



Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas – PCM
Instituto de Ciências Biomédicas
Universidade Federal do Rio de Janeiro

**Efeito da
heparina não fracionada, heparina de baixo peso
e pentoxifilina sobre a angiogênese em modelo
de auto-implante de tireóide em ratos**

Caroline Dieder Dalmas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre na área de Ciências Morfológicas – Programa MINTER.

Orientadora: Profa. Dra. Christina Maeda Takiya

Co-orientador: Prof. Dr. José Calos Nunes Mota

Rio de Janeiro

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Banca Examinadora:

Orientadores

Profa. Dra. Christina Maeda Takiya (Instituto de Ciências Biomédicas- UFRJ)

Prof. José Carlos Nunes Motta (Instituto de Ciências da Saúde - UFBA)

Examinadores

Profa. Dr. Marcos Farina (Instituto de Ciências Biomédicas- UFRJ)

Prof. Dr. Radovan Borojevic (Instituto de Ciências Biomédicas- UFRJ)

Profa. Dra. Fabiana Paim - UFBA (Instituto de Ciências da Saúde - UFBA)

- Suplente e revisor

Prof. Dra. Maria Eugênia (Instituto de Ciências Biomédicas- UFRJ)

- Suplente

Profa. Luciana Maria Pedreira Ramalho

Rio de Janeiro

2008

DEDICATÓRIA

À minha filha Beatriz, obrigada por você existir, pela paciência e confiança nas vezes em que não pude te amamentar. Por ser minha vida.

Dedico a você esta tese. Amo você!!!

AGRADECIMENTOS

Chegou o momento de expressar os sinceros agradecimentos a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A Deus

Por mais uma etapa finalizada. Por cada aprendizado, pela maturidade adquirida durante esse processo, pelas novas descobertas, pelo desejo de explorar novos horizontes e pela felicidade que sinto hoje por ter a certeza de ter escolhido o caminho certo!

À Prof^a Christina Maeda Takiya

Agradeço pela confiança em me acolher no Mestrado, no Laboratório de Patologia Celular e tornar possível a realização deste sonho. Agradeço pelo meu despertar para a área de pesquisa, que hoje muito me fascina. Obrigada pela orientação, pelos conhecimentos adquiridos e pelo apoio quando estava tão longe de casa.

Ao Prof. José Carlos Motta

Pela paciência na realização desta dissertação, pelo aprendizado e incentivo.

Aos meus pais, irmãos e familiares.

Pelo suporte a mais uma conquista na minha vida. Vocês são minha referência, meu porto seguro. Obrigado pela paciência e estímulo. Amo vocês!!!

Ao meu marido Rodrigo Andrade

Agradeço a Deus por você ter estado ao meu lado durante este processo!

Pelo cuidado, pelo carinho, pela atenção e paciência.

Aos Profs. Radovan Borojevic, Vivaldo Mora Neto, Fabiana Paim

Idealizadores e efetivadores do Programa de Mestrado Interinstitucional.

Ás colegas do mestrado, Viviane e Maria Clara

Vivenciaram as conquistas e dificuldades de cada etapa.

Á colega e amiga Vivian Samoto

Esteve ao meu lado em todos os momentos. Obrigado pela paciência e incentivo.

Aos colegas do laboratório de patologia celular, Vivian, Leonardo, Leandro, André, Jones, Isabela, Deise e Silvania, os quais vivenciaram cada resultado obtido.

Aos colegas de trabalho Erasmo de Almeida Jr., Cristiane Malheiros, Viviane Landulfo.

Compreendo e reconheço que jamais estive sozinha nesta jornada. Pessoas muito preciosas, mencionadas ou não, empreenderam de alguma forma neste ideal, as quais ofereço meu gestual de gratidão.

“O melhor educador não é o que controla, mas o que liberta. Não é o que desiste facilmente, mas o que estimula sempre a começar de novo. Não procura o seu próprio brilho, mas se faz pequeno para tornar seus colegas de trabalho grandes.”

Augusto Cury

RESUMO

A angiogênese é uma etapa importante nos processos de reparação tecidual, implantação de metástases e aceitação de implantes. Portanto, a verificação do efeito de substâncias amplamente utilizadas em pós-operatórios como heparinas e pentoxifilina sobre a implantação de enxertos e sobre o seu destino são de suma importância. Utilizamos o autotransplante de tireóide como modelo de angiogênese devido a sua fácil manipulação e por ser um modelo animal já estabelecido. **Metodologia:** Ratos Wistar fêmeas pesando 120-200g foram submetidos à tireoidectomia parcial sendo o fragmento de tireóide ressecado implantado no ligamento largo. Os animais foram tratados durante 15 dias com pentoxifilina (PTX, 20mg/kg, 3 vezes/ semana), heparina não fracionada - HNF(4mg/mL/dia) ou heparina de baixo peso - HBP (4mg/mL/dia). Todas as drogas foram diluídas em água estéril e administradas por via intraperitoneal. Animais falso-operados também foram tratados com as mesmas drogas e sacrificados no mesmo tempo que os animais experimentais. Os implantes foram submetidos à análise histológica para avaliar, por histomorfometria, a densidade de vasos capilares, densidade de macrófagos e densidade de mastócitos. A expressão de VEGF, ED1 e *Griffonia simpliciflora* foram avaliadas por imunohistoquímica. **Resultados:** Após 15 dias o autotransplante se mostrou viável, com intensa vascularização capilar e infiltração macrofágica-mastocitária. O fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) foi imunolocalizado nos folículos tireoideanos e no endotélio vascular. Todas as drogas diminuíram significativamente ($p < 0,05$) a imunoexpressão de VEGF. Pentoxifilina e HNF levaram a diminuição significativa da densidade capilar e da densidade macrofágica ($p < 0,05$ em ambas as comparações). Pentoxifilina e HBP levaram a diminuição significativa ($p < 0,05$) de mastócitos, enquanto que HNF acarretou no aumento ($p > 0,05$) do afluxo de mastócitos. **Conclusão:** A angiogênese induzida pelo autotransplante de tireóide é em parte mediada pelo VEGF. Pentoxifilina, HNF e HBP levam a diminuição da produção de VEGF. Além disso, os macrófagos e mastócitos parecem ter uma importante função na reação induzida pelo autotransplante de tireóide no ligamento largo.

Abstract

Angiogenesis is an important step in tissue repair, metastasis and graft implantation. In this way, the knowledge of the effects of pentoxifylline (PTX), unfractionated heparin (UFH) and low molecular weight heparin (LMWH), drugs widely employed in post-operative situations must be verified. The choice for an established model of thyroid autograft implanted in the large ligament was based on technical reasons. **Methods:** Female wistar rats weighting 120-200g were submitted to partial thyroidectomy and implantation of the thyroid fragment in the large ligament. The rats were treated with 20mg/kg PTX, 4mg/kg/day UFH and 4mg/kg/day LMWH for 15 days. All drugs were diluted in sterile water and given by intraperitoneal route. Sham-operated animals were treated with the drugs and sacrificed at the same day as the experimental animals. **Results:** After 15 days, thyroid autografts were viable and exhibited a great amount of capillaries, macrophages and mast cells. Vascular endothelial growth factor (VEGF) was immunolocalized in follicular epithelial cells and in the capillaries. All drugs significantly ($p < 0,05$) reduced VEGF immunoexpression. PTX and UFH led to a significant ($p < 0,05$) reduction of capillaries and macrophages densities. PTX and HBP significantly ($p < 0,05$) diminished mast cell counting while UFH led to an increase ($p > 0,05$) this cell population. **Conclusions:** Angiogenesis induced by thyroid autograft was to some extent mediated by VEGF. PTX, UFH and LMWH reduced VEGF production. Furthermore, macrophages and mast cell seem to play an important role in this mechanism.

SUMÁRIO

1. Introdução	11
2. Revisão da Literatura	13
2.1. Aspectos estruturais e funcionais da tireóide	13
2.2. Aspectos estruturais e funcionais do autotransplante da tireóide	14
2.3. Formação dos vasos sanguíneos	15
2.3.1. Angiogênese no embrião	17
2.3.2. Angiogênese pós-natal	17
2.4. Fatores angiogênicos	19
2.5. Fatores estimuladores da angiogênese	21
2.5.1. Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	21
2.5.2. Angiopoetinas (Ang)	24
2.5.3. Fator de crescimento fibroblástico (FGF)	25
2.5.4. Óxido nítrico (ON)	27
2.5.5. Prostaglandinas (PGs)	27
2.6. Fatores inibidores da angiogênese	27
2.7. VEGF e tireóide	29
2.8. Angiogênese e pentoxifilina (PTX)	30
2.9. Angiogênese e heparina	32
2.9.1. Heparina não fracionada (HNF)	33
2.9.2. Heparina de baixo peso molecular (HBP)	34
3. Objetivos	36
3.1. Objetivo geral	36
3.2. Objetivos específicos	36
4. Material & Métodos	37
4.1. Animais	37
4.2. Drogas	37
4.3. Protocolo experimental	38
4.3.1. Grupo autotransplante	38
4.3.2. Grupo autotransplante + HBP	38
4.3.3. Grupo autotransplante + HNF	38
4.3.4. Grupo autotransplante + PTX	38
4.3.5. Grupo falso operado	38
4.3.6. Grupo falso operado + HBP	39
4.3.7. Grupo falso operado + HNF	39
4.3.8. Grupo falso operado + PTX	39

4.4. Protocolo cirúrgico	39
4.4.1. Fase pré-operatória	39
4.4.2. Técnicas operatórias	40
4.4.2.1. Laparotomia	40
4.4.2.2. Cervicotomia	41
4.4.3. Fase pós-operatória	43
4.5. Estudo morfológico	43
4.6. Imunohistoquímica	43
4.7. Protocolo para detecção de <i>Griffonia simpliciflora</i>	43
4.8. Histomorfometria	43
4.9. Análise estatística	46
5. Resultados	47
5.1. Análise histológica do autotransplante de tireóide	47
5.2. Análise histológica do autotransplante de tireóide tratado com pentoxifilina	47
5.3. Análise histológica do autotransplante de tireóide tratado com HNF	50
5.4. Análise histológica do autotransplante de tireóide tratado com HBP	50
5.5 - Análise histológica dos grupos falso-operados	53
5.6 - Análise histoquímica para <i>Griffonia simpliciflora</i> para a identificação de capilares sanguíneos e representação gráfica da densidade capilar (μm^2)	53
5.7. Imunolocalização e representação gráfica da imunoexpressão de VEGF	56
5.8. Distribuição e representação gráfica da densidade numérica de macrófagos ED1 positivos	56
5.9. Distribuição e representação gráfica da densidade numérica de mastócitos	
6. Discussão	57
7. Conclusões	61
8. Referências Bibliográficas	70
Anexos	71

1. Introdução

Pouco se conhece sobre a evolução e a aceitação do autotransplante de tireóide. Estudos experimentais e mesmo em humanos demonstraram que estas técnicas são viáveis e que o autotransplante de tireóide pode sobreviver e substituir a função tiroideana após a tireoidectomia total (MOTA et al, 1999; PAPAZIOGAS et al, 2002; ROY et al, 2003; MOTA et al, 2004).

O princípio do autotransplante de glândulas endócrinas após sua ressecção total ou subtotal com a finalidade de se evitar a insuficiência funcional pós-operatória foi inicialmente proposta por HALSTED em 1909. Posteriormente foram realizados com sucesso, autotransplantes de paratireóide e pâncreas (WALKER et al, 1994; RABKIN et al, 1999) porém não se obtendo sucesso para aqueles envolvendo tecido da adrenal, testículo ou ovário (NABISHAH et al, 1998; CALLEJO et al, 1999).

O estudo histológico do autotransplante da tireóide na raiz do mesentério revelou que cerca de 40% a 80% da glândula sofre processo degenerativo inicial, que logo é compensado por alterações regenerativas (MOTA et al, 1999). Os níveis séricos de T3 e T4 diminuem da segunda até a quinta semana após o implante seguido de aumento gradual até os níveis normais entre a quinta e oitava semana (PAPAZIOGAS et al, 2002; MOTA et al, 2004) indicando a capacidade funcional do auto-enxerto. O aumento de TSH, acompanhando o declínio dos níveis dos hormônios tireóideos e sua diminuição na oitava semana indica que o auto-enxerto é capaz de assumir a função tireoidiana entre a terceira e quarta semanas pós-implante. Possivelmente o intervalo de tempo entre a tireoidectomia e o início de função do autoimplante reflita o período de instalação da neovascularização em torno do enxerto (PAPAZIOGAS et al, 2002). Sendo o processo de angiogênese importante para a reparação tecidual, implantação de metástases e para a aceitação de implantes, é de suma importância se verificar o efeito de substâncias anti-angiogênicas, como as heparinas

e a pentoxifilina, drogas utilizadas comumente na prática médica, sobre a implantação de enxertos e seu destino. Utilizamos o modelo do autoimplante de tireóide por ser de fácil manipulação cirúrgica e por já estar bem estabelecido quanto a sua funcionalidade.

2. Revisão da literatura

2.1. Aspectos estruturais e funcionais da tireóide

A glândula tireóide está localizada na porção anterior do pescoço, abaixo da laringe. Ela cobre a junção das cartilagens tireóide e cricóide e é composta por um lobo direito e por um lobo esquerdo ligados na linha média pelo istmo. Está envolvida por uma cápsula delicada de tecido conjuntivo denso não modelado, de onde partem septos que subdividem o órgão em lóbulos. A unidade estrutural e funcional da tireóide é o folículo tireoideano. Este tem um aspecto de cisto, onde o revestimento epitelial é composto pelos tireócitos, as células parenquimatosas. Os tireócitos podem ter diferentes formas, variando de pavimentosa a colunar baixa em função dos níveis do hormônio estimulante da tireóide (TSH). Em resposta ao TSH os tireócitos aumentam de tamanho e de atividade, se tornando colunares. Na sua ausência, as células se tornam mais baixas e menos ativas. A luz central do folículo tireoideano é constituída pelo colóide, material proteináceo, amorfo e PAS positivo (Figura 1). O principal componente do colóide é a glicoproteína tireoglobulina, havendo também várias enzimas e outras glicoproteínas. A tireoglobulina é a forma inativa de estocagem dos hormônios tireoideanos tiroxina (tetraiodotironina ou T4) e tri-iodotironina (T3), formados pela iodinação de resíduos de tirosina da tireoglobulina. A tireoglobulina produzida pelos tireócitos é secretada por exocitose na luz dos folículos havendo então a incorporação de iodo, liberado para a luz folicular pelas células parenquimatosas. Os hormônios tireoideanos formados, também em resposta ao TSH, são capturados a partir do colóide através de mecanismo envolvendo endocitose mediada por receptor, sendo esta endocitose visualizada como os vacúolos de reabsorção do colóide, atravessando então a membrana plasmática e atingindo a circulação sanguínea e linfática (ROSS et al 1995; STEVENS & LOWE, 1995).

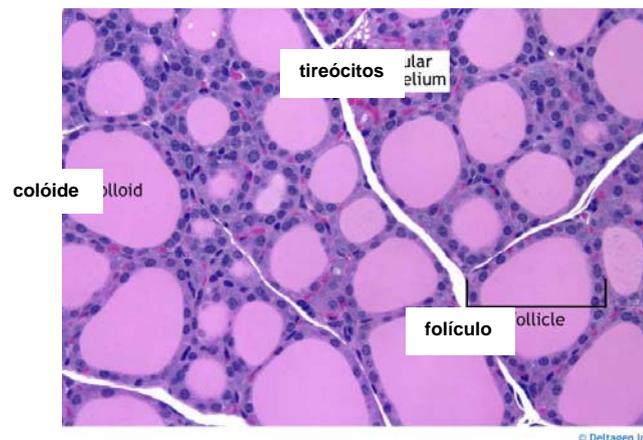


Figura 1 - Aspecto histológico da glândula tireóide. Folículos de diversos tamanhos revestidos por tireócitos e preenchidos por colóide.

Entre as células foliculares encontra-se outro tipo celular – as células C ou células parafoliculares - produtoras de calcitona que, ao contrário do tireócito, não se estendem até a luz do folículo e se dispõem como células isoladas ou em grupos. Sua principal característica morfológica é a presença de numerosos grânulos secretórios com cerca de 0,1 a 0,5 μm de diâmetro (ROSS et al, 1995).

2.2. Aspectos estruturais e funcionais do autotransplante da tireóide

Tem sido demonstrado que o tecido tireóideano pode sobreviver em outros microambientes na ausência do suprimento sanguíneo nativo (MOTA et al, 1999; DOMBROWSKI et al, 2000; PAPAIZOGAS et al, 2002; ROY et al, 2003; MOTA et al, 2004). Após a oitava semana da realização de auto-implantes de tireóide em coelhos foi verificado haver a presença de neovascularização periférica em todos os animais (PAPAIZOGAS et al, 2002). Neste e em outro estudo (MOTA et al, 2004) foi demonstrado que o auto-enxerto é bem aceito e funcional. Após tireoidectomia total e autoimplante da tireóide intramuscular verificou-se que T3 e T4 se encontram diminuídos da segunda a quinta semanas pós-implante. Os níveis de TSH se mostraram elevados até cerca da quarta semana pós-

tireoidectomia, com diminuição progressiva a partir da quinta semana evidenciando a preservação do mecanismo autoregulatório entre hipotálamo-hipófise-autoenxerto. Sob o ponto de vista morfológico foi demonstrado que a tireóide se mantém preservada com os folículos tireóideos exibindo epitélio cubóide a cilíndrico, evidenciando estimulação pelo TSH (PAPAZIOGAS et al, 2002).

2.3. Formação dos Vasos Sanguíneos

As primeiras células endoteliais que se formam no embrião durante a gastrulação se originam do mesoderma posterior e lateral, migram em direção ao saco vitelino onde se diferenciam em células endoteliais e células hematopoéticas. Durante a migração, estas células se agrupam formando agregados denominados de ilhotas sanguíneas. As células presentes na periferia se achatam e se diferenciam em angioblastos, células precursoras dos vasos sanguíneos enquanto que as células centrais se diferenciam em células tronco-hematopoéticas, precursoras das células sanguíneas. A emergência simultânea, tanto espacial e temporal destas duas populações no saco vitelino sugere que a origem a partir de um precursor comum - o hemangioblasto (SHALABY et al 1997). Posteriormente os angioblastos se multiplicam e se diferenciam em células endoteliais configurando tubos que se interconectam formando uma rede de capilares ou *plexo capilar primário*. A partir desta fase os vasos sanguíneos passam a ser formados pelo processo de angiogênese, onde o plexo capilar primário é remodelado seguindo diferentes caminhos formando o leito capilar, artérias e veias (Figura 2) (RISAU et al, 1997; HANAHAN, 1997).

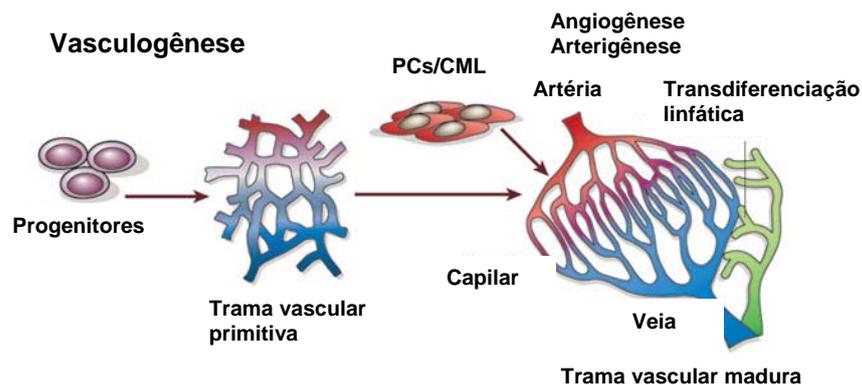


Figura 2: Desenvolvimento do sistema vascular. Na vasculogênese, progenitores endoteliais dão origem a rede vascular primitiva de capilares, artérias e veias; durante a angiogênese subsequente, a rede vascular se expande, pericitos (PCs) e células musculares lisas (CML) recobrem os canais endoteliais recém formados originando uma rede vascular. Os vasos linfáticos se desenvolvem por transdiferenciação venular. Modificado de Carmeliet, 2005.

Três fatores de crescimento estão envolvidos com o início da vasculogênese: o fator de crescimento fibroblástico básico (FGF-2), o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e a angiopoietina 1 (Ang-1). O FGF-2 é responsável pela geração dos hemangioblastos a partir do mesoderma esplâncnico. O VEGF é responsável pela diferenciação e proliferação dos angioblastos permitindo a formação de tubos endoteliais. Este fator é secretado pelas células mesenquimais situadas próximo às ilhotas sangüíneas, sendo que os hemangioblastos e angioblastos apresentam receptores para VEGF (MILLAUER et al, 1993). A Ang-1 medeia a interação entre as células endoteliais e os pericitos, células semelhantes as células musculares lisas que são recrutadas e que recobrem as células endoteliais capilares (RISAU, 1997).

2.3.1 – Angiogênese no embrião

Após a fase inicial de vasculogênese, as redes capilares primárias são remodeladas. Nesta fase as artérias e veias são formadas, sendo o processo denominado de angiogênese. O VEGF atua sobre os capilares neoformados levando ao afrouxamento da

adesão entre as células endoteliais. Ao mesmo tempo há degradação da matriz extracelular subjacente, nos pontos de afrouxamento dos contatos celulares permitindo que as células endoteliais proliferadas formem agregados que se direcionam para fora do tubo (brotamentos). Os novos vasos são estabilizados pelo fator de crescimento transformante β (TGF- β) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). Este fator é necessário para o recrutamento de pericitos que contribuem para a flexibilidade mecânica da parede capilar (LINDAHL et al, 1997).

2.3.2 – Angiogênese pós-natal

Nos tecidos adultos, durante os processos de reparação tecidual e no interior dos tumores, a angiogênese ocorre pela formação de novos vasos sanguíneos por brotamento a partir de vasos pré-existentes. Esta nova rede capilar consiste de tubos revestidos por células endoteliais, células musculares lisas e células adventícias estabilizadoras (Figura 3). A hipóxia no tecido adjacente é o principal estímulo para a angiogênese. Novos brotamentos capilares são responsáveis pelo aumento da densidade vascular nos tecidos, que permite o aumento da perfusão sanguínea nos tecidos hipóxicos e a longa distância.

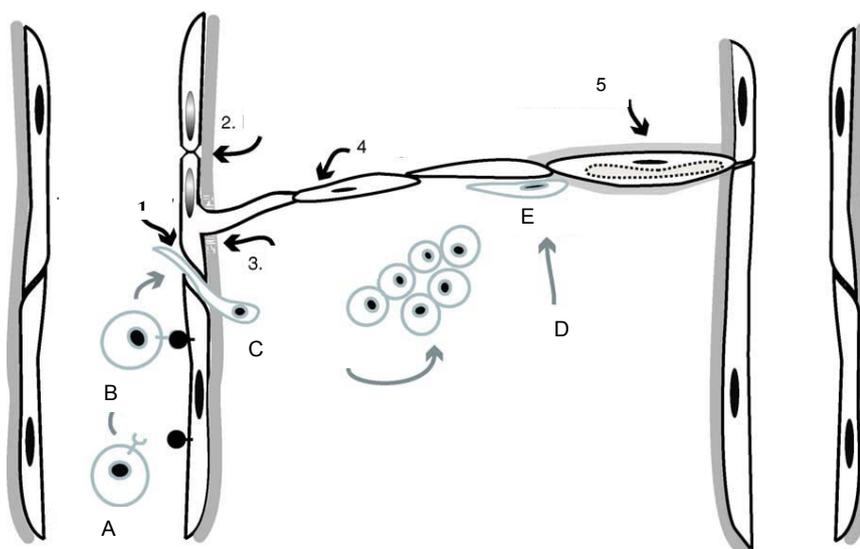


Figura 3: Representação esquemática da angiogênese. A formação de um novo vaso sanguíneo é iniciada pela ativação de células endoteliais e (1) aumento da permeabilidade capilar; (2) proliferação de células endoteliais; (3) proteólise da membrana basal e elementos da MEC; (4) migração das células endoteliais; (5) formação da luz e estabilização do novo vaso. Simultaneamente, células progenitoras endoteliais circulantes são recrutadas (A), aderem ao endotélio ativado (B), migram para o interstício (C), formando agrupamentos celulares (D) que se integram ao vaso neoformado (E). (MILKIEWICZ et al, 2006).

O processo de angiogênese envolve várias etapas altamente reguladas compostas pela ativação de células endoteliais pelo estímulo angiogênico, seja por fatores de crescimento, fatores mecânicos ou estímulo inflamatório, levando ao aumento da permeabilidade vascular através da dissolução das junções aderentes (PEPPER, 2001). A seguir ocorre proliferação das células endoteliais, proteólise da membrana basal para permitir a invasão das células endoteliais na matriz extracelular circunjacente e sua migração. Os grupamentos de células endoteliais migram dirigidas pelo estímulo angiogênico culminando com a formação da luz central e anastomose com capilares pré-existentes. Nesta fase se inicia a estabilização dos capilares neoformados a partir da formação de membrana basal, do estabelecimento de junções aderentes e inativação da ativação endotelial (KLAGSBRUN & D'AMORE, 1991) (Figura 3). Foi descrito que progenitores endoteliais circulantes também participam deste processo. Esta população celular é recrutada da medula óssea, adere ao endotélio ativado e migra através do capilar formando grupamentos no interstício (ASAHARA et al, 1999; MURAYAMA et al, 2002).

Exceto em casos específicos como cicatrização de feridas e no ciclo menstrual a formação de novos vasos sanguíneos ocorre raramente em organismos adultos. Em situações patológicas a neo-angiogênese ocorre classicamente nos processos tumorais (HANAHAN & FOLKMAN, 1996) (Figura 4).

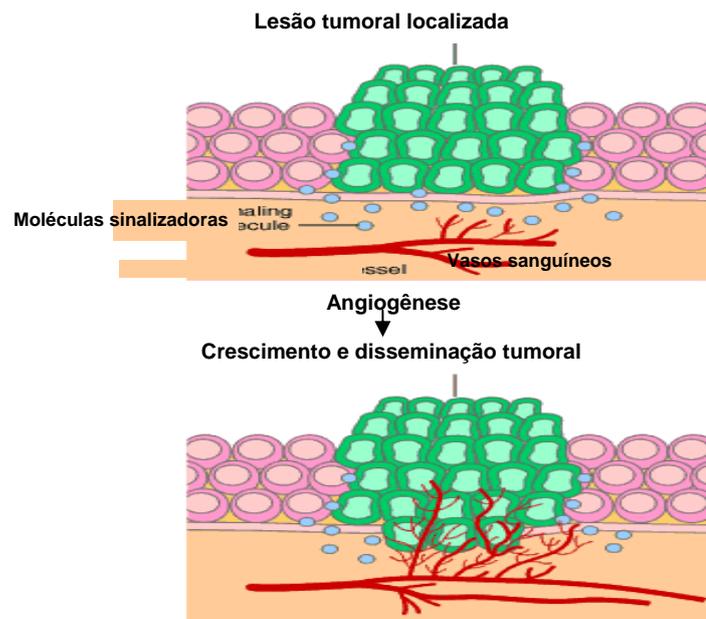


Figura 4: Influência da angiogênese nos processos tumorais. As células neoplásicas liberam moléculas sinalizadoras aos vasos sanguíneos normais ao seu redor. Essas moléculas ativam alguns genes do tecido endotelial que estimulam a formação de novos vasos, facilitando o desenvolvimento tumoral. Disponível em: <http://sciencepark.mdanderson.org/surp/seminars/Angiogenesis.pdf>

2.4. Fatores angiogênicos

A angiogênese é controlada pelo intercâmbio entre proteínas que estimulam ou inibem o crescimento de novos vasos sangüíneos. Em situações fisiológicas, o equilíbrio entre esses estímulos tende a inibição e, como conseqüência, o crescimento de novos vasos sangüíneos é impedido. Em certas situações patológicas, o controle inibitório local é incapaz de impedir o aumento da ativação de indutores angiogênicos, ocorrendo um crescimento anormal de vasos sangüíneos (IRUELA-ARISPE & DVORAK, 1997).

Numerosas moléculas têm um papel crítico na cascata angiogênica. A produção e ativação de fatores de crescimento, a presença de receptores nas células endoteliais para os fatores de crescimento, mediadores intracelulares de sinalização e fatores de transcrição são os eventos moleculares responsáveis pela angiogênese, sendo hoje em dia vistos como os alvos para as estratégias de manipulação da angiogênese.

Os principais fatores estimuladores e inibidores da angiogênese estão ilustrados na tabela I.

Quadro I - Principais fatores estimuladores e inibidores da angiogênese.

Fatores estimuladores	Fatores inibidores
Angiopoetinas (Ang) Fator de crescimento fibroblástico 1 (FGF-1) Fator de crescimento fibroblástico ácido (aFGF) Fator de crescimento fibroblástico 2 (FGF-2) Fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) Óxido nítrico (NO) Prostaglandinas (PGs)	TNP-470 Trombospondina-1 (TSP-1) Angiostatina Endostatina

2.5. Fatores estimuladores da angiogênese

2.5.1. Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

Os polipeptídeos da família do VEGF pertencem à família do fator de crescimento derivado da plaqueta (PDGF). São glicoproteínas homodiméricas com aproximadamente 45000 Da, com capacidade de ligação com a heparina (FERRARA et al, 1992). Nos mamíferos são codificadas por uma família de genes que incluem o VEGF-A, -B, -C, -D e o fator de crescimento derivado da placenta (PlGF), proteínas altamente relacionadas ao VEGF codificados pelos vírus pox da família Orf designados como VEGF-E e variantes adicionais denominadas como VEGF-F, isoladas de veneno de cobra. A partir de *splicing* alternativos e processamento proteolítico de VEGFs se originam várias isoformas funcionalmente distintas e com propriedades de sinalização diferentes. Estas múltiplas

isoformas de VEGFs ao se ligar a seus receptores com afinidade semelhante, mas produzindo propriedades de sinalização diferentes, são os responsáveis pela extrema complexidade da sinalização induzida pelo VEGF (CÉBE-SUAREZ et al, 2006).

As funções biológicas dos polipeptídeos da família do VEGF são mediados pela sua ligação com receptores tirosina-quinases, o receptor-1 do VEGF (VEGFR-1 ou flt-1), o receptor-2 (VEGF-2 ou KDR/flk-1) e o receptor-3 (flt-4). Estes receptores estão presentes na superfície celular de muitas células derivadas da medula óssea como as células hematopóéticas, macrófagos e células endoteliais, em algumas células malignas e em células musculares lisas. Os diferentes VEGFs com padrões distintos de especificidade para o receptor estão ilustrados na Figura 5.

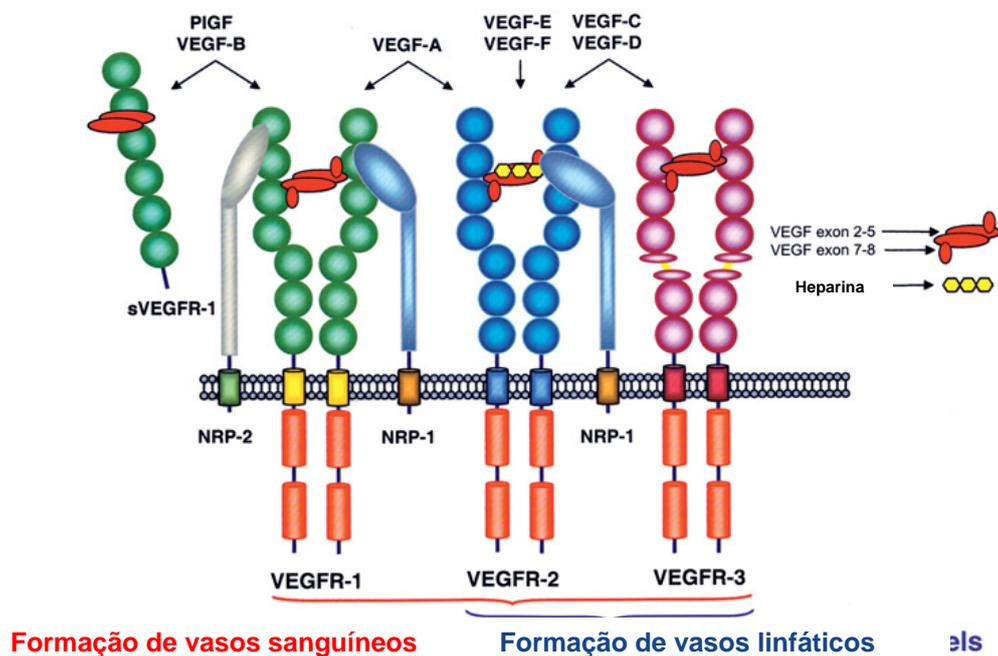


Figura 5 : Representação esquemática dos ligantes e receptores da família do VEGF (CÉBE-SUAREZ et al, 2006).

O VEGF-A se liga a VEGFR-1 e VEGFR-2 e a receptores heterodiméricos; VEGF-C e VEGF-D se ligam a VEGFR-2 e VEGFR-3, enquanto que VEGF-B e PIGF

se ligam exclusivamente ao VEGFR-1 e o VEGF-E exclusivamente ao VEGFR-2. VEGF-F interagem com VEGFR-1 ou VEGFR-2 (Figura 5).

Outros receptores existentes para os VEGFs são as neuropilinas 1 e 2 (NP-1, NP-2), que se acredita funcionarem como co-receptores para alguns sub-tipos de VEGFs e suas isoformas (YAMAZAKI & MORITA, 2006). Todas as isoformas de VEGF contendo o exon 7 ou os exons 6 e 7, incluindo o VEGF-A 165, VEGF-A183, VEGF-A189 e VEGF-A203 interagem além das NPs com o heparan sulfato (CÉBE-SUAREZ et al, 2006).

As funções básicas do VEGF são a promoção da sobrevivência, indução de proliferação, migração e invasão do tecido conjuntivo pelas células endoteliais, que contribuem para a angiogênese (BYRNE et al, 2005).

Os níveis de VEGF são críticos para o estabelecimento da rede vascular durante o desenvolvimento embrionário. A falta de um alelo no gene de VEGF leva a letalidade do embrião entre os dias 11 e 12 em consequência da vascularização defeituosa. A deleção do gene do VEGFR-1 em camundongos também resulta na morte do embrião no dia 8,5 devido a falta de vasos sanguíneos funcionantes. O VEGFR-2 também tem um papel importante no desenvolvimento sendo expresso nos angioblastos, nas ilhotas sanguíneas e nos vasos sanguíneos em formação. Embriões de camundongos nocautes para VEGFR-2 morrem entre os dias 8,5-9,5 devido ao defeito na formação tanto das células endoteliais quanto das células hematopoéticas. A sinalização do VEGF-C/VEGF/D via VEGFR-3 também é crucial para o desenvolvimento do sistema vascular embrionário e para a manutenção do sistema linfático. Animais nocautes para VEGFR-3 apresentam insuficiência cardiovascular e remodelação defeituosa do plexo vascular primário o que acontece por volta do dia 9,5 (BYRNE et al, 2005).

Fisiologicamente a sinalização do VEGF está restrita aos processos de cicatrização e manutenção do ciclo reprodutivo feminino. Do ponto de vista patológico, o VEGF participa tanto de processos neoplásicos quanto não neoplásicos. O VEGF é importante no estabelecimento da inflamação nos tecidos sinoviais de pacientes com artrite reumatóide onde é importante no estabelecimento da angiogênese e aumento do líquido sinovial. Já foi verificado nestes pacientes, aumento dos níveis séricos de VEGF havendo uma correlação entre os níveis de VEGF e a lesão sinovial. O VEGF também está elevado no plasma de pacientes diabéticos. A elevação dos níveis de glicose sanguínea tem efeitos tóxicos no endotélio além de levar ao aumento da síntese de VEGF. Este fator está implicado no desenvolvimento da neovascularização da retina que ocorre na retinopatia diabética como também na retinopatia hipertensiva. Nas neoplasias malignas, o VEGF está implicado na formação dos novos vasos intratumorais tanto por vasculogênese (recrutamento de progenitores endoteliais a partir da medula óssea) quanto por angiogênese. O VEGF nesta situação é produzido pelas células tumorais assim como pelas células inflamatórias que infiltram o tumor. Os níveis elevados de síntese de VEGF pelos tumores estão associados com o aumento da vascularização tumoral, metástase, quimioresistência e mau prognóstico (BYRNE et al, 2005).

2.5.2. Angiopoetinas (Ang)

As angiopoetinas (ang) desempenham um importante papel na manutenção, crescimento e estabilização de vasos sanguíneos. Os quatro tipos de angiopoetinas identificadas até o momento, constituem uma família de proteínas que se liga a receptores Tie. Os padrões de imunexpressão dos 2 receptores Tie são semelhantes ao dos VEGFRs (YANCOPOULOS et al, 1998). As angiopoetinas se ligam ao Tie-2 não tendo sido identificado o ligante de Tie-1 (OTROCK et al, 2007). A ang-1 é a angiopoetina mais estudada. Seu mRNA é detectado no miocárdio embrionário (dias 9-11) e mais tarde no

mesenquima circunjacente aos vasos vsangúíneos (DAVIS et al, 1996). A ang-1 não induz a proliferação de células endoteliais em cultura, mas estimula o brotamento de endotélio em sistemas de cultura utilizando bilhas com microcarreadores (DAVIS et al, 1995).

2.5.3. Fator de crescimento fibroblástico (FGF)

Outro importante estimulador da angiogênese é o fator de crescimento de fibroblástico (FGF). Constituem uma grande família de proteínas envolvidas no desenvolvimento, proliferação e diferenciação celular. Atuam em vários tipos celulares e regulam diversas funções fisiológicas incluindo a angiogênese, crescimento e migração celular, embriogênese, regulação metabólica e reparação tecidual. Seus efeitos são mediados por quatro receptores tirosina quinase (FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3 e FGFR-4) que apresentam uma grande gama de padrão de expressão. O *splicing* alternativo do mRNA do FGFR gera variantes do receptor que por sua vez exibem uma série de interações ligante-receptor. Vários membros desta família estão implicados em diversas alterações do crescimento ósseo assim como na formação e progressão tumoral (CROSS & CLAESSION-WELSH, 2001; ZHANG et al, 2006; ITOH, 2007).

A família do FGF é composta por 22 moléculas estruturalmente relacionadas que são agrupadas em sete subfamílias baseado nas semelhanças de sua seqüência e propriedades funcionais. Os FGFs interagem com heparina ou proteoglicanas de heparan sulfato que estabilizam os FGFs e previnem sua desnaturação térmica e proteólise, sendo necessários para a ativação dos receptores dos FGFs (FGFRs). As proteínas ligadoras de FGF aumentam sua biodisponibilidade e podem facilitar a ativação dos receptores. O FGF-1 e o FGF-2 foram originalmente isolados do cérebro e hipófise como mitógenos para fibroblastos. A maioria dos FGFs (FGF-3 ao FGF -8, FGF-10, FGF-17 ao FGF-19, FGF-21 e FGF-23) tem peptídeos sinalizadores na região N-terminal e são rapidamente secretados pelas células. Os FGFs -9, -16 e -20 não apresentam estes peptídeos porém são secretados. Os FGF-1 e

FGF-2 também não apresentam os peptídeos sinalizadores, mas diferentemente daqueles não são secretados porém são liberados das células na presença de lesão celular ou por exocitose independente da via do retículo endoplasmático-Golgi. FGF-22 apesar de apresentar um peptídeo sinalizador N-terminal, permanece ligado a superfície celular enquanto que o FGF-11 sem peptídeo sinalizador é intracelular e funciona de forma independente do receptor (CROSS & CLAESSION-WELSH, 2001; ZHANG et al, 2006; ITOH, 2007).

Os FGFs se ligam com alta afinidade as proteoglicanas de heparan sulfato (HSPG) localizadas na superfície celular e na matriz extracelular, Este *pool* de FGFs constitui um reservatório para este fator de crescimento de onde é liberado de forma regulada pela ação de heparanases. Os HSPGs também servem como co-receptores para os FGFs e modulam os efeitos do FGF tanto *in vitro* quanto *in vivo*. O FGF-1 é também denominado de FGF ácido (aFGF) e o FGF-2, FGF básico (bFGF) que foi a primeira molécula pró-angiogênico identificada. O bFGF induz o aumento da proliferação, migração e diferenciação de células endoteliais, células da musculatura lisa e fibroblastos que expressam FGFRs (CROSS & CLAESSION-WELSH, 2001; ZHANG et al, 2006; ITOH, 2007). Outras proteoglicanas de heparan sulfato tais como o perlecan e agrina foram identificadas no interior da MEC e podem atuar sequestrando FGF-2 (NUGENT & IOZZO, 2000).

GOTO et al (1993) demonstraram ocorrer um sinergismo entre FGF e VEGF, com o FGF estimulando a síntese de VEGF em linhagens de células tumorais. Como o FGF está presente em muitos tipos celulares, não se sabe exatamente qual é o mecanismo de produção e liberação desse fator. Segundo HYDER & STANCEL (1999), essa atividade angiogênica do FGF pode ser iniciada pela produção e liberação desse fator pelas próprias células ou é iniciada pela liberação de heparan sulfato da membrana celular ou da matriz extracelular.

2.5.4. Óxido Nítrico (ON)

Além da sua conhecida propriedade vasodilatadora, o óxido nítrico (ON) está envolvido com a mediação da angiogênese. O ON induz a proliferação e diferenciação do endotélio capilar via transcrição gênica dependente da sinalização pelo GMP cíclico. Foi demonstrado que baixas concentrações de ON podem levar a formação de tubos capilares em endotélio microvascular gástrico através da ativação de PKC e ERK e fosforilação de c-Jun enquanto altas concentrações inibiram estas respostas angiogênicas. Além disso, o ON mostrou ser um componente das vias indutoras de proliferação endotelial pelo VEGF além de ter um papel na modulação da expressão de VEGF (ZHANG et al, 2003).

2.5.5. Prostaglandinas (PGs)

As prostaglandinas (PGs) também estão envolvidas com a angiogênese. A produção das PGs ocorre pela conversão do ácido aracdônico pela ciclooxigenase (COX). TSUJI e colaboradores (1998) demonstraram que as células endoteliais HUVECs co-cultivadas com células que super-expressavam COX-2 migraram mais rapidamente que nas condições controle e quando cultivadas em gel de colágeno formavam redes capilares (RUEGG et al, 2004).

2.6. Fatores inibidores da angiogênese

Os inibidores angiogênicos são necessários para manter o crescimento normal dos vasos sanguíneos prevenindo a vascularização anormal (IRUELA-ARISPE E DVORAK, 1997). Em 1980, BROUTY-BOYE E ZETER em estudo com interferon- α , demonstraram pela primeira vez a inibição da migração de células endoteliais. Dois anos mais tarde, TAYLOR E FOLKMAN (1982), descreveram que a protamina, um antagonista da heparina, também possuía propriedades anti-angiogênicas. No entanto, esses componentes eram um prospecto de inibidores angiogênicos, pois não atuavam especificamente em células

endoteliais.

Em 1989, INGBERG e colaboradores demonstrou a ação do TNP-470, um análogo sintético da fumagilina, promovendo o bloqueio da migração e da proliferação de células endoteliais. Mais recentemente foi estudado em 84 tipos de tumores de camundongos e coelhos o efeito de um conjugado formado de TNP-470 e caplostatina, um polímero de hidroxipropil metacrilamida (HPMA). Como resultado, houve inibição entre 40-100% dos tumores na presença de pequena toxicidade, demonstrando menor toxicidade e maior eficácia do sugerindo a possibilidade da sua utilização clínica em neoplasias e em processos inflamatórios (SATCHI-FAINARO et al, 2004).

Outro fator inibidor da angiogênese é a trombospondina-1 (TSP-1), uma glicoproteína multifuncional da matriz extracelular. Segundo MAJACK e colaboradores (1986), a TSP possui funções autócrinas, sendo responsável pelo aumento da proliferação de células da musculatura lisa em resposta ao fator de crescimento epidérmico (EGF). Em contrapartida, GOOD e colaboradores (1990), demonstraram que a TSP-1 é um regulador negativo da resposta angiogênica. Com objetivo de uma melhor compreensão da TSP, IRUELA-ARISPE e colaboradores (1996), investigaram a expressão e a regulação da TSP-1 no endométrio humano, por ser um tecido que sofre períodos de crescimento e inibição da formação de vasos sanguíneos. Os resultados do estudo demonstraram que a TSP-1 foi expressa apenas na fase secretora do ciclo menstrual, onde não há proliferação celular. Foi localizada principalmente em pequenos capilares no endométrio funcional, demonstrando uma importante função da TSP-1 na supressão do remodelamento desses vasos impedindo seu crescimento. Os mesmos autores demonstraram ainda que a TSP-1 é regulada dose e tempo dependentes pela progesterona e que os níveis de TSP-1 induzidos por esse esteróide são suficientes para inibir a migração e a proliferação de células endoteliais.

Dois outros inibidores da angiogênese foram descritos mais recentemente: um

fragmento do plasminogênio denominado de angiostatina (O'REILLY et al, 1994), e um fragmento do colágeno XVIII denominado endostatina (O'REILLY et al, 1997). Ambos atuam como inibidores específicos da proliferação de células endoteliais diminuindo o crescimento dos vasos sanguíneos e impedindo o desenvolvimento dos tumores. Nos modelos experimentais estudados, após a administração desses componentes, o crescimento de metástases era inibido, pois havia um equilíbrio entre apoptose e proliferação de células tumorais. A angiostatina e a endostatina foram os primeiros componentes descritos, com ação anti-angiogênica originados das próprias células neoplásicas. As células tumorais aparentemente secretavam fatores que proporcionavam um *feedback* negativo, ocasionando uma inibição do crescimento de vasos sanguíneos (IRUELA-ARISPE & DVORAK, 1997).

2.7. VEGF e tireóide

O aumento da vascularização na tireóide ocorre no bócio hiperplásico, na doença de Graves e em lesões neoplásicas malignas. No carcinoma papilífero da tireóide foi verificado que a densidade de capilares se correlaciona com a sobrevida do paciente (ISHIWATA et al, 1998). Em um modelo experimental de bócio em ratos, induzido por baixos níveis de iodo e tiouracil, a densidade capilar na tireóide aumentou nos primeiros três dias de tratamento e aos vinte dias, os folículos tireoidianos estavam quase totalmente circundados por uma rede capilar com endotélio contínuo (WOLLMAN et al, 1978). Neste modelo a proliferação endotelial com fusão dos capilares ocorreu antes da proliferação do epitélio folicular (WOLLMAN et al, 1978; SMEDS & WOLLMAN, 1983; MANY et al, 1984), havendo evidências de que *in vitro* os tireócitos sintetizam e secretam VEGF-A, cuja expressão gênica é modulada pelo TSH, AMP cíclico e soro de pacientes com doença de Graves (SATO et al, 1995). Em um modelo animal de bócio induzido pelo tiouracil verificou-se que a expressão do mRNA de VEGFR-1 e VEGFR-2 aumentam durante a formação do bócio e que isto ocorre após o aumento do TSH plasmático, em paralelo com a proliferação capilar

tireoidiana (VIGLIETTO et al, 1997).

A tireóide é um excelente modelo para o estudo da angiogênese associada a processo de hiperplasia epitelial uma vez que durante a formação do bócio há o crescimento de células foliculares e endoteliais. Este crescimento celular provavelmente é regulado por citocinas e fatores de crescimento liberados pelas células foliculares em resposta a baixas concentrações de TSH (RAMSDEN, 2000).

2.8. Angiogênese e pentoxifilina (PTX)

A PTX (Figura 6) é uma droga derivada da metil-xantina, que regula a viscosidade sanguínea, aumenta a capacidade de deformação de eritrócitos e granulócitos e inibe a agregação plaquetária (MULLER, 1979; SAMLASKA et al, 1994).

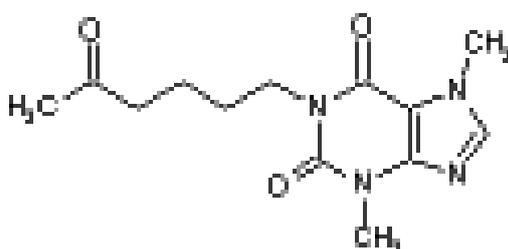


Figura 6. Estrutura molecular da PTX.

A partir de 1980 foram realizados vários estudos para avaliar os efeitos do tratamento com pentoxifilina no desenvolvimento de retinopatias. Segundo SONKIN e colaboradores (1993) esta droga aumenta o fluxo de sangue da retina em pacientes diabéticos. KRUGER e colaboradores (1998) e SEBAG e colaboradores (1998) demonstraram que o uso de PTX também aumentava o fluxo sanguíneo coroidal em pacientes com degeneração macular. Além disso, foi demonstrado que a pentoxifilina impedia a angiogênese em modelo experimental de angiogênese em córneas de coelhos (UEDA E FUDUKA, 1997).

AMIRKHOSRAVI e colaboradores (1998) sugeriram que a PTX inibia a produção de VEGF induzido por hipóxia em retina de ratos, assim como a proliferação de células endoteliais e angioblastos. Como consequência ocorria redução da vasculogênese e da neo formação vascular (HEMO et al, 1995). Outros estudos (FERRARA et al, 1996; CARMELIET et al, 1996) evidenciaram a falta de vasculogênese se a sinalização via VEGF estivesse interrompida.

Para quantificar a neovascularização da retina de ratos recém-nascidos expostos a 80% de oxigênio terapia, YASUKO e colaboradores (2000) observaram o efeito da PTX administrada por via intraperitoneal durante dez dias. Os resultados mostraram redução significativa das áreas avasculares na retina nos animais tratados com a PTX e diminuição da vasculogênese mediada pelo VEGF, porém nenhum efeito significativo da droga sobre a angiogênese.

Estudos realizados por GUDE e colaboradores (1996, 1999), demonstraram em melanoma de camundongo o efeito anti-metastático da PTX. Em outro estudo em que foi comparado o número de vasos neoformados com o volume tumoral utilizando-se doses mais elevadas de PTX, os resultados evidenciaram diminuição do crescimento tumoral em resposta à interrupção da angiogênese (GUDE et al, 2001).

Os mecanismos moleculares envolvidos na modulação da angiogênese pela administração de PTX são complexos e muitas vezes indeterminados. JOSEPH e ISAACS (1998) demonstraram que a PTX inibe a secreção de TNF- α , em tumor prostático de rato. Os resultados mostraram redução de 71% do número de macrófagos associados ao tumor, assim como da densidade dos vasos sanguíneos e do crescimento tumoral. AMBRUS e colaboradores (1991) estudaram o efeito anti-angiogênico da PTX em modelos experimentais tumorais e observaram inibição na função macrófaga.

2.9. Angiogênese e heparina

A heparina é biosintetizada e armazenada em grânulos de mastócitos. Tecidos ricos em mastócitos como os pulmões de bovinos e mucosa intestinal de porcos, são usados como fonte comercial de heparina (Figura 7) (BAUER, 1994). Atualmente, existem duas formas de heparina disponíveis para uso clínico: as heparinas não fracionadas (UFH), com peso molecular em torno de 3000 a 30000 Da, e as heparinas de baixa massa molar (HBMM) com peso molecular entre 2000 a 10000 Da (BONEU, 1996 e 2000). A atividade anticoagulante da heparina é mediada pela sua interação com o fator antitrombina (AT). Esta ligação induz uma mudança na estrutura da antitrombina, aumentando sua atividade anticoagulante. O complexo heparina-AT liga-se ao fator X, inibindo o fator Xa. Tanto a HBPM quanto a HNF possuem esta atividade anti Xa (HARENBERG, 1990; BAUER, 1991).

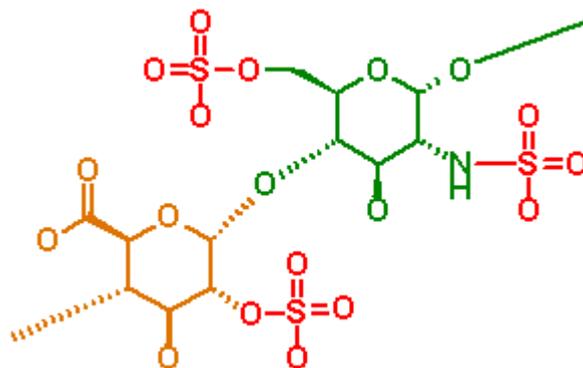


Figura 7 - Estrutura molecular da heparina.

A HBPM e a HNF, além de interagir com a antitrombina, pode se ligar via interações eletrostáticas através de suas cadeias de glicosaminoglicanas a uma grande variedade de proteínas e moléculas incluindo alguns fatores de crescimento envolvidos no processo de angiogênese (HIRSH et al, 2004).

2.9.1. Heparina não fracionada

A heparina não-fracionada é um mucopolissacarídeo heterogêneo que se liga a anti-

trombina por um pentasacarídeo, catalizando a inativação da trombina e resultando na estabilização de formação de fibrina (HIRSH et al, 2004).

2.9.2. Heparina de Baixo Peso Molecular

As heparinas de baixo peso molecular (HBPM) são frações da HNF produzidas pela despolimerização com ácido nitroso, degradação enzimática ou por benzilação, processo que reduz o seu peso molecular (HIRSH et al, 2004). Por conter cadeias menores, possuem, conseqüentemente, atividade anti-fator Xa mais seletiva e menor atividade anti-trombina. Além disto, ao contrário do que ocorrem com a heparina não-fracionada, estes agentes não são inativados pelo fator plaquetário IV. Por serem agentes mais específicos, as heparinas de baixo peso molecular podem ser administradas em doses menores e possuem efeitos anticoagulantes mais previsíveis (MORRIS et al, 2005).

Embora os resultados da literatura sejam controversos, alguns estudos mostram que o tratamento com heparina em portadores de neoplasias malignas reduz o volume do tumor primário. ONKOSHI e colaboradores (1993) descreveram que em camundongos, heparina em altas doses por um período de quinze dias reduz o crescimento de carcinoma escamoso. Por outro lado, CHAN e colaboradores (1980) observaram que em ratos, doses elevadas de heparina durante quarenta dias não influenciava o crescimento de metástase.

AMIRKHOSRAVI e colaboradores (2003) demonstraram que a HBPM, administrada em camundongos durante quinze dias após a inoculação de células cancerígenas via intravenosa, reduz o número de sítios de metástases pulmonares. Porém, esta atividade anti-metastática da heparina só foi observada quando a administração era feita antes da inoculação das células tumorais.

Para analisar o crescimento intraperitoneal de carcinoma de cólon em ratos, PROSS e colaboradores (2003) utilizaram HBPM por via intraperitoneal durante vinte e um dias, que

resultou na redução no volume tumoral e posteriormente (PROSS et al, 2004) também na diminuição do número de metástases abdominais. SMORENBURG e colaboradores (1999) não observaram nenhuma diminuição de metástases hepáticas em ratos tratados com HBPM ou com HNF.

Os mecanismos moleculares envolvidos na modulação da angiogênese pela administração de heparina são complexos e muitas vezes indeterminados. MALGORZATA e colaboradores (2006) relatam que como a heparina interage com as células endoteliais, elas são designadas especificamente para bloquear a sinalização celular através de forte interação com fatores angiogênicos, podendo diminuir ou induzir a angiogênese. A firme ligação do VEGF com a heparina é mediada através do domínio exon 7-codificado (HOEBEN et al, 2004).

Estudos realizados por ORNITZ e colaboradores (1992) demonstraram que heparinas de baixo peso molecular podem modular a ação de vários fatores de crescimento angiogênicos como também a interação das células endoteliais com a trama de fibrina. Tanto a heparina de baixo peso como a heparina não-fracionada inibem a concentração de FGFb e o VEGF, diminuindo a proliferação das células endoteliais, porém causam efeitos diferentes na trama de fibrina.

3. Objetivos

3.1. Geral

Caracterizar em ratos, o efeito da heparina de baixo peso, da heparina não fracionada e da pentoxifilina sobre a angiogênese induzida pelo autotransplante parcial de tireóide no ligamento largo do útero.

3.2. Específicos

1. Quantificar através de estudo morfométrico o efeito da heparina de baixo peso, da heparina não fracionada e da pentoxifilina sobre a densidade de capilares neoformados induzidos pelo autotransplante parcial da glândula tireóide no ligamento largo do útero.
2. Caracterizar e quantificar através de estudo histomorfométrico o efeito da heparina de baixo peso, da heparina não fracionada e da pentoxifilina sobre a imunexpressão de VEGF no ligamento largo do útero com o autotransplante de tireóide.
3. Caracterizar através de estudo histomorfométrico o efeito da heparina de baixo peso, da heparina não fracionada e da pentoxifilina sobre a população de macrófagos ED1 positivos no ligamento largo com o autotransplante de tireóide,
4. Caracterizar através de estudo histomorfométrico o efeito da heparina de baixo peso, da heparina não fracionada e da pentoxifilina sobre a população de mastócitos no ligamento largo com autotransplante de tireóide,

4. Material e Métodos

4.1. Animais

Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com as recomendações éticas e legais especificadas para a experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (1991).

Foram utilizadas no presente estudo quarenta ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), pesando entre 120g e 200g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal da Bahia. Os animais foram alojados em gaiolas individuais e alimentados durante todo o período experimental com ração comercial granulada (Purina), contendo vitaminas, sais minerais, oligoelementos, proteínas, carboidratos (anexo I), e água *ad libitum*

Os animais permaneceram em ambiente com temperatura de 25°C e exposição luminosa controlada por cerca de uma semana para a adaptação ao ambiente. Passado este período, antes das cirurgias, os animais foram distribuídos por sorteio em oito grupos com cinco animais.

4.2. Drogas

- Heparina de baixo peso molecular (HBP), enoxiparina sódica, com atividade anti-Xa: 98UI/mg; atividade anti-IIa: 26,6UI/mg;
- Heparina não fracionada (HNF) obtida de NIBSC (código 97/578, 5th *International standard for fractionated heparin*), ambas gentilmente cedidas pelo Prof. Paulo Mourão do Laboratório do Tecido Conjuntivo do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro;
- Pentoxifilina (PTX) Trental® comercializada pelo laboratório Delta.

4.3. Protocolo experimental

4.3.1. Grupo AutoTransplante (Auto TX) (n=5)

Os animais foram submetidos à tireoidectomia parcial seguida do transplante (autotransplante) do lobo esquerdo da tireóide no ligamento largo do útero (descrito abaixo) e mortos no décimo quinto dia por secção medular, sob efeito de anestesia geral.

4.3.2. Grupo AutoTX + HBP (n=5)

Os animais foram submetidos ao AutoTX e tratados durante 15 dias com heparina de baixo peso (HBP) por via intraperitoneal na concentração de 4mg/kg/dia.

4.3.3. Grupo AutoTX + HNF (n=5)

Os animais foram submetidos ao AutoTX e tratados durante 15 dias com heparina não-fracionada (HNF) por via intraperitoneal na concentração de 4mg/kg/dia.

4.3.4. Grupo AutoTX + PTX (n=5)

Os animais foram submetidos ao AutoTX e tratados com Pentoxifilina (Delta) – PTX por via intraperitoneal na concentração de 20mg/kg (diluição em água estéril) três vezes por semana.

4.3.5. Grupo Falso-operado (n=5)

Os animais foram submetidos à cervicotomia e à laparotomia num mesmo tempo cirúrgico para manipulação da tireóide e do ligamento largo respectivamente. Após o fechamento das cavidades os animais receberam, por via intraperitoneal, 500 μ L/dia de água estéril.

4.3.6. Grupo Falso-operado + HBP (n=5)

Os animais foram submetidos à cervicotomia e à laparotomia num mesmo tempo cirúrgico para manipulação da tireóide e do ligamento largo respectivamente. Após o fechamento das cavidades os animais receberam, por via intraperitoneal, HBP (4mg/kg/dia)

em água estéril durante 15 dias.

4.3.7. Grupo Falso-operado + HNF (n=5)

Os animais foram submetidos à cervicotomia e à laparotomia num mesmo tempo cirúrgico para manipulação da tireóide e do ligamento largo respectivamente. Após o fechamento das cavidades os animais receberam, por via intraperitoneal, HNF (4mg/kg/dia) em água estéril durante 15 dias.

4.3.8. Grupo Falso-operado + PTX (n=5)

Os animais foram submetidos à cervicotomia e à laparotomia num mesmo tempo cirúrgico para manipulação da tireóide e do ligamento largo respectivamente. Após o fechamento das cavidades os animais receberam, por via intraperitoneal, PTX (20mg/kg três vezes por semana) em água estéril durante 15 dias.

Todos os animais foram mortos por deslocamento cervical após quinze dias.

4.4. Protocolo Cirúrgico

4.4.1. Fase pré-operatória

Trinta dias antes do início dos trabalhos experimentais, todos os animais receberam mebendazol com a finalidade de tratar infestações helmínticas. As ratas permaneceram em restrição alimentar por seis horas, antes da cirurgia, recebendo apenas o suporte hídrico. Os animais foram anestesiados com quetamina e xilazina (0,1mL / 100g de peso corporal), por via intramuscular, propiciando analgesia por uma a duas horas.

Os animais foram colocados em decúbito dorsal, em uma mesa operatória, construída para animais de pequeno porte. Foram realizadas a tricotomia das regiões cervical e abdominal e anti-sepsia com solução de polivinilpirrolidona (PVP) e álcool a 70% nas regiões do tórax, abdome, coxas e genitália.

4.4.2. Técnicas Operatórias

4.4.2.1. Laparotomia

Foi realizada laparotomia xifopubiana através de incisão mediana longitudinal com cerca de cinco centímetros. A incisão interessava a pele, tecido subcutâneo, aponeurose, músculos e peritônio (Figura 8). A hemostasia dos vasos superficiais sangrantes foi feita por eletrocoagulação. Inicialmente a região foi aberta para localização do sítio de fixação do implante da tireóide. Enquanto o fragmento de tireóide era retirado para o implante a ferida operatória abdominal permanecia protegida com compressas estéreis pequenas, umedecidas em solução salina 0,9 % (Figura 8).

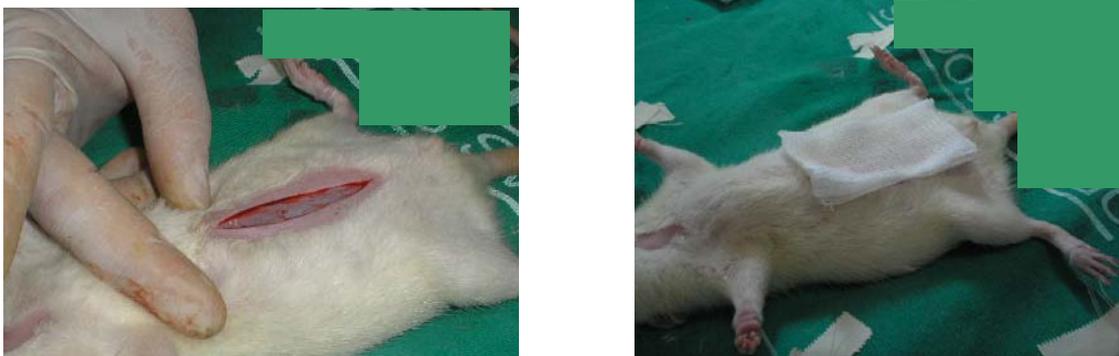


Figura 8 – Aspecto geral da ferida operatória na laparotomia abdominal.

4.4.2.2 Cervicotomia

A cervicotomia foi realizada com incisão mediana longitudinal com cerca de quatro centímetros. A diérese estendeu-se desde a região supra-hióidea até a fúrcula esternal, incisionando-se a pele, tela subcutânea e plastima, afastando-se as glândulas salivares. Os músculos infra-hióideos posicionados anteriormente a traquéia foram separados na linha mediana, expondo a tireóide (Figura 9). Reconhecido o losango cervical que se limita na parte superior pelos músculos hiomaxilares, na parte inferior pelo esternocleidomastóideo e esternohióideo, encontra-se à traquéia.



FIGURA 9 – Cervicotomia de 5 cm e desvio da traquéia e do lobo direito da tireóide (T).

A tireoidectomia do lobo esquerdo foi realizada por cuidadosa dissecação com pinça de Halsted. Em seguida, o fragmento de tireóide com cerca de 2,5 X 1,3 X 1,6 mm foi implantado no ligamento largo do útero. O fragmento de tireóide foi fixado com monofilamento 6-0, deixando as extremidades do fio longas para identificação no momento da retirada dos implantes (Figura 10).



Figura 10 – Lobo direito da tireóide (seta) implantado no ligamento largo do útero.

As suturas das regiões cervical e abdominal foram realizadas por planos, com pontos contínuos simples com fio mono nylon 6-0. Em seguida, a ferida foi limpa com solução salina a 0,9% (Figura 11).



Figura 11 – Sutura das feridas cirúrgicas realizada por planos com fio de mononylon 6-0.

4.4. 3. Fase pós-operatória

Após o procedimento cirúrgico e recuperação anestésica (cerca de três horas) os animais tiveram acesso a alimentos sólidos e água tendo sido mantidos ao Biotério Central da UFBA e mantidos confinados em gaiolas individuais até o final do experimento. Os animais eram observados diariamente para a ocorrência de complicações na ferida cirúrgica.

4.5. Estudo morfológico

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical sob efeito de anestesia, aplicada de forma semelhante à realizada para o procedimento cirúrgico. Os fragmentos de tireóide implantados no ligamento largo ou apenas fragmentos do ligamento largo dos

animais do grupo falso operados foram retirados juntamente com o tecido adjacente e imersos em formaldeído a 10% tamponado para posterior processamento histológico. Após fixação durante 48 horas o material foi desidratado em concentrações crescentes de álcool, clarificado em xilol e embebido em parafina. Cortes histológicos com 5µm de espessura foram obtidos em micrótomo (Leica RM 2165, Nussloch, Alemanha) e corados pelas técnicas de hematoxilina-eosina (H&E) e alcian blue pH 2.5 para a identificação de mastócitos (KIERNAN, 1990) .

4.6. Imunohistoquímica

Foram utilizados os seguintes anticorpos:

- VEGF (sc-7269), anticorpo monoclonal camundongo (Santa Cruz Biotechnology, USA).
- ED1 (MCA341R), anticorpo monoclonal anti-rato (Serotec, USA).

Os cortes histológicos com 5 µm de espessura foram recolhidos em lâminas previamente preparadas com poli-L-lisina para aderência das amostras.

Para realização da imuno-histoquímica os cortes foram desparafinizados em banhos de xilol, etanol em soluções decrescentes (100%, 90% e 80%) e água destilada. Em seguida os cortes foram submetidos à recuperação antigênica (RA), através da imersão em tampão citrato, pH 6.0, aquecido em banho-maria, por 20 minutos, a temperatura de 90°C. Após o resfriamento, as amostras foram submetidas à inibição da peroxidase endógena, através da incubação em solução de metanol e peróxido de hidrogênio a 3%, por 10 minutos, seguida de lavagens com tampão fosfato (PBS). O bloqueio de ligações inespecíficas foi feito através do tratamento com solução de soro-albumina bovina a 5%, em PBS contendo 0,5% de triton-X 100, por uma hora. Em seguida, as amostras foram incubadas com os anticorpos

específicos em diluições previamente testadas (1:200 para todos os anticorpos), a 4°C, por 16 horas, em câmara escura. Posteriormente, após lavagens com PBS, foi feita a incubação com o anticorpo secundário biotinilado, seguida de incubação no complexo streptavidina-peroxidase. A revelação foi realizada com diaminobenzidina (Dakocytomation), seguindo-se de contracoloração pela hematoxilina de Harris (1:3), por 5 minutos e montagem com Entellan (Merck, Alemanha). Como controle negativo da reação utilizou-se cortes histológicas submetidos ao mesmo protocolo de coloração, exceto pela incubação com o anticorpo primário, substituído por soro não imune da espécie animal do anticorpo (soro normal de camundongo para o VEGF e soro normal de coelho para o ED1).

4.7. Protocolo para a detecção da *Griffonia simpliciflora*

A lectina *Griffonia simpliciflora* (BS-I), que se liga especificamente a resíduos galactosil evidencia o endotélio vascular de várias espécies animais, inclusive rato (ALROY et al, 1987). A lectina *Griffonia simpliciflora* biotinilada foi utilizada para a detecção do endotélio e posterior quantificação dos capilares.

Sua detecção foi realizada de forma semelhante à imuno-histoquímica. Os cortes histológicos foram desparafinizados e hidratados, seguindo-se da inibição da peroxidase endógena como descrito acima. Após o bloqueio das ligações inespecíficas, os cortes histológicos foram incubados com a lectina biotinilada na diluição de 1:250 a 4°C por 16 horas, em câmara úmida. Posteriormente os cortes foram submetidos a lavagens com solução de PBS e incubados com estreptavidina conjugada à peroxidase (Sigma, St. Louis, MI, USA). Para a visualização da peroxidase foi utilizado o substrato cromógeno DAB (Liquid DAB, Dakocytomaton), seguindo-se lavagens com PBS e água destilada e contracoloração pela hematoxilina de Harris.

4.8. Histomorfometria

O estudo morfométrico foi realizado através de sistema de captura de imagens, constituído de câmara fotográfica digital EVOLUTION (Media Cybernetics, USA), acoplada a microscópio de luz Eclipse 800 NIKON (Japan) e a computador contendo o programa de análise de imagens MAGEPRO-PLUS 5.0 Media Cybernetics, USA). Imagens digitalizadas de alta qualidade (2048 x 1536 *pixels buffer*) obtidas das lâminas coradas pela *Griffonia simpliciflora*, VEGF, ED1 e alcian blue, utilizando aumento de 40x (lente objetiva) foram utilizadas para a quantificação da densidade de vasos capilares (número de secções transversais). de capilares/ μm^2), densidade de superfície da imunopressão de VEGF (percentual de imunopressão de VEGF/ superfície total examinada), densidade de macrófagos (número de macrófagos/ μm^2) e densidade de mastócitos (número de macrófagos/ μm^2).

4.9. Análise estatística

Todos os dados foram submetidos a análise estatística com auxílio do programa *Microsoft Excel®* e *SigmaStat®*. Os resultados da análise histomorfométrica dos grupos foram expressos sob a forma de média \pm desvio padrão. Na comparação de mais que duas médias em uma única variável categórica independente (fator), aplicou-se o teste de Análise de Variância (ANOVA) e o pós-teste Student-Newman-Keuls. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

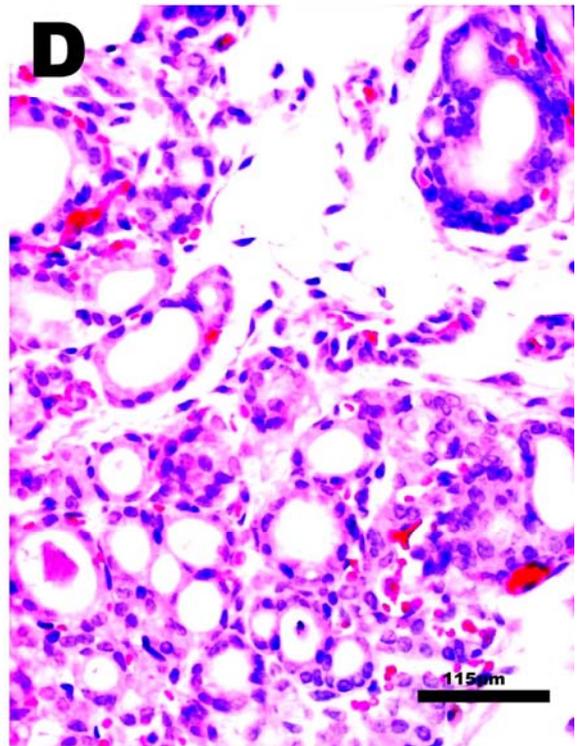
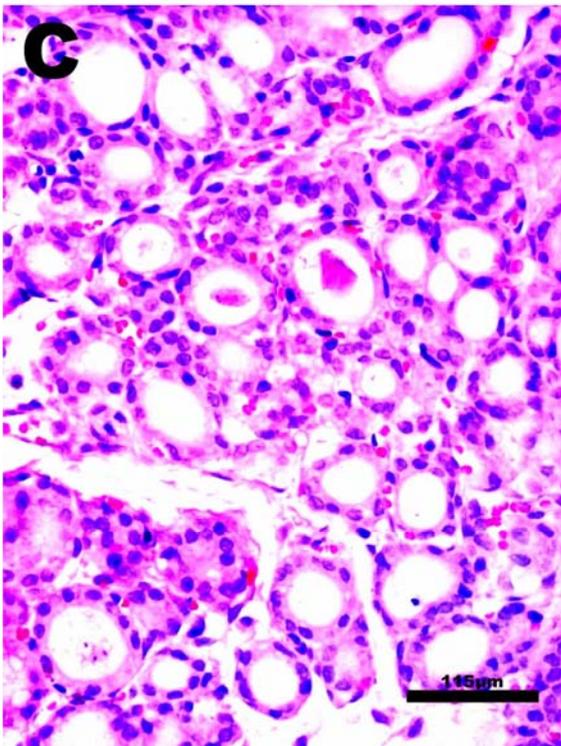
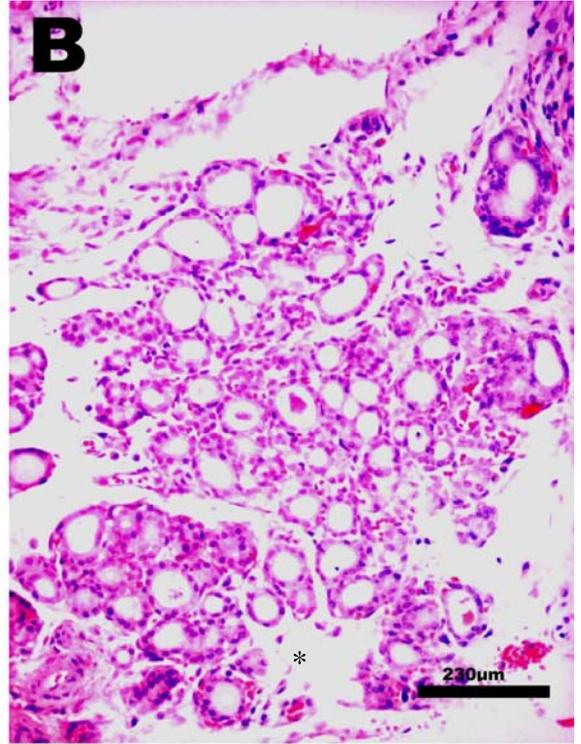
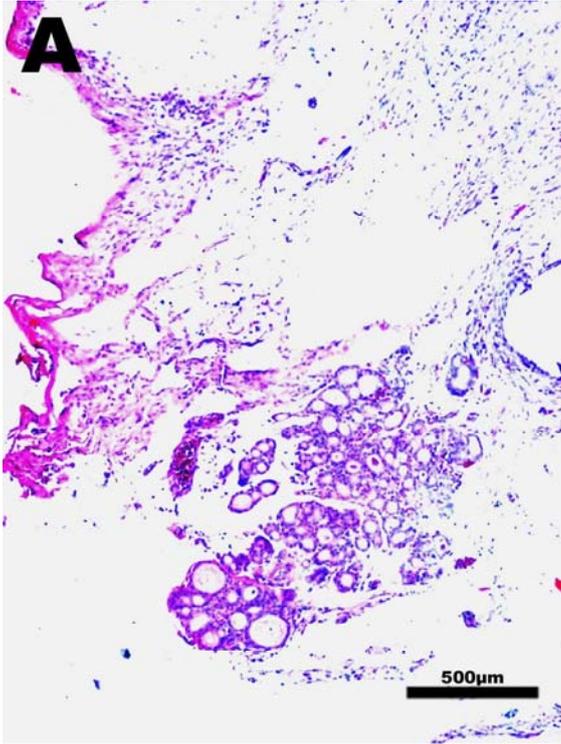
5. Resultados

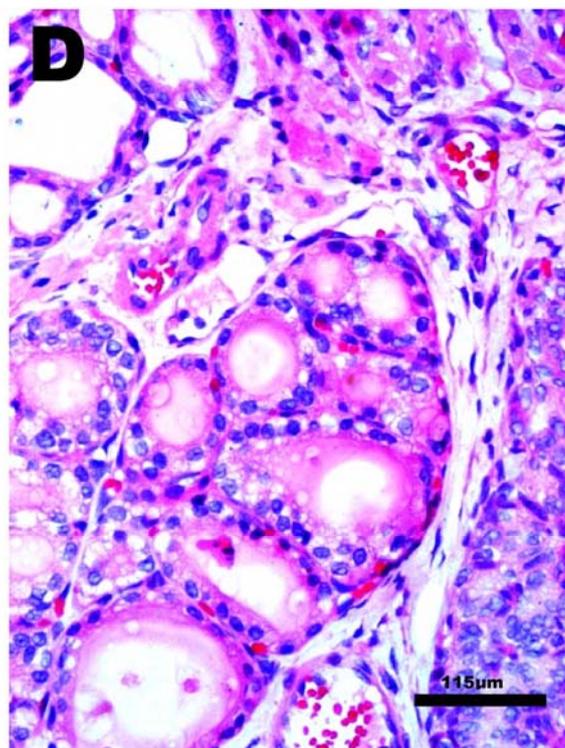
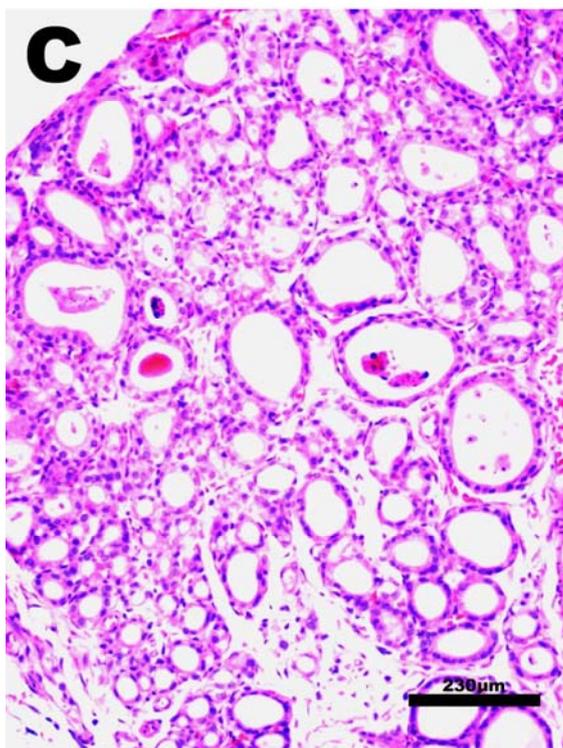
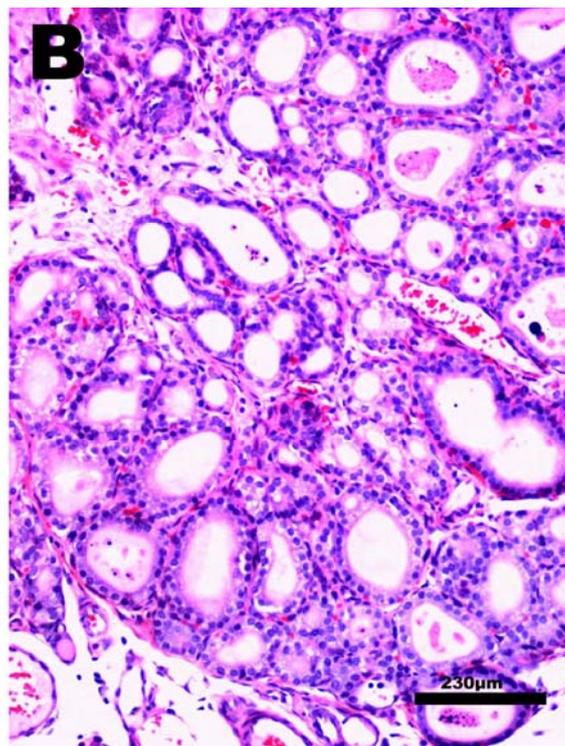
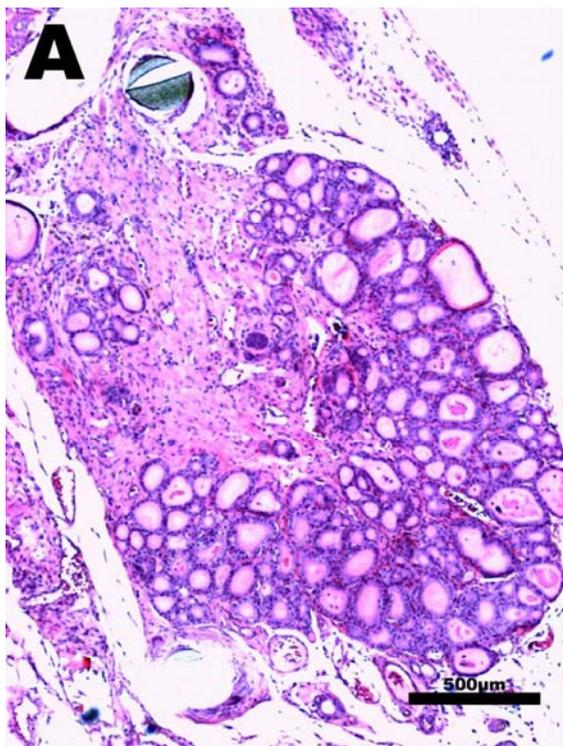
5.1. Análise histológica do autotransplante de tireóide

A análise dos cortes histológicos corados pela H&E demonstrou que após 15 dias o implante permanecia viável, com folículos tireoideanos revestidos por epitélio pavimentoso contendo colóide ou por epitélio cuboidal e sem colóide. Raramente foram observadas áreas com rarefação de folículos preenchidos por tecido conjuntivo frouxo (Figura 12).

5.2. Análise histológica do autotransplante de tireóide tratado com pentoxifilina.

Não houve modificações importantes da arquitetura do autotransplante de tireóide nos animais tratados com PTX. Foram observadas no interior do autotransplante áreas focais de rarefação folicular preenchidas por tecido conjuntivo denso. O epitélio folicular era predominantemente do tipo cuboidal, com ausência ou redução da quantidade de colóide (Figura 13).



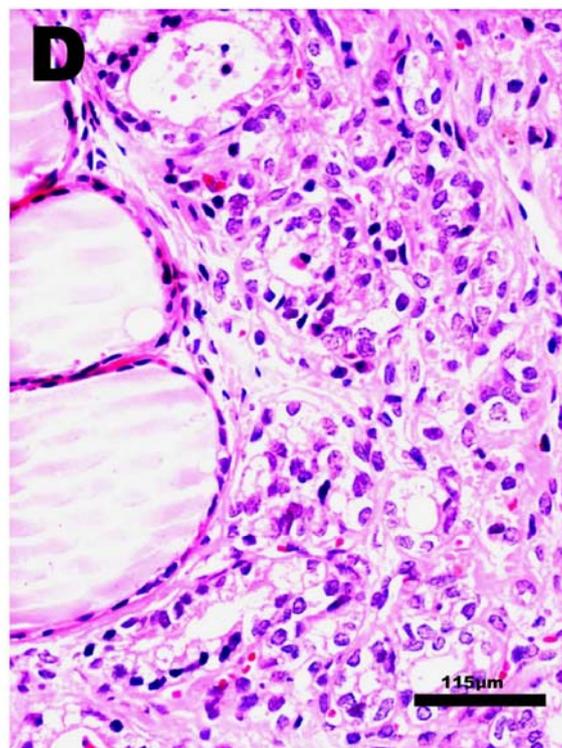
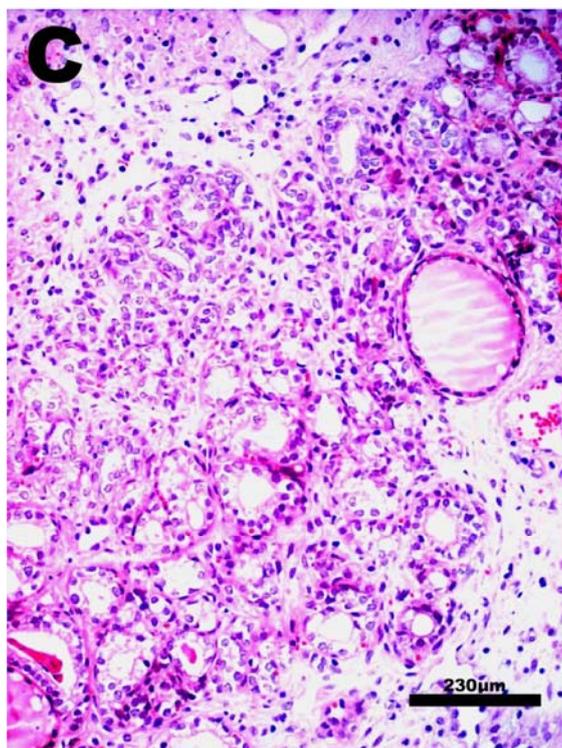
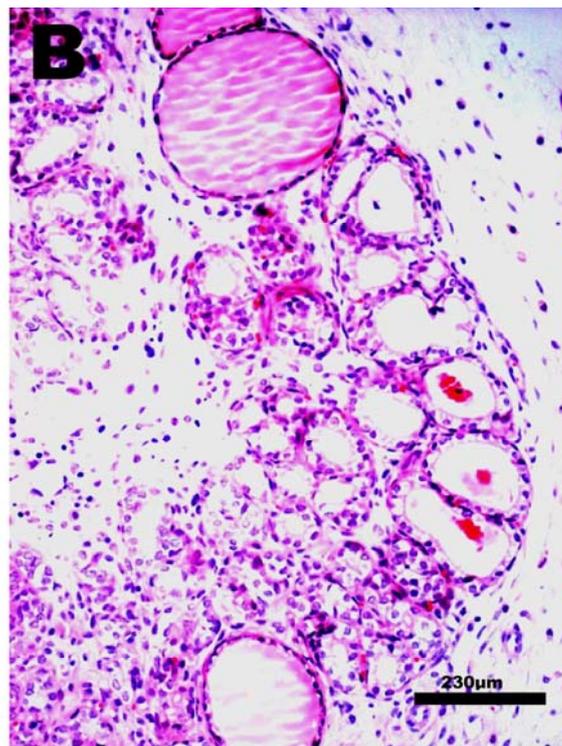
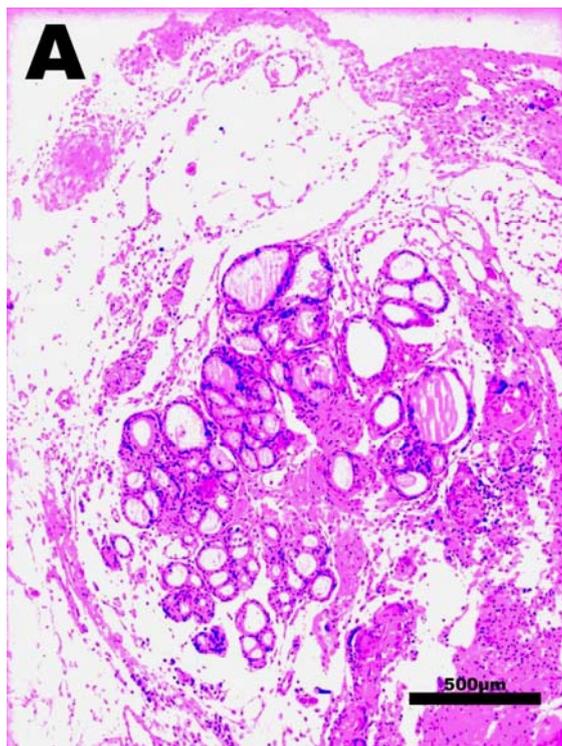


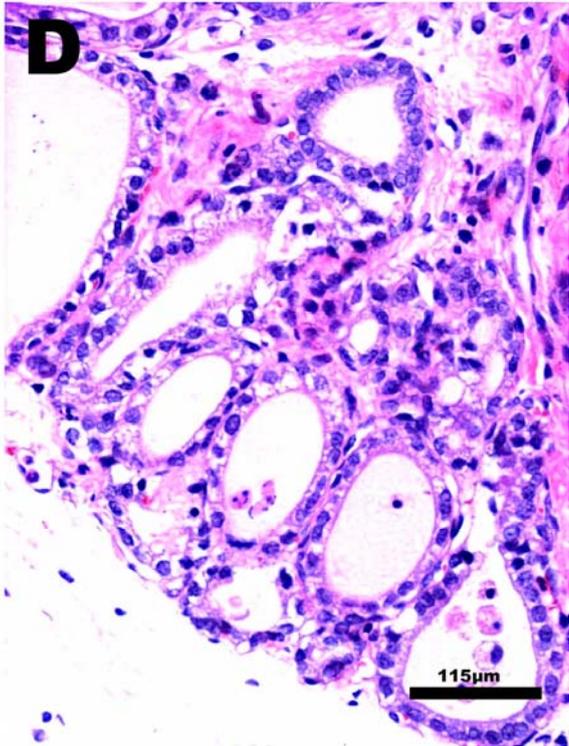
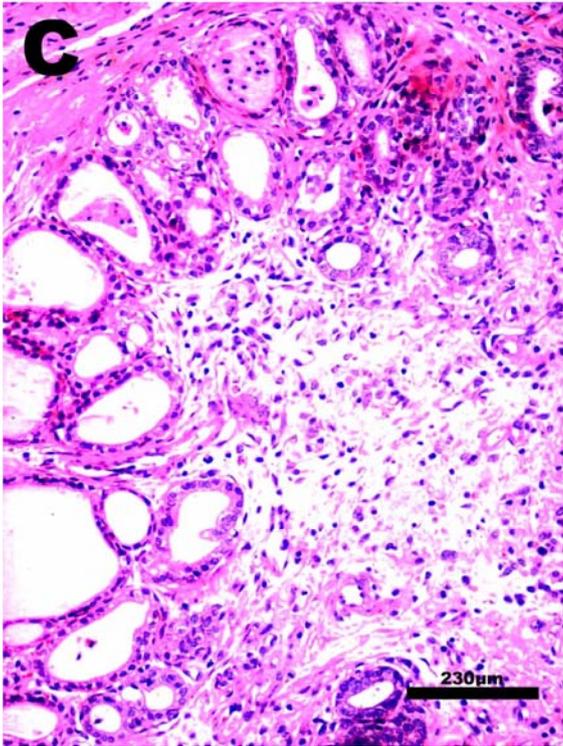
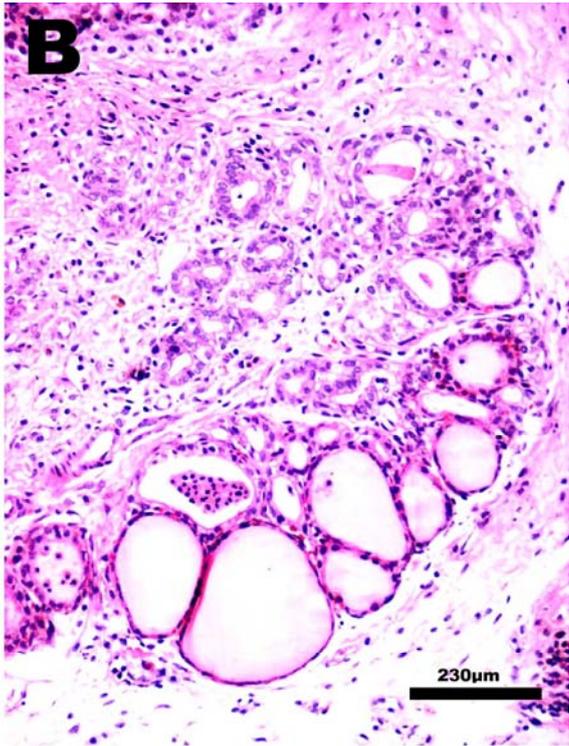
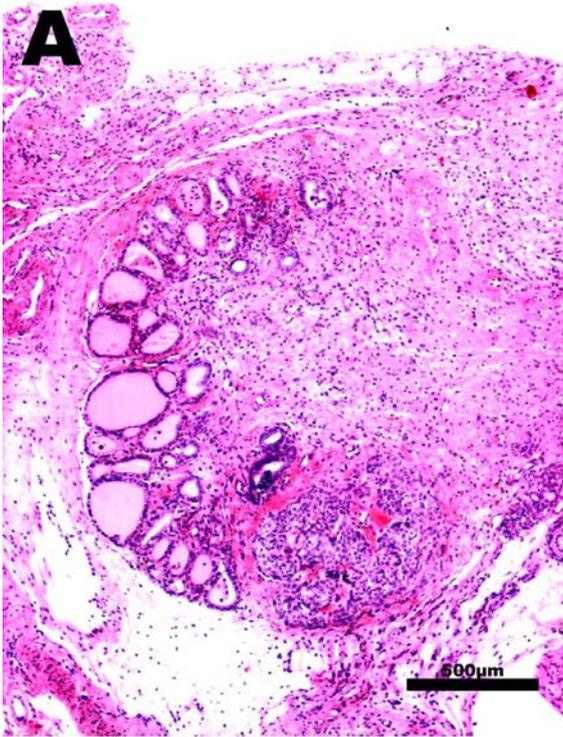
5.3. Análise histológica do autotransplante de tireóide tratado com heparina não fracionada (HNF).

O tratamento com a HNF levou a rarefação folicular no autotransplante. Os folículos remanescentes no implante tinham tamanhos variados sendo os maiores revestidos por epitélio pavimentoso e preenchidos por colóide. Os folículos menores eram revestidos por epitélio cuboidal ou cilíndrico sem colóide no interior. Em virtude da rarefação folicular o infiltrado de células macrofágicas se tornou mais evidente (Figura 14).

5.4. Análise histológica do autotransplante de tireóide tratado com heparina de baixo peso (HBP).

O tratamento com a HBP levou a alteração da micro arquitetura do autotransplante. Os folículos encontravam-se rarefeitos, eram revestidos por epitélio achatado contendo colóide ou por epitélio cuboidal e sem colóide e localizavam-se preferencialmente na periferia do implante. Parte do tecido tireoideano do autotransplante foi substituído por tecido conjuntivo frouxo contendo infiltrado inflamatório mononuclear (Figura 15).



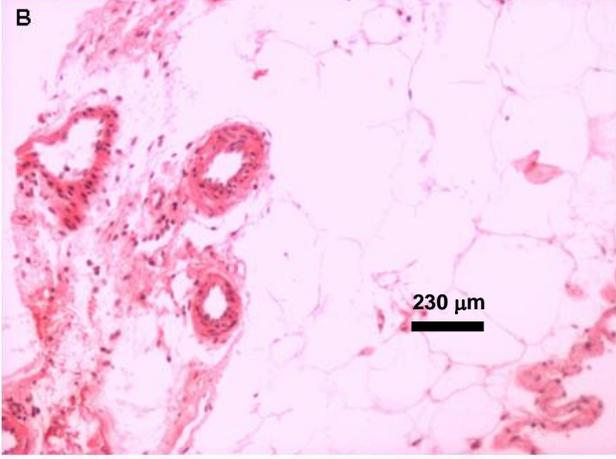
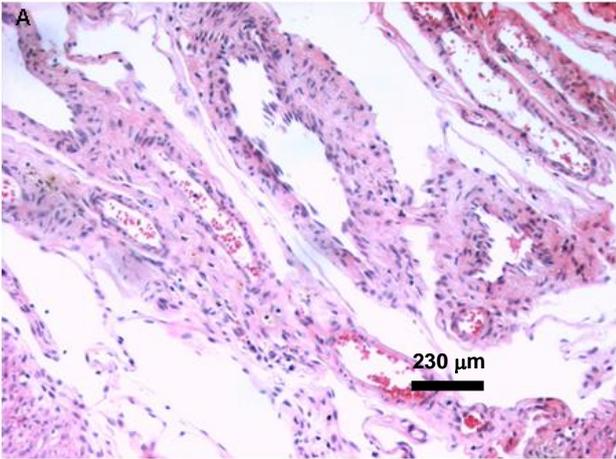


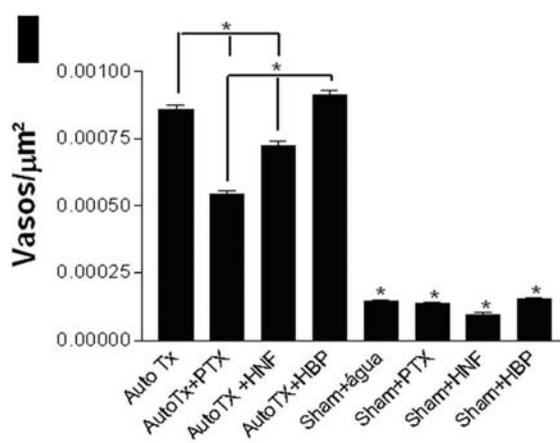
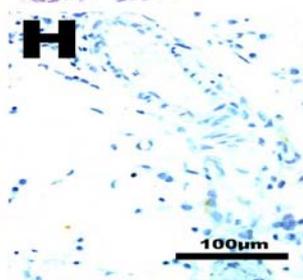
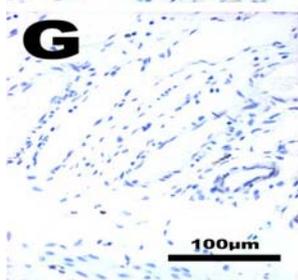
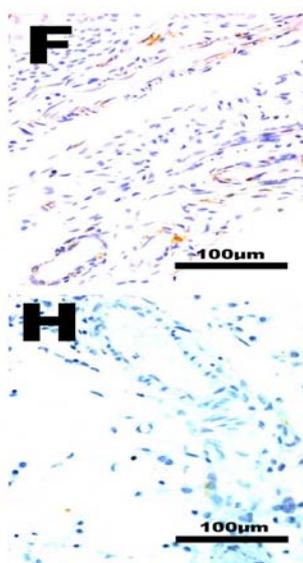
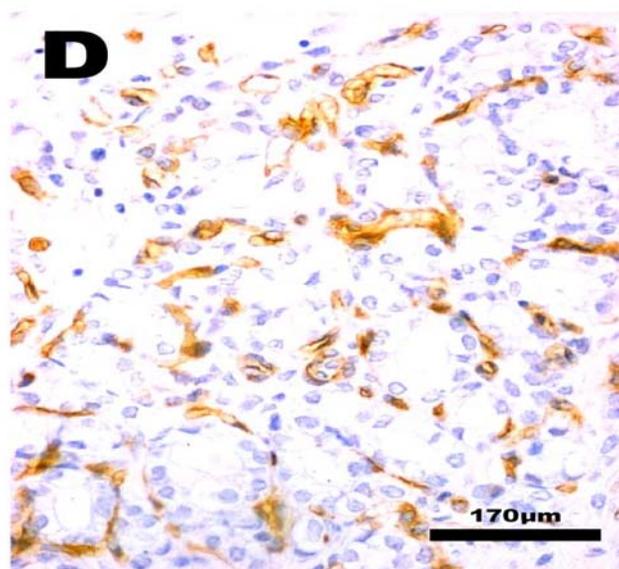
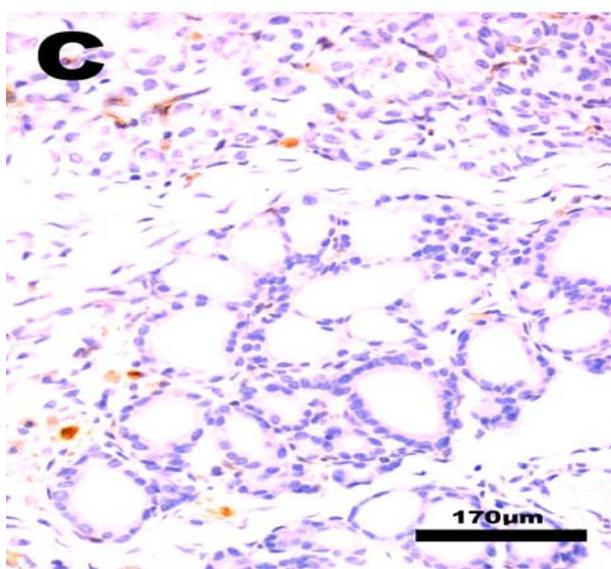
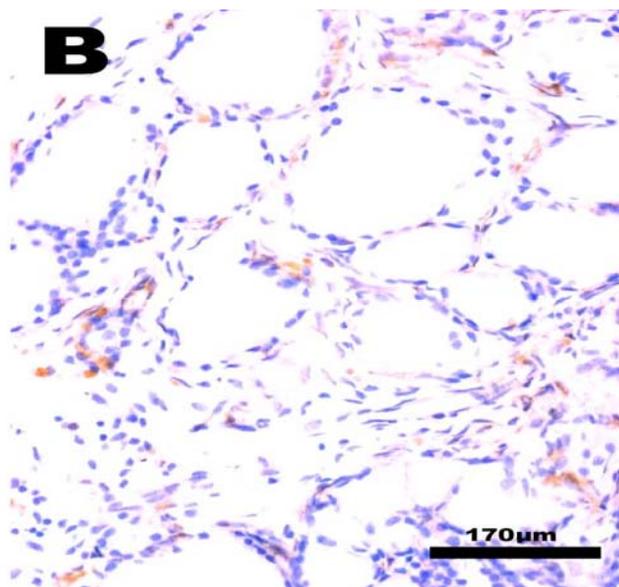
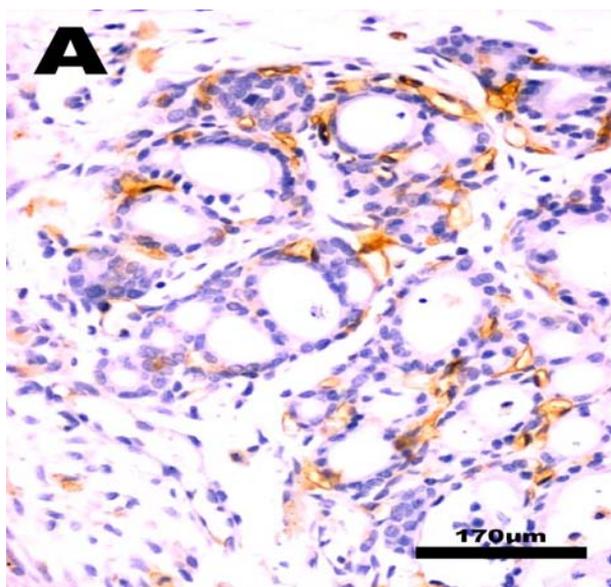
5.5 - Análise histológica dos grupos falso-operados

Os animais dos grupos falso-operados tratados com água, PTX, HNF e HBP apresentaram ligamento largo constituído por tecido conjuntivo e tecido adiposo contendo grande número de vasos arteriulares e venosos, assim como de capilares entremeados com adipócitos. Nos espaços perivasculares ou na periferia do ligamento largo pode ser visto a presença de raros mastócitos e alguns macrófagos. O aspecto histológico do ligamento largo não diferiu entre os animais dos diferentes grupos (água, PTX, HNF e HBP, Figura 16).

5.6 - Análise histoquímica para *Griffonia simpliciflora* para a identificação de capilares sanguíneos e representação gráfica da densidade capilar (μm^2)

A *Griffonia* evidenciou rica rede capilar entre os folículos tireoidianos como pode ser observada no autotransplante (Figura 17A). A administração de PTX e HNF promoveu redução ($p < 0,001$) da rede capilar no autotransplante em relação ao grupo autotransplante (Figura 17 A-C, I). A HBP não modificou ($p > 0,05$) o padrão da rede capilar no autotransplante (Figura 17D). Nos animais falso-operados tratados com água, PTX, HNF e HBP foram verificadas leve reatividade do endotélio capilar do tecido do ligamento largo (Figuras 17E-H). A quantificação dos capilares mostrou haver maior densidade capilar nos animais autotransplantados em relação aos animais falso-operados ($p < 0,001$). A PTX e HNF levaram a diminuição significativa da densidade capilar ($p < 0,001$) em relação ao grupo autotransplantado. A HBP não modificou a densidade capilar no ligamento largo ($p > 0,05$).





5.7. Imunolocalização e representação gráfica da imunexpressão de VEGF.

A imunexpressão de VEGF no autotransplante de tireóide foi observada tanto na maioria dos folículos tireoideanos como no endotélio de capilares localizados entre os folículos e no ligamento largo. Algumas células inflamatórias também se mostraram imunoreativas (Figura 18A).

No grupo de animais com o implante de tireóide, tratados com PTX, a imunexpressão de VEGF no epitélio folicular e nos capilares era negativa ou fracamente positiva (Figura 18B). A quantificação histomorfométrica mostrou redução significativa ($p < 0,01$) na expressão do marcador em relação aos animais do grupo autotransplantado não tratado com drogas (Figura 18I).

Tanto a HNF quanto a HBP levaram a diminuição da imunexpressão de VEGF nos folículos tireoidianos, nos capilares e nas células inflamatórias (Figuras 18C e D). A análise histomorfométrica revelou diminuição significativa ($p < 0,05$) na expressão deste marcador em relação animais do grupo autotransplantado não tratado com drogas (Figura 18I).

Os animais falso-operados tratados com água, PTX, HNF e HBP exibiram endotélio capilar e células inflamatórias reativas para o VEGF (Figuras 18E-H).

5.8. Distribuição e representação gráfica da densidade numérica de macrófagos ED1 positivos.

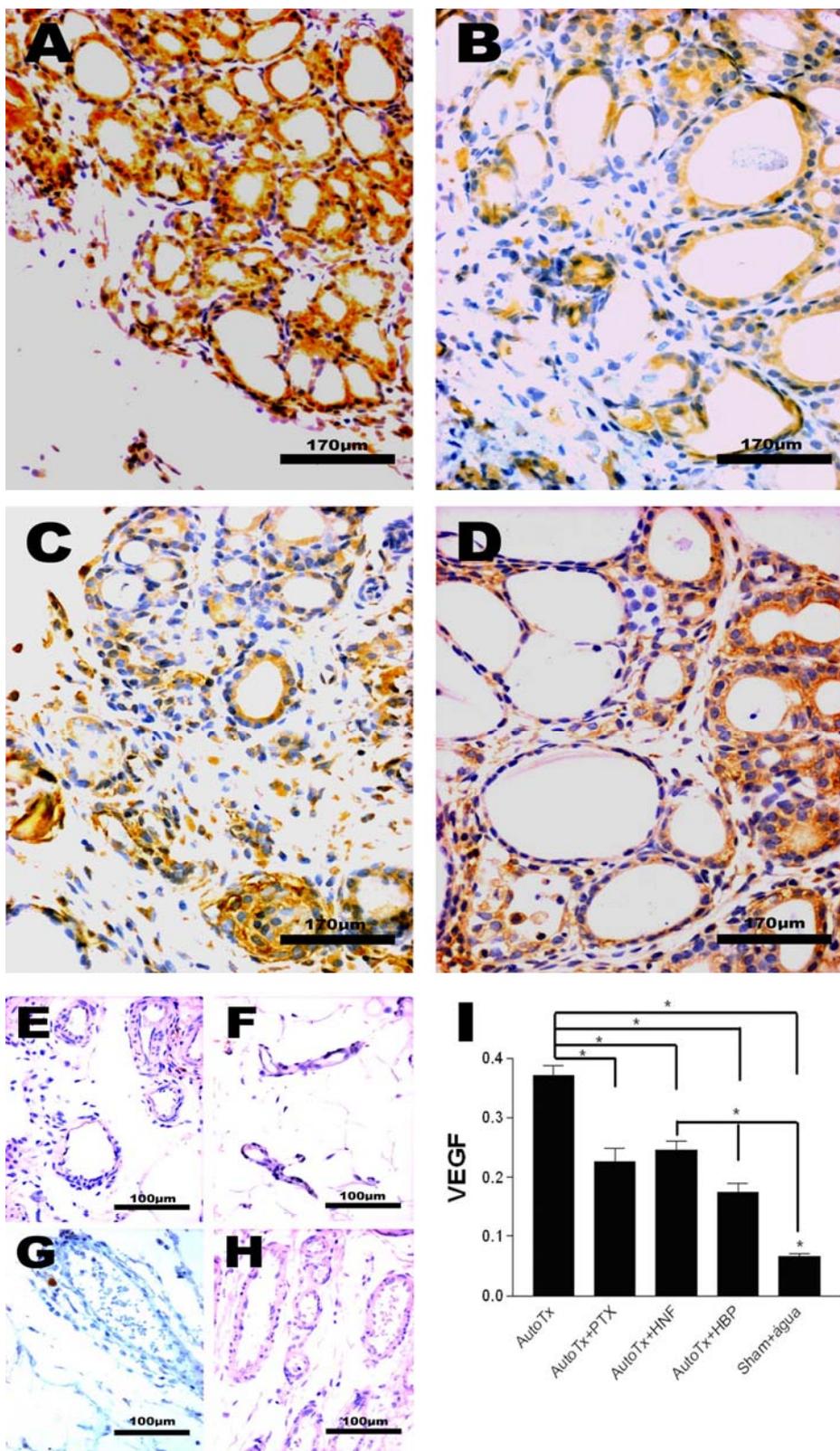
A população de macrófagos reativos para ED-1 é abundante no tecido tireoideano do autotransplante e no ligamento largo dos animais dos diversos grupos (Figura 19A). Em relação aos animais autotransplantados não tratados com drogas, a utilização de PTX e de HNF levou a diminuição significativa desta população celular ($p < 0,001$ em ambos os casos) (Figuras 19B, C e I). A HBP não modificou significativamente a população macrofágica quando comparada ao grupo de animais autotransplantados ($p > 0,05$) (Figuras 19 D e I).

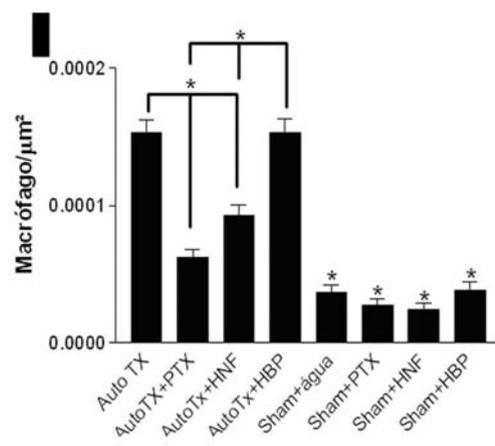
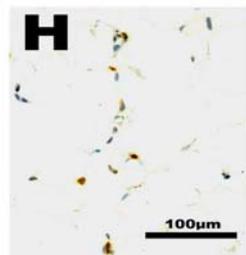
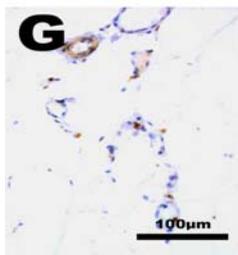
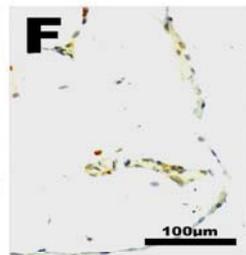
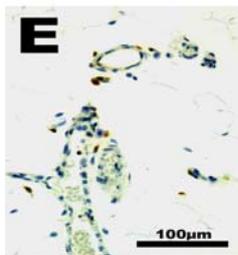
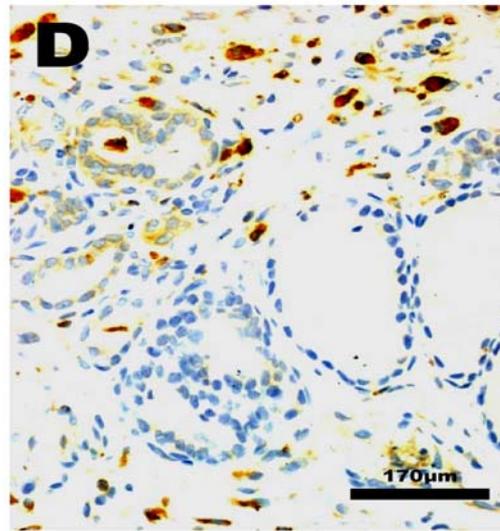
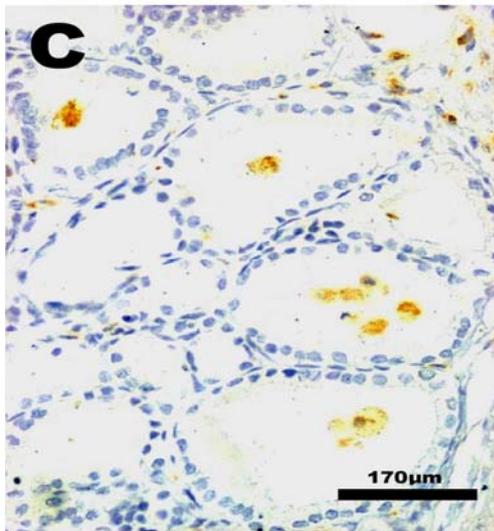
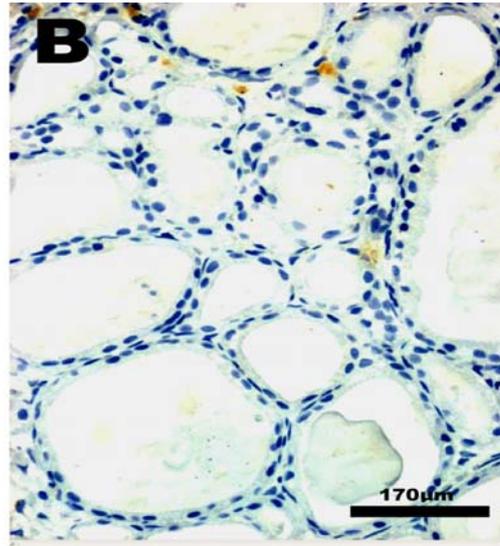
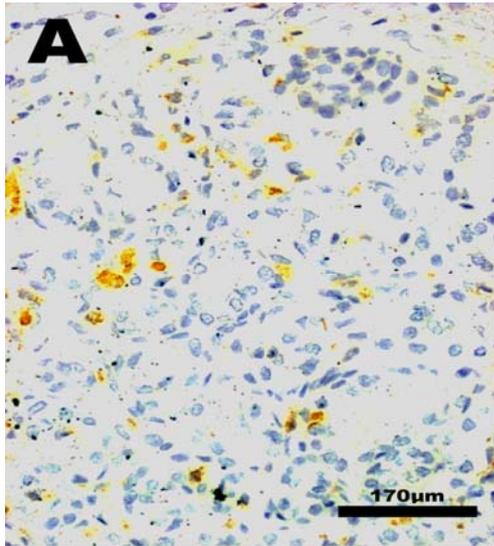
Nos animais falso-operados tratados com água, PTX, HNF e HBP verificaram-se a presença de pequena quantidade de macrófagos no ligamento largo (Figuras 19E-H). A população de macrófagos nestes animais é significativamente diferente ($p < 0,001$) do grupo de animais autotransplantados tratados ou não com drogas (Figura 19I).

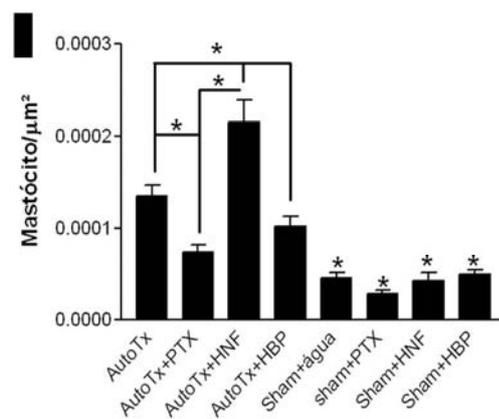
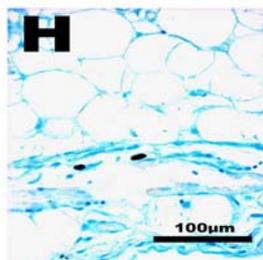
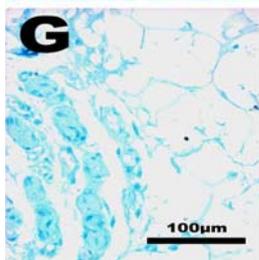
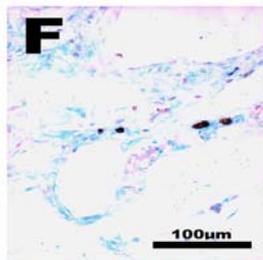
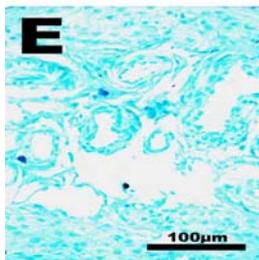
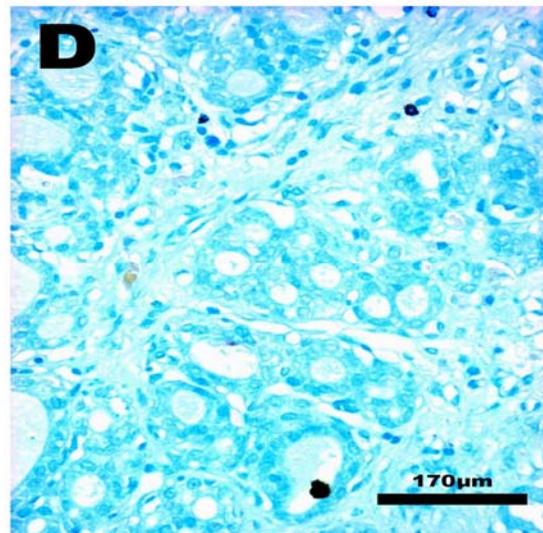
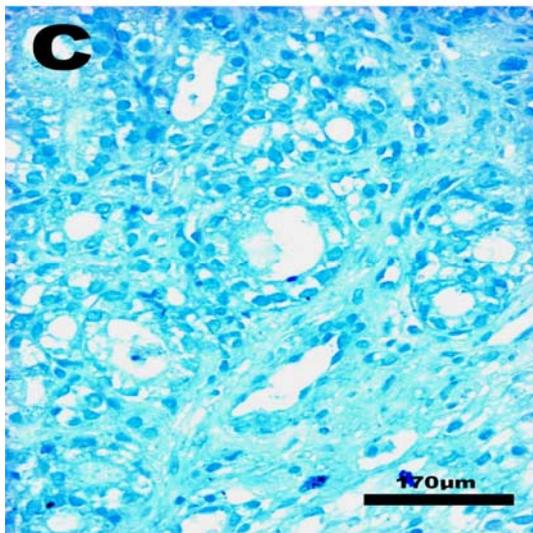
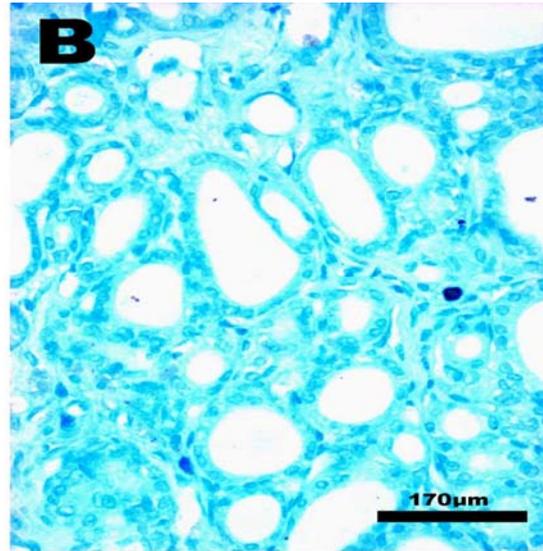
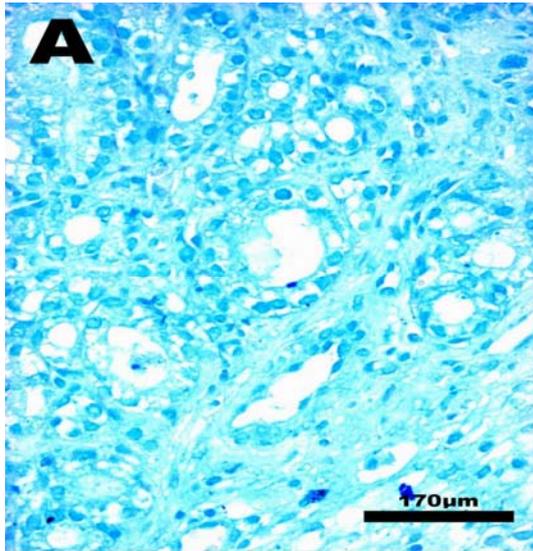
5.9. Distribuição e representação gráfica da densidade numérica de mastócitos.

A população de mastócitos nos animais submetidos ao autoimplante de tireóide localizava-se preferencialmente nos septos interfoliculares e ligamento largo (Figura 20 A). Em relação aos animais autotransplantados não tratados a PTX reduziu significativamente ($p < 0,05$) a densidade de mastócitos (Figuras 20B e 20I) a HNF levou ao aumento ($p < 0,001$) (Figuras 20C e 20I) e a HBP não alterou ($p > 0,05$) a densidade populacional dessas células (Figuras 20D e 20I).

Não houve diferença significativa na densidade de mastócitos entre os animais dos grupos falso-operados tratados com veículo, PTX, HNF e HBP quando comparados entre si (Figuras 20E-I).







6. Discussão

O modelo de autotransplante da tireóide escolhido para o estudo do efeito da HNF, HBP e da PTX sobre a angiogênese induzida, se mostrou eficaz para a caracterização *in vivo* do papel destas moléculas neste processo. Como já documentado, é um modelo de fácil manipulação, que permite a viabilidade do autotransplante (MOTA et al, 1999; ROY et al, 2003; MOTA et al, 2004). Em cerca de 20 horas o fluxo sanguíneo no interior do tecido ectópico é restabelecido e a neovascularização se torna evidente em uma semana (HOBBS & CLIFF, 1971). Nossos achados são, em parte, semelhantes ao de MOTA e colaboradores (1999 e 2004), que demonstraram haver edema e infiltrado inflamatório mononuclear no interior do tecido transplantado. Apesar de estes autores relatarem que o implante da tireóide na raiz do mesentério é capaz de manter a arquitetura celular e folicular com ausência de necrose ou de absorção dos implantes, nossos resultados diferiram em parte desses achados. Notamos a presença de áreas rarefeitas no grupo controle (autotransplante) e, mais acentuadamente, nos grupos tratados. Em modelo de implantação de folículos tireoidianos no fígado, pela veia porta, DOMBROWSKI e colaboradores (2000) verificaram que animais não tireoidectomizados apresentaram zonas de fibrose nos implantes três semanas após a cirurgia, o que não ocorreu nos animais tireoidectomizados. Segundo estes autores isto é devido aos níveis de TSH sérico no limite inferior da normalidade nos animais não tireoidectomizados. O aumento do TSH sérico, induzido pela tireoidectomia, seria uma pré-condição para a persistência e crescimento dos transplantes. Infelizmente não foi possível verificar os níveis hormonais no nosso estudo. MOTA e colaboradores (2004) verificaram anteriormente que no auto-implante de tireóide na raiz do mesentério não houve modificações significativas dos níveis de T3 e T4, porém, os níveis de TSH estavam elevados.

A angiogênese é um processo de extrema importância na manutenção do autotransplante de tireóide no ligamento largo do útero, pois a glândula necessita de nova rede vascular para se regenerar e diferenciar-se. Um importante mediador da angiogênese é o VEGF, uma glicoproteína que estimula a proliferação e a migração das células endoteliais e aumenta a permeabilidade vascular (FERRARA et al, 1997). O equilíbrio entre os fatores estimuladores e os fatores inibidores da angiogênese é essencial para a formação de vasos sanguíneos funcionais.

Para a verificação da modulação do processo de formação de novos vasos após a realização do implante utilizamos como marcador de células endoteliais a técnica histoquímica para detecção da lectina *Griffonia simpliciflora* biotinizada. O endotélio vascular, apesar de ter uma morfologia semelhante nos diferentes vasos sanguíneos, é heterogêneo não só em relação a sua estrutura como sob o ponto de vista fisiológico, metabólico e imunológico (KUMAR et al, 1987). Aliado a isto, a sua identificação por meio de técnicas de imunolocalização apresenta problemas.

A detecção de antígenos nos tecidos depende de vários fatores, como duração e tipo de fixação, métodos de processamento e inclusão, da preservação do antígeno na superfície da célula (ISMAILA et al, 2003). Uma vez que as células endoteliais apresentam glicocálice de superfície constituído principalmente de resíduos oligossacarídicos das glicoproteínas da membrana, lectinas específicas têm sido aplicadas para a identificação de células endoteliais de diversos órgãos e animais (ALROY et al, 1987; LAITINEN, 1987; LAWRENSON et al, 2000). Após testes realizados com diversas lectinas (resultados não mostrados) a *Griffonia simpliciflora agglutinin-I* (GSA-I), apesar de não identificar todos os endotélios (LAITINEN, 1987; PORTER et al, 1990; SMOLKOVA et al, 2001; JOHANSSON et al, 2006), foi a que melhor exibiu a rede microvascular no ligamento largo e no autoimplante de tireóide.

O tratamento com PTX levou, como esperado, à diminuição da densidade capilar. É bem conhecido o fato de que a PTX é um potente agente antiinflamatório, capaz de diminuir a ativação e/ou recrutamento de macrófagos e mastócitos (SCHMIDT-CHOUDHURY et al, 1996; KORHONEN et al, 2004) ou modular mediadores envolvidos na inflamação e células capazes de afetar diretamente ou indiretamente a produção e/ou regulação ou ativação do VEGF (CHEN et al, 2006; COIMBRA et al, 2006). A importância dos macrófagos na angiogênese é demonstrada em situações de depleção de monócitos/macrófagos e utilização de animais nocautes para MCP-1. Em modelo de angiogênese induzida pelo IL-1 β verificou-se a supressão da angiogênese e da infiltração macrofágica (HUANG et al, 2001; LOW et al, 2001). O mesmo não ocorreu na depleção de neutrófilos ou linfócitos no mesmo modelo (NAKAO et al, 2005).

Durante a inflamação, os vasos em formação permitem o afluxo de nutrientes e de células inflamatórias que liberam citocinas e fatores de crescimento necessários para a angiogênese. Os neutrófilos, que surgem inicialmente no processo inflamatório, produzem uma série de fatores angiogênicos, incluindo VEGF (GAUDRY et al, 1997). Segue-se a vinda de macrófagos que, quando ativados, influenciam a cascata da angiogênese, pela produção de fatores que a estimulam FGFb, PDGF, VEGF, de outros fatores de crescimento como o GCSF, FGFb, TGF- β que modulam a secreção e ativação de proteases, além de citocinas como a IL-1 e IL-8 que atuam diretamente estimulando a migração e/ou proliferação de células endoteliais ou a mediação de (SUNDERKÖTTER et al, 1994).

Os mastócitos são células efetoras do sistema imune, altamente especializadas, de importância tanto para a defesa do hospedeiro como em reações alérgicas. Estão distribuídas por todo o organismo e são freqüentemente encontradas em associação com os vasos sanguíneos e filetes nervosos. Nos ratos, são identificados pelo menos duas

populações: os mastócitos do tecido conjuntivo, população predominante na pele e cavidade peritoneal e os mastócitos das mucosas, encontrados principalmente no pulmão e mucosa intestinal. Os mastócitos do tecido conjuntivo se coram pela safranina, contém altas quantidades de histamina e armazenam em seus grânulos, predominantemente as proteoglicanas de heparina. Os mastócitos das mucosas contêm predominantemente proteoglicanas de condroitina sulfato, não se coram pela safranina e contêm níveis baixos de histamina. Além disso, os mastócitos sintetizam e armazenam em seus grânulos secretórios, grandes quantidades de serina proteases, as quimases e as triptases, ambas presentes nos grânulos de ratos (METCALF et al, 1997). Além disso, há uma série de evidências de que os mastócitos participam da regulação da angiogênese fisiológica e patológica. Muitas substâncias biologicamente ativas contidas nos grânulos dos mastócitos participam em vários estágios da angiogênese. Enzimas como a catepsina G, elastase e colagenase são liberadas dos grânulos dos mastócitos e participam na primeira etapa da angiogênese. A triptase, também presente nos grânulos, leva a ativação de metaloproteinases e do ativador do plasminogênio causando a degradação da MEC; o TGF- β aumenta a ação do ativador do plasminogênio; a IL-8 produzida pelos mastócitos, aumenta a expressão de ICAM-1 nas células endoteliais, responsável pela adesão entre elas durante a neoformação vascular; a heparina, estimula a migração e proliferação endotelial e torna o FGFb protegido da proteólise ao se ligar a ele além de ativá-lo; o FGFb e o VEGF estimulam a migração e proliferação das células endoteliais. Por outro lado, fatores angiogênicos como o PDGF-AB, o VEGF e o FGFb estimulam a migração mastocitária (GRUBER et al, 1995).

O tratamento dos animais com HNF levou a diminuição significativa da densidade vascular no implante, o que era esperado e está em concordância com a literatura (NORRBY, 1993; TAKAHASHI et al, 2005). Porém a HBP não modulou a angiogênese.

Em relação à interferência da heparina sobre a angiogênese, os resultados são contraditórios.

NORRBY (1993) verificou que a resposta angiogênica da heparina está relacionada ao seu peso molecular. A fração de 2,4 kDa da HNF (PM de cerca de 15 kDa) suprime a angiogênese em cerca de 46% ($p < 0,001$) enquanto que a fração de 22 kDa estimula a angiogênese em 123% ($p < 0,01$) quando comparadas a HNF. Uma fração de 5,0 kDa de heparina derivada da mucosa intestinal de porco levou a supressão da angiogênese mediada por VEGF de forma significativa mas não as frações de 2,5 ou de 16,4 kDa respectivamente (NORRBY & OSTEGAARD, 1997).

É bem estabelecido que as heparinas interfiram em várias etapas do processo angiogênico. KHORANA e colaboradores (2003), em cultura de células endoteliais da veia umbilical, demonstraram que a HBP de 6,0 kDa inibiu em 94% a proliferação endotelial enquanto que a fração de 3,0 kDa inibiu em 60% e a HNF 58%. Além disso, há relatos de que as heparinas também possam modular a formação do tubo endotelial. As frações de 3,0 e 6,0 kDa levaram a diminuição significativa da formação do tubo em matrigel enquanto que a HNF não teve efeito sobre este processo (KHORANA et al, 2003). A HBP foi capaz de aumentar a formação de tubo endotelial induzido pelo FGFb através da super-expressão de integrina- $\alpha 6$ dependente de heparan sulfato (CHABUT et al, 2003). Devido a este fato, torna-se necessário em nosso estudo verificar se a angiogênese em nosso modelo não seria, em parte, dependente de FGFb.

O efeito das heparinas sobre a angiogênese está relacionado principalmente à interferência com a atividade dos fatores de crescimento angiogênicos. A heparina modula a interação com o VEGF165 com seus receptores solúveis e celulares de alta afinidade, de forma complexa dependente das propriedades de ligação do fator de crescimento, do tipo específico de receptor envolvido e da quantidade e composição das

moléculas de heparina (TESSLER et al 1994; VIGNOLI et al 2006). Além disso, parece que a potência das heparinas, nos diferentes ensaios, é uma função direta do tamanho (TESSLER et al, 1994; RHOGANI et al 1994; COLTRINI et al 1994). As heparinas também modulam a angiogênese através de sua função anticoagulante, interferindo com enzimas proteolíticas, com a ligação dos fatores com a matriz extracelular ou mesmo através de seus efeitos sobre o pericito. O efeito sobre a angiogênese, via a função anticoagulante das heparinas, são principalmente inibitórias.

O VEGF é um dos fatores mais importantes na neoformação vascular tanto durante a embriogênese quanto em adultos. Nossa hipótese no presente estudo é de que a sua expressão seria modificada pela PTX, HNF e a HBP. Através dos nossos resultados verificamos que o VEGF está expresso nos tireócitos e em capilares intra-parenquimatosos.

WANG e colaboradores (1998) verificaram que a tireóide normal apresenta imunoreatividade para o VEGF somente no endotélio vascular e no tecido estromal interfolicular. Com a indução de bócio hiperplásico a sua expressão aumenta na tireóide, com reatividade intensa nos folículos tireoidianos e células endoteliais e menos aparente no estroma interfolicular (WANG et al, 1998). KLEIN e colaboradores (1999), por outro lado, demonstram fraca intensidade de VEGF, também por imunohistoquímica, no folículo tireoideano e em poucos vasos de pequeno e médio calibre. No nosso estudo, o implante de tireóide no ligamento largo apresentou intensa expressão de VEGF nos folículos tireoideanos, como observado por WANG e colaboradores (1998) após a indução do bócio hiperplásico. A análise histológica o autotransplante não demonstra, após 15 dias, aspecto hiperplásico da tireóide implantada, o que nos faz supor que o aumento da expressão de VEGF se deva ao processo hipóxico instalado durante o procedimento cirúrgico e nas fases iniciais, até o restabelecimento da vascularização no tecido.

O tratamento dos animais autotransplantados com PTX, HNF e HBP reduziu a imunexpressão de VEGF. AMIRKHOSRAVI e colaboradores (1998) demonstraram que a PTX é capaz de inibir a secreção de VEGF a partir de diversas linhagens de células malignas; apesar de o mesmo não ter sido verificado em células normais é bem possível que a PTX também tenha regulado a expressão de VEGF nos tireócitos, uma vez que a maior densidade de expressão de VEGF no nosso modelo é dependente das células epiteliais. O tratamento com PTX levou, como esperado, à diminuição da densidade capilar além de levar a diminuição da imunexpressão de VEGF. Em comparação com o tecido transplantado houve diminuição da intensidade da imunomarcagem nas células epiteliais tireóideas. Além disso, a diminuição da rede microvascular no interior do implante e no ligamento largo também contribuíram para esta diminuição.

Quando comparados os autotransplantes parciais da glândula tireóide tratados com diferentes drogas, observamos que a PTX, a HBP e a HNF, reduziram a expressão de VEGF, com a HBP apresentando um efeito maior, conforme descrito por SOKER e colaboradores (1994). Eles demonstraram que somente a HBP, mas não a HNF, pode inibir a ligação do VEGF com seus receptores. Em estudo da angiogênese *in vivo*, JAYSON e colaboradores (1997) também observaram a inibição de VEGF no tratamento com HBP comparado com a HNF. TAKAHASHI e colaboradores (2005) em modelo de xenotransplante de tumor de camundongos tratados com HNF verificaram que a HNF inibiu a angiogênese e o crescimento tumoral. Com este tipo tumoral foi verificado que houve inibição da produção de VEGF *in vivo* e *in vitro* pelos três tipos de heparina. Além disso, ITO & CLAESSEON-WELSH (1999) usando ensaio *in vitro* com células endoteliais de porco, que expressam endogenamente o heparan sulfato, descreveram que a heparina modula a ligação do VEGF ao VEGFR-1 de forma negativa.

O tratamento dos animais com HNF promoveu a redução significativa de macrófagos

e aumento da população de mastócitos. Não há até o momento referências sobre a modulação da população de mastócitos pelas heparinas. A redução da população macrofágica pode ser atribuída ao efeito antiinflamatório das heparinas, inibição da adesão dos leucócitos aos capilares ou ainda pela inibição da ativação das células imunes (CASTELLIA et al, 2004). Por outro lado, o efeito da HBP levou a diminuição significativa do número de mastócitos e não alterou a população de macrófagos. Anteriormente foi verificado que o uso da HBP acarretou um aumento da população macrofágica em modelo de obstrução ureteral unilateral (PECLY et al, 2006).

7. Conclusões

1. A vascularização do autotransplante parcial de tireóide no ligamento é fundamental para a glândula se regenerar.
2. A angiogênese induzida pelo autotransplante de tireóide no ligamento largo da rata é, em parte mediada pelo VEGF.
3. A PTX, HNF e HBPM levam a diminuição da produção de VEGF sobre a angiogênese induzida pelo autotransplante parcial de tireóide no ligamento largo do útero da rata.
4. A PTX e a HNF levaram a diminuição significativa da densidade macrofágica no ligamento largo com o autotransplante de tireóide.
5. Os macrófagos e mastócito parecem ter uma importante função na reação induzida pelo autotransplante de tireóide no ligamento largo.

8. Referências Bibliográficas

ALROY J , GOYAL V, SKUTEISKY E. Lectin histochemistry of mammalian endothelium. *Histochemistry* 86:603-607, 1987.

AMBRUS JL, AMBRUS CM, TOUMBIS CA, FORGACH P, KARAKOUSIS CP, NISWANDER P, LANE W. Studies on tumor induced angiogenesis. *J Med* 22(6):355-369, 1991.

AMIRKHOSRAVI A, MEYER T, WARNES G. Pentoxifylline inhibits hypoxia-induced upregulation of tumor cell tissue factor and vascular endothelial growth factor. *Thromb Haemost* 80:598–602, 1998.

AMIRKHOSRAVI A, MOUSA SA, AMAYA M, FRANCIS JL. Antimetastatic effect of tinzaparin, a low-molecular-weight heparin. *JThromb Haemost.* 1(9):1972-1976, 2003.

ASAHARA T, TAKAHASHI T, MASUDA H, KALKA C, CHEN D, IWAGURO H, INAI Y, SILVER M, ISNER J. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J* 18: 3964-3972, 1999.

BAUER KA, BARZEGAR S, ROSENBERG RD. Influence of anticoagulants used for blood collection on plasma prothrombin fragment, F1 + 2 measurements. *Thromb Res* 15;63(6):617-628, 1991.

BAUER E, SUMPIO J, TIMOTHY R, ALAN D. Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 1508-1512, 2002.

BONEU B. Glycosaminoglycans: clinical use. *Semin Thromb Hemost* 22(2):209-212, 1996.

BONEU B. Low molecular weight heparins: are they superior to unfractionated heparins to prevent and to treat deep vein thrombosis? *Thromb Res* 15:113-120, 2000.

BROUTY-BOYE D, ZETTER BR. Inhibition of cell motility by interferon. *Science.* 208:516-518, 1980.

BYRNE AM, BOUCHIER-HAYES DJ, HARMEY JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med* 9(4):777-794, 2005.

CALLEJO J, JAUREGI MT, VALLS C, FERNANDEZ ME, CABRE S, LILLA JM. Heterotopic ovarian transplantation without vascular pedicle in syngeneic Lewis rats: six-month control of the estradiol and follicle-stimulating hormone concentrations after intraperitoneal and subcutaneous implants. *Fertil Steril* 72: 513 – 517, 1999

CARMELIET P, FERREIRA V, BREIER G. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380:435–439, 1996.

CARMELIET P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 9: 653–660, 2005.

CASTELLIA R, PORROA F, TARSIA P. The heparins and cancer: review of clinical trials and biological properties. *Vas Med* 9: 205-213, 2004.

CÉBE-SUAREZ S, ZEHNDER-FJÄLLMAN A, BALLMER-HOFER K. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell Mol Life Sci* 63: 601-615, 2006.

CHABUT D, FISCHER A-M, COLLIEC-JOUAULT S, LAURENDEAU I, MATOU S, LE BONNIEC B, HELLEY D. Low Molecular Weight Fucoïdan and Heparin Enhance the Basic Fibroblast Growth Factor-Induced Tube Formation of Endothelial Cells through Heparan Sulfate-Dependent α_6 Overexpression. *Mol Pharmacol* 64: 696-702, 2003.

CHAN SY, POLLARD M. Metastasis-enhancing effect of heparin and its relationship to a lipoprotein factor. *J Natl Cancer Inst* 64(5):1121-1125, 1980.

CHEN JX, ZENG H, LAWRENCE ML, BLACKWELL TS, MEYRICK B. Angiopoietin-1-induced angiogenesis is modulated by endothelial NADPH oxidase, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H1563–H1572, 2006.

COIMBRA R, MELBOSTAD H, LOOMIS W, PORCIDES RD, WOLF P, TOBAR M, HOYT DB. LPS-induced acute lung injury attenuated by phosphodiesterase inhibition: effects on proinflammatory mediators, metalloproteinases, NF- κ B, and ICAM-1 expression. *J Trauma* 60: 115-125, 2006.

COLTRINI D, RUSNATI M, ZOPPETTI G, ORESTE P, GRAZIOLI G, NAGGI A. Different effects of mucosal, bovine and chemically modified heparin on selected biological properties of basic fibroblast growth factor. *Biochem J* 303:583–590, 1994.

CROSS MJ, CLAESSION-WELSH L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci* 22: 201-207, 2001.

DAVIS S, ALDRICH TH, JONES PF, ACHESON JA, COMPTON DL, JAIN V, RYAN TE, CZESLAW BJ, RADZIEJEWSKI JC, MAISONPIERRE PC, YANCOPOULOS GD. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning, *Cell* 87: 1161–1169, 1996.

DOMBROWSKI F, KLOTZ L, HACKER HJ, LI Y, KLINGMULLER D, BRIX K, HERZOG V, BANNASCH P. Hyperproliferative hepatocellular alterations after intraportal transplantation of thyroid follicles. *Am J Pathol* 156: 99-113, 2000.

FERRARA N, HOUCK K, JAKEMAN L, IEUNG DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 13: 18-32, 1992.

FERRARA N, CARVER-MOORE K, CHEN H. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380:439–442, 1996.

FERRARA N, DAVIS-SMYTH T. The biology of vascular endothelial growth factor.

Endoc Rev 18:4-25, 1997.

FERRARA N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell*.2001;280:1358-1366.

GAUDRY M, BRÉGERIE O, ANDRIEU V, EL BENNA J, POCIDALO MA, HAKIN J. Intracellular pool vascular endothelial growth factor in human neutrophils. *Blood* 90:4153-4161, 1997.

GOOD DJ, POLVERINI PJ, RASTINEJAD F, LE BEAU MM, LEMONS RS, FRAZIER WA, BOUCK NP. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of trombospondin. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6624-6628, 1990.

GOTO F, GOTO K, WEINDEL K, FOLKMAN J. Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Lab Invest* 69(5):508-517, 1993.

GRUBER BL, MARCHESE MJ, KEW R. Angiogenic factors stimulate mast-cell migration. *Blood* 1995; 86: 2488-2493 Levi-Schaffer F & Pe'er J. Mast cell and angiogenesis. *Clin Exp Allergy* 31: 521-524, 2001.

GUDE RP, BINDA MM, BOQUETE AL, BONFIL RD. Inhibition of endothelial cell proliferation and tumor-induced angiogenesis by pentoxifylline. *Journal Cancer Res Clin Oncol* 127:625-630, 2001.

GUDE RP, BINDA MM, LOPEZ PRESAS H, KLEIN-SZANTO AJP, BONFIL RD. Studies on the mechanisms responsible for inhibition of experimental metastasis of B-16 F-10 murine melanoma by pentoxifylline. *Journal Biomed Science* 6:133-141, 1999.

GUDE RP, INGLE AD, RAO SGA. Inhibition of lung homing of B-16 F-10 by pentoxifylline, a microfilament depolymerising agent. *Cancer Lett* 106:171-176, 1996.

HALSTED WS. Auto- and homotransplantations in dogs and parathyroid glands. *J Exp Med* 2: 175, 1909.

HANAHAN D, FOLKMAN J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86: 353-364, 1996.

HARENBERG J. Pharmacology of low molecular weight heparins. *Semin Thromb Hemost* 16:12-18, 1990.

HEMO I, ITIN A, PE'ER J, STONE J, KESHET E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* 1:1024-1028, 1995.

HIRSH J, RASCHKE R. Heparin and low-molecular-weight heparin. *Chest* 126:188S-203S, 2004.

HOEBEN A, LANDUYT B, HIGHLEY MS, WILDIERS H, VAN OOSTEROM AT, DE

BRUIJN EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev.* 56(4):549-580, 2004.

HOBBS JB, CLIFF DWJ. Observations on tissue grafts established in rabbit ear chambers a combined light and electron microscopic study. *J Exp Med* 134: 964-985, 1971.

HUANG DR, WANG J, KIVISAKK P, ROLLINS BJ, RANSOHOFF RM. Absence of monocyte chemoattractant protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and antigen-specific T helper cell type 1 immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 193: 713-726, 2001.

HYDER SM, STANCEL GM. Regulation of angiogenic growth factors in the female reproductive tract by estrogens and progestins. *Mol Endocrinol* 13(6):806-811, 1999.

INGBER, DE. Mechanical signaling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology. *Circ Res* 91, 877–887, 2002.

IRUELA-ARISPE ML, PORTER P, BORNSTEIN P, SAGE H.. Thrombospondin-1, an inhibitor of angiogenesis is a regulated by progesterone in the human endometrium. *J Clin Invest* 97:403-412, 1996.

IRUELA-ARISPE ML, DVORAK HF. Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors. *Thromb Haemos* 1: 672-677, 1997.

ISHIWATA T, IINO Y, TAKEI H, OYAMA T, MORISHITA Y. Tumor angiogenesis as an independent prognostic indicator in human papillary thyroid carcinoma. *Oncol Rep* 5(6):1343-1348, 1998.

ISMAILA JA, POPPAA V, KEMPERB LE, SCATENAB M, GIACHELLIB CM, COFFINC JD, CHARLES E. MURRYA CE. Immunohistologic labeling of murine endothelium. *Cardio Patho* 12: 82– 90, 2003.

ITO N, CLAEISSON-WELSH L. Dual effects of heparin on VEGF binding to VEGF receptor-1 and transduction of biological responses. *Angiogenesis* 3: 159-166, 1999.

ITOH N. The Fgf Families in humans, mice, and zebrafish: their evolutionary processes and roles in development, metabolism, and disease. *Biol. Pharm. Bull.* 30: 1819—1825, 2007.

JAYSON GC, GALLAGHER JT. Heparin oligosaccharides: inhibitors of the biological activity of bFGF on Caco-2 cells. *Br J Cancer.* 75(1):9-16, 1997.

JOHANSSON M, ANDERSSON A, CARLSSON P-O, JANSSON L. Perinatal development of the pancreatic islet microvasculature in rats. *J. Anat* 208: 191–196, 2006.

JOSEPH I, ISAACS JT. Macrophage role in the anti-prostatic cancer response to one class of antiangiogenic agents. *Jour Nat Canc Inst* 21;1648-1653, 1998.

KHORANA AA, SAHNI A, ALTLAND OD, FRANCIS CW. Heparin Inhibition of Endothelial Cell Proliferation and Organization Is Dependent on Molecular Weight. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23:2110-2115, 2003.

KIERNAN JA. Histological & histochemical methods: theory and practice. pergamon press. *Oxford* 2: 433, 1990.

KLAGSBRUM M and D'AMORE PA. Regulators of angiogenesis. *Annu Rev Physiol* 53:217-239, 1991.

KLEIN M, PICARD E, VIGNAUD J-M, MARIE B, BRESLER L, TOUSSAINT B, WERYHA G, DUPREZ A, LECLÈRE J. Vascular endothelial growth factor gene and protein: strong expression in thyroiditis and thyroid carcinoma. *J Endocrinol* 157: 5–12, 1998.

KORHONEN K, KIURU A, SVEDSTRÖM E, KÄÄPÄ P. Pentoxifylline reduces regional inflammatory and ventilatory disturbances in meconium-exposed piglet lungs. *Pediatr Res* 56: 901-906, 2004.

KRUGER A, MARTULLA B, WOLZT M. Short-term oral pentoxifylline use increases choroidal blood flow in patients with age related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 116:27–30, 1998.

KUMAR RK, TRUSCOTT JY, SMITH GJ, LYKKE AW. Lymphokine-induced phenotypic changes in cells of a type 2 pneumocyte-related strain: characterization of activity in mitogen-stimulated spleen cell supernatants. *Exp Lung Res* 13(2):127-40, 1987.

LAITINEN L. *Griffonia simplicifolia* lectins bind specifically to endothelial cells and some epithelial cells in mouse tissues. *Histochemical J* 19: 225—234, 1987.

LAWRENSON JG, CASSELLA JP, HAYES AJ, FIRTH JA, G. ALLT G. Endothelial glycoconjugates: a comparative lectin study of the brain, retina and myocardium. *J. Anat* 196: 55-60, 2000.

LINDAHL P, JOHANSSON BR, LEVÉEN P, BETSHOLTZ C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* 277(5323): 242-245, 1997.

LOW QE, DRUGEA IA, DUFFNER LA, QUINN DG, COOK DN, ROLLINS BJ, KOVACS EJ, DIPIETRO LA. Wound healing in MIP-1alpha(-/-) and MCP-1(-/-) mice. *Am J Pathol.*159:457-463, 2001.

MAJACK RA, COOK SC, BORNSTEIN P. Control of smooth muscle cell growth by components of the extracellular matrix: autocrine role for trombospondin. *Proc Natl Acad Sci* 83:9050-9054, 1986.

MALGORZATA M, ISPANOVIC E, JENNIFER L, HAAS T. Regulators of angiogenesis and strategies for their therapeutic manipulation. *Intern Jour Bioche & Cell Bio* 38: 333–357, 2006.

MANY MC, DENEJF JF, HAUMONT S. Precocity of the endothelial proliferation during a

course of rapid goitrogenesis. *Acta Endocrinol* 105(4):487-491, 1984.

METCALF DD, BARAM D, MEKORI YA. Mast cells. *Physiol Rev* 77: 1033-1079, 1997.

MILLAUER B, WIZIGMANN-VOOS S, SCHNÜRCH H, MARTINEZ R, MOLLER NP, RISAU W, ULLRICH A. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 72: 835-846, 1993.

MILKIEWICZ M, ISPANOVIC E, DOYLE JL, HAAS TL. Regulators of angiogenesis and strategies for their therapeutic manipulation. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 333-357, 2006.

MORRIS TA, JACOBSON A, MARSH JJ, LANE JR. Pharmacokinetics of UH and LMWH are similar with respect to antithrombin activity. *Thromb Res* 115:45-51, 2005.

MOTA JCN, SILVA LA, ANDRADE ZA, BARBOSA AJr. Aspectos morfológicos dos autotransplantes de tireóide da rata. *Col Bras Cir* 26: 135-139, 1999.

MOTA JCN, SILVA AL, BARBOSA Jr AA, NASCIMENTO M. Aspectos funcionais e imunológicos do transplante autólogos da tireóide em ratos. *Acta Cirúrgica Bras* . 19: 630-636, 2004.

MULLER R. Pentoxifylline, a biomedical profile. *Jour Med* 10:307-329, 1979.

MURAYAMA T, TEPPER OM, SILVER M, MA H, LOSORDO DW, ISNER JM, ASAHARA T, KALKA C. Determination of bone marrow-derived endothelial progenitor cell significance in angiogenic growth factor-induced neovascularization. *Exp Hematol* 3: 967-972, 2002.

NAKAO S, KUWANO T, TSUTSUMI-MIYAHARA C, UEDA S, KIMURA YN, HAMANO S, SONODA KH, SAIJO Y, NUKIWA T, STRIETER RM, ISHIBASHI T, KUWANO M, ONO M. Infiltration of COX-2-expressing macrophages is a prerequisite for IL-1 beta-induced neovascularization and tumor growth. *J Clin Invest* 115: 2979-2991, 2005.

NORRBY K. Heparin and angiogenesis: a low-molecular-weight fraction inhibits and a high-molecular-weight fraction stimulates angiogenesis systemically. *Haemostasis* 1:141-149, 1993.

NORRBY K, OSTERGAARD P. A 5.0-kD heparin fraction systemically suppresses VEGF165-mediated angiogenesis. *Int J Microcirc Clin Exp* 17(6):314-21, 1997.

NUGENT MA, IOZZO RV. Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol* 32: 115-120, 2000.

OHKOSHI M, AKAGAWA T, NAKAJIMA M. Effects of serine protease inhibitor FOY-305 and heparin on the growth of squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 13(4):963-966, 1993.

O'REILLY MS, HOLMGREN L, SHING Y, CHEN C, ROSENTHAL RA, MOSES M, LANE WS, CAO Y, SAGE EH, FOLKMAN J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that

mediates the suppression of metastasis by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 79:315-328, 1994.

O'REILLY MS, BOEHM T, SHING Y, FUKAI N, VASIOS G, LANE WS, FLYNN E, BIRKHEAD JR, OLSEN BR, FOLKMAN J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88:277-285, 1997.

ORNITZ DM, YAYON A, FLANAGAN JG, SVAHN CM, LEVI E, LEDER P. Heparin is required for cell-free binding of basic fibroblast growth factor to a soluble receptor and for mitogenesis in whole cells. *Mol Cell Biol* 12(1):240-247, 1992.

OTROCK ZK, MAHFOUZ RAR, MAKAREN JA, SHAMSEDDINE AI. Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cells Mol Dis* 39: 212-220, 2007.

PAPAZIOGAS B, ANTONIADIS A, LAZARIDIS C, MAKRIS J, KOTAKIDOU R, PARASKEVAS G, PAPZIOGAS T. Functional capacity of the thyroid autograft: na experimental study. *J Surg Res*.103: 223-227, 2002.

PECLY IMD, GONÇALVES RG, RANGEL EP, TAKIYA CM, TABOADA FS, MARTINUSSO CA, PAVÃO MSG, LEITE JR M. Effects of low molecular weight heparin in obstructed kidneys: decrease of collagen, fibronectin and TGF-*b*, and increase of chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans and macrophage infiltration. *Nephrol Dial Transplant* 21: 1212–1222, 2006.

PERTOVAARA L, KAIPAINEN A, MUSTONEN T, ORPANA A, FERRARA N, SAKSELA O, ALITALO K. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem* 269: 6271–6274, 1994.

PEPPER MS. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 1104–1117, 2001.

PORTER GA, PALADE GE, MILICI AJ. Differential binding of the lectins Griffonia simplicifolia I and Lycopersicon esculentum to microvascular endothelium: organ-specific localization and partial glycoprotein characterization. *Eur J Cell Biol* 51: 85-95, 1990.

PROSS M, LIPPERT H, MISSELWITZ F, NESTLER G, KRÜGER S, LANGER H, HALANGK W, SCHULZ HU. Low-molecular-weight heparin (reviparin) diminishes tumor cell adhesion and invasion in vitro, and decreases intraperitoneal growth of colonadenocarcinoma cells in rats after laparoscopy. *Thromb Rev* 110(4):215-220, 2003.

PROSS M, LIPPERT H, NESTLER G, KUHN R, LANGER H, MANTKE R, SCHULZ HU. Effect of low molecular weight heparin on intra-abdominal metastasis in a laparoscopic experimental study. *Int J Colorectal Dis* 19(2):143-146, 2004.

RABKIN JM, OLYAEI AL, ORLOFF SL, GEISLER SM, WAHOFF DC, HERING B J, SUTHERLAND DE. Distant processing of pancreas islets for autotransplantation following total pancreatectomy. *Am J Surg* 177: 423 -427,1999.

Ramsden JD. Angiogenesis in the thyroid gland. *Jour Endoc* 166, 475–480, 2000.

RISAU W. Mechanisms of angiogenesis. *Nat* 386:671-674, 1997.

ROGHANI M, MANSUKHANI A, DELL'ERA P, BELLOSTA P, BASILICO C, RIFKIN DB, Heparin increases the affinity of basic fibroblast growth factor for its receptor but is not required for binding. *J Biol Chem* 269:3976-3984, 1994.

ROY PG, SAUND MS, THUSOO TK, ROY D, SANKAR R. Fate of human thyroid tissue autotransplants. *Surg Today* 33: 571-576, 2003.

ROSS MH, ROMRELL LJ, KAYE GI. *Histology: a text and atlas*. 3: 823, 1995.

RUEGG C, DORMOND O, MARIOTTI, A. Endothelial cell integrins and COX-2: mediators and therapeutic targets of tumor angiogenesis. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1654: 51-67, 2004.

SAMLASKA CP, WINFIELD EA. Pentoxifylline. *Jour Am Acad Dermatol* 30:603-621, 1994.

SATCHI-FAINARO R, MAMLUK R, WANG L, SHORT SM, NAGY JA, FENG D, DVORAK AM, DVORAK HF, PUDER M, MUKHOPADHYAY D, FOLKMAN J. Inhibition of vessel permeability by TNP-470 and its polymer conjugate, caplostatin. *Cancer Cell* 7: 252-255, 2005.

SATO K, YAMAZAKI K, SHIZUME K, KANAJI Y, OBARA T, OHSUMI K, DEMURA H, YAMAGUCHI S, SHIBUYA M. Stimulation by thyroid-stimulating hormone and Grave's immunoglobulin G of vascular endothelial growth factor mRNA expression in human thyroid follicles in vitro and flt mRNA expression in the rat thyroid in vivo. *J Clin Invest* 96(3):1295-1302, 1995.

SCHMIDT-CHOUDHURY A, FURUTA GT, LAVIGNE JA, GALLI SJ, WERSHIL BK. The regulation of tumor necrosis factor-alpha production in murine mast cells: pentoxifylline or dexamethasone inhibits IgE-dependent production of TNF-alpha by distinct mechanisms. *Cell Immunol* 10;171(1):140-146, 1996.

SEBAG J, TANG M, BROWN S, SADUN AA, CHARLES MA. Effects of pentoxifylline on choroidal blood flow in nonproliferative diabetic retinopathy. *Angiology* 45:429-433, 1994.

SHALABY F, HO J, STANFORD WL, FISCHER KD, SCHUH AC, SCHWARTZ L, BERNSTEIN A, ROSSANT J. A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* 89: 981-990, 1997.

SMEDS S, WOLLMAN SH. Capillary endothelial cell multiplication in adipose tissue pads on the thyroid during the feeding of thiouracil. *Endocrinology* 112(5):1718-1722, 1983.

SMOLKOVA O, ZAVADKA A, BANKSTON P, LUTSYK A. Cellular heterogeneity of rat vascular endothelium as detected by HPA and GS I lectin-gold probes. *Med Sci Monit* 7: 659-668, 2001.

SMORENBURG SM, VINK R, TE LINTELO M, TIGCHELAAR W, MAAS A, BÜLLER

HR, VAN NOORDEN CJ. In vivo treatment of rats with unfractionated heparin (UFH) or low molecular weight heparin (LMWH) does not affect experimentally induced colon carcinoma metastasis. *Clin Exp Metastasis* 17(5):451-456, 1999.

SOKER S, GOLDSTAUB D, SVAHN CM, VLODAVSKY I, LEVI BZ, NEUFELD G. Variations in the size and sulfation of heparin modulate the effect of heparin on the binding of VEGF165 to its receptors. *Biochem Biophys Res Comm* 203: 1339-1347, 1994.

SONKIN PL, KELLY LW, SINCLAIR SH, HATCHELL DL. Pentoxifylline increases retinal capillary blood flow velocity in patients with diabetes. *Arch Ophthalmol* 111:1647-1652, 1993.

STEVENS A, LOWE J. *Histologia*. V. 878.1995.

SUNDERKÖTTER C, STEINBRINK K, GOEBELER M, BHARDWAJ R, SORG C. Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol* 55: 410-422, 1994.

TAKAHASHI H, EBHARA S, OKAZAKI T, ASADA M, SASAKI H, YAMAYA M. A comparison of the effects of unfractionated heparin, dalteparin and danaparoid on vascular endothelial growth factor-induced tumour angiogenesis and heparanase activity. *Brit J Pharm* 146: 333-343, 2005.

TAYLOR RN, LEOVIC DI, MUELLER MD. Protamine is a inhibitor of angiogenesis. *Nature* 297: 307-312, 1982.

TESSLER S, ROCKWELL P, HICKLIN D, COHEN T, LEVI B Z, WITTE L. Heparin modulates the interaction of VEGF165 with soluble and cell associated flk-1 receptors. *J Biol Chem* 269: 12456-12461, 1994.

TSUJII M, KAWANO S, TSUJI S, SAWAOKA H, HORI M, DUBOIS RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 29;93(5):705-716, 1998.

UEDA T, UEDA T, FUKUDA S. Lipid hydroperoxide induced. TNF α , VEGF, and neovascularization in the rabbit cornea: effect of TNF α inhibition. *Angiogenesis* 1:174 -184, 1997.

VIGLIETTO G, ROMANO A, MANZO G, CHIAPPETTA G, PAOLETTI I, CALIFANO D, GALATI MG, MAURIELLO V, BRUNI P, LAGO CT, FUSCO A, PERSICO MG. Upregulation of the angiogenic factors PIGF, VEGF and their receptors (Flt-1, Flk-1/KDR) by TSH in cultured thyrocytes and in the thyroid gland of thiouracil-fed rats suggest a TSH-dependent paracrine mechanism for goiter hypervascularization. *Oncogene* 27;15(22):2687-2698, 1997.

WALKER RP, PALOYAN E, KELLEY TF, GOPALSAMI C, JAROSZ H. Parathyroid autotransplantation in patients undergoing a total thyroidectomy: a review of 261 patients. *Otolaryngol Head Neck Surg* 111: 258-264, 1994.

WANG JF, MILOSVESKI V, SCHRAMEK C, FONG GH, BECKS GP, HILL DJ. Presence and possible role of vascular endothelial growth factor in thyroid cell growth and function. *J Endocrinol* 157: 5-12, 1998.

WOLLMAN SH, HERVEG JP. Thyroid capsule changes during the development of thyroid hyperplasia in the rat. *Am J Pathol* 93(3):639-654, 1978.

WOLLMAN SH, HERVEG JP, ZELIGS JD, ERICSON LE. Blood capillary enlargement during the development of thyroid hyperplasia in the rat. *Endocrinology* 103(6):2306-2314, 1978.

YAMAZAKI Y, MORITA T. Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. *Mol Divers* 10: 515-527, 2006.

YANCOPOULOS GD, KLAGSBRUN M, FOLKMAN J. Vasculogenesis, angiogenesis, and growth factors: ephrins enter the fray at the border. *Cell* 93: 661–664, 1998.

YASUKO H, LAUREN R, DOREY C. Pentoxifylline inhibition of vasculogenesis in the neonatal rat retinal. *OVS* 41:9, 2000.

ZHANG R, WANG L, ZHANG L, CHEN J, ZHU Z, ZHANG Z. Nitric oxide enhances angiogenesis via the synthesis of vascular endothelial growth factor and cGMP after stroke in the rat. *Circ Res* 92: 308–313, 2003.

ZHANG X, OMAR A, IBRAHIMI OA, OLSEN SK, UMEMORI H, MOHAMMADI M, ORNITZ DM. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family: *the complete mammalian fgf family.* *J Biol Chem* 281: 15694–1570, 2006.

Anexo I

Composição por quilograma da ração

Vitamina A 2.100 UI, Vitamina D³ 400 UI, Riboflavina 1,8 mg, Vitamina E 1,5 mg, ácido Pantotênico 4,83 mg, Niacina 7,98 mg, Vitamina B¹² 8 mcg, Cobalto (Co) 0,18 mg, Iodo (I) 0,30 mg, Cobre (Cu) 1,53 mg, Ferro (Fe) 6,56 mg, Manganês (Mn) 1,30 mg, Zinco (Zn) 11,25 mg.

NÍVEIS DE GARANTIA

Umidade (máxima)	13,0 %
Proteína (mínima)	17,0 %
Extrato Etéreo (mínimo)	3,0 %
Matéria fibrosa (máxima)	16,0 %
Matéria mineral (máxima)	11,0 %
Cálcio (Ca) (máximo)	2,5 %
Fósforo (P) (mínimo)	0,42%
Teor calórico	2300 calorias / kg

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)