEGF, tanto pelo compartimento hematopoiético, como pelo compartimento epitelial do timo (OLSSON et al., 2006).

Dockery e Fraher (2007), ao versarem sobre a aplicação da estereologia em estudos vasculares, relatam que uma variedade de descrições numéricas, como análises de fractais e correlações espaciais, vem sendo usada para caracterizar leitos vasculares, porém a estereologia tem sido empregada em um número limitado de áreas que estudam a vascularização. Os mesmos autores alertam para a necessidade da extensão da estereologia em estudos dessa natureza, pois dados importantes que a técnica fornece sobre a estrutura espacial biológica, na qual residem informações fisiológicas e moleculares, demonstram o seu potencial de utilidade. De fato, em nosso estudo a correlação das variáveis estereológicas estimadas com os valores da expressão gênica do VEGF e seus receptores KDR e Flt-1 constituiu ferramenta importante na fundamentação de nossas inferências.

De forma geral, observamos que o VEGF-A, KDR e o Flt-1 segue a curva vascular do timo, tendo um aumento na expressão no período involutivo do órgão, este fato pode ser relacionado a um período de hipóxia. No período involutivo há uma diminuição no suporte sanguíneo do órgão, promovendo assim um ambiente propício à hipóxia aumentando a expressão do VEGF-A e seus receptores (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997; FERRARA, 1999).

A interação VEGF-KDR depende também da presença do outro receptor para VEGF, o Flt-1, que atua regulando a disponibilidade do ligante VEGF-A. Normalmente o Flt-1 se liga ao VEGF e impede que o mesmo se ligue ao KDR. A ligação ao KDR inicia uma cascata intracelular de fosforilação dos resíduos de tirosina para culminar nas ações expostas acima.

Em nossas análises confirmamos a expressão do VEGFR-3/Flt-4 localizado em pequenos vasos, linfáticos, próximos à cápsula tímica que penetram na região cortical, assim como na região medular. Esses vasos por sua vez, localizavam-se próximos a vasos sanguíneos maiores (ODAKA et al., 2006). A expressão do VEGFR3 nos vasos linfáticos tímico concorda com Jdanov (1960) que mostrou a existência de uma rede linfática de capilares no timo.

A expressão do Flt-4 não seguiu o padrão de expressão dos demais receptores, enquanto que o Flt-1 e o KDR aumentaram a expressão na fase final da involução, o Flt-4 diminuiu. Estudos relacionados à expressão dos receptores mostram que o Flt-1 e o KDR são estimulados em situações de hipóxia, assim como o VEGF-A, podendo com isso, explicar o aumento da expressão destes na fase involutiva (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997).

O Flt-4, sendo receptor para o VEGF-C e D, não segue o padrão de expressão do VEGF-A, VEGF-C e dos demais receptores, KDR e Flt-1. A diminuição da expressão do Flt-4 na involução do timo deve-se ao fato de que durante o período de desenvolvimento este é encontrado na maior parte do endotélio, sendo que após essa fase a expressão desta molécula passa a ser restrita ao endotélio linfático na maioria dos tecidos (JI, 2009; SABATTINI; BETTINI, 2009).

Assim como relatado na literatura, observamos a expressão do Flt-4 nas células endoteliais linfáticas, capilares fenestrados e veias, monócitos e macrófagos (TAKAHASHI et al., 2001; SHIBUYA; CLAEISSON-WELSH, 2006; RIBATTI et al., 2007).

O VEGF-C e D exercem ação angiogênica via KDR e Flt-4, e linfangiogênica via Flt-4, os níveis de expressão absoluto ou relativo desses receptores nas células endoteliais parecem determinar se VEGF-C/D exercem efeito angiogênico ou linfangiogênico. Essa relação do VEGF-C com esses receptores explica o aumento da expressão deste fator no período de involução do timo (TAKAHASHI et al., 2001; SHIBUYA; CLAEISSON-WELSH, 2006; RIBATTI et al., 2007).

Descrito como fator de permeabilidade vascular e mitótico sobre células do endotélio vascular, o VEGF desempenha um papel importante no desenvolvimento embrionário e pós natal, em condições normais e patológicas (FERRARA et al., 1992; SENGHER et al., 1983).

Há poucos dados sobre a expressão do VEGF-A e VEGF-C no timo. Sabe-se que o desenvolvimento de uma rede vascular no timo depende de uma significativa concentração do VEGF nas células epiteliais, sendo que esse nível rapidamente diminui após o nascimento. Observamos a expressão do VEGF e seus receptores em células epiteliais dispostas em rede interligadas, assim como Cimpean et al. (2008), sendo estas localizadas principalmente na região medular, além dos corpúsculos tímicos.

Os corpúsculos tímicos exercem uma função importante na maturação e seleção de linfócitos no timo no período pós natal, sendo assim, a expressão do VEGF e seus receptores nos corpúsculos tímicos, em especial na fase após o nascimento, pode estar envolvida nesse processo de maturação e seleção (WATANABE et al., 2005).

Alguns estudos correlacionam altos níveis do VEGF com a interferência no desenvolvimento de células progenitoras de linfócitos, estabelecendo um link entre VEGF e atrofia tímica. Esse dado torna-se importante em nossas análises, onde observamos a expressão do VEGF em aglomerados celulares com poucos linfócitos no tecido tímico na fase involutiva (OHM et al., 2003).

Assim, comparando com os trabalhos sobre VEGF em placentas de diversos animais inclusive nos cães, concordamos que o VEGF atua localmente de forma autócrina e/ou parácrina e estimula a formação e manutenção de leitos vasculares (MARQUES JR, 2006; WINTHER; DANTZER, 2001). Além dessa função, acreditamos que este sistema module a função de células tímicas não relacionadas à vascularização, como as células epiteliais, que modulam o complexo linfo-estromal promovendo um microambiente para a maturação de timócitos (VAN DE WIJNGAERT et al., 1984; SUSTER, ROSAI, 1990; VON GAUDECKER, 1991; PHILP et al., 1993; MÜLLER et al., 2005). Neste contexto, o estudo da expressão do sistema VEGF contribui para a melhor caracterização da formação de microambientes tímicos que promovem a maturação de timócitos.

A presença específica das isoformas VEGF₁₂₀, VEGF₁₆₄ e VEGF₁₈₈, do VEGF-A no timo de camundongos (MÜLLER et al., 2005) e em estudos na placenta canina (MARQUES JR., 2006) foram levados em consideração para a escolha dos anticorpos utilizados neste estudo.

Podemos salientar que possíveis variações entre os grupos na expressão do sistema VEGF pode estar relacionado ao regime alimentar dos indivíduos. Este raciocínio tem como base o fato das amostras terem sido coletadas durante campanhas de castrações e animais provenientes do CCZ - São Paulo, o que restringiu o nosso acesso ao histórico dos animais. Essa provável diferença alimentar pode levar à variação na expressão dos fatores estudados, o que foi demonstrado por Arnold et al. (2001) em estudos realizados com ovelhas jovens com restrição alimentar, as quais obtiveram uma queda na expressão do sistema VEGF, o mesmo ocorre em ovelhas que receberam dieta altamente protéica (REDMER et al., 2005). Além desses trabalhos, há outros que demonstram a influência de outros fatores, como “stress” térmico (REGNAULT et al., 2002, 2003), idade materna (BOROWICZ et al., 2005), alta altitude e consequência hipóxia crônica (WHEELER et al., 2002; MAYHEW et al., 2004).

A crescente expressão do VEGF durante o desenvolvimento concorda com o estudo de Aitkenhead et al. (1998), que considera o VEGF como um mediador autócrino e parácrino, associado à angiogênese durante a embriogênese.

Observamos que a expressão do VEGF-A coincide com a vasculogênese do tecido, assim sua expressão diminui com a diminuição do calibre e do número de vasos no tecido, na involução do timo, assim como Winther e Dantzer (2001) e Marques Jr. (2006).

Em nosso estudo observamos a quantificação da expressão do sistema VEGF no órgão como um todo. Uma técnica que poderá vir a esclarecer as diferenças quantitativas de expressão entre os distintos grupos celulares é a técnica de microdissecção a laser (EMMERT-BUCK et al., 1996). Essa técnica torna possível, através da identificação microscópica das células de interesse no tecido intacto, a extração de tipos celulares específicos e a subsequente extração do seu RNA, permitindo a análise desse material por técnicas de hibridização microarray (WANG et al., 2006). O que forneceria dados gênicos específicos de cada um dos tipos celulares estudados e permitiria uma comparação precisa com os resultados protéicos e moleculares.

O sistema VEGF estudado no timo de cães não apresentou expressão protéica similar à encontrada na placenta de cães estudado por Marques Jr. (2006). Na placenta canina a expressão do VEGF-A e dos receptores Flt-1 e KDR mostrou-se de forma crêscente durante o

desenvolvimento placentário, tendo uma diminuição na involução, fato este não ocorreu no timo de cães, onde o sistema apresentou maior expressão durante o período involutivo.

O timo é um órgão fisiologicamente hipóxico (HALE et al., 2002), que apresenta uma concentração média de O₂ (PO₂) de menos de 10 mmHg, a qual chega a ser, no mínimo, quatro vezes menor que a PO₂ do sangue arterial periférico. Os timócitos e células epiteliais apresentam uma adaptação peculiar a esta condição hipóxica, que parece ser fundamental para processos fisiológicos tímicos como a seleção, maturação e diferenciação de timócito. Genes comumente responsivos à hipóxia como os genes COX-2, HMOX-1 e BNIP3, não são ativados quando células do timo são submetidas a concentrações baixas de O₂ (ar ambiente) em relação a concentrações altas (100%), o que ocorre em qualquer tecido ou linhagem celular exposto a estas condições (HALE et al., 2002). Mesmo diante de um aumento da PO₂, as células de diferentes regiões anatômicas do timo não deixam de apresentar reação positiva para pimonidazol (um marcador de células em hipóxia) mesmo quando situadas nas proximidades de vasos sanguíneos, o que indica a ativação de mecanismos intrínsecos de manutenção do estado hipóxico (HALE et al., 2002). Tais mecanismos ainda não foram elucidados, mas os dados do presente estudo apontam para uma regulação temporal da vascularização do timo, o que sugere que o aporte sanguíneo no órgão varie, em acordo com a expressão observada do VEGF e seus receptores KDR e Flt-1, e com os valores estimados das variáveis estereológicas.

A vascularização do timo é feita por artérias que, passando pela cápsula, adentram o órgão e seguem por meio dos seus septos de tecido conjuntivo que o dividem em vários lóbulos. Estas artérias alcançam a junção corticomedular, de onde se ramificam e se direcionam à periferia da camada cortical externa, até próximo à cápsula, para depois retornarem à sua região de origem, formando assim alças que atravessam todo o córtex. As alças vasculares, envoltas por células epiteliais tímicas, compõem a barreira hemato-tímica e impedem em grande parte o acesso de macromoléculas à área de maturação linfocitária (PEARSE, 2006). Quando estas alças chegam à região subcapsular, delineiam vasos de disposição paralela à cápsula, conferindo notável irrigação à região. Este padrão de vascularização cortical determina, provavelmente, o menor grau de hipóxia encontrado na região subcapsular do timo, conforme demonstrado por Hale et al. (2002), e também corrobora com os achados do mesmo estudo que descrevem diferentes graus de PO₂ no baço, de acordo com o padrão de sua vascularização.

A condição de baixas tensões de O₂ acompanha o timo ao longo de todo seu desenvolvimento e involução; foi demonstrado que tanto camundongos de 4, como de 40 semanas de idade, apresentam os mesmos valores de PO₂ (HALE et al., 2002). Em nosso estudo observamos um aumento do sistema VEGF na fase involutiva do órgão, fase esta onde ocorre a diminuição vascular local, promovendo um ambiente de hipóxia.

Se a resposta do sistema VEGF-A à diminuição da vascularização do timo representa uma tentativa de compensar este estado de hipóxia ou se esta resposta é gerada para manutenção do estado hipóxico fisiológico do órgão, estes são aspectos que merecerão atenção em estudos futuros.

O que podemos ainda acrescentar no aspecto da manutenção do estado hipóxico no timo, com base nos resultados obtidos, é que apesar da alteração da expressão dos genes, as proteínas codificadas por eles, que efetivamente desempenham ação na manutenção da vascularização pela formação de novos vasos, não apresentam aumento de expressão em acompanhamento ao aumento da expressão gênica.

O VEGF também é mediador das relações entre timócitos e células endoteliais, como também das relações entre estas e células do estroma tímico, principalmente no período pós-natal (CUDDIHY et al., 2009). A vascularização tímica, considerada por estes autores como o terceiro compartimento anatômico do órgão, parece desempenhar função adicional no desenvolvimento tímico, além de sua função clássica de carrear os precursores de linfócitos, oriundos da medula óssea, para o interior do órgão. De acordo com os mesmos autores, expressão reduzida de VEGF nas células epiteliais leva a uma completa alteração do padrão vascular. De fato, a expressão da proteína e do mRNA do sistema VEGF-A no timo canino, conforme demonstrado e descrito no presente trabalho, não se relaciona apenas às células do endotélio vascular do órgão, podendo inclusive se relacionar negativamente à vascularização.

Descrito recentemente na placenta humana e de camundongos, o EG-VEGF desempenha um importante papel na placentação, proliferação, migração e fenestração seletiva nas células endoteliais de glândulas endócrinas (LE COULTER et al., 2001). Entretanto, estudos mostram a expressão do EG-VEGF em outros órgãos como fígado, rim e intestino, sugerindo que o EG-VEGF não é um fator restrito à glândulas endócrinas (HOFFMANN; FEIGE; ALFAIDY, 2006, 2007).

O timo e a placenta são dois órgãos transitórios, com elevada taxa metabólica e podem sofrer modificações na proliferação e diferenciação celular em situações de stress constante, além disso, a expressão do EG-VEGF é semelhante em ambos os órgãos.

A expressão do sistema VEGF e o EG-VEGF mostraram um perfil tempo dependente específico e semelhante no timo de cães. O mesmo comportamento não ocorre na placenta humana e de camundongos, onde mostra uma expressão espaço temporal distinta.

Nossos resultados sugerem que o sistema VEGF e o EG-VEGF desempenham diferentes papéis durante o desenvolvimento e involução do timo, o qual pode ser especificado em estudos futuros. Possíveis funções incluem um efeito modulatório na vasculogênese e microambiente, influenciando na proliferação e diferenciação de timócitos, maturação de células T, interação célula-célula e secreção hormonal.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo permitem concluir que:

- A curva de crescimento vascular do timo segue o padrão de desenvolvimento e involução do órgão.
- Os sistemas VEGF e EG-VEGF foram localizados nas células endoteliais, corpúsculo tímico e células epiteliais do timo durante o desenvolvimento e involução do órgão.
- A expressão do sistema VEGF e do EG-VEGF obedece a um padrão temporal correlacionando-se com o desenvolvimento e involução do timo.
- A expressão do sistema VEGF e do EG-VEGF em células epiteliais indica uma função modulatória destas células e não apenas das células endoteliais.
- A expressão do sistema VEGF e do EG-VEGF indica uma ação parácrina e/ou autócrina das células epiteliais do timo.
- A progressão da idade após o nascimento se correlaciona negativamente com aspectos quantitativos a vascularização do órgão, mas não com a expressão gênica do sistema VEGF-A, sugerindo resposta do sistema a uma condição hipóxica.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. 5 ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 2005, 351 p.
- ACHEN, M. G.; JELTSCH, M.; KUKK, E.; MAKINEN, T.; VITALI, A.; WILKS, A. F.; ALITALO, K.; STACKER, S. A. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinase VEGF receptor 2 (Flt1) and VEGF receptor 3 (Flt-4). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 2, p. 548-553, 1998.
- AGRESTE, F. R.. **Estudo quantitativo da vascularização do timo em cães**. 2005. 118 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- AITKENHEAD, M.; CHRIST, B.; EICHMANN, A.; FEUCHT, M.; WILSON, D. J.; WILTING, J. Paracrine and autocrine regulation of vascular endothelial growth factor during tissue differentiation in the quail. **Dev Dyn**, v. 212, p. 1-13, 1998.
- ALBERTS, B. **Biologia molecular da célula**. 4. ed. Brasil: ArtMed, 2004. 2396 p.
- ALMAWI, W. Y.; BEYHUM, H. N.; RAHME, A. A.; RIEDER, M. J. Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 60, p. 563-572, 1996.
- AMANO, M.; HAMATANI, K. The short-lived lymphocyte in the thymus cortex of the rat. **Cell Structure and Function**, v. 6, p. 159-166, 1981.
- ANDERSON, G.; JENKINSON, E. J. Lymphostromal interactions in thymic development and function. **Immunology Review**, v. 1, p. 31-40, 2001.
- APPOLINÁRIO, A. V. M. **Vascularização arterial do timo de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*, LINNAEUS, 1758) da raça Nova Zelândia Branco**. 1998. 66 p. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

AUERBACH, R. Morphogenetic interactions in the development of the mouse thymus gland. **Developmental Biology**, v. 2, p. 271-284, 1960.

AYANLAR-BATUMAN, O.; FERRERO, A. P.; DIAZ, A.; JIMENEZ, S. A. Regulation of transforming growth factor- β 1 gene expression by glucocorticoids in normal human T lymphocytes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 88, p. 1574-1580, 1991.

AYRES, M.; AYRES JR., M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. **BioEstat 3.0. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: Mamirauá/ MCT-CNPq/ Conservation International, 2003. 291 p.

BANKS, J. W. Sistema linfático e imunitário. In: _____. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1991. p. 370-390.

BAR-DAYAN, Y.; AFEK, A.; BAR-DAYAN, Y.; GOLDBERG, I.; KOPOLOVIC, J. Proliferation, apoptosis and thymic involution. **Tissue&Cell**, v. 31, n. 4, p. 391-396, 1999.

BAR-DAYAN, Y.; SMALL, M. Effect of bovine growth hormone administration on the pattern of thymic involution in mice. **Thymus**, v. 23, p. 95-101, 1994.

BARLEON, B.; SOZZANI, S.; ZHOU, D.; WEICH, H. A.; MONTOVANI, A.; MARME, D. Migration of human monocytes in response vascular endothelial growth factor (VEGF) es mediated via VEGF receptor Flt-1. **Blood**, v. 87, p. 3336-3343, 1996.

BARTBLOTT, T.; KELLER, M. P.; KRENGER, W.; HOLLÄNDER, G. A. A short primer on early molecular and cellular events in thymus organogenesis and replacement. **Swiss Medical Weekly**. v. 136, p. 365-369. 2006.

BATES, D. O.; HARPER, S. J. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. **Vascular Pharmacology**, v. 39, p. 225-237, 2002.

BELL, R.; HAZELL, L.; PRICE, P. Influence of dietary protein restriction on immune competence. II. Effect on lymphoid tissue. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 26, p. 314-326, 1976.

BILLINGHAM R. E.; BRENT, L.; MEDAWAR, P. B. Quantitative studies on tissue transplantation immunity. III. Actively acquires tolerance. **Philosophical Transactions of the Royal Society London**. v. __, n. 239B, p. 357-412, 1956.

BLACKBURN, C. C.; MANLEY, N. R. Developing a new paradigm for thymus organogenesis. **Immunology Review**, v. 4, p. 278-289, 2004.

BOCKMAN, D. Development of the thymus. **Microscopy Research and Technique**, v. 38, p. 209-215, 1997.

BODEY, B.; BODEY JR., B.; SIEGEL, S. E.; KAISER, H. E. Involution of the mammalian thymus one of the leading regulators of aging. **In Vivo**. v. 11, n. 5, p. 421-440, 1997.

BOROWICZ, P. P.; VONNAHME, K. A.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; REDMER, D. A.; JOHNSON, J. L.; REYNOLDS L. P. The effects of maternal age (age at first pregnancy) on placental expression of the major angiogenic factors and their receptors. **Journal of Society for Gynecologic Investigation**, v. 12, p. 327, 2005.

BRADLEY, O. C.; GRAHAME, T. **Topographical anatomy of the dog**. 16. ed. Edinburg: W. Green & Son, 1948. p. 51.

BRUNI, A. C.; ZIMMERL, U. **Anatomia degli animali domestic**. 2. ed. Milano: Francesco Vallardi, 1951. v. 4, p. 261.

CAMPOS, D. B. **Imunolocalização do VEGF, bFGF e seus receptores na placenta bovina e influência destes fatores sobre a produção de progesterona pelas células placentárias em cultura**. 2005. 193 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CAO, Y. Why and how do tumors stimulate lymphangiogenesis?. **Lymphatic Research and Biology**, v. 6, n. 3-4, 2008.

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. **Circulation**, v. 94, n. 5, p. 664-670, 2004.

CARMELIET, P. VEGF as a key mediator for angiogenesis in cancer. **Oncology**, v. 69, p. 4-10, 2005. Supplement, 3.

CÉBE-SUAREZ, S.; ZHENDER-FIJÄLLMAN, A.; BELLMER-HOFER, K. The role of VEGF receptor in angiogenesis: complex partnerships. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 5, p. 601-615, 2006.

CHEUNG, C. Y. Vascular endothelial growth factor: possible role in fetal developmental and placental function. **Journal of Society for Gynecologic Investigation**, v. 4, p. 169-177, 1997.

CHEUNG, C. Y.; MADHU, S.; EBAUGH, M. J.; BRACE, R. A. Vascular endothelial growth factor gene expression in ovine placenta and fetal membranes. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 173, p. 753-759, 1995.

CHUNG, J.-Y.; SONG, Y.; WANG, Y.; MAGNESS, R. R.; ZHENG, Y.; Differential expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), endocrine gland derived-VEGF, and VEGF receptors in human placentas from normal and preeclamptic pregnancies. **The Journal of clinical Endocrinology & Metabolism**, v.5, n. 89, p. 2484-2490, 2004.

CIMPEAN, A. M.; RAICA, M.; ENCICA, E.; CORNEA, R.; BOCAN, V. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor A (VEGF), and its receptors (VEGFR1, 2) in normal and pathologic conditions of the human thymus. **Annals of Anatomy**, v. 190, p. 238-245, 2008.

CLAUSS, M.; WEICH, H.; BREIER, G.; KNIES, U.; ROCKL, W.; WALTENBERGER, J.; RISAU, W. The vascular growth factor receptor flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of Placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 17629-17634, 1996.

COGGESHALL, R. E. A consideration of neural counting methods. **Techniques**, v. 15, n. 1, p. 9-13, 1992.

COGGESHALL, R. E.; LEKAN, H. A. Methods for determining numbers of cells and synapses: a case for more uniform standards of review. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 364, p. 6-15, 1996.

CONTREIRAS, E. C.; LENZI, H. L.; MEIRELLES, M. N. L.; CAPUTO, L. F. G.; CALADO, T. J. C.; VILLA-VERDE, D. M. S.; SAVINO, W. The equine thymus microenvironment: a

morphological and immunohistochemical analysis. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 28, p. 251-264, 2004.

COOPER, M. D.; PETERSON, R. D. A.; GOOD, R. A. Delineation of the thymic and bursal lymphoid system in the chicken. **Nature**, v. 205, n. 4967, p. 143-146, 1965.

CORBEL, C.; LEMARCHANDEL, V.; THOMAS-VASLIN, V.; PELUS, A.S.; AGBOTON, C.; ROMÉO, P. H. Neuropilin 1 and CD25 co-regulation during early murine thymic differentiation. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 31, n. 11, p. 1082-1094, 2007.

CORDIER, A. C.; HAUMONT, S. M. Development of thymus, parathyroids and ultimobranchial bodies in NMRI and nude mice. **American Journal of Anatomy**, v. 157, p. 227-263, 1980.

COSTA, A. C. **Manual de embriologia**. 2 ed. Lisboa: Livraria Luso-Espanhola, 1957. 342 p.

DEHOFF, R. T.; AIGELTINGER, E. H.; CRAIG, H. R. Experimental determination of the topological properties of three-dimensional microstructures. **Journal of Microscopy**, v. 95, p. 69-91, 1972.

DEMIR, R.; SEVAL, Y.; HUPPERTZ, B. Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta. **Acta Histochemica**, v. 109, p. 257-265, 2007.

DEMIR, R.; YABA, A.; HUPPERTZ, B. Vasculogenesis and angiogenesis in the endometrium during menstrual cycle and implantation. **Acta Histochemica**, v. 112, n. 3, 2010.

DESOUZA, I. R. M.; TRAJANO, V.; SAVINO, W. Is there an interspecific diversity of the thymic microenvironment? **Developmental Immunology**, v. 3, p. 123-135, 1993.

DESOUZA, I. R. M.; SAVINO, W. Modulation of cytokeratin expression in the hamster thymus: evidence for a plasticity of the thymic epithelium. **Developmental Immunology**, v. 3, p. 137-146, 1993.

DICKSON, W. M. Glândulas endócrinas. In: _____. **Dukes-fisiologia dos animais domésticos**. 10. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1988. p. 659-687.

DIDIO, J. A. Sistema endócrino. In: _____. **Tratado de anatomia sistêmica aplicada**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. v. 2, p. 583-603.

DIJKSTRA, C. D.; SMINIA, T. Thymus: normal anatomy, histology, immunohistology, ultrastructure, rat. In JONES, T. C.; WARD, J. M.; MOHR, U.; HUNT, R. D. **Hemopoietic system**. Berlin: Springer-Verlag, 1990. p. 185-193.

DOCKERY, P.; FRAHER, J. The quantification of vascular beds: a stereological approach. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 82, p. 110-120, 2007.

DROEGE, W.; ZUCKER, R.; HANNING, K. Developmental changes in the cellular composition of the chicken thymus. **Cellular Immunology**, v. 12, p. 186-193, 1974.

DROEGE, W. Amplifying and suppressive effect of thymus cells. **Nature**, v. 234, n. 5331, p. 549-551, 1971.

DRUMMOND, S. S. **Aspectos morfométricos e vascularização arterial do timo em suínos da raça Hampshire**. 1996. 57 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

DUERSTOCK, B. S.; BAJAJ, C. L.; BORGES, R. B. A. A comparative study of the quantitative accuracy of tree-dimensional reconstructions of spinal cord from serial histological sections. **Journal of Microscopy**, v. 210, n. 2, p. 138-148, 2003.

DULL, R. O.; YUAN, J.; CHANG, Y. S.; TARBELL, J.; JAIN, R. K.; MUNN, L. L. Kinetics of placenta growth factor/vascular endothelial growth factors synergy in endothelial hydraulic conductivity and proliferation. **Microvascular Research**, v. 61, n. 2, p. 203-210, 2001.

DUNK, C.; AHMED, A. Expression of VEGF-C and activation of its receptors VEGFR-2 and VEGFR-3 in trophoblast. **Histology and Histopathology**, v. 16, n. 2, p. 359-375, 2001.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. O. **Tratado de anatomia veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 567 p.

ELENKOV, I. J.; WIDER, R. L.; CHROUSOS, G. P.; VIZI, E. S. The sympathetic nerve-an interactive interface between two supersystems: the brain and the immune system. **Pharmacological Reviews**, v. 52, p. 595-638, 2000.

ELLENBERGER, W.; BAUM, H. **Hudbuch der vergleichenden anatomie der haustiere**. 18. ed. Berlin: Springer Verlag, 1977. 603 p.

EMMERT-BUCK, M. R.; BONNER, R. F.; SMITH, P. D.; CHUAQUI, R. F.; ZHUANG, Z.; GOLDSTEIN, S. R.; WEISS, R. A.; LIOTTA, L. A. Laser capture microdissection. **Science**, v. 274, p. 998-1001, 1996.

EVANS, H. E. The heart and arteries. In: _____. **Miller's anatomy of the dog**. 3. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1993. p. 586-681.

EVANS, H. E.; DELAHUNTA, A. **Miller's guide to the dissection of the dog**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1980. v. 1, p. 115-122.

EVANS, H. E.; CHRISTENSEN, G. C. **Miller's anatomy of the dog**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1979. p. 839-840.

FERRARA, N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. **Journal of Molecular Medicine**, v. 77, n. 7, p. 527-543, 1999.

FERRARA, N.; CARVER-MOORE, K.; CHEN, H.; DOWD, M.; LU, L.; O'SHEA, K. S.; POWELL-BRAXTON, L.; HILLAN, K. J.; MOORE, M. W. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. **Nature**, p. 439-442, 1996.

FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial growth factor. **Endocrine Reviews**, v. 18, n. 1, p. 4-25, 1997.

FERRARA, N.; HAUKE, K.; JAKEMAN, L.; LEUNG, D. W. Molecular and biological properties of the vascular growth factor family of proteins. **Endocrine Reviews**, v.13, p. 18-32, 1992.

FERRARA, N.; HENZEL, W. J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 161, n. 2, p. 851-858, 1989.

FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nat Med**, v. 9, p. 669-676, 2003.

FIRTH, G. A. The normal lymphatic system of the domestic fowl. **The Veterinary Bulletin**, v. 47, n. 3, p. 167-179, 1977.

FLEISCHER, B. The avian immune system. **Immunological Today**, v. 2, n. 10, p. 195-200, 1981.

FONG, G. H.; ROSSANT J.; GERTSENSTEIN, M.; BREITMAN, M. L. Role of the flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. **Nature**, v. 376, p. 66-70, 1995.

FRASER, H. M.; BELL, J.; WILSON, H.; TAYLOR, P. D.; MORGAN, K.; ANDERSON, R. A.; DUNCAN, W. C. Localization and quantification of cyclic changes in the expression of endocrine gland vascular endothelial growth factor in the human corpus luteum. **Journal of clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 1, n. 90, p. 427-434, 2005.

GAGLIARDO, K. M. **Número total de neurônios no gânglio mesentérico caudal de cães domésticos nas diferentes fases do desenvolvimento. Qual o papel da idade na população total e no tamanho dos neurônios?** 111 p. Tese (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

GEORGE, A. J. T.; RITTER, M. Thymic involution with ageing: obsolescence or good housekeeping? **Immunology Today**, v. 17, p. 267-272, 1996.

GILLE, H.; KOWALSKI, J.; LI, B.; LECOUTER, J.; MOFFAT, B.; ZIONCHECK, T. F.; PELLETIER, N.; FERRARA, N. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 5, p. 3222-3230, 2001.

GLICK, B. The bursa of Fabricius and immunoglobulin synthesis. **International Review of Cytology**, v. 48, p. 345-402, 1977.

GÓMEZ, R.; SIMÓN, C.; REMOHÍ, J.; PELLICER, A. Vascular endothelial growth factor receptor-2 activation induces vascular permeability in hyperstimulated rats, and this effect is prevented by receptor blockade. **Endocrinology**, v. 143, n. 11, p. 4339-4348, 2002.

GORDON, J.; WILSON, V. A.; BLAIR, N. F.; SHERIDAN, J.; FARLEY, A.; WILSON, L.; MANLEY, N.; BLACKBURN, C. C. Functional evidence for a single endodermal origin for the thymic epithelium. **Nature Immunology**, v. 5, n. 5, p. 546-553, 2004.

GRAY, D. H. D.; UENO, T.; CHIDGEY, A. P.; GOLDBERG, G. L.; TAKAHAMA, Y.; BOYED, R. Controlling the thymic microenvironment. **Current Opinion in Immunology**, v. 17, p. 137-143, 2005.

GUNDERSEN, H. J.; JENSEN, E. B.; KIEU, K.; NIELSEN, J. The efficiency of systematic sampling in stereology-reconsidered. **Journal of Microscopy**, v. 193, p. 199-211, 1999.

GUNDERSEN, H. J. G.; BAGGER, P.; BENDTSEN, T. F.; EVANS, S. M.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N.; MOLLER, A.; NIELSEN, K.; NYENGAARD, J. R.; PAKKENBERG, B.; SORENSEN, F. B.; VESTERBY, A.; WEST, M. J. The new stereological tools: disector, fractionator, nuclear and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. **Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 96, p. 857-881, 1988a.

GUNDERSEN, H. J. G.; BENDTSEN, T. F.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N.; NIELSEN, K.; NYENGAARD, J. R.; PAKKENBERG, B.; SORENSEN, F. B.; VESTERBY, A.; WEST, M. J. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 96, p. 379-394, 1988b.

GUNDERSEN, H. J.; JENSEN, E. B. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. **Journal of Microscopy**, v. 147, p. 219-223, 1987.

GURTLER, H.; KETZ, H. A.; KOLB, E.; SCHRODER, L.; SEIDEL, H. **Fisiologia veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1984. 612 p.

HALE, L. P.; BRAUN, R. D.; GWINN, W. M.; GREER, P. K.; DEWHIRST, M. W. Hypoxia in the thymus: role of oxygen tension in thymocyte survival. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 282, p. 1467-1477, 2002.

HALEY, P. J. Species differences in the structure and function of the immune system. **Toxicology**, v. 188, p. 49-71, 2003.

HAM, W.; CORMACK, D. H. **Histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. 305 p.

HANAHAN, D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. **Science**, v. 277, n. 5322, p. 48-50, 1997.

HASCHEK, W. M.; ROUSSEAUX, C. G. Immune system. In: _____. **Fundamentals of Toxicologic Pathology**, San Diego: Academic Press, 1998. p. 233-273.

HENERY, C. C.; MAYHEW, T. M. The cerebrum and cerebellum of the fixed humans brain: efficient and unbiased estimates of volumes and cortical surface areas. **Journal of Anatomy**, v. 167, p. 167-180, 1989.

HENRY, K. The thymus gland. In: HENRY, K.; SYMMERS, W. S. **Thymus, lymph nodes, spleen and lymphatics**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1992. p. 27-139.

HILL, A. D. K.; NAAMA, H. A.; GALLAGHER, H. J.; SHOU, J.; CALVANO, S. E.; DALY, J. M. Glucocorticoids mediate macrophage dysfunction in protein calorie malnutrition. **Surgery**, v. 118, p. 130-137, 1995.

HIRAMINE, C.; NAKAGAWA, T.; MIYAUCHI, A.; HOJO, K. Thymic nurse cells as the site of thymocyte apoptosis and apoptotic cell clearance in the thymus of cyclophosphamide treated mice. **Laboratory Investigation**, v. 75, p. 185-201, 1996.

HOFFMANN, P.; FEIGE, J.; ALFAIDY, J. Placental Expression of EG-VEGF and its Receptors PKR1 (Prokineticin Receptor-1) and PKR2 Throughout Mouse Gestation. **Placenta**, v. 28, p. 1049-1058, 2007.

HOFFMANN, P.; FEIGE, J.-J.; ALFAIDY, N.; Expression and oxygen regulation of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 and Its receptors in human placenta during early pregnancy. **Endocrinology**, v. 4, n. 147, p. 1675-1684, 2006.

HOFFMANN-FEZER, G.; LOSCH, U. Distribution of IgM, IgG and IgA positive cell in lymphatic organs of normo and dysgammaglobulinemic UM-B 19 chickens. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, v. 70, n. 4, p. 346-351, 1983.

HOWARD, C. V.; REED, M. G. Three-dimensional measurement in microscopy. In: _____. **Unbiased stereology**. Oxford: Bios Scientific Publishers, 1998. p. 246.

HUANG, K.; ANDERSSON, C.; ROOMANS, G. M.; ITO, N.; CLAESSEON-WELSH, L. Signaling properties of VEGF receptor-1 and -2 homo- and heterodimers. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, n. 4, p. 315-324, 2001.

HWANG, W. S.; HO, T. Y.; LUK, S. C.; SIMON, G. T. Ultrastructure of the rat thymus. A transmission, scanning electron microscope, and morphometric study. **Laboratory Investigation**, v. 31, p. 473-487, 1974.

JDANOV, D. A. New data on the functional morphology of the lymphatic system of the endocrine glands. **Acta Anatomica**, v. 41, p. 240-259, 1960.

JL, R.C. Lymph node lymphangiogenesis: a new concept for modulating tumor metastasis and inflammatory process. **Histology and Histopathology**, v. 24, p. 377-384, 2009.

JOORY, K. D.; LEVICK, J. R.; MORTIMER, P. S.; BATES, D. O. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression in normal human tissues. **Lymphatic Research and Biology**, v. 4, n. 2, p. 73-82, 2006.

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 Journal**, v. 15, n. 9, p. 290-298, 1996.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 427 p.

KAIPAINEN, A.; KORHONEN, J.; MUSTONEN, T.; VAN HINSBERGH, V. W.; FANG, G. H.; DUMONT D.; BREITMAN, M.; ALITALO, K. Expression of fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 8, p. 3566-3570, 1995.

KARKKAINEN, M. J.; PETROVA, T. V. Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. **Oncogene**, v. 19, n. 49, p. 5598-5605, 2000.

KATO, S. Thymic microvascular system. **Microscopy Research and Technique**, v. 38, p. 287-299, 1997.

KISELEVA, E. P.; KRYLOV, A. V.; LYUDYNO, V. I.; SUVOROV, A. N. Effect of VEGF on mouse thymocyte proliferation and apoptosis in vitro. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 139, n. 5, p. 576-579, 2005.

KISLIOUK, T.; PODLOVNI, H.; SPANEL-BOROWSKI, K.; OVADIA, O.; ZHOU, Q. Y.; MEIDA, R.; Prokineticins (Endocrine Gland-Derived Vascular Endothelial Growth Factor and BV8) in the bovine ovary: expression and role as mitogens and survival factors for corpus luteum-derived endothelial cells. **Endocrinology**, v. 9. n. 146, p. 3950-3958, 2005.

KOCH, T. Lehrbuch der veterinar – anatomie. **Jena, Gustav Fischer**, v. 2, p. 16, 1963.

KOWANETZ, M.; FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. **Clin Cancer Res**, v. 12, n. 17, p. 5018-5022, 2006.

KROEMER, G. The pharmacology of T cell apoptosis. **Advances in immunology**, v. 58, p. 211-296, 1995.

KROUSTRUP, J. P.; GUNDERSEN, H. J. Estimating the number of complex particles using the ConnEulor principle. **Journal of Microscopy**, v. 203, p. 314-320, 2001.

KUPER, C. F.; BEEMS, R. B.; HOLLANDERS, V. M. H. Development and aging, thymus, rat. In: JONES, T. C.; WARD, J. M.; MOHR, U.; HUNT, R. D. **Hemopoietic System**. Berlin: Springer-Verlag. 1990.

KURZ, B.; FEINDT, J.; VON GAUDECKER, B.; KRANZ, A.; LOPPNOW, H.; MENTLEIN, R. B-Adrenoceptor mediated effects in rat cultured thymic epithelial cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 120, p. 1401-1408, 1997.

LANG, I.; HOFFMANN, C.; OLIP, H.; PABST, M. A.; HAHN, T.; DOHR, G.; DESOYE, G. Differential mitogenic responses of human macrovascular and microvascular endothelial cells to cytokines underline their phenotypic heterogeneity. **Cell Proliferation**, v. 34, n. 3, p. 143-155, 2001.

LANGE, T.; GUTTMANN-RAVIV, N.; BARUCH, L.; MACHLUF, M.; NEUFELD, G. VEGF162, a new heparin-binding vascular endothelial growth factor splice form that is expressed in transformed human cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 17164-17169, 2003.

LAU, L. L.; SPAIN, L. M. Altered aging-related thymic involution in T cell receptor transgenic, MHC-deficient, and CD4- deficient mice. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 114, p. 101-121, 2000.

LE COUTER, J.; KOWALSKI, J.; FOSTER, J.; HASS, P.; ZHANG, Z.; DILLARD-TELM, L.; FRANTZ, G.; RANGELL, L.; DEGUZMAN, L.; KELLER, G.-A.; PEALE, F.; GURNEY, A.; HILLAN, K. J.; FERRARA, N. Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. **Nature**, v. 412, p. 877-884, 2001.

LEE, H. W.; KIM, S. M.; SHIM, N. R.; BAE, S. K.; JUNG, I. G.; KWAK, J. Y.; KIM, B. S.; KIM, J. B.; MOON, J. O.; CHUNG, J. S.; YOON, S. Expression of nerve growth factor is upregulated in the rat thymic epithelial cells during thymus regeneration following acute thymic involution. **Regulatory Peptides**, v. 141, p. 86-95, 2007.

LEPOSAVIC, G.; MICIC, M.; UGRESIC, N.; BOGOJEVIC, M.; ISAKOVIC, K. Components of sympathetic innervation of the rat thymus during late fetal and postnatal development: histofluorescence and biochemical study. **Thymus**, v. 19, p. 77-87, 1992.

LEPOSAVIC, G.; PLECAS, B.; KOSEC, D. Differential effects of chronic propranolol treatment on the phenotypic profile of thymocytes from immature and adult rats. **Immunopharmacology**, v. 46, p. 79-87, 2000.

LI, X. F.; CHARNOCK-JONES, D. S.; ZHANG, E.; HIBY, S.; MALIK, S.; DAY, K.; LICENCE, D.; BOWEN, J. M.; GARDNER, L.; KING, A.; LOKE, Y. W.; SMITH, S. K. Angiogenic growth factor messenger ribonucleic acids in uterine natural killer cells. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 4, p. 1823-1834, 2001.

LIMA, F. A.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. O papel do timo no desenvolvimento do sistema immune. **Pediatrics (São Paulo)**, v. 29, n. 1, p. 33-42, 2007.

LIND, E. F.; PROCKOP, S. E.; PORRITT, H. E.; PETRIE, H. T. Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. **Journal Experimental Medicine**, v. 194, p. 127-134, 2001.

LOWRY, O. H.; ROSEMBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDA, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, USA, v. 193, p. 265-275, 1951.

MACHADO, G. V. **Sobre a origem, o número e a esquelotopia dos ramos arteriais destinados ao timo, em fetos de equinos SRD (*Equus caballus*)**. 30 f. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

MADDEN, K. S.; FELTEN, D. L. Beta-adrenoceptor blockade alters thymocyte differentiation in aged mice. **Cell and Molecular Biology**, v. 47, p. 189-196, 2001.

MAGALHÃES, D. A. R. **Análise do transcriptoma durante a ontogenia do timo**. 141 f. Tese (Doutorado em Genética) – Faculdade de Medicina de ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. **Manual de quantificação morfológica: morfologia, alometria, estereologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: EDUERJ, 1994. 102 p.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. **Métodos quantitativos em morfologia**. Rio de Janeiro: EDUERJ, 1995. 131 p.

MARCHETTI, B.; MORALE, M. C.; PALLETIER, G. Sympathetic nervous system control of rat thymus gland maturation: autoradiographic localization of the β_2 -adrenergic receptor in the thymus and presence of sexual dimorphism during ontogeny. **Progress NeuroEndocrine-Immune**, v. 3, p. 103-115, 1990.

MARCHETTI, B.; MORALE, M. C.; PARADIS, P.; BOUVIER M. Characterization expression and hormonal control of a thymic β_2 -adrenergic receptor. **American Journal of Physiology**, v. 267, p. E18-E31, 1994.

MARQUES JR, J. E. B. **Estudo comparativo da distribuição temporal do sistema VEGF na placenta de cães e bovinos**. 140 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MARTIN, P. **Lehrbuch der Anatomie der Hausdtiere**. Stuttgart, Velag von Schickhardt und Ebner, 1902, v.1, p. 430.

MARTIN, P.; SCHUDER, N. **Lehrbuch der Anatomie der Hausdtiere**. Stuttgart, Velag von Schickhardt und Ebner, 1938, v. 3, p. 370.

MATTFELDT, T.; MALL, G.; GHAREHBAGHI, H.; MOLLER, P. Estimation of surface area and length with the orientator. **Journal of Microscopy**, v. 159, p. 301-317, 1990.

MAYHEW, T. M. A review of recent advances in stereology for quantifying neural structure. **Journal Neurocytology**, v. 21, p. 313-328, 1992.

MAYHEW, T. M.; CHARNOCK-JONES, D. S.; KAUFMANN, P. Aspects of human feto-placental vasculogenesis and angiogenesis III. Changes in complicated pregnancies. **Placenta**, v. 25, p. 127-139, 2004.

MAYHEW, T. M.; GUNDERSEN, H. J. If you assume, you can make an ass out of u and me: a decade of the disector for stereological counting of particles in 3D space. **Journal of Anatomy**, v. 188, n. 1, p. 1-15, 1996.

MAYHEW, T. M.; MWAMENGELE, G. L. M.; DANTZER, V. Comparative morphometry of the mammalian brain: estimates of cerebral volumes and cortical surface areas obtained from macroscopic slices. **Journal of Anatomy**, v. 172, p. 191-200, 1990.

MAYHEW, T. M.; OLSEN, D. R. Magnetic resonance imaging (MRI) and model-free estimates of brain volume determined using the cavalieri principle. **Journal of Anatomy**, v. 178, p. 133-144, 1991.

MAYNARD, S. E.; MIN, J. Y.; MERCHAN, J.; LIM, K. H.; LI, J.; MONDAL, S.; LIBERMANN, T. A.; MORGAN, J. P.; SELLKE, F. W.; STILLMAN, I. E.; EPSTEIN, F. H.; SUKHATME, V. P.; KARUMANCHI, S. A. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt-1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension and proteinuria in preeclampsia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, p. 649-658, 2003.

MELO, A. M. A.; LAGE, M. C. D. Alguns aspectos da estrutura e funções do timo em *Gallus domesticus*. **Repertório de Trabalhos do Laboratório Nacional de Investigação Veterinária**, v. 19, p. 13-24, 1987.

MEYER, M.; CLAUSS, M.; LEPPLE-WIENHUES, A.; WALTENBERGER, J.; AUGUSTIN, H. G.; ZICHE, M.; LANZ, C.; BUTTNER, M.; RZIHA, H.; DEHIO, C. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signaling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinase. **The Embo Journal**, v. 18, n. 2, p. 363-374, 1999.

MILLER, J. F. A. P. The discovery of thymus functional and of thymus derived lymphocytes. **Immunology Review**, v. 185, p. 7-14, 2002.

MORALE, M. C.; BATTICANE, N.; BARTOLONI, G.; GUARCELLO, V.; FARINELLA, Z.; GALASSO, M. G.; MARCHETTI, B. Blockade of central and peripheral luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) receptors in neonatal rats with a potent LHRH – antagonist maturation of the cell-mediated and humoral immune responses. **Endocrinology**, v. 128, p. 1073-1085, 1991.

MUÑOZ-CHÁPULI, R.; QUESADA, A. R.; MEDINA, M. A. Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, n. 17, p. 2224-2243, 2004.

MÜLLER, S. M.; TERSZOWSKI, G.; BLUM, C.; HALLER, C.; ANQUEZ, V.; KUSCHERT, S.; CARMELIET, P.; AUGUSTIN, H. G.; RODEWALD, H. R. Gene targeting of VEGF-A in thymus epithelium disrupts thymus blood vessel architecture. **PNAS**, v. 102, n. 30, p. 10587-10592, 2005.

NABARRA, B.; ANDRIANARISON, I. Thymic reticulum of mice. III. The connective compartment (innervation, vascularisation, fibrous tissues and myoid cells). **Tissue&Cell**, v. 27, p. 249-261, 1995.

NAGY, J. A.; VASILE, E.; FENG, D.; SUNDBERG, C.; BROWN, L. F.; DETMAR, M. J.; LAWITTS, J. A.; BENJAMIN, L.; TAN, X.; MANSEAU, E. J.; DVORAK, A. M.; DVORAK, H. F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangogenesis as well as angiogenesis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 196, n. 11, p. 1497-1506, 2002.

NEAGOE, P. E.; LEMIEUX, C.; SIROIS, M. G. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A 165-induced prostacyclin synthesis requires the activation of VEGF receptor -1 and -2 heterodimer. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 11, p. 9904-9912, 2005.

NEZELOF, C. Thymic pathology in primary and secondary immunodeficiencies. **Histopathology**, v. 21, p. 499-511, 1992.

NICKEL, R.; SCHUMMER, A.; SEIFERLE, E. Lymphatic system. In: _____. **The anatomy of the domestic animals**. Berlin: Verlag Paul Parey, 1981. v. 3, p. 269 - 440.

NIEUWENHUIS, P.; STET, R. J.; WAGENAAR, J. B.; WUBBENA, A. S.; KAMPINGA, J.; KARRENBELD, A. The transcapsular route: a new way for (self-) antigens to bypass the blood-thymus barrier? **Immunology Today**, v. 9, p. 372, 1988.

NYENGAARD, J. R.; BENDTSEN, T. F.; GUNDERSEN, J. G. Stereological estimation of the number of capillaries, exemplified by renal glomeruli. **Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 4, p. 92-99, 1988.

NYENGAARD, J. R.; MARCUSSEN, N. The number of glomerular capillaries estimated by an unbiased and efficient stereological method. **Journal of Microscopy**, v. 171, p. 27-37, 1993.

ODAKA, C.; MORISADA, T.; OIKE, Y.; SUDA, T. Distribution of lymphatic vessels in mouse thymus: immunofluorescence analysis. **Cell & Tissue Research**, v. 325, p. 13-22, 2006.

OHM, J. E.; GABRILOVICH, D. I.; SEMPOWSKI, G. D.; KISSELEVA, E.; PARMAN, K. S.; NADAF, S.; CARBONE, D. P. VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression. **Blood**, v. 101, p. 4878-4886, 2003.

OLSEN, N. J.; KOVACS, W. J. Gonadal steroids and immunity. **Endocrine Reviews**, v. 17, p. 369-384, 1996.

OLSSON, A. K.; DIMBERG, A.; KREUGER, J.; CLAEISSON-WELSH, L. VEGF receptor signaling – in control of vascular function. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 7, n. 5, p. 359-371, 2006.

PAAVONEN, K.; HORELLI-KUITUNEN, N.; CHILOV, D.; KUKK, E.; PENNANEN, S.; KALLIONIEMI, O.; PAJUSOLA, K.; OLOFSSON, B.; ERIKSSON, U.; JOUKOV, V.; PALOTIE, A.; ALITALO, K. Novel human vascular endothelial growth factor genes VEGF-B and VEGF-C localize to chromosomes 11q13 and 4q34, **Respectively Circulation**, v. 93, p. 1079-1082, 1996.

PAKKENBERG, B.; BOESEN, J.; ALBECK, M.; GJERRIS, F. Unbiased and efficient estimation of total ventricular volume of the brain obtained from CT-scans by stereology method. **Neuroradiology**, v. 31, p. 413-417, 1989.

PAKKENBERG, B.; GUNDERSEN, H. J. New stereology method for obtaining unbiased and efficient estimates of total nerve cell number in human brain areas. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 97, p. 677-681, 1989.

PAKKENBERG, B.; GUNDERSEN, H. J. Total number of neurons and glial cells in human brain nuclei estimated by disector and fractionator. **Journal of microscopy**, v. 150, p. 1-20, 1988.

PARK, H. J.; KIM, M. N.; KIM, J. G.; BAE, Y. H.; BAE, M. K.; WEE, H. J.; KIM, T. W.; KIM, B. S.; KIM, J. B.; BAE, S. K.; YOON, S. Up-regulation of VEGF expression by NGF that enhances reparative angiogenesis during thymic regeneration in adult rat. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1773, p. 1462-1472, 2007.

PARK, J. E.; KELLER, G. A.; FERRARA, N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. **Molecular biology of the cell**, v. 4, n. p. 12, 1317-1326, 1993.

PAZ, P.; SANCHEZ, A.; MELCON, C.; FERNANDEZ, J. G.; CHARMORRO, C. A. A study of the chick thymus microenvironment during development: analysis by antibodies against thymic epithelium. **Anatomical Records**, v. 235, p. 296-302, 1993.

PEARSE, G. Normal structure, function and histology of the thymus. **Toxicologic Pathology**, v. 34, p. 504-514, 2006.

PHILP, J. H.; PEZZANO, M.; LI, Y.; OMENE, C.; BOTO, W.; GUYDEN, J. The binding, internalization, and release of thymocytes by thymic nurse cells. **Cellular Immunology**, v. 148, p. 301-315, 1993.

PICKER, L. J.; SIEGELMAN, M. H. Lymphoid tissues and organs. In: PAUL, W. E. **Fundamental Immunology**. 3. ed. New York: Raven Press, 1993.

PLENDL, J. Angiogenesis and vascular regression in the ovary. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 29, n. 5, p. 257-266, 2000.

PLOUET, J.; MORO, F.; BERTAGNOLLI, S.; COLDEBOELF, N.; MAZARGUIL, H.; CLAMENS, S.; BAYARD, F. Extracellular cleavage of vascular endothelial growth factor 189 amino acid form by urokinase is required for its mitogenic effect. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 20, p. 13390-13396, 1997.

POLTORAK, Z.; COHEN, T.; SIVAN, R.; KANDELIS, Y.; SPIRA, G.; VLODAVISKY, I.; KESHET, E.; NEUFELD, G. VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. **The journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 11, p. 7151-7158, 1997.

PROCKOP, S.; PETRIE, H. T. Cell migration and the anatomic control of thymocyte precursor differentiation. **Seminars in immunology**, v. 12, p. 435-444, 2000.

POVER, C. M.; COGGESHALL, R. E. Verification of the disector method for counting neurons, with comments on the empirical method. **The Anatomical Record**, v. 231, p. 573-578, 1991.

POWELL, P. C. Notions fondamentales d'immunologie aviaire. **Poit Veterinary**, v. 14, n. 70, p. 57-66, 1983.

RAO, K.; SRIKANTIA, S.; GOPALAN, C. Plasma cortisol levels in protein calorie malnutrition. **Archives of Diseases of Children**, v. 43, p. 365-367, 1968.

RAUSKI, A.; KOSEC, D.; VIDIC-DANKOVIC, B.; RADOJEVIC, K.; PLECAS-SOLAROVIC, B.; LEPOSAVIC, G. Thymopoiesis following chronic blockade of beta adrenoceptors. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 25, p. 513-528, 2003.

REDMER, D. A.; AITKEN, R. P.; MILNE, J. S.; REYNOLDS, L. P.; WALLACE, J. M. Influence of maternal nutrition on mRNA expression of placental angogenic factors and their receptors in ovine adolescent pregnancy. **Biological Reproduction**, v. 72, p. 1004-1009, 2005.

REGNAULT, T. R.; DE VRIGER, B.; GALAN, H. L.; DAVIDSEN, M. L.; TREMBLER, K. A.; BATTAGLIA, F. C.; WILKENNING, R. B.; ANTHONY, R. V. The relationship between transplacental O₂ diffusion and placenta expression of PlGF, VEGF and their receptors in a placental insufficiency model of fetal growth restriction. **Journal of Physiology**, v. 550, p. 641-656, 2003.

REGNAULT, T. R.; ORBUS, R. J.; DE VRIGER, B.; DAVIDSEN, M. L.; GALAN, H. L.; WILKENNING, R. B.; ANTHONY, R. V. Placental expression of PlGF, VEGF and their receptors in a model of placental insufficiency-intrauterine growth restriction (PI-IUGR). **Placenta**, v. 23, p. 132-144, 2002.

REICHLIN, S. Neuroendocrine-immune interactions. **New England Journal of Medicine**, v. 329, p. 1246-1253, 1993.

REMAKERS, C.; RUIJTER, J. M.; DEPREZ, R. H. L.; MOORMAN, A. F. M. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience**, v. 339, p. 62-66, 2003.

REYNOLDS, L. P.; BOROWICZ, P. P.; VONNAHME, K. A.; JOHNSON, M. L.; WALLACE, J. M.; CATON, J. S.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; REDMER, D. A. Animal models of placental angiogenesis. **Placenta**, v. 26, p. 689-708, 2005.

REYNOLDS, L. P.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; REDMER, D. A. Angiogenesis in the female reproductive system: pathological implications. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 83, p. 151-164, 2002.

REYNOLDS, L. P.; REDMER, D. A. Angiogenesis in the placenta. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 4, p. 1033-1040, 2001.

REYNOLDS, L. P.; REDMER, D. A. Utero-placental vascular development and placental function. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 1839-1851, 1995.

RIBATTI, D.; NICO, B.; CRIVELATTO, E.; ROCCARO, A. M.; VACCA, A. The history of angiogenic switch concept. **Leukemia**, v. 21, n. 1, p. 44-52, 2007.

RIBATTI, D.; VACCA, A.; NICO, B.; RIA, R.; DAMMACCO, F. Cross-talk between hematopoiesis and angiogenesis signaling. **Current Molecular Medicine**, v. 2, n. 6, p. 537-543, 2002.

RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. **Nature**, v. 386, p. 671-674, 1997.

ROBERTS, J. M.; LAIN, K. Y. Recent Insights into the Pathogenesis of Pre-eclampsia. **Placenta**, v. 23, p. 359-371, 2002.

ROBINSON, C. J.; STRINGER, S. E. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. **Journal of Cell Science**, v. 114, n. 5, p. 853-865, 2001.

ROSE, M. E. The immune system in birds. **Journal of The Royal Society Medicine**, v. 72, n. 9, p. 701-705, 1979.

SABATTINI, S.; BETTINI, G. An immunohistochemical analysis of canine haemangioma and haemangiosarcoma. **Journal of Comparative Pathology**, v. 140, p. 158-168, 2009.

SANTOS, A. L. Q.; SILVA, F. O. C.; SEVERINO, R. S.; DRUMMOND, S. S.; BOMBONATO, P. P. Contribuição ao estudo da vascularização arterial do timo em gatos SRD. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ANATOMIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, [Resumo]. Brasília, 1988. p. 109.

SAINTE-MARIE, G.; PENG, F. S.; MARCOUX, D. The stroma of the thymus of the rat: morphology and antigen diffusion, a reconsideration. **American Journal of Anatomy**, v. 177, p. 333-352, 1986.

SAVINO, W. The thymus is a common target organ in infectious diseases. **PloS Pathogen**, v. 6, n. 2, p. 62, 2006.

SAVINO, W.; DARDENNE, M. Immune-neuroendocrine interactions. **Immunology Today**, v. 16, p. 318-322, 1995.

SAVINO, W.; DARDENNE, M. Neuroendocrine control of thymus physiology. **Endocrine Reviews**, v. 21, p. 412-443, 2000.

SCHUMMER, A.; WILKENS, H.; VOLLMERHAUS, B.; HABERMEHL, K. H. **The anatomy of the domestic animals**. Berlin: Paul Parey, 1981. p. 283-288.

SCHWARZE, E.; SCHRODER, L. **Compêndio de anatomia veterinária: aparato circulatório y piel**. Zaragoza: Acribia, 1972. v. 3, p. 182.

SENGER, D. R.; GALLI, S. J.; DVORAK, A. M.; PERRUZZI, C. A. HARVEY', V. S.; DVORAK, H. F. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. **Science**, v. 219, n. 4587, p. 983-985, 1983.

SHARKEY, A. M.; CHARNOCK-JONES, D. S.; BOOCOCH, C. A.; BROWN, K. D.; SMITH, S. K. Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor in human placenta. **Journal of Reproduction and Fertilization**, v. 99, p. 609-615, 1993.

SHARMA, J. M.; TIZARD, I. Avian cellular immune effector mechanisms – a review. **Avian Pathology**, v. 13, n. 3, p. 357-376, 1984.

SHIBUYA, M. Structure and dual function of vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1). **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, n. 4, p. 409-420, 2001.

SHIBUYA, M.; CLAESSEON-WELSH, L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. **Experimental Cell Research**, v. 312, p. 549-560, 2006.

SILVA, F. O. C.; BOMBONATO, P. P.; SEVERINO, R. S.; DRUMMOND, S. S.; SANTOS, A. L. Q.; BORGES, M. Suprimento arterial do timo em cães SRD. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 31, n. 2, p. 89-94, 1994.

SILVA, F. O. C.; SEVERINO, R. S.; SANTOS, A. L. Q.; DRUMMOND, A. S.; SILVA, M.; BOMBONATO, P. P.; REZENDE, R. J.; LIMA, E. M. M. Suprimento arterial do timo em gatos sem raça definida. **Bioscience Journal**, v. 17, n. 1, p. 61-66, 2001.

SOLAROVIC, B. P.; LALIC, L.; LEPOSAVIC, G. Age-dependent morphometrical changes in the thymus of male propranolol-treated rats. **Annals of Anatomy**, v. 186, p. 141-147, 2004.

SOLAROVIC, B. P.; PESIC, V.; RADOJEVIC, K.; LEPOSAVIC, G. Morphometrical Characteristics of Age-Associated Changes in the Thymus of old Male Wistar Rats. **Anatomy, Histology and Embriology**, v. 186, p. 141-147, 2006.

SURTH, C. D.; SPRENT, J. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. **Nature**, v. 372, p. 100-103, 1994.

STERIO, D. C. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using dissection. **Journal of Microscopy**, v. 134, p. 127-136, 1984.

TAKAHASHI, H.; SHIBUYA, M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. **Clinical Science**, v. 109, p. 227-241, 2005.

TAKAHASHI, T.; YAMAGUCHI, S.; CHIDA, K.; SHIBUYA, M. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A dependent activation of PLC- γ and DNA synthesis in vascular endothelial cells. **EMBO**, v. 20, n. 11, p. 2768-2778, 2001.

TAKEDA, A.; STOELTZING, O.; AHMAD, S. A.; REINMUTH, N.; LIU, W.; PARIKH, A. Role of angiogenesis in the development and growth of liver metastasis. **Journal of Surgical Oncology**, v. 9, n. 7, p. 610-616, 2002.

TAMELLA, T.; ENHOLM, B.; ALITALO, K.; PAAVONEN, K. The biology of vascular endothelial growth factors. **Cardiovascular Research**, v. 65, p. 550-563, 2005.

TIZARD, I. Órgãos do Sistema Imune. In: _____. **Introdução à imunologia veterinária**. 6. ed. São Paulo: Roca, 2000. p. 76-92.

TIWARI, B. K.; GOEL, M. C. Contact sensitivity to DNCB in normal and cell-mediated-immunity deficient chickens: in vivo detection and correlation with lymphocyte transformation and graft-versus-host reaction. **Veterinary and Immunology and Immunopathology**, v. 8, n. 4, p. 329-339, 1985.

VAN DE WIJNGAERT, F. P.; KENDALL, M. D.; SCHUURMAN, H. J.; RADEMAKERS, H. P. M.; KATER, L. Heterogeneity of epithelial cells in the human thymus – an ultrastructural study. **Cell and tissue Research**, v. 237, p. 227-237, 1984.

VAN EWIJK, W. Immunohistology of lymphoid and non-lymphoid cells in the thymus in relation to T lymphocyte differentiation. **American Journal of Anatomy**, v. 170, p. 311-330, 1984.

VAN EWIJK, W.; HOLLÄNDER, G.; TERHORST, C.; WANG, B. Stepwise development of thymic microenvironments in vivo is regulated by thymocyte subsets. **Development**, n. 127, p. 1583-1591, 2000.

VENZKE, W. G. Sistema Linfático em geral. In: GUETTY, R. **Sisson/Grossman anatomia dos animais domésticos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. v. 1, p. 163-167.

VIZI, E. S.; ORSÓ, E.; OSIPENKO, O. N.; HASKÓ, G.; ELENKOV, I. J. Neurochemical, electrophysiological and immunocytochemical evidence for a noradrenergic link between the sympathetic nervous system and thymocytes. **Neuroscience**, v. 68, p. 1263-1276, 1995.

VON GAUDECKER, B. Functional histology of the human thymus. **Anatomy & Embryology**, v. 183, p. 1-15, 1991.

WANG, H.; OWENS, J. D.; SHIH, J. H.; LI, M. C.; BONNER, R. F.; MUSHONSKI, J. F. Histological staining methods preparatory to laser capture microdissection significantly affect the integrity of the cellular RNA. **BMC Genomics**, v. 6, p. 97-105, 2006.

WARNER, N. L. The immunological role of different lymphoid organs in the chicken. II. The immunological competence of thymic cell suspensions. **The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, v. 42, p. 401-416, 1964.

WATANABE, N.; WANG, Y. H.; LEE, H. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the human thymus. **Nature**, v. 436, p. 1181–1185, 2005.

WEIBEL, E. R. **Stereological methods. Practical methods for biological morphometry**. London: Academic Press, 1979. 415 p.

WHEELER, T.; ANTHONY, F. W.; YOUNG, D. A.; MOORE, L. G.; ZAMUDIO, S. Maternal circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) is elevated in high altitude pregnancy. **Journal of Society Gynecology Investigation**, v. 9, p. 301, 2002.

WILLIAMS, B. Vascular permeability/cascular endothelial growth factors: a potential role in the pathogenesis and treatment of vascular diseases. **Vascular Medicine**, v. 1, n. 4, p. 251-258, 1996.

WINTHER, H.; AHMED, A.; DANTZER, V. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two specific receptor, Flt-1 and KDR in the porcine placenta and non-pregnant uterus. **Placenta**, v. 20, p. 35-43, 1999.

WINTHER, H.; DANTZER, V. Co-localization of vascular endothelial growth factor and its two receptors flt-1 and KDR in the mink placenta. **Placenta**, v. 22, n. 5, p. 457-465, 2001.

WEISE, L. M.; VEIKKOLA, T.; MERCER, A. A.; SAVORY, L. J.; FLEMING, S. B.; CAESAR, C.; VITALI, A.; MAKINEN, T.; ALITALO, K.; STACKER, S. A. The vascular endothelial growth factor (VEGF)-like protein form of virusNZ2 binds to VEGFR2 and neuropilin-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 96, p. 3091-3096, 1999.

WITMERT, A. N.; BLIJSWIJK, B. C.; DAÍ, J.; HOFMAN, P.; PARTANEN, T. A.; VRENSSEN, G. F. J. M.; SCHLINGEMANN, R. O. VEGFR-3 in adult angiogenesis. **Journal of Pathology**, v. 195, n. 4, p. 490-497, 2001.

WULFSOHN, D.; GUNDERSEN, H. J.; VEDEL JENSEN, E. B.; NYENGAARD, J. R. Volume estimation from projections. **Journal of Microscopy**, v. 215, p. 111-120, 2004.

XAVIER, J. G. **Repercussões estruturais da desnutrição protéica e renutrição em tecidos linfo-hematopoiéticos de camundongos**. 1999. 254 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

YAMASHITA, H.; KAMADA, D.; SHIRASUNA, K.; MATSUI, M.; SHIMIZU, T.; KIDA, K.; BERISHA, B.; SCHAMS, D.; MIYAMOTO, A. Effect of local neutralization of basic fibroblast growth factor or vascular endothelial growth factor by a specific antibody on the development of the corpus luteum in the cow. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, n. 9, p. 1449-1456, 2008.

YAN, Z.; NEULEN, J.; RACZEK, S.; WEICH, H. A.; KECK, C.; GRUNWALD, K.; BECKWOLDT, M. Vascular endothelial growth factor (VEGF)/ vascular permeability factor (VPF) production by luteinized human granulosa cells in vitro: a paracrine signal in corpus luteum formation. **Gynecology and Endocrinology**, v. 12, n. 3, p. 149-153, 1998.

ZACHARY, I.; GLIKI, G. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of vascular endothelial growth factor family. **Cardiovascular Research**, v. 49, p. 568-581, 2001.

ZHAO, H. Q.; MACDONALD, I. E. Na unbiased and efficient procedure for 3D connectivity measurement as applied to porous media. **Journal of Microscopy**, v. 172, p. 157-162, 1993.

ZYGMUNT, M.; HERR, F.; MUNSTEDT, K.; UWE, L.; LIANG, O. D. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 110, p. S10 - S18, 2003.