FERNANDA RODRIGUES AGRESTE

Estudo quantitativo da vascularização do timo em cães

SÃO PAULO

2005

FERNANDA RODRIGUES AGRESTE

Estudo quantitativo da vascularização do timo em cães

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

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:
Prof. Dr. Pedro Primo Bombonato

SÃO PAULO

2005

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

Elza
BIBLIOTECA VIRGÍNIE BUFF D'ADICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
25/11/05

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1607
FMVZ

Agreste, Fernanda Rodrigues
Estudo quantitativo da vascularização do timo em cães /
Fernanda Rodrigues Agreste. – São Paulo : F. R. Agreste, 2005.
118 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo.
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de
Cirurgia, 2005.

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 (glândula endócrina). 2. Vascularização em animal.
3. Sistema linfático. 4. Morfometria. 5. Cães. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Assistência Acadêmica

Comissão de Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo estereológico da vascularização do timo em cães", protocolo nº698/2005, utilizando 24 cadáveres de cães, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Pedro Primo Bombonato, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Stereological study of the thymus vascularization in dogs", protocol number 698/2005, utilizing 24 corpse of dogs, under the responsibility of Prof. Dr. Pedro Primo Bombonato, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 14 de junho de 2005

Prof.^a Dr.^a Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: AGRESTE, Fernanda Rodrigues

Título: Estudo quantitativo da vascularização do timo em cães

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

Data: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

**"Do meu telescópio, eu via Deus caminha! 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 esse trabalho à benção de ter a família que tenho e ao
grande amor que sinto por eles...**

**A meu orientador Prof. Pedro Bombonato, agradeço enormemente
pela paciência, confiança e oportunidade, sem as quais não teria
atingido meus objetivos e me tornado uma profissional mais
responsável e um ser humano melhor.**

AGRADECIMENTOS

**"Em ti confiam os que conhecem o teu nome; porque tu, Senhor,
nunca desamparas os que te buscam".
(Salmo 9:10)**

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

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

Aos meus tios, Edson e Suzete, Osny e Marlize, e meus primos, Suely e Luciano, Eduardo e Daniel, que compartilharam todos os tempos livres e "ocupado" neste período, obrigado pelo carinho, aprendizado, compreensão, respeito por todo amor que me fizeram sentir.

Às minhas avós, Maria (*in memoriam*), Iracema e Vilma, pelos ensinamentos e por despertarem em mim a paixão pelos animais.

Ao Prof. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda por toda a atenção dada na UERJ, e pelos ensinamentos muitos dos quais utilizados nesta dissertação.

À pós-graduanda da UERJ Karla, por todo o carinho e paciência em me ajudar nos primeiros passos da estereologia.

À todos os professores e funcionários 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). Obrigado por todas as oportunidades, ensinamentos e convívio.

Ao Prof. Francisco Javier Hernandez Blazquez por ceder seu laboratório para o desenvolvimento de pesquisas.

À Profa. Dra. Maria Angélica Miglino por me receber e permitir o desenvolvimento deste trabalho no departamento.

Ao Prof. Dr. Jens R. Nyengaard do Stereological Research Laboratory, University Institute of Pathology, Institute of Experimental Clinical Research, University of Aarhus, Denmark.

À Shirley, técnica do laboratório de microscopia eletrônica do Departamento de Patologia, por toda a ajuda no processamento do material.

Aos meus grandes amigos e técnicos, Edinaldo Ribas Farias ("Índio"), Ronaldo Agostinho da Silva e Diogo Palermo.

Aos funcionários da pós graduação e da biblioteca da FMVZ-USP, pela prestimável atenção, carinho e paciência.

Às minhas amigas: Carolina do Prado (Carol), Rosemary Viola Bosch (Rose), Lílian de Jesus Oliveira (Li), Janaína Munueira Monteiro (Jana), Priscilla Barros Moraes (Pri); responsáveis 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 compartilhado.

Ao grande amigo Fábio Hosoi Rezende ("Peixe") pelo auxílio nas imagens.

À amiga Maria Cecília ("Piolha") por todo o tempo que passamos juntas, as conversas e risadas, que foram fundamentais durante este tempo.

Aos amigos da pós-graduação - Selma Maria Almeida Santos ("Selminha"), Ana Paula Rodrigues Corrêa Martins, Ana Paula Vidotti, Hildebrando Gomes Benedicto (Hill), Arley José Birck, Káterin Grondona, Thiago Aloia (Thi), Ricardo Romão Guerra (Ri), Fernando Garbelotti (Ferdí), Juliana Plácido Guimarães (Jú), Renata Mari (Rê), Josy Alvarenga Cal, Isaac Albuquerque, David Inturrizaga... a convivência com vocês foi maravilhosa!

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 Medicina Veterinária e de meus conhecimentos. Obrigado por vocês existirem!

A todos àqueles que, de algum modo, tornaram possível a realização deste trabalho.

Os meus sinceros e eternos agradecimentos!

À você...

RESUMO

AGRESTE, F. R. **Estudo quantitativo da vascularização do timo em cães.** [Quantitative study of the thymus vascularization in dogs]. 2005. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Durante a vida fetal e no período neonatal, o timo é órgão de grande importância imunológica e, anatomicamente é o maior órgão linfático e com alta atividade linfopoiética, constando como precursor da linfopoiese. 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 na sua maioria de maneira genérica. Com isso, aspectos morfológicos como número de vasos, tamanho do órgão foram estudados considerando as variáveis sexo e faixas etárias. Para este estudo, foram utilizados 24 fetos de cães domésticos, sem raça definida, machos e fêmeas, divididos em quatro grupos etários. Os timos foram processados para o estudo da microscopia de luz, e as análises estereológicas foram realizadas utilizando o método do disector físico associado com o princípio de ConnEulor. O volume do órgão (V_{ref}), comprimento, espessura e largura aumentaram gradativamente com o desenvolvimento, sendo maior nos machos do que nas fêmeas. As variáveis estereológicas analisadas (densidade de comprimento do vaso - L_v , comprimento do vaso - L , densidade de superfície de área - S_v , superfície de área - S , estimativa da densidade numérica vascular - $N_{v(vasc)}$, número total de vasos no órgão - $N_{(vasc)}$), tiveram um aumento gradativo, sendo que o L_v foi maior nas fêmeas e as demais os machos apresentaram maior valor. Aumento na $N_{v(vasc)}$ e $N_{(vasc)}$ foi observado nos animais do grupo IV.

Palavras-chave: Timo (glândula endócrina). Vascularização em animal. Sistema linfático. Morfometria. Cães.

ABSTRACT

AGRESTE, F. R. **Quantitative study of the thymus vascularization in dogs.** [Estudo quantitativo da vascularização do timo em cães]. 2005. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

During phoetal life and neonatal period, the thymus is the organ that has a wide immunological relevance and, anatomically speaking is the largest lymphoid organ presenting high limphopoietic activity presented as the predecessor of limphopoiesis. The literature about thymus irrigation in dogs is scarce, becouse most authors refer to the subject in a general way. Then, morphological aspects as number, shape, size, irrigation, and quantitative were study considering sexy and differents ages of development of the dogs. To the study, were used twenty-four fetus of the mongrel domestics dogs, males and females, divided into four different well defined aged groups (fetus 30, 40, 50 and 60 days). The thymus were processed for the light microscopy study, and the stereological analyses were done using the physical disector method associated with the ConnEulor principle. The volume of the organ, length, thickness and wide increased gradually with the development, in males is great that female. The stereological variables analysed (length density – L_v , length od vascullar – L , surface area density – S_v , surface area – S , vascullar number density - $N_{v(vasc)}$, and vascullar total number - $N_{(vasc)}$), had the gradual high, the L_v was more in female and the others variables were more in males. The rise of $N_{v(vasc)}$ and $N_{(vasc)}$ was observed on the group four animals.

Key words: Thymus (endocriny gland). Vascularization in animal. Lymphatic system. Morphometry. Dogs.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

mm	- milímetro
cm	- centímetro
SNA	- sistema nervoso autônomo
β	- beta
IL-1	- interleucina 1
LSH	- hormônio estimulante dos linfócitos
Ig	- imunoglobulina
INF- γ	- interferon gama
TNF- α	- Fator de necrose tumoral alfa
LPS	- lipopolissacarídeo
TGF- β	- fator transformante do crescimento beta
SRD	- sem raça definida
PBS	- solução salina tamponada fosfatada
M	- molar
pH	- potencial hidrogenioiônico
°C	- Graus Celsius
μm	- micrômetro
$V_{(\text{ref})}$	- Volume Referência
d	- distância para cortes macroscópicos
k	- distância para cortes microscópicos
Σa	- somatória das áreas

CE	- coeficiente de erro
AUI	- Aleatórios e Uniformemente Isotrópicos
IUR	- Isotropic Uniform Random
Φ	- seno
θ	- co-seno
mm ²	- milímetro quadrado
a	- área
p	- número de pontos
h	- altura
At	- área teste
$V_{(dis)}$	- volume do disector
H	- hole
I	- island
B	- bridge
X_v	- número de Euler
$N_{v(vasc)}$	- densidade numérica vascular
$N_{(vasc)}$	- número de vasos
L	- comprimento do vaso
L_v	- densidade de comprimento do vaso
S	- superfície de área
S_v	- Densidade de superfície de área
Qa	- número de perfis por área
I_L	- número de intersecções

cm³ - centímetro cúbico

DP - desvio padrão

LISTA DE FIGURAS

- Figura 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)..... 29
- Figura Sistemas testes com diferentes ângulos utilizados no método orientador. A - relógio Φ (seno) ou Φ -clock. B - relógio θ (co-seno) ou θ -clock..... 64
- Figura 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..... 67
- Figura 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”..... 70
- Figura 5 Macroestrutura do timo de cão (recém-nato). A: Lateral esquerda. b – lobo esquerdo; d – coração; e – esôfago; seta branca – nervo frênico; ponta de seta – primeiro e quinto pra de costelas. B: Lateral direita. A – lobo direito; d- coração; * - artéria torácica interna direita; seta branca – nervo frênico. C: Vista ventral. A – lobo direito; b – lobo esquerdo; c – primeiro par de costelas; f – traquéia..... 77
- Figura Histograma comparando as variáveis volume referência, comprimento, espessura e largura do timo entre as faixas estarias e o sexo. A: Volume referência (Vref). B: comprimento do timo. C: espessura do timo. D: largura do timo..... 82
- Figura 7 Fotomicrografias dos timos. A: feto com 30 dias, macho. B: feto com 40 dias, macho. C: feto com 50 dias, macho. D: recém-nato, 60 dias, fêmea. E: recém-nato, 60 dias, macho. V – vasos; seta – Corpúsculo de Hassal..... 84
- Figura Histograma comparando as variáveis estereológicas 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 ($N_{v(vasc)}$), número total de vasos no órgão ($N_{(vasc)}$) entre as faixas etárias e o sexo. A: densidade de comprimento do vaso (L_v). B: comprimento do vaso (L). C: densidade de superfície de área (S_v). D: superfície de área (S). E: estimativa da densidade numérica vascular ($N_{v(vasc)}$). F: número total de vasos no órgão ($N_{(vasc)}$)..... 88

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Tamanho do timo em filhotes de cães (NICKEL et al., 1981)..... 30
- Tabela 2 - Valores das variáveis volume referência, comprimento, espessura e largura do timo em recém-natos e fetos machos nos diferentes grupos etários. São Paulo, 2005..... 80
- Tabela 3 - Valores das variáveis volume referência ($V_{(ref)}$), comprimento, espessura e largura do timo em recém-natos e fetos fêmeas nos diferentes grupos etários. São Paulo, 2005..... 81
- Tabela 4 - Valores das variáveis densidade de comprimento do vaso (L_v), comprimento do vaso (L), densidade de superfície de área (S_v), superfície de área (S), estimacão da densidade numérica vascular ($N_{v(vasc)}$), número total de vasos no órgão ($N_{(vasc)}$), do timo em recém-natos e fetos fêmeas nos diferentes grupos etários. São Paulo, 2005... 89
- Tabela 5 - Valores das variáveis densidade de comprimento do vaso (L_v), comprimento do vaso (L), densidade de superfície de área (S_v), superfície de área (S), estimacão da densidade numérica vascular ($N_{v(vasc)}$), número total de vasos no órgão ($N_{(vasc)}$), do timo em recém-natos e fetos machos nos diferentes grupos etários. São Paulo, 2005... 90
- Tabela 6 - Valores de p do teste de Mann-Whitney (teste U) para a verificacão de diferença entre os sexos dos fetos de cães. São Paulo, 2005..... 91
- Tabela 7 - Valores de p do teste de Wilcoxon (teste T) para a verificacão de diferença entre as faixas etárias dos fetos de cães. São Paulo, 2005.... 91

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	26
2.1 TOPOGRAFIA DO TIMO.....	28
2.2 DESENVOLVIMENTO DO TIMO.....	30
2.3 VASCULARIZAÇÃO.....	33
2.4 HISTOLOGIA.....	37
2.5 INFLUÊNCIA DO SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO (SNA).....	40
2.6 TIMECTOMIA.....	44
2.7 ORIGEM DOS LINFÓCITOS E DIFERENCIAÇÃO DOS LINFÓCITOS T....	46
2.8 FUNÇÕES DO TIMO.....	48
2.9 INVOLUÇÃO TÍMICA.....	51
3 MATERIAL E MÉTODO.....	55
3.1 MATERIAL.....	56
3.2 MÉTODO.....	57
3.2.1 Lavagem do sistema circulatório e fixação do timo por meio de perfusão.....	57
3.2.2 Processamento do material.....	58
3.2.3 Microscopia de luz de cortes semi-finos.....	59
3.2.4 Volume do órgão ou Volume Referência (Vref).....	60
3.2.5 Método Orientador.....	62

3.2.6 Análise Estereológica.....	64
3.2.6.1 Método Disector Físico.....	65
3.2.6.2 Determinação do Número de Euler no Método de Disector.....	68
3.2.6.3 Estimação da Densidade Numérica Vascular ($N_{V(vasc)}$).....	72
3.2.6.4 Número Total de Vasos no Órgão ($N_{(vasc)}$).....	72
3.2.6.5 Estimação da densidade de comprimento do vaso (L_v), comprimento do vaso (L), densidade de superfície de área (S_v), superfície de área (S).....	73
3.2.7 Análise Estatística.....	74
4 RESULTADOS.....	75
4.1 ANATOMIA MACROSCÓPICA DO TIMO.....	75
4.2 ANATOMIA MICROSCÓPICA DO TIMO.....	82
4.3 ANÁLISE ESTEREOLÓGICA.....	85
5 DISCUSSÃO.....	92
6 CONCLUSÃO.....	101
REFERÊNCIAS.....	103

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Diante dos constantes avanços da ciência na área da imunologia e da indubitável importância que esta área vem adquirindo atualmente, faz-se cada vez mais necessário o empreendimento de estudos que visem conhecer aspectos diversos concernentes ao sistema imunitário, buscando a elucidação de doenças e seus tratamentos, tendo como principal enfoque nos estudos relativos aos diferentes mecanismos de aquisição de defesas orgânicas, particularmente aquelas decorrentes dos esquemas de vacinação propostos classicamente para as distintas espécies animais.

É de conhecimento da ciência que diversas reações imunológicas são exaradas após exposição de antígenos, sendo assim, a imunidade corporal está associada com atividades relacionadas aos órgãos linfomielóides e células, sendo o sistema linfático constituído de uma rede de defesa difusa e distribuída estrategicamente, seja na forma de folículos dispersos ou agregados, contra organismos infecciosos e outros materiais nocivos (SETO, 1981).

Contudo, os órgãos linfomielóides podem ser classificados como primários ou centrais, responsáveis pela produção e diferenciação de linfócitos, e incluem a medula óssea e timo nas diversas espécies animais, o apêndice cecal no coelho, o saco vitelínico e a bolsa cloacal nas aves; ou ainda em secundários ou periféricos, capacitados para promoverem a maturação de imunócitos e servirem de sítios das respostas imunes, estes são representados pelo baço, tonsilas cecais, glândula da terceira pálpebra, tonsilas palatinas e tecidos linfóides intestinais (SANTANA, 1999; TIZARD, 1985).

Diversos experimentos têm revelado que no desenvolvimento normal, a manutenção dessas estruturas linfóides é dependente de um órgão linfóide específico quanto ao caráter precursor linfopoietico – o timo. Assim como, 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 (APPOLINÁRIO, 1998; BOMBONATO, 1997).

Em aves e mamíferos, há duas modalidades de mecanismos de defesa, uma inespecífica que inclui a ação de enzimas bactericidas, fagócitos e o sistema de ativação complementar, e a específica adquirida como resultado da interação de tecidos linfóides com organismos infecciosos, sendo mediada, portanto, por células e anticorpos (SANTANA, 1999).

Apesar da função tímica ser responsabilizada por mecanismos fundamentais na aquisição das defesas e conseqüentes respostas orgânicas, ela ainda não é totalmente esclarecida, tampouco as bases morfológicas que respondem por tais funções, assim como seu processo de desenvolvimento e involução, constituição estrutural, ainda estão por serem respondidas (BOMBONATO, 1997).

Ainda 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, na qual tornam-se comprometidas em animais recém-nascidos submetidos à timectomia (APPOLINÁRIO, 1998; MACHADO, 1989).

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).

A remoção do timo de animais adultos não produz resultados óbvios imediatos. Se, porém, os animais forem mantidos por vários meses após a timectomia, observa-se um declínio progressivo no número de linfócitos circulantes e na capacidade destes linfócitos montarem uma resposta imune mediada por células, sugerindo que embora o timo no adulto ainda seja funcional, em virtude da existência de um reservatório no timo de células de vida longa, as quais são totalmente utilizadas antes dos efeitos da timectomia tornaram-se aparentes (TIZARD, 2000).

Muitos autores estudam o timo usando técnicas histológicas, sendo as mais usadas baseadas em microscopia de luz, eletrônica e imunohistoquímica (IZARD, 1997). Recentemente a morfologia tem-se beneficiado com uso de técnicas genéticas e moleculares que ajudam no esclarecimento de dúvidas, melhorando as pesquisas biológicas e biomédicas (MANDARIM, 2003). Entretanto, algumas questões que aparecem frequentemente em períodos de adaptação, evolução ou doenças no organismo, necessitam de análises quantitativas para melhor entendimento (ANDERSEN, PAKKENBERG, 2003; MAYHEW, 1992; ROBERTS et al., 2000; WEIBEL, 1989). O desenvolvimento de uma plataforma estrutural quantitativa em experimentos biológicos permite uma variação nas medidas de molécula para organismos, sendo este uma das séries de maior realização nos últimos anos (BOLLENDER, 1992).

Estudos estereológicos são cada vez mais freqüentes na literatura, particularmente nos campos do desenvolvimento, evolução, patologia e neurociências. O desafio da estereologia é interpretar o arranjo estrutural tridimensional interno com base na análise de cortes da estrutura que mostram apenas uma informação bidimensional, tendo como princípio considerações geométricas e probabilidade estatística (JENSEN, 1998; MANDARIM, 2003; WEIBEL, 1979).

A estereologia tem vantagens sobre os estudos qualitativos. Primeiramente, os resultados são numéricos (e não subjetivos). Segundo, a comparação entre diferentes grupos (idade, espécies, ação de drogas, manipulação, etc) são facilmente realizadas; entretanto, este método é indicado para algumas situações. Terceiro, o trabalho fatídico associado com estudos quantitativos praticamente desapareceu com a estratégia de amostragem estrita e a maneira de executar a moderna estereologia. Quarto, é considerado um método aceitável. Quinto, há um curto tempo de treinamento de seus cientistas. E finalmente, é necessário um baixo custo do equipamento (BJARKAM et al., 2001; BOLENDER, 1981; BOLENDER, 1982; CHARLESTON et al., 2003; DAVEY et al., 2003; GUNDERSEN et al., 1999; KUBINOVA et al., 2001; KUBINOVA; JANACEK, 2001; MANDARIM, PEREIRA, 2002).

No que diz respeito à irrigação do timo em cães, em particular no respeitante aos seus aspectos quantitativos, 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, e ainda assim descrevendo tão somente os vasos responsáveis pela nutrição do órgão.

O conhecimento do comportamento vascular, de sua estrutura, das interferências que ocorrem 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, objetivamos estudar e quantificar os aspectos morfológicos e estereológicos da vascularização do timo em cães, correlacionando com o sexo e o desenvolvimento etário.

Revisão de Literatura

2 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 oferecermos um melhor entendimento, compilamos e apresentamos os informes propostos pelos tratadistas e trabalhos específicos no que se refere ao timo.

2.1 TOPOGRAFIA DO TIMO

O timo é encontrado no espaço mediastinal cranial. Entretanto, nos equinos, 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, 1985).

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 discreta lobulações. Apresenta apenas 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 deita-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 à 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 (NICHEL 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 (NICHEL 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

2.2 DESENVOLVIMENTO DO TIMO

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 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 otimiza 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 as glândulas tireóide e 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-se 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 mesenquima 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 mesenquima da crista neural foi verificada por Auerbach (1960), quem investigou o desenvolvimento do timo em ratos. Auerbach observou após 12 dias de gestação alta proliferação no timo, fato este não ocorre quando se remove o mesenquima comum, o que está presente no desenvolvimento de demais órgãos, no desenvolvimento do timo. Quando se usa o mesenquima do pulmão ou da glândula sub-mandibular 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 mesenquima que compõe o arco faríngeo, a região da faringe, é derivada da crista neural. A crista neural origina-se de um grupo de células que migram ventrolateralmente da parte dorsal do tubo neural e proliferam. Alguns agregados originam componentes neurais, como gânglios simpáticos (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).

2.3 VASCULARIZAÇÃO

Quanto à irrigação do timo, esta apresenta características peculiares; na qual 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, estes sofrem uma involução com o órgão (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; KATO, 1997).

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).

Tratadistas clássicos como Martin (1902); Martin e Schauder (1938) e Ellenberger e Baum (1977) decrevem o suprimento sanguíneo do timo pelos ramos das artéria 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); Dyce et al. (1997), 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 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.

Segundo 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 que são responsáveis pela irrigação do timo em várias espécies animais: nos carnívoros a artéria torácica interna perfura 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.

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.

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

2.4 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 (DIJKSTRA; SMINIA, 1990, VENZKE, 1986).

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 espalhadas (VON GAUDECKER, 1991; VENZKE, 1986).

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

Alguns estágios de maturação requerem contato celular direto mediado por receptores, estabelecendo-se verdadeiros complexos linfo-estromais, constituindo em região cortical as chamadas células enfermeiras, condição em que uma única célula epitelial aparece preenchida por grande número de timócitos (PHILP et al., 1993). Também macrófagos 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 um divisor 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).

As células epiteliais corticais, tipo 2 e 3, encontram-se em íntimo contato com os timócitos através de seus prolongamentos. 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 à 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 reticulares em decomposição e que são entremeados por linfócitos e grânulos eosinofílicos. Aparentemente os corpúsculos percorrem um ciclo de neoformação, decomposição e absorção (GURTLE et al., 1984).

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 progressivamente de menores dimensões 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).

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).

2.5 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 (KURZ et al., 1997; LEPOSAVIC et al., 1992; VIZI et al., 1995).

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 dependem 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 neo-natal 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) demonstrou 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), tratou 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 Laposavic 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. Mudanças 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 (KURZ et al., 1997; MARCHETTI et al., 1990; SOLAROVIC et al., 2004).

Em ratos adultos tratados com propranolol, Solarovic et al. (2004) observou 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).

2.6 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. Característico é a diminuição de linfócitos e da capacidade orgânica para a formação de anticorpos (GURTLE 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. Já a resposta aos antígenos polissacarídicos não deve ser 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 em animais adultos. Porém, após vários meses o número de linfócitos circulantes e a sua capacidade de montar uma resposta imunomediada por células estarão reduzidos. 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 (GURTLE, 1984).

2.7 ORIGEM DOS LINFÓCITOS E DIFERENCIAÇÃO DOS LINFÓCITOS T

Embora os antígenos sejam capturados e processados pelos macrófagos, células B e células dendríticas, uma resposta imune é, na verdade, montada por células chamadas linfócitos. 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, o que proporciona 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, a medula óssea 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. Como o baço, o fígado e os linfonodos, a medula óssea contém muitos macrófagos e conseqüentemente remove partículas de sangue. Finalmente, é uma fonte importante de anticorpos. Em virtude dessas funções múltiplas, a medula óssea se divide em dois compartimentos, um compartimento hematopoiético e um vascular. Esses compartimentos se alternam, como fatias de

bolo, nas áreas em forma de cunha dentro dos ossos longos. 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 (nas aves, para o bursa de Fabricius). Uma vez dentro do timo, as células (agora chamadas timócitos) se dividem rapidamente. No timo ocorre a multiplicação e especialização dos linfócitos T, que em sua membrana celular apresentam firmemente ligados anticorpos específicos, e com o auxílio dos quais podem ser ligados antígenos ou então 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 (GURTLER 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 prolinfócitos em linfócitos T e B. Sua ação é bloqueada pelo

propranolol, de modo que os receptores β -adrenérgicos aparentemente participam da diferenciação (GURTLER 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 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).

2.8 FUNÇÕES DO TIMO

O timo é um órgão linfoepitelial primariamente envolvido na diferenciação, seleção e maturação dos linfócitos T (PICKER; SIEGELMAN, 1993; SUSTER; ROSAI, 1990; VAN EWIJK, 1984). 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 os sistemas nervoso e endócrino, situando-o numa posição central dentro da circuitaria neuroimunoendócrina (REICHLIN, 1993; SAVINO; DARDENNE, 1995).

A produção de precursores de células T, assim como a imprescindibilidade para o processo de diferenciação destes precursores culminando com a formação das referidas células T, é uma das principais funções do timo (HAM; CORMACK, 1983; ROSE, 1979).

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; SHARMA; TIZARD, 1984; TIWARI; GOEL, 1985).

Os linfócitos T não representam uma população homogênea de células timo-derivadas, mas sim uma quantidade de sub-grupos 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 assassinas, 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).

Já, as células T de ajuda interferem na imunidade humoral, pois libertam o factor auxiliar T que, juntamente com o antígeno que por elas é reconhecido, promovem a ativação dos linfócitos B. Deste modo o timo, ou concretamente as células T de ajuda que ele contém, 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, 1984).

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 de ajuda 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).

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 órgão de roedores adultos atróficos 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 (DROEGE et al., 1974; WARNER, 1964).

Dos distúrbios da função do timo devem ser citados a atrofia e a hiperplasia. Na atrofia do timo ocorre 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) (GURTLE et al., 1984).

2.9 INVOLUÇÃO TÍMICA

Durante a vida do animal o timo sofre uma involução, dita 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).

Nos carnívoros o início da involução coincide com o aparecimento dos dentes secundários (NICKEL et al., 1981).

O timo apresenta seu maior tamanho em relação ao resto do corpo no momento do nascimento, porém, só é considerado completamente formado em ratos com uma semana de vida neonatal, atingindo seu volume máximo nessa espécie aos dois meses de idade (KUPER et al., 1990). A partir daí o órgão começa a involuir, diminuindo gradualmente de tamanho (HWANG et al., 1974). Nesses casos

as alterações histológicas mais evidentes relacionam-se à queda do número de timócitos corticais, com diminuição na relação córtex/medula e à alteração na distribuição e morfologia das células epiteliais (BAR-DAYAN et al., 1999). Estas assumem aspecto fusiforme, arranjam-se em rosetas, ou delineiam feixes sendo circundadas por tecido conjuntivo denso, provavelmente demonstrando um estado afuncional (SUSTER; ROSAI, 1990).

Efeitos hormonais e neuroendócrinos fazem parte da regulação da involução (BAR-DAYAN; SMALL, 1994).

A diminuição da relação córtex/medula pode ser por uma alteração na relação entre o índice de apoptose e proliferação celular no órgão durante a involução (BAR-DAYAN et al., 1999).

Bar-Dayan et al. (1999) em pesquisa com camundongos jovens e adultos, mostrou que depois da involução tímica há um desequilíbrio entre o índice de apoptose e proliferação celular principalmente na região cortical, a taxa de apoptose é maior do que a de proliferação celular nos ratos adultos, além disso, observaram que este índice é maior na região cortical do que na medular. Surth e Sprent (1994), descreveram a distribuição das células apoptóticas no timo, e observaram que há uma concentração na região corticomedular (seis vezes mais que no córtex, e dezoito vezes mais que na medula). Isto pode ter uma importância fisiológica, esta concentração de células apoptóticas na região córticomedular impede a migração das células do córtex para a medula (HIRAMINE et al., 1996).

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).

Uma série de distúrbios pode determinar a redução do volume tímico. 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).

Já as disfunções adquiridas determinam usualmente alterações regressivas reversíveis, denominadas atrofia tímicas. 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 frequentes 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 cariorrexis 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).

Na espécie humana é freqüente ainda a deposição de tecido adiposo localmente, evento ausente em camundongos (GEORGE; RITTER, 1996). Merece referência à redução na quantidade de mastócitos durante o processo involutivo tímico em oposição ao habitualmente observado na espécie humana em condições análogas (HENRY, 1992). Possivelmente essa diferença no mosaico celular presente durante o processo involutivo relaciona-se com o quadro histopatológico distinto observado, em particular em relação à fibrose (XAVIER, 1999).

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).

A ativação das glândulas adrenais integra o quadro fisiopatológico da desnutrição protéica e protéico-calórica, determinando a elevação dos níveis séricos de corticosteróides (RAO et al., 1968; HILL et al., 1995). Estes apresentam atividades imunossupressivas, atuando em especial em linfócitos T e macrófagos. Os mecanismos envolvidos nessas interações são apenas parcialmente conhecidos, existindo evidências de redução na liberação de ácido araquidônico das membranas celulares, interferência no fluxo iônico transmembrana, modulação da apoptose, inibição da expressão de moléculas de adesão induzidas por INF- γ (interferon γ), TNF- α (Fator de necrose tumora α), lipopolissacarídeo (LPS) e IL-1 e supressão da produção e ativação de citocinas (ALMAWI et al., 1996). Porém existem exceções como a do TGF- β (fator transformante do crescimento β), que parece ter sua expressão elevada pela ação dos glicocorticóides em linfócitos T, fibroblastos e osteoblastos. Essa elevação explicaria os efeitos antiproliferativos dos glicocorticóides, suprime-se sua ação antiproliferativa (AYANLAR-BATUMAN et al., 1991). Dessa maneira, a redução da população de linfócitos e de precursores hematopoiéticos medulares, ocorrendo sob influência adrenal, pode estar sob mediação de TGF- β . Em animais adrenalectomizados submetidos à desnutrição identifica-se uma perda de peso dos órgãos linfóides inferior àquela presente em animais com adrenais (BELL et al., 1976). Reconhecidamente o TGF- β está envolvido em eventos de transdiferenciação celular, como no caso da ativação miofibroblástica, bem como em condições aplásicas medulares ou processos fibróticos teciduais (XAVIER, 1999).

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 MATERIAL

Para a realização desta pesquisa foram coletados 24 timos provenientes de fetos e recém-natos de cães domésticos (*Canis familiaris*), com 30, 40 50 e 60 dias, sem raça definida (SRD), machos e fêmeas em igual número, oriundos do HOVET-FMVZ-USP. Os animais, e seus respectivos timos coletados foram separados em 4 grupos etários. Dentro destes grupos foram sub-divididos de acordo com o sexo. Os animais considerados nesta pesquisa eram de cadelas prenhez que não apresentavam sinais clínicos compatíveis com qualquer patologia, além disso, os filhotes não apresentavam nenhum grau de consangüinidade.

- Grupo I - três machos e três fêmeas, fetos com 30 dias.
- Grupo II - três machos e três fêmeas, fetos com 40 dias.
- Grupo III - três machos e três fêmeas, fetos com 50 dias.
- Grupo IV - três machos e três fêmeas, recém-natos com 60 dias.

3.2 MÉTODO

3.2.1 Lavagem do sistema circulatório e fixação do timo por meio de perfusão

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 parte torácica da aorta foi isolada, sendo introduzida em sua luz, 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. Uma solução contendo solução salina tamponada fosfatada (PBS) a 0,1M e pH 7,4 e heparina a 2% foi perfundida através da aorta, possibilitando a lavagem dos sistemas arterial e venoso. Em seguida, a solução fixadora de Karnovsky modificada, constituída por glutaraldeído 5% (Merk®) e formaldeído a 1% (Sigma®) em tampão cacodilato de sódio (EMS®) a 0,125M e pH 7,4 foi perfundida nos animais, através do mesmo vaso utilizado para a solução de lavagem, no entanto, para a perfusão do fixador a veia cava caudal e veia cava cranial foram laqueadas.

3.2.2 Processamento do material

Após a perfusão da solução fixadora de Karnovsky modificada, os timos foram removidos. Sendo em seguida, 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 e orientando o sentido crânio-caudal do mesmo. Em seguida, foram seccionados transversalmente com a utilização de uma lâmina cortante, originando fatias com distância média de 3 mm para obtermos a estimativa do volume pelo método de Cavalieri, e após permaneceram imersos no fixador por um período mínimo de 24 horas.

As fatias escolhidas aleatoriamente obedeceram ao método orientador modificado (MATTFELDT et al., 1990).

Posteriormente, os fragmentos tímicos foram lavados em solução 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 lavados na mesma solução tampão de cacodilato anteriormente referida, seguido de água destilada. Após foram imersos 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.

À 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.

3.2.3 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 um micrômetro (1 µm) de espessura, 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.

3.2.4 Volume do órgão ou Volume Referência ($V_{(ref)}$)

Segundo o matemático Bonaventura Cavalieri (1635 apud HOWARD; REED, 1998), o volume de qualquer objeto pode ser estimado através de uma exaustiva série de secções paralelas separadas por uma distância conhecida. 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, 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 $a \times (a+2)$

3.2.5 Método Orientator

O tecido ou órgão isotrópico é aquele onde a estrutura aparece homogeneamente, com as mesmas características em todas as direções, 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 sempre cortes AUI ou IUR de qualquer tecido ou órgão hoje contamos com 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 contenham 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. Essas fatias selecionadas permitem 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 (coseno) 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.

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

3.2.6 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 equivalem 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).

3.2.6.1 Método Disector Físico

A quantificação vascular no timo de 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 (COGGESHALL; LEKAN, 1996; MAYHEW; GUNDERSEN, 1996; COGGESHALL, 1992; MAYHEW, 1992; POVER; COGGESHALL, 1991; PAKKENBERG; GUNDERSEN, 1988).

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 câmera 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, 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, abedecendo 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 timos 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 (At) 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.

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

3.2.6.2 Determinação do Número de Euler no Método de Disector

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 (KROUSTRUP; GUNDERSEN, 2001; DEHOFF, 1972).

O número de Euler é um valor inteiro, específico, que pode ser definido por algumas estruturas em alguma dimensão (KROUSTRUP; GUNDERSEN, 2001; ZHAO; MACDONALD, 1993; DEHOFF et al., 1972). 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 convexa, 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).

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"

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 representado 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 ($N_{v(cap)}$), ou densidade de conectividade (Equação 6) (NYENGAARD; MARCUSSEN, 1993).

3.2.6.3 Estimação da Densidade Numérica Vascular ($N_{V(vasc)}$)

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 ($N_{V(cap)}$), 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

3.2.6.4 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

3.2.6.5 *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 (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

3.2.7 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 de 0,05 ($p < 0,05$).

Resultados

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos dos quatro grupos etários foram subdivididos segundo os aspectos relativos à anatomia macroscópica, anatomia microscópica e análise estereológica.

4.1 ANATOMIA MACROSCÓPICA DO TIMO

Nos cães dos diferentes grupos etários analisados os timos apresentavam coloração rósea, localizados no espaço mediastinal cranial, entre os pulmões e acima da base do coração. Na porção cranial apresentavam discreta divisão entre o lobo esquerdo e direito, sendo unidos por tecido de conexão. Na porção caudal os lobos direito e esquerdo eram totalmente separados, sendo o lobo direito maior que o esquerdo. Sua porção cranial estendia-se cranialmente ao primeiro par de costelas, e sua porção caudal próximo ao quinto par das cartilagens costais (Figura 5).

Apresentavam suprimento sanguíneo oriundos das artérias torácica interna direita e esquerda, estas penetravam no parênquima de cada lobo tímico para a seguir dividirem-se em ramos tímicos do tronco braquiocefálico, das artérias subclávia direita e esquerda, do tronco costocervical, primeira intercostal e das artéria pericardicofrênica, também contribuíram com sua irrigação.

Figura 5 – Macroestrutura do timo de cão (recém-nato). A: Lateral esquerda. b – lobo esquerdo; d – coração; e – esôfago; seta branca – nervo frênico; ponta de seta – primeiro e quinto par de costelas. B: Lateral direita. A – lobo direito; d- coração; * - artéria torácica interna direita; seta branca – nervo frênico. C: Vista ventral. A – lobo direito; b – lobo esquerdo; c – primeiro par de costelas; f – traquéia

De forma geral, **o comprimento, a espessura e a largura** do timo tiveram um aumento gradativo de acordo com o desenvolvimento dos fetos, sendo nas fêmeas os valores maiores do que nos machos.

No grupo I o **comprimento** do timo variou em média 1,684 cm, sendo em média nas fêmeas 1,7 cm, e nos machos 1,673 cm. A **espessura** variou em média 0,4 cm, sendo nas fêmeas 0,445 cm e nos machos 0,3575 cm. A **largura** variou em média 0,535 cm, sendo nas fêmeas 0,55 cm e nos machos 0,5325 cm. Somente a espessura teve diferença estatisticamente significativa se comparado o sexo.

No grupo II o comprimento do timo variou em média 1,7447 cm, sendo em média nas fêmeas 1,775 cm, e nos machos 1,73675 cm. A espessura variou em média 0,426 cm, sendo nas fêmeas 0,4575 cm e nos machos 0,385 cm. A largura variou em média 0,503 cm, sendo nas fêmeas 0,5075 cm e nos machos 0,4975 cm. Somente a espessura teve diferença estatisticamente significativa se comparado o sexo.

No grupo III o comprimento do timo variou em média 1,7932 cm, sendo em média nas fêmeas 1,913 cm, e nos machos 1,65375 cm. A espessura variou em média 0,419 cm, sendo nas fêmeas 0,4075 cm e nos machos 0,4475 cm. A largura variou em média 0,652 cm, sendo nas fêmeas 0,675 cm e nos machos 0,63 cm. Houve diferença estatisticamente significativa no comprimento do timo quando comparado o sexo dos animais.

No grupo IV o comprimento do timo variou em média 2,522 cm, sendo em média nas fêmeas 2,675 cm, e nos machos 2,3775 cm. A espessura variou em média 0,55 cm, sendo nas fêmeas 0,5675 cm e nos machos 0,5275 cm. A largura variou em média 1,014 cm, sendo nas fêmeas 1,0775 cm e nos machos 0,965 cm. Houve diferença

estatisticamente significativa no comprimento e na largura do timo quando comparado o sexo dos animais.

Houve diferença estatisticamente significativa no comprimento do timo quando comparado os animais do grupo II e III; na espessura quando comparado os animais do grupo I e II, I e III, II e III.

O **volume do órgão ou volume referência (Vref)** - cm^3 - foi estimado pelo método de Cavalieri através de planos macroscópicos paralelos e seriados, seus valores aumentaram gradativamente de acordo com o desenvolvimento dos fetos, sendo maior nas fêmeas quando analisada a mesma faixa etária. O volume referência variou em média no grupo I de 2,02, sendo nos machos de 2,0175 e nas fêmeas de 2,05; no grupo II de 2,071, sendo nos machos de 1,955 e nas fêmeas de 2,17; no grupo III de 2,06, sendo nos machos de 1,9125 e nas fêmeas de 2,175; no grupo IV de 3,12, sendo nos machos de 3,11 e nas fêmeas de 3,24. Houve diferença estatisticamente significativa se comparado o sexo no grupo III, e quando comparado às faixas etárias entre os grupos I e II, I e III, II e III. Nos demais grupos não houve diferença estatisticamente significativa.

Os valores individuais tais como volume referência, comprimento, espessura e largura do timo estão apresentados sistematicamente nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2 – Valores das variáveis volume referência, comprimento, espessura e largura do timo em recém-natos e fetos machos nos diferentes grupos etários. São Paulo, 2005

Grupos (machos)	$V_{(ref)} (cm^3)$	Comprimento (cm)	Espessura (cm)	Largura (cm)
<i>I (30 dias)</i>				
1	2,05	1,6	0,48	0,54
2	2,1	1,8	0,44	0,58
3	1,95	1,6	0,42	0,5
Média	2,0175	1,673	0,3575	0,5325
DP	0,017321	0,028284	0,01	0,01
<i>II (40 dias)</i>				
1	2,15	1,8	0,46	0,5
2	2,18	1,8	0,44	0,51
3	2,17	1,7	0,49	0,51
Média	1,955	1,73675	0,385	0,4975
DP	0,196299	0,031342	0,034641	0,005774
<i>III (50 dias)</i>				
3	2,3	1,954	0,36	0,64
5	2,1	1,892	0,41	0,67
6	2,2	1,914	0,45	0,72
Média	1,9125	1,65375	0,4475	0,63
DP	0,086603	0,043555	0,035119	0,100664
<i>IV (60 dias)</i>				
3	2,9	2,6	0,6	1,05
4	3,4	2,7	0,55	1,09
6	3,26	2,7	0,57	1,08
Média	3,11	2,3775	0,5275	0,965
DP	0,254231	0,060828	0,017321	0,035119

Tabela 3 – Valores das variáveis volume referência ($V_{(ref)}$), comprimento, espessura e largura do timo em recém-natos e fetos fêmeas nos diferentes grupos etários. São Paulo, 2005

Grupos (fêmeas)	$V_{(ref)}$ (cm ³)	Comprimento (cm)	Espessura (cm)	Largura (cm)
<i>I (30 dias)</i>				
4	2,01	1,7	0,37	0,52
5	2,01	1,66	0,35	0,54
6	2,04	1,7	0,36	0,53
Média	2,05	1,7	0,445	0,55
DP	0,106066	0,11547	0,030551	0,04
<i>II (40 dias)</i>				
4	2,04	1,7	0,4	0,5
5	2,04	1,743	0,4	0,5
6	1,7	1,761	0,34	0,49
Média	2,17	1,775	0,4575	0,5075
DP	0,015275	0,057735	0,025166	0,005774
<i>III (50 dias)</i>				
1	1,8	1,652	0,48	0,76
2	1,95	1,626	0,45	0,56
4	1,95	1,711	0,41	0,64
Média	2,175	1,913	0,4075	0,675
DP	0,1	0,031432	0,045092	0,040415
<i>IV (60 dias)</i>				
1	3,4	2,3	0,55	0,96
2	3,07	2,4	0,52	0,99
5	2,9	2,41	0,52	0,92
Média	3,24	2,675	0,5675	1,0775
DP	0,257941	0,57735	0,025166	0,020817

As diferenças das variáveis comparando a faixa etária e os sexos estão representados na figura 6.

Figura 6 – Histograma comparando as variáveis volume referência, comprimento, espessura e largura do timo entre as faixas estarias e o sexo. A: Volume referência (Vref). B: comprimento do timo. C: espessura do timo. D: largura do timo. São Paulo, 2005

4.2 ANATOMIA MICROSCÓPICA DO TIMO

Cada lobo tímico é revestido por uma cápsula delgada de tecido conjuntivo e pouca quantidade de tecido adiposo. Formam espessamentos em pontos de junção da cápsula com os vasos que nutrem o timo.

O tecido conjuntivo emite evaginações a partir da cápsula, de onde partem numerosos septos que dividem parcialmente o lobo formando a estrutura lobular. Nos

pontos de emissão dos septos, predominam os vasos sanguíneos que por sua vez se ramificam no percurso dos septos interlobulares e no próprio parênquima tímico.

Evidenciamos epitélio subcapsular perivascular delimitando toda a superfície e os espaços perivasculares do timo, apresentando-se achatado e alongado, formando uma divisão entre o espaço intratímico e o parênquima vascularizado.

Com o método orientador, o órgão passou a ser isotrópico, assim não há como diferenciar a região cortical e medular nos cortes semi-finos.

A estrutura celular do órgão apresentou-se de forma organizada com a presença de agregados concêntricos, os corpúsculos de Hassal em todos os grupos estudados.

Nos animais do grupo I e II, o timo apresentou-se de forma homogênea, as células do parênquima estavam próximas no entanto eram menores, quando comparado com os animais do grupo III e IV. Não foram notadas diferenças visuais entre os machos e as fêmeas (Figura 7).

O arranjo celular do grupo II eram semelhantes aos do grupo I, as células apresentaram-se juntas e distribuídas de forma homogênea, porém com vasos de calibre maior do que os animais do grupo I (Figura 7).

Os animais do grupo III as células distribuíram-se de forma difusa, os vasos aumentaram de calibre (Figura 7).

Os animais do grupo IV diferenciaram dos demais grupos por apresentarem vasos com maior diâmetro, sendo em maior número nos machos, as células apresentaram-se difusas e maiores. As células reticulares emitem fibras longas destacando um incremento na trama reticular no parênquima (Figura 7).

Figura 7 – Fotomicrografias dos timos. A: feto com 30 dias, macho (Barra 50 μ m). B: feto com 40 dias, macho (Barra 50 μ m). C: feto com 50 dias, macho (Barra 50 μ m). D: recém-nato, 60 dias, fêmea (Barra 40 μ m). E: recém-nato, 60 dias, macho (Barra 40 μ m). V – vasos; seta – Corpúsculo de Hassal

4.3 ANÁLISE ESTEREOLÓGICA

A **estimação da densidade de comprimento do vaso (L_v)** teve um aumento gradativo de acordo com o desenvolvimento dos fetos à exceção do grupo II, sendo maior nos machos. Variou em média no grupo I de 332, sendo nos machos de 270 e nas fêmeas de 390; no grupo II de 288, sendo nos machos de 380 e nas fêmeas de 210; no grupo III de 410, sendo nos machos de 380 e nas fêmeas de 395; no grupo IV de 522, sendo nos machos de 530 e nas fêmeas de 520. Houve diferença estatisticamente significativa se comparado o sexo no grupo I, e quando comparado as faixas etárias entre os grupos I e II. Nos demais grupos não houve diferença estatisticamente significativa (Figura 8A).

O **comprimento do vaso (L)** - mm – teve um aumento gradativo de acordo com o desenvolvimento fetal à exceção do grupo II, sendo maior nas fêmeas. Variou em média no grupo I de 674, sendo nos machos de 540 e nas fêmeas de 810; no grupo II de 581, sendo nos machos de 762,5 e nas fêmeas de 440; no grupo III de 848, sendo nos machos de 870 e nas fêmeas de 870; no grupo IV de 1600, sendo nos machos de 1600 e nas fêmeas de 1675. Houve diferença estatisticamente significativa se comparado o sexo no grupo I, e quando comparado as faixas etárias entre os grupos I e II. Nos demais grupos não houve diferença estatisticamente significativa (Figura 8B).

A **densidade de superfície de área (S_v)** teve um aumento gradativo de acordo com o desenvolvimento fetal, sendo maior nas fêmeas. Variou em média no grupo I de 102, sendo nos machos de 85 e nas fêmeas de 145; no grupo II de 138, sendo nos machos de 185 e nas fêmeas de 95; no grupo III de 228, sendo nos machos de 185 e nas fêmeas de 280; no grupo IV de 298, sendo nos machos de

270 e nas fêmeas de 315. Houve diferença estatisticamente significativa se comparado o sexo no grupo III, e quando comparado às faixas etárias entre os grupos I e II. Nos demais grupos não houveram diferenças estatisticamente significante (Figura 8C).

A **superfície de área (S)** - mm^2 - teve um aumento gradativo de acordo com o desenvolvimento fetal, sendo maior nas fêmeas. Variou em média no grupo I de 210, sendo nos machos de 170 e nas fêmeas de 305; no grupo II de 281, sendo nos machos de 367,5 e nas fêmeas de 200; no grupo III de 464, sendo nos machos de 320 e nas fêmeas de 615; no grupo IV de 906, sendo nos machos de 830 e nas fêmeas de 985. Houve diferença estatisticamente significativa quando comparado as faixas etárias entre os grupos I e II, II e III. Não houve diferença estatisticamente significante se comparado os sexos (Figura 8D).

A **densidade numérica vascular ($N_{v(\text{vasc})}$)**, quantidade de vasos por unidade de volume (cm^3), foi maior nos machos comparado com as fêmeas. O $N_{v(\text{vasc})}$ variou em média no grupo I de $219,552 \cdot 10^4$, sendo nos machos de $95,4 \cdot 10^4$ e nas fêmeas de $89,6 \cdot 10^4$; no grupo II de $51,2 \cdot 10^4$, sendo nos machos de $57,6 \cdot 10^4$ e nas fêmeas de $51,2 \cdot 10^4$; no grupo III de $54,08 \cdot 10^4$, sendo nos machos de $73,6 \cdot 10^4$ e nas fêmeas de $35,6 \cdot 10^4$; no grupo IV de $116,92 \cdot 10^4$, sendo nos machos de $153,6 \cdot 10^4$ e nas fêmeas de $58,7 \cdot 10^4$. Houve diferença estatisticamente significativa quando comparado as faixas etárias entre os grupos I e IV, II e III. Não houve diferença estatisticamente significante se comparado os sexos (Figura 8E).

O **número total de vasos no órgão ($N_{(\text{vasc})}$)**, estimado pelo método disector físico em combinação com a estimativa do número de Euler (X_v), foi maior nos machos. O $N_{(\text{vasc})}$ variou em média no grupo I de $156,8 \cdot 10^4$, sendo nos machos de $146,952 \cdot 10^4$ e nas fêmeas de $183,9028 \cdot 10^4$; no grupo II de $79,90284 \cdot 10^4$, sendo

nos machos de $111,1171 \cdot 10^4$ e nas fêmeas de $47,8080 \cdot 10^4$; no grupo III de $91,99436 \cdot 10^4$, sendo nos machos de $142,3168 \cdot 10^4$ e nas fêmeas de $54,1651 \cdot 10^4$; no grupo IV de $303,1664 \cdot 10^4$, sendo nos machos de $342,72 \cdot 10^4$ e nas fêmeas de $183,196 \cdot 10^4$. Houve diferença estatisticamente significativa quando comparado as faixas etárias entre os grupos I e II, I e III, I e IV, II e III. Não houve diferença estatisticamente significativa se comparado os sexos (Figura 8F).

Figura 8 - Histograma comparando as variáveis estereológicas 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 ($N_{v(vasc)}$), número total de vasos no órgão ($N_{(vasc)}$) entre as faixas estarias e o sexo. A: densidade de comprimento do vaso (Lv). B: comprimento do vaso (L). C: densidade de superfície de área (Sv). D: superfície de área (S). E: estimativa da densidade numérica vascular ($N_{v(vasc)}$). F: número total de vasos no órgão ($N_{(vasc)}$). São Paulo, 2005

Os resultados apresentados tais como: estimaco da densidade de comprimento do vaso (L_v), comprimento do vaso (L), densidade de superfície de rea (S_v), superfície de rea (S), estimaco da densidade numérica vascular ($N_{v(vasc)}$), número total de vasos no rgo ($N_{(vasc)}$) estão apresentados sistematicamente nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4 - Valores das variáveis densidade de comprimento do vaso (L_v), comprimento do vaso (L), densidade de superfície de rea (S_v), superfície de rea (S), estimaco da densidade numérica vascular ($N_{v(vasc)}$), número total de vasos no rgo ($N_{(vasc)}$), do timo em recém-natos e fetos fêmeas nos diferentes grupos etários. São Paulo, 2005

Grupos (fêmeas)	L_v	L (mm)	S_v	S (mm ²)	$N_{v(vasc)} \times 10^4$	$N_{(vasc)} \times 10^4$
<i>I (30 dias)</i>						
1	360	740	80	160	896000	1838030
2	420	900	220	470	768000	1635840
3	360	700	60	120	1152000	2246400
Média	390	810	145	305	89,6	183,9028
DP	34,64102	105,8301	87,17798	191,5724	195	311
<i>II (40 dias)</i>						
1	260	530	140	280	256000	522240
2	180	380	60	130	640000	139520
3	220	470	120	260	512000	1111040
Média	210	440	95	200	51,2	47,8080
DP	40	75,49834	41,63332	81,44528	195	489
<i>III (50 dias)</i>						
3	340	780	220	500	256000	591360
5	420	900	280	600	400000	132000
6	400	900	340	760	768000	1311244
Média	395	870	280	615	35,6	54,1651
DP	41,63332	69,28203	60	131,1488	264	594
<i>IV (60 dias)</i>						
3	520	1500	320	900	1024000	2969600
4	500	1700	300	1020	150000	510000
6	560	1800	340	1.000	1024000	3338240
Média	520	1675	315	985	58,7	183,196
DP	30,5505	152,7525	20	64,29101	304	153

Tabela 5 – Valores 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 ($N_{v(vasc)}$), número total de vasos no órgão ($N_{(vasc)}$), do timo em recém-natos e fetos machos nos diferentes grupos etários. São Paulo, 2005

Grupos (machos)	Lv	L (mm)	Sv	S (mm ²)	$N_{v(vasc)} \times 10^4$	$N_{(vasc)} \times 10^4$
<i>I (30 dias)</i>						
4	320	640	40	80	1000000	200000
5	280	560	120	240	1152000	2315520
6	200	400	60	120	512000	1047040
Média	270	540	85	170	95,4	146,952
DP	61,10101	122,202	41,63332	83,26664	334	106
<i>II (40 dias)</i>						
4	260	530	140	280	256000	522240
5	420	860	240	490	640000	1305600
6	460	800	120	210	768000	1311244
Média	380	762,5	185	367,5	57,6	111,171
DP	65,8301	175,784	64,29101	145,7166	266	453
<i>III (50 dias)</i>						
1	420	780	180	180	512000	950272
2	500	980	180	350	1024000	1996800
4	380	740	200	400	384000	748800
Média	380	870	185	320	73,6	142,3168
DP	61,10101	128,582	11,54701	115,3256	334	669
<i>IV (60 dias)</i>						
1	540	1800	240	820	896000	3046400
2	540	1600	260	800	1536000	2176000
5	500	1400	320	900	2176000	6310400
Média	530	1600	270	830	153,6	342,72
DP	23,09401	200	41,63332	52,91503	340	217

Os valores de p do teste de Mann-Whitney, verificando a diferença entre os sexos, e o teste de Wilcoxon, verificando as diferenças entre as faixas etárias, estão nas tabelas 6 e 7.

Tabela 6 – Valores de p do teste de Mann-Whitney (teste U) para a verificação de diferença entre os sexos dos fetos de cães. São Paulo, 2005

	30 dias	40 dias	50 dias	60 dias
Lv	0,0495 *	0,0809	0,33827	1
L	0,0495 *	0,0809	0,6625	0,6625
Sv	0,3827	0,2752	0,0495 *	0,1904
S	0,3827	0,0809	0,8273	0,0809
N_{v(vasc)}	1	0,5127	0,2752	0,2752
N_(vasc)	0,5127	0,1904 *	0,2752	0,5127
V(ref) (cm³)	0,5127	0,0495	0,0495 *	0,8273
comprimento (cm)	0,5127	0,3827	0,0495 *	0,0495 *
espessura (cm)	0,0495 *	0,0495 *	0,2752	0,0809
Largura (cm)	0,6625	0,1266	0,6625	0,0495 *

Legenda: (*) diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabela 7 – Valores de p do teste de Wilcoxon (teste T) para a verificação de diferença entre as faixas etárias dos fetos de cães. São Paulo, 2005

	Lv	L(mm)	Sv	S(mm ²)	Nv	N	Vref(cm ³)	C(cm)	E (cm)	I(cm)
60/50	0,0431	0,0277	0,0592	0,0277	0,0796	0,0464	0,0277	0,0277	0,0277	0,0277
60/40	0,0277	0,0277	0,0277	0,0277	0,0464	0,0277	0,0277	0,0277	0,0277	0,0277
60/30	0,0277	0,0277	0,0277	0,0277	0,5002*	0,1159*	0,0277	0,0277	0,0277	0,0277
50/60	0,0431	0,0277	0,0592	0,0277	0,0796	0,0464	0,0277	0,0277	0,0277	0,0277
50/40	0,0796	0,0277	0,0747	0,173*	0,4652*	0,6858*	0,7532*	0,4631*	0,9165*	0,0277
50/30	0,0796	0,0464	0,0277	0,0277	0,0277	0,1159*	0,6858*	0,2489*	0,5294*	0,0277
40/60	0,0277	0,0277	0,0277	0,0277	0,0464	0,0277	0,0277	0,0277	0,0277	0,0277
40/50	0,0796	0,0277	0,0747	0,173*	0,4652*	0,6858*	0,7532*	0,4631*	0,9165*	0,0277
40/30	0,5002*	0,4631*	0,3454*	0,3454*	0,0431	0,1159*	0,5002*	0,0679	0,138*	0,0431
30/60	0,0277	0,0277	0,0277	0,0277	0,5002*	0,1159*	0,0277	0,0277	0,0277	0,0277
30/50	0,0796	0,0464	0,0277	0,0277	0,0277	0,1159	0,6858*	0,2489*	0,5294*	0,0277
30/40	0,5002*	0,4631*	0,3454*	0,3454*	0,0431	0,1159*	0,5002	0,0679	0,138	0,0431

Legenda: (*) diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). C = comprimento; E = espessura; I = largura.

Discussão

5 DISCUSSÃO

O interesse pela pesquisa do timo tem aumentado em virtude da importância que o tema vem assumindo e pela escassa literatura relativa ao órgão de maior porte do sistema imunitário dos animais. Dados relativos à vascularização arterial do timo em cães são incompletos, parcimoniosos e por vezes escassos.

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), 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 faríngeana, 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.

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 hematotímica 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.

Junqueira e Carneiro (1999) e Kato (1997) 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.

Os principais tratadistas como Bruni e Zimmerl (1951), Ellenberger e Baum (1977), Schauder (1938), Schwarze e Schroder (1972), se ocuparam, praticamente, do estudo de grandes animais (bovinos, eqüinos e suínos), onde os subsídios sobre a anatomia do timo são maiores, principalmente no respeitante à sua morfologia, deixando de lado considerações à respeito dos cães.

Bradley e Grahame (1948) relatam a irrigação do timo a partir das artérias torácicas internas, enquanto outros autores como Bruni e Zimmerl (1951), Dyce et al. (1997), Ellenberg e Baum (1977), Schwarze e Schroder (1972) 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.

Os tratadistas como Bruni e Zimmerl (1951), Ellenberger e Baum (1977), Koch (1963), Martin (1902), Martin e Schauder (1938), Schwarze e Schroder (1972), Sisson e Grossman (1959) descrevem o suprimento sanguíneo do timo pelos ramos das artérias carótida comum, subclávia, torácica interna, tronco braquiocefálico, artérias torácicas internas, pericárdica e para a parte cervical do timo, colaterais das artérias tireoidea caudal e carótida comum.

Os achados macroscópicos quanto à irrigação do timo nos filhotes de cães estudados foram iguais aos observados por Evans e Christensen (1979), Evans e Delahunta (1980) e Silva et al. (1994) que afirmaram que o timo é irrigado por ramos das artérias torácicas internas, do tronco braquiocefálico, pericardicofrênica, troncos costocervical e primeira intercostal e artérias subclávias. Foi também observado a artéria torácica interna perfurando o tecido tímico como relatado por Schummer et al. (1981) e Evans (1993).

Venzke (1986) refere que irrigação no cão 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, ramo esta não encontrado nos cães estudados.

Concordamos com Silva et al. (1994) quanto à origem, que identificou modalidades de vascularização próprias para cada peça de fetos e natimortos de cães estudados.

Quanto à histologia do órgão concordamos com Didio (2002), Firth (1977), Melo e Lage (1987) os quais relatam que a cápsula e o septo do timo consistem de tecido conjuntivo areolar frouxo e tecido adiposo, formando espessamentos em pontos de junção da cápsula com os vasos que nutrem o timo.

Como os timos estudados foram isotropizados, não diferenciamos as regiões corticais, medulares e 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 como relatado por Saint-Marie et al. (1986).

Como relatado por Amano e Hamatani (1980), Dijkstra e Sminia (1990), Picker e Siegelman (1993), Suster e Rosai (1990), Van Ewijk (1984) e Xavier (1999), evidenciamos uma população de células tímicas imunofenotipicamente heterogênia em diferentes tamanhos, porém não diferenciamos as regiões corticais e medulares.

Como relatado por Dijkstra e Sminia (1990) identificamos 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 um divisor entre o espaço intratímico e o mesênquima vascularizado, considerado como o substrato morfológico da barreira timo-sangue, porém, Nieuwenhuis et al. (1988) discorda com o trânsito antigênico transcapsular.

Como relatado por Gurtler et al. (1984), Henry (1992), Nabarra e Adrianarison (1995) os corpúsculos de Hassal foram evidenciados em todas as faixas etárias estudadas como uma estrutura tubular complexa.

Elenkov et al. (2000), Kurz et al. (1997), Leposavic et al. (2000), Leposavic et al. (1992), Lind et al. (2001), Maden e Felten (2001) e Rauski et al. (2003), Savino e Dardenne (2000), Solarovic et al. (2004), Vizi et al. (1995) relatam a inervação dos órgãos linfóides, as interações entre os microambientes do timo e o desenvolvimento de células T controladas pelo sistema nervoso autônomo (SNA) e neuroendócrino e a presença dos expressões de β -adrenoreceptores, fatores estes que não formam objeto de nosso estudo.

Olsen e Kovacs (1996) afirmam que mudanças do tamanho do timo na puberdade pode apresentar alterações hormonais, estes achados estão de acordo com a hipótese de Marchetti et al. (1994), Marchetti et al. (1990) e Morale et al. (1991) que relata o sistema nervoso simpático envolvido na regulação da resposta de estímulos pela ação hormonal na mudança da densidade de receptores dentro do timo, e com nossos achados que indicam variações de tamanho em relação à idade.

O método de Cavalieri e o coeficiente de erro usado para obtenção do volume do órgão estão de acordo com os trabalhos de Duerstock et al. (2003), Gundersen et al. (1988b), Gundersen e Jensen (1987), Henery e Mayhew (1989), Mayhew,

Mwamengele e Dantzer (1990), Mayhew e Olsen (1991), Mayhew (1992), Wulfsohn et al. (2004), Pakkenberg et al. (1989).

O volume do timo aumenta com o desenvolvimento do animal, tendo um aumento brusco no grupo IV (recém-natos com 60 dias), acredita-se que esse aumento deve-se ao fato de que ao nascimento o órgão apresenta-se totalmente desenvolvido, conforme indicação contidas na literatura, estabelecendo-se após a maturidade sexual sua involução.

Para o estudo das variáveis estereológicas, necessitamos de secções isotrópicas como pré-requisitos, assim, concordamos em utilizarmos o método orientador modificado de acordo com Mattfeldt et al. (1990), onde o órgão aparece homogeneamente, com as mesmas características em todas as direções (MANDARIM, 1994).

Segundo Nengard, Bendtsen e Gundersen (1988) os vasos são estruturas tubulares que 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 equivalem com a conectividade, com isso, na prática estereológica o número de capilares é igual à estimativa da conectividade, por isso usamos o princípio da conectividade ou princípio de ConnEulor associado ao disector físico para a análise estereológica do timo.

O método do disector físico foi aplicado de acordo com Coggeshall (1992), Coggeshall e Lekan (1996), Gagliardo (2003), Gundersen et al. (1999), Gundersen et al. (1988a), Mayhew e Gundersen (1996), Mayhew (1992), Pakkenberg e Gundersen (1988 e 1989), Pover e Coggeshall (1991), Sterio (1984). Sendo aplicado

por toda extensão do timo, para permitir que todas as regiões apresentassem as mesmas chances de serem amostradas, obedecendo um sistema de amostragem denominado “systematic random sampling scheme”.

O princípio da conectividade é uma extensão do método do disector, baseada em exaustivos cortes seriados (DEHOFF, 1972; KROUSTRUP; GUNDERSEN, 2001; ZHAO; MACDONALD, 1993). Para a estimativa da conectividade baseamos-nos nos trabalhos Kroustrup, Gundersen (2001), Nyengaard, Bendtsen e Gundersen (1988), Nyengaard e Marcussen (1993), assim obtivemos os valores da densidade numérica vascular ($N_{v(vasc)}$) e número total de vasos no órgão ($N_{(vasc)}$), cuja comparação é prejudicada por não encontrarmos na literatura descrições correlatas.

A densidade numérica vascular ($N_{v(vasc)}$) e número total de vasos no órgão ($N_{(vasc)}$) diminuíram gradativamente nos animais do grupo II e III (40 e 50 dias), tendo um aumento nos animais do grupo IV (60 dias). Esse aumento deve-se possivelmente à proximidade do nascimento. Observamos também que os machos apresentaram maior valor que as fêmeas. Ainda que o $N_{v(vasc)}$ e $N_{(vasc)}$ nos machos seja maior do que nas fêmeas, o V_{ref} das fêmeas é maior do que nos machos, o que parece uma incongruência, porque seria de se esperar o menor V_{ref} tivesse também o menor $N_{(vasc)}$, este fato pode ser decorrente das variações peso corpóreo, tamanho e tipo racial dos animais estudados.

Estimação da densidade de comprimento do vaso (L_v), comprimento do vaso (L), densidade de superfície de área (S_v) e superfície de área (S) estão de acordo

com Nyengaard (1993), estas variáveis aumentaram gradativamente com o desenvolvimento, as fêmeas apresentaram maior valor que os machos, com exceção do Lv onde é maior nos machos.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Dos resultados obtidos podemos concluir que:

1 – O timo apresenta-se composto por dois lobos unidos por um tecido de conexão, com coloração rósea, localizados no espaço mediastinal cranial, entre os pulmões e acima da base do coração, sua porção cranial estende-se pouco além do primeiro par de costelas.

2 – A estrutura celular do timo mostrou-se organizada com a presença de agregados concêntricos, os corpúsculos de Hassal, envolvidos por uma delgada cápsula de tecido conjuntivo que é espessada por tecido adiposo, servindo de substrato para a passagem dos vasos sanguíneos, dispondo-se em arquitetura lobular..

3 – Os timos das fêmeas apresentaram maior volume (V_{ref}) e dimensões de tamanho que nos machos, porém, a densidade numérica vascular - $N_{v(vasc)}$ e número total de vasos - $N_{(vasc)}$ no órgão são menores.

5 – As variáveis estereológicas tiveram um 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 - L_v , densidade numérica vascular - $N_{v(vasc)}$ e número total vascular - $N_{(vasc)}$.

6 – Os vasos observados na microscopia de luz de cortes semi-finos, aumentaram de tamanho gradativamente, assim como a densidade vascular $N_{v(vasc)}$ e o número total de vasos $N_{(vasc)}$, sendo mais evidente nos animais do grupo IV (60 dias), próximo ao nascimento.

Referências

REFERÊNCIAS

- 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.
- 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.
- ANDERSEN, B. B.; PAKKENBERG, B. Stereological quantitation in cerebella from people with schizophrenia. **Brazilian Journal Psychiatry**, v. 182, p. 354-361, 2003.
- APPOLINÁRIO, A. V. M. **Vascularização arterial do timo de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*, LINNAEUS, 1758) da raça Nova Zelândia Branco**. 1998. 66p. 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: Editora Manole, 1991. p. 370-390.
- 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.

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.

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.

BJARKAN, C. R.; PEDERSEN, M.; SORENSEN, S. New strategies for embedding, orientation and sectioning of small brain specimens enable direct correlation to MR-images, brain atlases, or use of unbiased stereology. **Journal Neuroscience Methods**, v. 108, p. 153-159, 2001.

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

BOLENDER, R. P. Biological stereology: history, present state, future directions. **Microscopy Research Technique**, v. 21, p. 255-261, 1992.

BOLENDER, R. P. Stereology and its uses in cell biology. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 383, p. 1-16, 1982.

BOLENDER, R. P. Stereology: applications to pharmacology. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 21, p. 549-573, 1981.

BOMBONATO, P. P. **Aspectos da morfologia, topografia e vascularização arterial do timo em fetos de búfalo**. 1997. 88p. Tese (Título de Professor Livre Docente em Anatomia dos Animais Domésticos) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

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**. 3. ed. Milano: Francesco Vallardi, 1977, v. 2, p. 314-386.

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

CHARLESTON, L. B.; THYER, A. C.; KLEIN, N. A.; SOULES, M. R.; CHARLESTON, J. S. Na improved method for the production of slides from oversized sample of glycol methacrylate-embedded tissue: application for optical disector based stereology. **Journal of Histotechnology**, v. 26, p. 49-52, 2003.

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.

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.

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.

DAVEY, M. G.; HEDRICK, H. L.; BOUCHARD, S.; ADZICK, N. S.; FLAKE, A. W.; DOOLIN, E. J. Computer-assisted stereology: Point fraction of lung parenchyma and alveolar surface density in fetal and newborn sheep. **Scanning**, v. 25, p. 37-44, 2003.

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.

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.

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.

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.

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. 57p. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) – 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.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. O. **Tratado de anatomia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 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.

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.

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.

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?** 2003. 111p. Tese (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

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

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

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.

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.

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

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

HASCHEK, W. M.; ROUSSEAU, 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-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.

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

IZARD, J. Introduction to the thymus. **Microscopy Research and Technique**, v. 38, p. 207-208, 1997.

JENSEN, E. B. V. **Local stereology**. Singapore, New Jersey, London, Hong Kong: World Scientific, 1998. 247p.

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

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

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

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.

KUBINOVA, L.; JANACEK, J. Confocal microscopy and stereology: estimating volume, number, surface area and length by virtual test probes applied to three-dimensional images. **Microscopy Research and Technique**, v. 53, p. 425-435, 2001.

KUBINOVA, L.; JANACEK, J.; RIBARC, S.; CEBASEK, V.; ERZEN, I. Three-dimensional study of the capillary supply of skeletal muscle fibres using confocal microscopy. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 22, p. 217-227, 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.

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.

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.

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.

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

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.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 75, n. 4, p. 469-486, 2003.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; PEREIRA, L. M. Renal cortical remodelling by NO-synthesis blockers in rats is prevented by angiotensin-converting enzyme inhibitor and calcium channel blocker. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 5, p. 276-283, 2001.

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

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.

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.

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

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

.

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

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.

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.

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.

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.

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.

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

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**, suplement 4, p. 92-99, 1988.

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

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.

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.

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.

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

ROBERTS, N.; PUDDEPHAT, M. J.; MCNULTY, V. The benefit of stereology for quantitative radiology. **Brazilian Journal Radiology**, v. 73, p. 679-697, 2000.

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

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.

SANTANA, M. I. S. **Vascularização arterial do timo em aves (*Gallus gallus domesticus* – Linnaeus, 1758) da linhagem NPK**. 1999. 98 f. Tese (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

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.

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.

SETO, F. Early development of the avian immune system. **Poultry Science**, v. 60, p. 181-195, 1981.

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

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.

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

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.

SUSTER, S.; ROSAI, J. Histology of the normal thymus. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 14, p. 284-303, 1990.

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

TIZARD, I. Células e tecidos do sistema imunitário. In: _____. **Introdução à imunologia veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 1985, p. 52-68.

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.

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.

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.

WEIBEL, E. R. Measuring through the microscope: development and evolution of stereological methods. **Journal of Microscopy**, v. 155, n. 3, p. 393-403, 1989.

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

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.
- 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.