

Tíssiana Rachel Rossi Schneider

**ANÁLISE DA VASCULATURA DE LINFONODOS SUBMANDIBULARES EM
DIFERENTES TEMPOS DO PROCESSO CICATRICIAL DE FERIDA CIRÚRGICA
EM LÍNGUA DE RATOS**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Doutorado em Odontologia, área de concentração em Estomatologia Clínica, da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Dra. Maria Antonieta Lopes de Souza

Porto Alegre

2007

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho às âncoras da minha vida, minha **Mãe Inês Rossi**, minha irmã **Liliana Paula Rossi** e meu esposo **Jean Pierre Schneider**.

Jean, meu companheiro, amigo, incentivador, reanimador de forças, corretor de português, psicólogo, psiquiatra e algumas “cositas más”. Sempre presente, prestativo, disposto a ajudar, ler, corrigir, enfim, sempre comigo em tudo. Devemos aproveitar todos os segundos da vida, que é passageira, ao lado de pessoas que amamos e que nos fazem bem. É ótimo saber que fazes parte da minha vida e que passarei boa parte dela em tua companhia. De preferência que possamos matear juntos durante a velhice em algum lugar bem sossegado com a certeza de que viveremos bem sempre. Te amo muito e serei eternamente grata por tudo.

Minha mãe Ines, motivo primeiro de minha existência, o ponto de partida. Desde que nasci, soube que posso encontrar na senhora o ninho aconchegante, o abraço caloroso de mãe, preocupada sempre. “Liga ou manda uma mensagem quando chegar em Porto Alegre para dizer se está tudo bem”, “fica tranqüila, tudo vai dar certo”, frases que mais escutei no tempo de doutorado. Agradecerei sempre por ser minha mãe ou um anjo que foi colocado em minha vida. Obrigada pela preocupação, pela força e incentivo constantes. Te amo muito, minha mãe.

“Tu és divina e graciosa, estátua magestosa. Do amor por Deus estruturada...”
Mana **Lili**, tu és toda coração, amor, dedicação e doação. És outro anjo e tenho somente a agradecer por poder compartilhar contigo minha vida. Agradeço pela ternura, amor, preocupação, confiança e incentivo. Tenho a certeza de que muito ainda viveremos juntas. Te amo, minha irmã.

AGRADECIMENTOS

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) na pessoa do Magnífico Reitor **Prof. Dr. Joaquim Clotet** que viabilizou a realização deste curso.

À Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul na pessoa do Diretor **Prof. Dr. Marcos Túlio Mazzini Carvalho** pela infra-estrutura concedida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul na pessoa da Coordenadora **Profª. Drª. Nilza Pereira da Costa**, símbolo de profissionalismo, diplomacia e dedicação.

À direção da Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC), representada pelo Magnífico Reitor **Dr. Aristides Cimadon** e à Vice-reitoria de pesquisa, pós-graduação e extensão na pessoa do **Prof. Dr. Luiz Carlos Lückmann**, pelo apoio financeiro concedido através do Plano de Capacitação e Qualificação Docente dessa instituição.

À **Profª. Drª. Maria Antonieta Lopes de Souza** serei eternamente grata pelos ensinamentos que me proporcionou, muito aprendi sobre ser Professor. Como diz o poeta e escritor Érico Veríssimo: “Olha o que sou mesmo...digamos assim, um ‘aprendiz perplexo’. Mas acho que pelo menos descobri as coisas de que gosto e as que detesto ou me deixam indiferente. E isso não é pouco”.

Às Professoras do Curso de Doutorado: **Drª. Liliane Yurgel, Drª. Fernanda Salum, Drª. Maria Antônia Z. de Figueiredo e Drª. Karen Cherubini**, pela infundável devoção e constantes ensinamentos. Obrigada por mostrarem que ainda existem pessoas preocupadas com os semelhantes e que lutam com todas as forças para dar mais alento aos necessitados. O mundo precisa de mais pessoas como vocês.

À **Profª. Drª. Liliane Yurgel**: serei eternamente grata pelas horas dispensadas em escutar, orientar e reavivar as forças para a contínua caminhada. Apesar de muitas vezes ser eu a “bola da vez”, me mostrou que o professor deve repassar conceitos de vida e de humanidade, além do conhecimento. Sua generosidade e cuidado com todos demonstra a sua grandiosidade.

À **Profª. Drª. Karen Cherubini**: apesar das infundáveis correções dos artigos (umas novecentas e noventa vezes mais ou menos) aprendi contigo o sentido da palavra doação. Tudo o que faz na Estomatologia é doação pura. Me mostrou que um professor não somente repassa conhecimentos teóricos aos alunos e sim compartilha de princípios éticos. Com certeza aprendi contigo ser mais dedicada, mais paciente, mais cuidadosa e mais humana.

A todos os **Professores** do curso de Doutorado que, nas mais diferentes disciplinas, contribuíram para a minha formação possibilitando o nascer de um novo conhecimento.

Às professoras da disciplina de Patologia do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), **Dr^a. Ana Paula Gomes, Dr^a. Adriana Etges e Dr^a. Lenita Araújo**, pela incansável ajuda na resolução dos problemas decorrentes do desenvolvimento da tese. Serei eternamente grata pelo ensinamento do que é ser Mestre. **Lenita**: sabes o quanto és importante para mim e para o Jean. O bom é saber que sempre estarás por perto, mesmo que distante. Obrigada pela amizade e pelos ensinamentos. **Adriana**: agradeço pela amizade, pelo carinho, pela dedicação e pela ajuda dispensada na realização dessa tese. Meu sincero agradecimento. **Ana**: sabes o quanto fostes importante para a conclusão desse trabalho. Palavras não são suficientes para agradecer a amizade, a ajuda, a paciência, a disponibilidade constante e os conhecimentos repassados.

Ao **Prof. Dr. Felipe Luís Schneider** por permitir o acesso ao Laboratório de Neuroanatomia da UFRGS possibilitando o desenvolvimento dessa pesquisa.

À **Prof^a. Dr^a. Berenice Dedavid**, coordenadora do Centro de Microscopia e Microanálise da PUCRS, pela convivência, pela compreensão das dificuldades e pela disposição em me ajudar sempre.

Ao Professor **Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho**, coordenador do Laboratório de Patologia da PUCRS, pela compreensão, ajuda e por disponibilizar o uso do laboratório, fundamental para realização da tese.

À amiga, parceira e agora **Dr^a. Flaviana Dornela Verli**. Agradeço o incentivo, a confiança e a ajuda. Saiba que és parte desse trabalho. Contigo fui ao laboratório pela primeira vez, aprendi os caminhos, me envolvi na tua pesquisa e me apaixonei pelo teu trabalho. Por causa disso tudo se criou outra tese, esta que agora defendo. Nunca conseguirei agradecer o suficiente, tua doação foi fundamental para realização desse trabalho.

Agradeço ao profissional, amigo, companheiro, orientador, estimulador que é generoso até no nome: **Antônio Generoso Severino** pela incansável parceria nas muuuuuitas horas de trabalho no Laboratório de Neuroanatomia da UFRGS. Meu sincero agradecimento e respeito.

Aos anjos que apareceram na minha vida e possibilitaram que esse trabalho fosse concluído no período programado. Os primeiros anjos foram os funcionários do Centro de Microscopia, **Mirian Souza dos Santos e seu esposo Filipe** (amigos sempre, mesmo distante), **Maurício França, Eduardo Ávila Perosa e Dr José Constantino Vaz** que passaram a fazer parte da minha vida. Sentirei falta das horas que passamos juntos e do chimarrão em frente ao laboratório antes de iniciar o trabalho. Um outro anjo foi a funcionária do Laboratório de Patologia da PUCRS, **Vanessa**. Muito obrigada pela ajuda. Vocês são provas vivas de que quando se tem vontade de ajudar tudo é possível.

Aos funcionários da Secretaria da pós-graduação, **Davenir Menger Bruch, Ana Lúcia Silveira Prestes, Marcos Caetano Correa e Carlos Eduardo Minossi** pela incansável ajuda e disponibilidade em resolver todas as pendengas do dia-a-dia.

Às funcionárias do laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas pela confecção das lâminas. **Silvana** agradeço de coração e não tenha dúvida que és parte desse trabalho.

Aos **Professores** do Curso de Odontologia da Universidade do Oeste de Santa Catarina (em especial **Professores das disciplinas de Semiologia, Clínica Integrada I, Oclusão e Dentística Restauradora**), e aos **Funcionários** (em especial **Geisa Trombeta, Inácio Cimadon, Kátia Lopes e Leda D'Agostini**) pelo apoio, ajuda e compreensão durante o tempo que estive ausente.

À amiga e incentivadora **Profª. Cláudia Wesoloski** que me possibilitou realizar essa tese. Agradecerei eternamente pelo apoio, pela confiança, pela amizade e por segurar as “pontas” (que não eram poucas) no tempo que estive ausente. “É bom sair, mas muito melhor é poder voltar para casa”.

À nova amiga **Drª. Sandra Marinho** (nem tão nova assim, rsrs) que muito me ajudou nas incansáveis leituras da tese. Agradeço por todas as horas dispensadas, pela convivência, pelas risadas (alôô!), pelas conversas, pelos lanches e almoços juntas, por escutar e por falar (e como fala, dããã!!!!). Sentirei muitas saudades e espero mesmo longe, ou perto quem sabe, compartilhar ainda mais dessa amizade.

A todos os colegas do curso de Doutorado, em especial **Márcia Peter Maahs, Elaini Hosni e Sérgio Miguens Jr.** Foi muito bom ter compartilhado com vocês esse tempo, sentirei muitas saudades e espero que possamos nos reencontrar sempre.

Ao amigo e irmão **Fernando “Fefo” Schneider**, grata novamente pela ajuda, obrigada pelo pouso, pela hospitalidade, pelas correrias que fizestes para mim, enfim por tudo. “Alamaula!”, não sei se percebestes mas já fez parte de muita coisa na minha vida. Obrigada sempre.

Aos **Pacientes** do Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da PUCRS que são pelas lições de luta, de superação e de força.

À todos os **Parentes e Amigos**, que de uma maneira ou de outra fizeram parte desse trabalho, incentivando, escutando ou simplesmente por estarem ali por perto, me fazendo sentir o aconchego de estar ao lado de quem se gosta.



RESUMO

RESUMO

Este estudo avaliou a vasculatura dos linfonodos submandibulares em diferentes tempos cicatriciais de ferida cirúrgica produzida em ventre de língua de ratos *Wistar* machos. Através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), foram avaliados 123 linfonodos pela técnica de moldagem vascular, e em microscopia de luz, foram avaliados 232 linfonodos através de cortes histológicos corados com HE, nos tempos 2, 3, 7, 10, 14 e 21 dias pós-operatórios. Analisando os cortes histológicos, verificou-se que o interior dos nódulos foliculares apresentou uma quantidade pequena de vasos sanguíneos, ficando estes concentrados na porção basal desses nódulos. Quando os grupos experimentais foram comparados entre si, constatou-se maior quantidade de vasos sanguíneos aos 21 dias pós-operatórios, não diferindo significativamente dos tempos de 2, 7 e 14 dias. Quando os grupos experimentais foram comparados aos controles, constatou-se diferença significativa aos 2, 3, 14 e 21 dias pós-operatórios em relação ao número médio de vasos sanguíneos. Durante a análise dos modelos vasculares através da MEV, mensurou-se a área dos nódulos foliculares e os diâmetros dos capilares que circundam esses nódulos. Observou-se um aumento significativo no diâmetro dos capilares a partir do segundo dia, que persistiu até o décimo dia pós-operatório. A área dos nódulos foliculares aumentou significativamente somente a partir do terceiro dia e esse aumento persistiu até o décimo-quarto dia pós-operatório. A angiogênese por intussuscepção foi vista em todos os grupos avaliados, no entanto, em maior quantidade no segundo e terceiro dia pós-operatório (83,33% e 80% respectivamente). Observou-se, no presente estudo, que o aumento do diâmetro dos capilares ocorreu anteriormente ao aumento da área dos nódulos foliculares, e que a quantidade de vasos sanguíneos foi semelhante na porção basal dos nódulos foliculares e na região periférica ao córtex profundo.

Palavras-chave: modelo vascular; inflamação; processo de reparo; linfonodos.



ABSTRACT

ABSTRACT

This study evaluated the vasculature of the submandibular lymph nodes in different healing stages of surgical wound produced in tongues from male *Wistar* rats. Using scanning electron microscopy (SEM), 123 lymph nodes were evaluated through the corrosion cast technique, and using light microscopy, 232 lymph nodes were evaluated through the histological sections stained with hematoxylin and eosin after 2, 3, 7, 10, 14 and 21 postoperative days.

Analyzing the histological sections, it was observed that inside of the follicle-nodules there was a small quantity of blood vessels, most of them concentrated in the basal portion. When the experimental groups were compared it was observed that after 21 post operative days there was the major quantity of blood vessels not presenting significant difference in the 2, 7 and 14 post operative days. When the experimental groups were compared with the controls it was observed a significant difference in the 2, 3, 14 and 21 post operative days in relation to the average number of blood vessels. During the analysis of the vascular models through the SEM, it was measured the area of follicle-nodules and the diameter of the capillaries that surround those nodules. A significant increase in the diameter of the capillaries was observed starting from the second day and persisted until the tenth post operative day. The area of the folliculo-nodules increased significantly only after the third day and this increasing persisted until the fourteenth post surgical day. The intussusceptive angiogenesis was seen in all evaluated groups, although it was in larger amount in the second and third postoperative days (83,33% and 80% respectively). In this study, it was observed that the increase of vascular diameter occurred before the increase of the folliculo-nodules area, and the quantity of blood vessels were similar in the basal portion of the follicle-nodules and the peripheral region of the deep cortex.

Key words: corrosion cast; inflammation; wound healing; lymph node.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Mesa cirúrgica interposta entre os maxilares e amarrilho envolvendo os incisivos inferiores46
- Figura 2-** **a)** Ponta ativa do *punch*; **b)** posicionamento do *punch* 90° em relação ao ventre lingual 47
- Figura 3-** Incisão realizada na base da ferida 47
- Figura 4-** **a)** Ventre incisionado do animal; **b)** incisão transversal realizada abaixo do esterno; **c)** incisão do diafragma (seta); **d)** injeção da heparina diretamente no coração; **e)** incisão relaxante realizada nas costelas direitas e esquerdas; **f)** individualização da artéria aorta ascendente; **g)** pinçamento da artéria aorta descendente; **h)** fixação do cateter no interior da artéria aorta ascendente; **i)** incisão do átrio direito 49
- Figura 5-** **a)** Incisão linear desde a sínfise mentoniana até o pescoço; **b)** divulsão da pele com tesoura de ponta romba; **c)** incisão realizada abaixo da mandíbula; **d)** visualização da área contendo os linfonodos; **e)** incisão profunda logo acima dos linfonodos; **f)** incisão realizada nas porções laterais e em profundidade para remoção da peça; **g)** peça contendo linfonodos, glândulas sublinguais e glândulas submandibulares bilaterais 50
- Figura 6-** Remoção dos tecidos superficiais com tesoura de ponta romba 51
- Figura 7-** Visualização dos linfonodos **(1)**, das glândulas sublinguais **(2)** e das glândulas submandibulares **(3)**51
- Figura 8-** Posição do linfonodo no emblocamento52

- Figura 9-** **a)** Modelo esquemático dos locais avaliados em cada linfonodo. HE, 40X de aumento; **b)** maior aumento do local N2 demonstrando as áreas avaliadas em cada nódulo folicular. HE, 100X de aumento 52
- Figura 10-** **a e b)** Imagens demonstrando a seqüência utilizada para a contagem dos vasos sanguíneos 53
- Figura 11-** **a)** Espécimes colados nos *stubs*; **b)** espécimes metalizados com a utilização de fios de cobre (setas) 55
- Figura 12-** **a)** Eletromicrografia de varredura demonstrando a divisão do linfonodo em quadrantes. 26X de aumento; **b)** eletromicrografia de varredura demonstrando as medidas do diâmetro no eixo X e no eixo Y dos nódulos foliculares. 200X de aumento56
- Figura 13-** Eletromicrografia de varredura demonstrando a mensuração do diâmetro dos vasos sanguíneos na superfície do nódulo folicular. 400X de aumento56
- Figura 14-** Vaso sanguíneo com endotélio cúbico, característico das áreas internodulares. **a)** HE, 200X de aumento; **b)** HE, 400X de aumento63
- Figura 15-** **a)** Figura demonstrando nódulo folicular (círculo) e o local no interior do centro germinativo onde foi realizada a avaliação (retângulo). HE, 40X de aumento; **b)** visão mais aproximada no centro germinativo demonstrando a presença de um capilar (seta amarela). HE, 200X de aumento 63
- Figura 16-** **a)** Figura demarcando a porção apical de um nódulo folicular (retângulo). HE, 40X de aumento; **b)** presença de capilar no interior da área demarcada (seta amarela). HE, 200X de aumento 64

- Figura 17-** Cadeia vascular em forma de “cesto” circundando o nódulo folicular em suas porções inferior. **a)** 40X de aumento; **b)** 100X de aumento 64
- Figura 18-** Vênulas de endotélio alto observadas na zona internodular (área A2/A3) de animais-controle (setas). HE, 400X de aumento 65
- Figura 19-** Vênulas de endotélio alto observadas na porção basal dos nódulos foliculares (área A4) de animais-controle (setas). HE, 400X de aumento.....65
- Figura 20-** Vênulas de endotélio alto observadas na zona internodular (área A2/A3) de animais dos grupos 2, 3, 4, 5 e 6. Setas localizadas na periferia das vênulas. HE, 400X de aumento 66
- Figura 21-** Vênulas de endotélio alto observadas na porção basal dos nódulos foliculares (área A4) de animais dos grupos 2, 3, 4, 5 e 6. Setas localizadas na periferia das vênulas. HE, 400X de aumento 66
- Figura 22-** Vênulas de endotélio alto observadas na zona internodular (área A2/A3) e na porção basal (A4) dos nódulos foliculares de animais do grupo 6. Setas localizadas na periferia das vênulas. **a)** HE, 200X de aumento; **b)** HE, 200X de aumento; **c)** HE, 400X de aumento; **d)** HE, 400X de aumento 67
- Figura 23-** **a)** Imagem demonstrando a presença de córtex profundo. HE, 40X de aumento; **b)** delimitação do córtex externo (1) e do córtex profundo (2). HE, 40X de aumento 68
- Figura 24-** Vênulas de endotélio alto com endotélio mais regular observadas na região de córtex profundo (área C1/C2). HE, 400X de aumento68
- Figura 25-** Linfócito realizando diapedese (seta). HE, 400X de aumento68

- Figura 26-** **a)** Endotélio regular das vênulas presentes na zona medular. HE, 400X de aumento; **b)** contato íntimo das vênulas (seta preta) com os cordões medulares (seta azul). HE, 200X de aumento 69
- Figura 27-** **a)** Eletromicrografia de varredura de modelos arteriais; setas indicam a impressão nuclear. 4000X de aumento; **b)** eletromicrografia de varredura de vasos sanguíneos exibindo impressão nuclear (setas azuis) além da impressão do limite celular (setas pretas). 4000X de aumento; **c)** eletromicrografia de varredura de modelos de vênulas regulares; setas indicam a impressão nuclear. 4000X de aumento; **d)** eletromicrografia de varredura de modelos de vênulas de endotélio alto. 1180X de aumento71
- Figura 28-** **a)** Eletromicrografia de varredura demonstrando densa rede vascular, interrompida pelos nódulos foliculares, presentes no córtex externo. 26X de aumento; **b)** eletromicrografia de varredura demonstrando o interior dos nódulos foliculares com mínima quantidade de vasos (seta). 200X de aumento 72
- Figura 29-** Eletromicrografia de varredura demonstrando a cadeia de capilares formando plexo semelhante à cúpula na superfície externa dos nódulos foliculares; **a)** 188X de aumento; **b)** 500X de aumento72
- Figura 30-** Eletromicrografia de varredura demonstrando encontro entre um capilar e uma vênula de endotélio alto (seta). 1000X de aumento72
- Figura 31-** Eletromicrografia de varredura dos diferentes padrões de chanfros circulares observados no encontro de um capilar com uma vênula de endotélio alto. **a)** 2000X de aumento; **b)** 8000X de aumento; **c)** 1000X de aumento; **d)** 4000X de aumento; **e)** 1000X de aumento; **f)** 4000X de aumento; **g)** 1000X de aumento; **h)** 4000X de aumento 73
- Figura 32-** Eletromicrografia de varredura demonstrando área de constrição no calibre vascular na união de um capilar com uma vênula de endotélio

alto; **a)** 1000X de aumento; **b)** medidas demonstrando a diminuição do calibre no local de união do capilar com a vênula de endotélio alto. 8000X de aumento 73

Figura 33- Eletromicrografia de varredura demonstrando característica da rede vascular formada pelas vênulas de endotélio alto na base e nas laterais dos nódulos foliculares (setas amarelas) e vasos de fundo cego (setas vermelhas) na periferia dos nódulos foliculares. 200X de aumento74

Figura 34- Eletromicrografia de varredura demonstrando a fusão de vênulas de endotélio alto de menor calibre formando vênulas de calibre maior na porção mais interna dos linfonodos; **a)** 600X de aumento; **b)** medidas demonstrando o aumento do calibre das vênulas de endotélio alto conforme se aproximam do interior do linfonodo, 500X de aumento 74

Figura 35- Eletromicrografia de varredura demonstrando característica das vênulas de endotélio alto presentes no grupo-controle e no grupo 1; **a)** 700X de aumento; **b)** medidas demonstrando o aumento do calibre das vênulas de endotélio alto conforme se aproximam do interior do linfonodo, 600X de aumento 75

Figura 36- Eletromicrografia de varredura demonstrando a cópia do espaço perivascular; **a)** 875X de aumento; **b)** seta indicando um capilar interposto ao espaço perivascular. 1750X de aumento75

Figura 37- Eletromicrografia de varredura dos diferentes padrões de angiogênese por intussuscepção observados nos modelos vasculares. **a)** 2000X de aumento; **b)** 8000X de aumento; **c)** 1000X de aumento; **d)** 4000X de aumento; **e)** 2000X de aumento; **f)** 4000X de aumento; **g)** 1000X de aumento; **h)** 8000X de aumento; **i)** 2000X de aumento; **j)** 8000X de aumento; **k)** 2000X de aumento; **l)** 8000X de aumento76

Figura 38- a) Eletromicrografia de varredura dos diferentes padrões de angiogênese por intussuscepção observados nos modelos vasculares do grupo 6. **a)** 2000X de aumento; **b)** 8000X de aumento; **c)** 2000X de aumento; **d)** 8000X de aumento; **e)** 2000X de aumento; **f)** 8000X de aumento; **g)** 2000X de aumento; **h)** 8000X de aumento 77

Figura 39- a) Eletromicrografia de varredura demonstrando as características dos vasos sanguíneos presentes na cápsula dos linfonodos. 51X de aumento; **b)** eletromicrografia de varredura demonstrando parte da cápsula sobreposta aos nódulos foliculares (setas). 100X de aumento.....77

Figura 40- Eletromicrografia de varredura demonstrando artérias da cápsula (setas) lançando ramos de menor calibre para a região de córtex externo; **a)** 250X de aumento **b)** 500 de aumento; **c)** 700X de aumento; **d)** 600X de aumento 78

Figura 41- Eletromicrografia de varredura demonstrando as características da vasculatura presente na região do hilo. **a)** 63X de aumento **b)** eletromicrografia de varredura demonstrando veia de grande calibre penetrando no interior do linfonodo através do hilo. 252X de aumento; **c)** 250X de aumento; **d)** eletromicrografia de varredura demonstrando veia e artéria penetrando no interior do linfonodo através do hilo. 1154X de aumento 79

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Número de animais e peso médio (g) inicial e final nos grupos experimentais (excetuando-se os animais-controle). Porto Alegre, 200760
- Tabela 2-** Concordância intra-examinador em relação ao número de vasos sanguíneos presentes nas áreas avaliadas. Porto Alegre, 2007 60
- Tabela 3-** Número médio total e desvio-padrão (dp) de vasos sanguíneos nos diferentes grupos experimentais, quando excluídos os animais-controle. Porto Alegre, 2007..... 61
- Tabela 4-** Número médio e desvio-padrão (dp) de vasos sanguíneos nas diferentes áreas de cada grupo experimental, quando excluídos os animais-controle. Porto Alegre, 2007 62
- Tabela 5-** Número médio total e desvio-padrão (dp) de vasos sanguíneos presentes nos grupos experimentais comparados com o número médio total de vasos sanguíneos do respectivo animal-controle. Porto Alegre, 2007..... 62
- Tabela 6-** Média e desvio-padrão (dp) das áreas dos nódulos foliculares nos diferentes grupos experimentais. Porto Alegre, 200769
- Tabela 7-** Média e desvio-padrão (dp) dos diâmetros dos vasos sanguíneos nos diferentes grupos experimentais. Porto Alegre, 200770
- Tabela 8-** Número total de animais (n) e porcentagem de animais com angiogênese por intussuscepção nos diferentes grupos experimentais. Porto Alegre, 2007..... 76

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A-	Peso (g) inicial dos animais nos grupos experimentais	116
Apêndice B-	Peso (g) final dos animais nos grupos experimentais	117
Apêndice C-	Identificação das lâminas coradas por HE, de acordo com o grupo experimental e dia da morte	118

LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1-** Protocolo de aprovação do projeto na Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS 120
- Anexo 2-** Protocolo de aprovação do projeto no Comitê de Ética do Hospital São Lucas da PUCRS 121
- Anexo 3-** Metodologia da técnica de modelos de corrosão vascular aplicada em linfonodos 122

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANOVA – Análise de Variância

CEMM – Centro de Microscopia e Microanálises

CREAL – Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório

EGF – Fator de crescimento epidérmico

FGF – Fator de crescimento de fibroblastos

FO – Faculdade de Odontologia

g – grama

HE – Hematoxilina de Harris e Eosina alcoólica

VEA – Vênula de endotélio alto

HGF – Fator de crescimento de hepatócitos

ICBS – Instituto de Ciências Básicas de Saúde

IGF – Fator de crescimento semelhante a insulina

IL – Interleucina

Kg – quilograma

KGF – Fator de crescimento de queratinócitos

kV – kilovolt

MEC – Matriz extracelular

MEV – microscopia eletrônica de varredura

ml – mililitro

mm – milímetro

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas

PF4 – Fator de plaquetas 4

pH – Potencial de hidrogênio

PUCRS – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

TGF – Fator de crescimento de transformação

TNF – Fator de necrose tumoral

UFPeI – Universidade Federal de Pelotas

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UI – Unidade internacional

V – volts

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

μm – micrômetro

π - Pi



SUMÁRIO

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	27
2.1	MODELO DE CORROSÃO VASCULAR E CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DO SISTEMA LINFÁTICO E LINFONODOS	27
2.2	PROCESSO DE REPARO DE FERIDAS.....	30
2.2.1	<i>Fase inflamatória</i>	31
2.2.2	<i>Fase proliferativa</i>	34
2.2.2.1	<i>Epitelização</i>	34
2.2.2.2	<i>Fibroplasia</i>	34
2.2.2.3	<i>Angiogênese</i>	35
2.2.2.3.1	<i>Angiogênese por brotamento</i>	37
2.2.2.3.2	<i>Angiogênese por intussuscepção</i>	37
2.2.3	<i>Fase de remodelamento</i>	38
2.3	IMUNOLOGIA NO PROCESSO DE REPARO DE FERIDAS.....	39
3	OBJETIVOS	43
3.1	OBJETIVO GERAL.....	43
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4	MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1	APROVAÇÃO DO PROTOCOLO DE PESQUISA.....	45
4.2	MICROSCOPIA DE LUZ	45
4.2.1	<i>Amostra</i>	45
4.2.2	<i>Grupos experimentais</i>	45
4.2.3	<i>Procedimento cirúrgico</i>	46
4.2.4	<i>Procedimento cirúrgico de perfusão e morte</i>	48
4.2.5	<i>Dissecação dos linfonodos</i>	50
4.2.6	<i>Preparo dos espécimes para análise em microscopia de luz</i>	51
4.2.7	<i>Análise dos espécimes corados por Hematoxilina e Eosina em microscopia de luz</i>	52
4.2.7.1	<i>Análise quantitativa</i>	53
4.2.7.2	<i>Análise qualitativa</i>	54
4.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	54
4.3.1	<i>Amostra</i>	54
4.3.2	<i>Preparo dos espécimes para análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	54
4.3.3	<i>Análise dos espécimes em microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	55
4.3.3.1	<i>Análise quantitativa</i>	55
4.3.3.2	<i>Análise qualitativa</i>	57
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
4.4.1	<i>Análise em microscopia de luz</i>	57
4.4.2	<i>Análise em microscopia eletrônica de varredura</i>	57
5	RESULTADOS	60
5.1	CARACTERÍSTICA DA AMOSTRA.....	60
5.2	ANÁLISE DOS ESPÉCIMES EM CORTES HISTOLÓGICOS CORADOS COM HEMATOXILINA E EOSINA.....	60

5.2.1	<i>Análise quantitativa da vasculatura dos linfonodos nos diferentes grupos experimentais</i>	60
5.2.2	<i>Análise qualitativa da vasculatura dos linfonodos nos diferentes grupos experimentais</i>	62
5.2.2.1	<i>Características da vasculatura da região de córtex externo</i>	62
5.2.2.2	<i>Características da vasculatura da região de córtex profundo</i>	67
5.2.2.3	<i>Características da vasculatura da região medular</i>	68
5.3	ANÁLISE DOS ESPÉCIMES EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	69
5.3.1	<i>Análise quantitativa da área dos nódulos foliculares nos diferentes grupos experimentais</i>	69
5.3.2	<i>Análise quantitativa do diâmetro dos modelos vasculares nos diferentes grupos experimentais</i>	70
5.3.3	<i>Análise qualitativa da vasculatura dos linfonodos nos diferentes grupos experimentais</i>	70
5.3.3.1	<i>Característica da vasculatura da região de córtex externo</i>	71
5.3.3.2	<i>Característica da vasculatura da cápsula dos linfonodos</i>	77
5.3.3.3	<i>Característica da vasculatura da região do hilo</i>	78
6	DISCUSSÃO	81
7	CONCLUSÕES	103
7.1	QUALITATIVAS	103
7.2	QUANTITATIVAS	103
	REFERÊNCIAS	106
	APÊNDICES	116
	ANEXOS	120



1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os linfonodos são cadeias de filtração que estão intercaladas aos vasos linfáticos e recebem linfa e antígenos de uma região circunscrita. Durante um trauma os vasos linfáticos passam a representar a principal rota de drenagem do leito cirúrgico (ALLER et al., 2004b) e, através da linfa aferente, o fluido inflamatório dos tecidos juntamente com leucócitos, antígenos, restos celulares, proteínas plasmáticas e fibrina são transportados para os linfonodos regionais que em resposta ao estímulo, aumentam de peso e tamanho. No momento seguinte ao trauma tecidual, um complexo processo é desencadeado e culmina com a cicatrização da ferida. Durante a cicatrização, seqüência de eventos biológicos e celulares orquestrados, interdependentes e sobrepostos, muitas substâncias são liberadas para que a integridade dos tecidos seja restaurada. Dentre essas substâncias estão as vasoativas e os fatores de crescimento que estimulam a angiogênese.

A angiogênese, processo pelo qual novos vasos sanguíneos são formados a partir de outros pré-existentes (DVORAK, 2005), é um evento estimulado durante o reparo em decorrência de desequilíbrio entre a quantidade de fatores pró-angiogênicos e antiangiogênicos no interior da ferida. Muito tem sido estudado sobre angiogênese e por estar diretamente envolvida em processos inflamatórios e neoplásicos. As técnicas histológicas, na análise dos eventos morfológicos da angiogênese, apresentam como principal limitação o aspecto bidimensional dos cortes, limitação essa que pode ser superada com a aplicação da técnica de corrosão vascular permitindo a aquisição de imagens tridimensionais que possibilitam o estudo morfológico da angioarquitetura existente e da neovascularização.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a vasculatura dos linfonodos submandibulares em animais-controle e em diferentes tempos do processo cicatricial de ferida cirúrgica produzida em ventre de língua de ratos através de modelos de corrosão e cortes histológicos. A razão reside na idéia de que as substâncias liberadas no fluido da ferida são direcionadas até os linfonodos regionais e causam alterações vasculares nesses órgãos e por acreditar que a compreensão e o diagnóstico de alterações patológicas necessita o prévio conhecimento das estruturas em seu estado normal.



2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 **MODELO DE CORROSÃO VASCULAR E CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DO SISTEMA LINFÁTICO E LINFONODOS**

A técnica de modelo de corrosão representa a obturação de espaços vazios com um material autopolimerizável e resistente à ação corrosiva dos ácidos empregados na maceração dos tecidos moles e à limpeza final da superfície dos modelos (LAMETSCHWANDTNER et al., 1989). Essa técnica tem se tornado um eficiente método de estudar a organização tridimensional da vasculatura dos órgãos, através da MEV, além de possibilitar a avaliação da relação espacial entre os diferentes tipos de vasos (CASTENHOLZ, 1989). Rotineiramente essa técnica é utilizada em animais de laboratório, mas alguns poucos casos são descritos em órgãos humanos (GRADE et al., 1994; SANGIORGI et al., 2004). A identificação dos diferentes tipos de vasos sanguíneos é obtida pela análise das impressões deixadas pelo endotélio vascular sobre a superfície do modelo adquirido (CASTENHOLZ, 1995; VERLI, 2006).

O modelo de corrosão também pode ser aplicado no estudo do sistema linfático através da injeção da resina diretamente no interstício ou no interior dos vasos linfáticos (CASTENHOLZ, 1986). A vasculatura linfática não forma um sistema circulatório fechado, pois transporta unidirecionalmente fluidos, proteínas e células, extravasadas do plasma e acumuladas nos espaços intersticiais, de volta aos vasos sanguíneos (SCAVELLI et al., 2004) mantendo, junto com o sistema vascular, a homeostasia tecidual (AL-RAWI et al., 2005). Estruturalmente os vasos linfáticos são divididos em iniciais, pré-coletores e coletores. Os vasos linfáticos iniciais não apresentam células murais e são caracterizados por uma membrana basal ausente ou incompleta (PODGRABINSKA et al., 2002). Essas estruturas de fundo cego têm a função de captar fluido, proteínas, partículas e células presentes no interstício e apresentam suas células endoteliais unidas diretamente aos tecidos subjacentes por finos filamentos de ancoragem (SCAVELLI et al., 2004). A união de vários vasos linfáticos iniciais dá origem aos vasos linfáticos pré-coletores que estão envolvidos na propulsão da linfa e representam a rota de drenagem inicial. Os vasos linfáticos coletores, formados pela fusão dos pré-coletores, auxiliam na propulsão da linfa,

impedem o fluxo retrógrado pela presença de válvulas e são intercalados por linfonodos, local onde a linfa é drenada (SCAVELLI et al., 2004).

A neoformação de novos linfáticos a partir de vasos pré-existentes, ou linfangiogênese, ocorre em tecidos normais e em processos patológicos como inflamação, reparo de feridas e câncer (JI, 2005). A linfangiogênese é reativada devido a notável capacidade das células endoteliais de se dividirem em resposta a um estímulo, principalmente pela inflamação, mesmo estando quiescentes durante a maior parte do tempo no adulto (CARMELIET, 2005). A linfangiogênese está basicamente ligada a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que é liberado durante a injúria tecidual (AL-RAWI et al., 2005). A atuação do VEGF nesse fenômeno foi comprovada por Nagy et al. (2002) depois de aplicarem essa citocina em orelha de ratos e observarem a formação de vasos linfáticos gigantes.

Os vasos linfáticos têm um importante papel no sistema imunológico por transportarem células brancas, do sangue e medula óssea, para o interior dos órgãos linfóides (SCAVELLI et al., 2004), além de direcionarem células apresentadoras de antígenos dos tecidos para os linfonodos (OLIVER, 2004; AL-RAWI et al., 2005). Os linfonodos são estruturas revestidas por cápsula de tecido conjuntivo, constituídas por uma região cortical externa, pelo córtex profundo e uma região medular que se irradia a partir do hilo para o interior do linfonodo (SAINTE-MARIE et al., 1990). O córtex externo está presente em quase toda a periferia dos linfonodos e é separado da cápsula pelo seio subcapsular, estrutura avascular que recebe, através dos vasos linfáticos aferentes, as células direcionadas dos tecidos para os linfonodos (OKADA et al., 2002). O seio subcapsular possui poros que possibilitam sua comunicação com o centro germinativo e com o espaço perivascular no córtex externo (OKADA et al., 2002) e, próximo a porção hilar, apresenta-se contíguo aos sinusóides medulares (OHTANI et al., 2003). O córtex externo compreende os nódulos foliculares, locais de produção de linfócitos B, separados entre si pelas regiões internodulares. Cada nódulo folicular apresenta forma ovóide ou esférica (BELISLE; SAINTE-MARIE, 1990), diâmetro entre 70-100 μ m (OKADA et al., 2002) e compreende um folículo linfóide e um centro germinativo (BÉLISLE; SAINTE-MARIE, 1981a). O córtex profundo, porção contígua ao córtex externo e responsável pela produção de células T, é formado por unidades semi-esféricas ou semi-ovais, que se projetam para o interior da porção medular (BÉLISLE; SAINTE-

MARIE, 1981b), sendo cada unidade revestida por uma área de córtex externo, contendo de dois a seis nódulos foliculares (SAINTE-MARIE et al., 1990).

O linfonodo não é uma entidade fisiológica que responde como um todo à estimulação feita por elementos imunogênicos, e sim uma entidade morfológica e funcionalmente compartimentalizada. Cada compartimento compreende: a abertura de um vaso linfático no seio subcapsular, a porção do seio subcapsular que recebe a linfa, a porção correspondente do córtex externo subjacente, uma unidade de córtex profundo e os cordões medulares contíguos a esses elementos corticais (SAINTE-MARIE et al., 1990).

O suprimento vascular de linfonodos cervicais humanos foi avaliado através da observação de modelos de corrosão vascular em MEV, e estes seguem o mesmo padrão vascular observado em linfonodos de animais de pequeno porte (GADRE et al., 1994). Os vasos sanguíneos acessam os linfonodos através de seu hilo e na porção medular as artérias dão origem a muitas arteríolas, algumas das quais alcançam diretamente o córtex externo. As arteríolas medulares tornam-se arteríolas corticais que se dividem formando muitos capilares na periferia do córtex profundo e na zona internodular sem alcançar o seio subcapsular (OKADA et al., 2002).

Superficialmente aos nódulos foliculares, a cadeia de capilares forma uma cúpula e, profundamente, esses capilares se conectam diretamente a um tipo especial de vasos, referidos como vênulas pós-capilares ou vênulas de endotélio alto (VEA) (BÉLISLE; SAINTE-MARIE, 1985), que são visualizadas nas margens laterais e porção basal dos nódulos foliculares, mas não no interior desses espaços (BÉLISLE; SAINTE-MARIE, 1990). As VEAs apresentam endotélio cubóide e são responsáveis pelo transporte de linfócitos virgens para o interior do córtex dos linfonodos (CYSTER, 2000; GRETZ et al., 2000). Os demais linfócitos entram nos linfonodos via linfa aferente juntamente com antígenos e outros tipos de células hematopoiéticas como as células dendríticas, macrófagos e granulócitos (IRJALA et al., 2003). Durante a observação de modelos vasculares em MEV, constata-se nessas VEAs um padrão de marcas profundas e cristas altas, deixando um perfil corrugado sobre a superfície de seu modelo (CASTENHOLZ, 1989). As vênulas de endotélio alto (VEAs) expressam, sobre sua superfície, moléculas de adesão e quimiocinas necessárias para o extravasamento de células para o interior do parênquima do linfonodo (von ANDRIAN; MEMPEL, 2003) e, por esse motivo,

quando visualizadas em MEV, podem apresentar alguns espaços vazios compatíveis com a diapedese realizada pelos linfócitos (CASTENHOLZ, 1995).

Os numerosos brotos iniciais das VEAs, presentes na porção mais superficial do córtex externo, se fundem dando origem a vênulas de maior calibre e estas são encontradas na porção mais interna do linfonodo. Na parte profunda da zona internodular ocorre conexão entre os troncos maiores das VEAs e, quando observados na porção cortical que reveste diretamente a medula, são contíguas com vênulas de endotélio regular dos cordões medulares. Quando observadas no córtex profundo as VEAs se concentram na periferia dessa região e excepcionalmente são encontradas no centro dessa unidade (BÉLISLE; SAINTE-MARIE, 1990).

2.2 PROCESSO DE REPARO DE FERIDAS

A ferida cirúrgica caracteriza-se pela descontinuidade do tecido epitelial com exposição de áreas do tecido conjuntivo e isso desencadeia um complexo processo que culmina na cicatrização da ferida (BROUGHTON et al., 2006) e no restabelecimento da proteção epitelial recuperando a força, integridade e função tecidual (THEORET, 2005).

O processo de cicatrização da ferida é uma seqüência de eventos biológicos e celulares orquestrados, interdependentes e sobrepostos, cujo objetivo comum é restaurar a integridade dos tecidos (LINGEN, 2001; BROWN et al., 1992; PARK; BARBUL, 2004). Esse processo pode ser dividido em fases inflamatória, proliferativa e de remodelamento (KIRSNER; EAGLSTEIN, 1993; DI VITA et al., 2005; OLUTOYE et al., 2005; THEORET, 2005).

A fase inflamatória, de curta duração, é caracterizada basicamente pela vasodilatação, exsudação de fluido rico em proteínas (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004), migração de células do sangue para os tecidos e liberação dos mediadores e citocinas dessas células (KIRSNER; EAGLSTEIN, 1993; DI VITA et al., 2005). Na fase proliferativa ocorrem os eventos de reepitelização, angiogênese e fibroplasia, enquanto que a fase de remodelação caracteriza-se pela deposição de produtos da matriz e subsequente mudança das características da mesma em função do tempo (KIRSNER; EAGLSTEIN, 1993; BROUGHTON et al., 2006).

2.2.1 Fase inflamatória

A resposta inflamatória é essencial ao reparo e ocorre de forma significativa como resultado da agregação plaquetária e ativação do complemento na resposta à injúria tecidual (SCHROCK et al., 1982). A fase inflamatória do processo de reparo de feridas cirúrgicas é similar em progressão a outras condições inflamatórias agudas (SZPADERSKA; DIPIETRO, 2005), sendo sua intensidade determinada pela intensidade do trauma (THEORET, 2005). A inflamação é uma importante reação de defesa a qual, num primeiro momento, objetiva a restrição, destruição e eliminação do irritante e, num segundo momento, envolve a regeneração do local injuriado (SCHROCK et al., 1982; ANISMAN et al., 1996b; SZPADERSKA; DI PIETRO, 2005). Em feridas cirúrgicas onde os bordos epiteliais não estão em íntimo contato, ocorre a cicatrização por segunda intenção e a resposta inflamatória é mais intensa quando comparada com as feridas em que a união primária acontece (GREENHALGH, 1998).

Quando a barreira tecidual é quebrada e o endotélio dos vasos sanguíneos é rompido, ocorre vasoconstrição momentânea seguida por vasodilatação que facilita a entrega local de plasma, plaquetas, eritrócitos, leucócitos e mediadores solúveis (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; THEORET, 2005). A vasodilatação induzida pela inflamação é mediada primariamente pelas prostaglandinas e pelo óxido nítrico (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Os elementos mais importantes imediatamente após a injúria são as plaquetas (KIRSNER; EAGLSTEIN, 1993; OLUTOYE et al., 2005) que, na presença de condições fisiológicas, não interagem com a parede dos vasos (KISUCKA et al., 2006). Contudo, em resposta à injúria vascular, quando a matriz extracelular (MEC) subjacente e o subendotélio estão expostos, a adesão plaquetária e subseqüente formação de trombo ocorrem através da ativação da cascata de coagulação (van HINSBERGH, 2001; SCHOENMAKERS et al., 2005; THEORET, 2005). A ativação das plaquetas resulta na degranulação e liberação de mediadores contidos em seus grânulos que iniciam a adesão de outras plaquetas àquelas já aderidas (KIRSNER; EAGLSTEIN, 1993). Além da adesão de outras plaquetas, promovida pelo fator de von Willebrand (KISUCKA et al., 2006), fibrinogênio, fibronectina e trombospondina, outros mediadores como a adenosina difosfato (APPLETON, 1994; LI et al., 2007) e trombina, recrutam mais plaquetas, permitindo a formação do trombo. Além disto,

outros mediadores como a serotonina e o tromboxano reduzem ainda mais a perda sanguínea pelo efeito vasoconstritor (SANTIAGO-DELPÍN, 2004). Além de promover a coagulação sanguínea, os produtos da cascata de coagulação são responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias como interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 β (IL-1), interleucina 8 (IL-8) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) (SCHOENMAKERS et al., 2005). As plaquetas são também extremamente importantes na secreção dessas citocinas pró-inflamatórias e de fatores de crescimento como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento α e β de transformação (TGF- α e TGF- β), o fator 4 de plaquetas (PF4), o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de crescimento semelhante a insulina (IGF) (SCHROCK et al., 1982; SENIOR et al., 1983; APPLETON, 1994; MÖHLE et al., 1997; YANG et al., 1999; CARMELIET, 2003; THEORET, 2005; BROUGHTON et al., 2006) os quais estimulam a migração de leucócitos. Além desses mediadores as plaquetas ainda liberam o conteúdo dos seus grânulos α como a serotonina, histamina, prostaglandina, bradicinina, tromboxano (BROUGHTON et al., 2006) e a P-selectina, que permite o rolamento dos leucócitos sobre o endotélio das VEAs (OLUTOYE et al., 2005).

A principal função da cascata de coagulação é assegurar a formação de um coágulo hemostático estável (CHAMBERS; LAURENT, 2002). A ativação da cascata de coagulação ocorre tanto pela via extrínseca, fonte primária da coagulação, quanto pela intrínseca, importante na produção de bradicinina, um mediador vasoativo que aumenta a permeabilidade vascular, e ambos os caminhos induzem a formação de fibrina que promove a coagulação sanguínea (GAJDUSEK et al., 1986). O caminho intrínseco da coagulação é representado por uma série de proteínas do plasma que são ativadas quando o fator de Hageman (fator XII) entra em contato direto com o colágeno, membrana basal ou plaquetas ativadas. A ativação do fator XII resulta na conversão de pró-enzimas em enzimas ativadas culminando na transformação da protrombina em trombina (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; LI et al., 2007). O caminho extrínseco por sua vez é iniciado pela produção de fator tecidual que é expresso sobre a superfície dos tecidos que normalmente não se encontram expostos ao compartimento vascular. A presença do fator tecidual causa ativação do fator VII com o qual forma um complexo e ativa uma série de fatores da coagulação resultando, do mesmo modo que o caminho intrínseco, na produção de

trombina (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Esta trombina formada dará origem a fibrina que apresenta um papel chave no processo de reparo tecidual subsequente, pois atua como uma matriz provisória possibilitando a migração de células inflamatórias e fibroblastos para o interior da área injuriada e atuando como uma reserva de fatores de crescimento e citocinas (CHAMBERS; LAURENT, 2002).

O endotélio é uma interface ativa entre o sangue e os tecidos produzindo fatores que evitam uma coagulação excessiva, além de produzirem o TNF- α , IL-1, IL-6 que são importantes no início da resposta inflamatória e na apresentação do antígeno (LIN et al., 2000). Recentemente a Interleucina-18 (IL-18), um potente quimiotático para células T humanas, foi observada em contato íntimo com as células endoteliais sugerindo que não somente a atração dos leucócitos da primeira linha de defesa é importante, mas também o recrutamento de macrófagos e linfócitos pode ocorrer durante o trauma (KOMAI-KOMA et al., 2003). Os fatores e mediadores liberados pela cascata de coagulação, pelas plaquetas, pela cascata do complemento e também pelas células injuriadas ou ativadas, são quimiotáticos para leucócitos fazendo com que os mesmos sejam recrutados da circulação sanguínea para o local da injúria (SANTIAGO-DELPÍN, 2004).

Os neutrófilos são os primeiros a chegar no local do trauma com a intenção de destruir e fagocitar bactérias e proteínas da matriz dentro da área da injúria (LINGEN, 2001; PARK; BARBUL, 2004; SZPADERSKA; DIPIETRO, 2005). Estes permanecem nos tecidos por pouco tempo, morrem e são fagocitados pelos macrófagos (THEORET, 2005) que são monócitos fenotipicamente transformados dentro dos tecidos (SZPADERSKA; DIPIETRO, 2005).

No tempo entre 48-96 horas pós-ferida, ocorre uma alteração no perfil das células inflamatórias presentes e o infiltrado inflamatório passa a ser predominantemente composto por macrófagos e linfócitos (BROUGHTON et al., 2006). Os macrófagos, através da secreção de citocinas e fatores de crescimento, promovem a ativação e recrutamento de outras células envolvidas na cicatrização como outros macrófagos, linfócitos, fibroblastos e células endoteliais; além de influenciar na angiogênese, fibroplasia e síntese da MEC (TONNESEN et al., 2000; PARK; BARBUL, 2004; SZPADERSKA; DIPIETRO, 2005; BROUGHTON et al., 2006). Quando os macrófagos estão ausentes o processo cicatricial é suprimido (SCHROCK et al., 1982).

2.2.2 Fase proliferativa

A fase proliferativa, que inicia antes da completa resolução da fase inflamatória, é caracterizada pela ocorrência da epitelização, da fibroplasia ou da formação de tecido de granulação e da angiogênese.

2.2.2.1 Epitelização

Um dos principais objetivos do organismo durante o reparo de feridas é reestabelecer o epitélio, que funciona como uma barreira de proteção. A proliferação epitelial inicia nas extremidades da ferida um a dois dias após a injúria tecidual e atinge a máxima proliferação entre 48 e 72 horas. Entretanto, o grau de fechamento da ferida depende da espécie animal, bem como do local e do tamanho da ferida (THEORET, 2005). As células epiteliais são estimuladas a lisar e fagocitar restos celulares encontrados no caminho na tentativa de avançar sob o coágulo, sendo vista a máxima epitelização entre 5 e 7 dias em uma ferida com cicatrização por segunda intenção (THEORET, 2005). A IL-1 e o TNF- α , liberados pelas células inflamatórias, facilitam a migração do epitélio pelo aumento da secreção de enzimas degradativas e de fator de crescimento de queratinócitos (KGF). O TGF- α e o TGF- β aumentam a síntese de receptores de superfície da célula epitelial em vários componentes da matriz extracelular facilitando a migração do epitélio (BROUGHTON et al., 2006). Esse processo é cessado no momento em que as células epiteliais entram em contato entre si (THEORET, 2005).

2.2.2.2 Fibroplasia

A substituição do coágulo pelo tecido de granulação assegura uma progressão ordenada para o reparo, pois a matriz provisória formada, além de proteger contra a infecção, serve de superfície para migração das células epiteliais (TONNESEN et al., 2000; THEORET, 2005). O tecido de granulação invade o local da ferida aproximadamente cinco dias após a injúria, sendo formado por

macrófagos, que produzem mediadores estimuladores da angiogênese e a fibroplasia, por fibroblastos, que proliferam e sintetizam componentes da MEC, e por novos vasos sanguíneos que carregam nutrientes e oxigênio para as células crescerem (APPLETON, 1994; THEORET, 2005).

Os sinais para proliferação e migração dos fibroblastos incluem vários quimiotáticos e citocinas ou fatores de crescimento como: IL-1, TNF- α , IGF, PDGF, EGF, fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e especialmente o TGF- β (THEORET, 2005). Outro estímulo para a proliferação de fibroblastos é o baixo conteúdo de oxigênio no centro da ferida. Assim que a formação de novos vasos ocorre, a quantidade de oxigênio aumenta e o estímulo para a proliferação dos fibroblastos diminui, o que caracteriza um processo de controle proliferativo (KIRSNER; EAGLSTEIN, 1993).

O que possibilita os fibroblastos migrarem para o interior do coágulo é uma gama de enzimas degradativas derivadas dos próprios fibroblastos, cuja produção e secreção é estimulada pelo PDGF e TGF- β (APPLETON, 1994). Tão logo os fibroblastos tenham proliferado, eles iniciam a substituição da matriz provisória por glicoproteínas, proteoglicanas e colágeno permitindo a união das margens da ferida. Assim que a matriz é depositada a síntese protéica cessa e os fibroblastos sofrem apoptose ou adquirem características de células musculares lisas se transformando em miofibroblastos (HARTY et al., 2003; THEORET, 2005).

2.2.2.3 *Angiogênese*

A angiogênese é o processo pelo qual novos vasos sanguíneos são formados a partir vasos pré-existentes (DJONOV et al., 2000; BURRI et al., 2004; DVORAK, 2005). Esse evento tem um importante papel no desenvolvimento vascular normal e em processos patológicos como o câncer, a cicatrização de feridas e a inflamação (FOLKMAN; SHING, 1992; LINGEN, 2001; DVORAK, 2005). Em tecidos normais os vasos são quiescentes e as células secretam baixos níveis de indutores e altos níveis de inibidores da angiogênese (LINGEN, 2001).

No mecanismo de reparo da ferida a angiogênese é um processo complexo e acompanhado por uma necessária inflamação (RISAL, 1997). Os capilares,

responsáveis pela distribuição de nutrientes, células inflamatórias e oxigênio para o local da ferida, logo após a injúria invadem o coágulo de fibrina e representam um dos componentes importantes do tecido de granulação inicial (NISSEN et al., 1998; LINGEN, 2001). Muitos são os produtos, como citocinas, fatores de crescimento e pequenas moléculas, envolvidos na geração de novos vasos: VEGF, a-FGF, b-FGF, fator de crescimento de hepatócito (HGF), PDGF, angiotensina 1 e 2, TGF α e β , IL-8, prostaglandina e vários lipídios (DVORAK, 2005). A presença de fatores angiogênicos no fluido da ferida cirúrgica humana e a possibilidade deste fluido formar novos vasos foi comprovada por Nissen et al. (1998) depois de aplicarem o fluido da ferida em córnea avascular de ratos e constatarem a formação de vasos sanguíneos no local (NISSEN et al., 1998).

A presença de exudato fibrinoso pode facilitar o processo de angiogênese por oferecer fatores de crescimento e matriz para a invasão e expansão de novos microvasos (van HINSBERGH, 2001). Muitos tipos celulares e fatores angiogênicos atuam em diferentes momentos do processo cicatricial. Altos níveis de b-FGF estão presentes na ferida cirúrgica no início da cicatrização e estimulam a migração e a proliferação das células endoteliais (NISSEN et al., 1996). Os macrófagos em um meio com hipóxia liberam fatores de crescimento que estimulam as células endoteliais das vênulas a romperem sua membrana basal e migrarem para dentro da ferida criando um tecido de granulação altamente vascular (GREENHALGH, 1998).

A quantidade de vasos sanguíneos presente no tecido de granulação diminui conforme o acúmulo de colágeno aumenta (TONNESEN et al., 2000). A maior quantidade de vasos observada em feridas, produzidas em pele de ratos, está presente nos dias 5 e 6 pós-injúria, o que corresponde ao pico na síntese de colágeno no interior da ferida (THOMPSON et al., 1991).

O VEGF-A, além de outros membros da família de citocinas multifuncionais e fatores de crescimento como b-FGF, liberado durante a injúria tecidual, podem induzir tanto a formação de vasos sanguíneos como de vasos linfáticos no local da injúria (NAGY et al., 2002; AL-RAWI et al., 2005). A formação de novos vasos sanguíneos a partir de outros pré-existentes pode ocorrer por dois mecanismos: brotamento e intussuscepção (RISAU, 1997). Embora ambos induzam a amplificação da cadeia capilar são regulados por diferentes moléculas e ocorrem por mecanismos distintos (DJONOV et al., 2003; DJONOV; BURRI, 2005).

2.2.2.3.1 Angiogênese por brotamento

A angiogênese por brotamento está caracterizada principalmente pela vasodilatação local, aumento da permeabilidade vascular e proliferação celular sendo iniciada pela degradação proteolítica da membrana basal, e subsequente migração e proliferação das células endoteliais para o interior da MEC (DJONOV et al., 2003; DJONOV; BURRI, 2005). Este processo é múltiplo e segue um programa bem definido: necessita da proliferação e migração de células endoteliais, degradação da membrana basal velha e síntese de nova, formação de brotos sólidos de células endoteliais conectando vasos vizinhos, reestruturação do interior do lúmen do broto e aquisição de pericitos (BURRI et al., 2004; DVORAK, 2005). Nas condições de reprodução, desenvolvimento e processo de reparo apresenta-se como um processo altamente controlado (FOLKMAN; SHING, 1992). O brotamento é um processo relativamente lento, que necessita de dias para seu início, implementação e integração dos segmentos neoformados dentro do sistema vascular (DJONOV; BURRI, 2005).

2.2.2.3.2 Angiogênese por intussuscepção

A angiogênese por intussuscepção consiste na inserção de colunas teciduais transcapilares, chamadas de pilares ou pontes, dentro do lúmen vascular e no subsequente crescimento dessas colunas resultando na divisão do vaso (DJONOV et al., 2000; KURZ et al., 2003). A rápida expansão do leito vascular através do processo de intussuscepção ocorre devido a redistribuição do volume das células endoteliais visto que estas não proliferam, mas se adelgamam e se espalham (DJONOV et al., 2000; DJONOV; BURRI, 2005). Ao contrário da angiogênese por brotamento, a angiogênese por intussuscepção ocorre na ausência virtual de proliferação de células endoteliais, é alcançada em baixos níveis de permeabilidade vascular e necessita de quatro a cinco horas para estar completa (DJONOV et al., 2003; BURRI et al., 2004).

O estresse mecânico pode, dentro de segundos, através da ativação de canais iônicos induzir cascatas bioquímicas e, dentro de minutos ou horas, induzir adaptações nas junções tipo *gap* entre as células endoteliais. Além disso, várias

moléculas angiogênicas, parâmetros hemodinâmicos e/ou tensão de oxigênio parecem ser responsáveis por iniciar e coordenar o crescimento intussusceptivo (KURZ et al., 2003). Em reparo de feridas, além da formação de colunas teciduais transcapilares, responsáveis pela expansão e remodelamento da cadeia vascular pré-existente, ocorre a formação de alças capilares na parede dos vasos maiores transformando os mesmos em uma densa cadeia de alças finas. A cadeia de alças neoformadas e a cadeia de vasos pré-existentes apresentam-se altamente interconectadas, permitindo o re-direcionamento do fluxo sanguíneo para o interior da ferida (PATAN et al., 2001). A intussuscepção pode ser regulada por muitos fatores que trabalham sinergicamente, entre outros o PDGF e seus receptores (BURRI et al., 2004), presentes em grande quantidade durante o processo de reparo da ferida.

2.2.3 Fase de remodelamento

Simultaneamente com a contração da ferida, provocada por células que combinam características de fibroblastos e células musculares lisas (miofibroblastos), a MEC está sendo formada e remodelada, sendo inicialmente um tecido de granulação que evolui para um tecido cicatricial maduro. O remodelamento, pela ação de enzimas degradativas presentes na própria matriz (metaloproteases), permite a substituição do colágeno imaturo (tipo III) pelo colágeno maduro (tipo I) além de aumentar a resiliência da matriz (KIRSNER; EAGLSTEIN, 1993). Durante o remodelamento, a redução na quantidade de vasos e fibroblastos ocorre paralelamente e pode estar envolvida com a comunicação entre essas células (DJONOV et al., 2003). Outra maneira de ocorrer a redução na quantidade de vasos é através da própria angiogênese por intussuscepção, pois a mesma também está envolvida na “poda” vascular. Essa “poda” ocorre através da formação de colunas teciduais transcapilares excêntricas na região de bifurcação dos vasos, induzindo a uma completa oclusão seguida de regressão, retração e por fim atrofia do broto afetado (KURZ et al., 2003). Patan et al. (2001) ao avaliarem a cicatrização de pedículos ovarianos de ratas constataram aos 21 dias pós-ferida, a presença de um tecido cicatricial com menor vascularização.

2.3 IMUNOLOGIA NO PROCESSO DE REPARO DE FERIDAS

O sistema imune é fundamental na defesa do hospedeiro contra injúrias teciduais, pois mesmo na ausência de estimulação antigênica, pode ser ativado por injúrias biológicas, físicas e químicas (ANISMAN et al., 1996b). O sistema imune está dividido em defesa humoral, que compreende anticorpos e complemento, e defesa celular, que consiste em neutrófilos, macrófagos e linfócitos (PARK E BARBUL, 2004). As células imunes desenvolvem papel importante na inflamação, no processo de defesa e são vitais para a cicatrização de feridas. Além disso, sua participação no processo de reparo é comprovada pela migração seqüencial para o interior da ferida cirúrgica e, pela secreção de moléculas de sinalização (PARK; BARBUL, 2004). A maioria dessas moléculas liberadas durante o reparo de feridas está envolvida tanto na reação inflamatória não específica quanto na reação imune específica, o que dificulta a separação entre esses dois processos (SANTIAGO-DELPÍN, 2004).

Para que ocorra a interligação entre os tecidos e a imunidade, faz-se necessária a migração de células e fluido intersticial dos tecidos para os órgãos linfóides secundários (SCHWARTZ-CORNIL et al., 2005). O sistema linfático é essencial para a resposta imune durante a exposição a agentes inflamatórios já que é a principal rota pela qual as células dendríticas, depois de capturarem o antígeno, migram para os linfonodos (OLIVER, 2004). A injúria tecidual funciona como iniciadora da inflamação, pois dispara a liberação de citocinas que atraem e estimulam os leucócitos. Estas quimiocinas ou citocinas quimiotáticas são produzidas por uma variedade de células como macrófagos, monócitos, linfócitos B e T, fibroblastos, células endoteliais, condrócitos e células musculares lisas (ANISMAN et al., 1996b). Em condições fisiológicas, o número de linfócitos que entram e saem dos linfonodos estão em equilíbrio, mas durante a inflamação ocorre um aumento no número de linfócitos que entram induzindo a um aumento dos linfonodos responsáveis pela drenagem da área afetada (CYSTER, 1999).

Durante o processo de dano tecidual as células mortas são fagocitadas por neutrófilos, células dendríticas ou macrófagos e têm a capacidade de ativar a resposta pró-inflamatória e imunológica (SHIMAMURA et al., 2005). A presença de células necróticas no local da ferida aumenta a capacidade dos macrófagos atuarem como células apresentadoras de antígenos (BARKER et al., 2002); além de serem

ótimas estimuladoras da maturação das células dendríticas e fonte de antígeno para a ativação das células T (MOEHLER et al., 2003). Segundo Hay e Hobbs (1977) a presença do antígeno pode tanto aumentar a proporção de linfócitos que deixa o sangue dentro do linfonodo, como o fluxo de sangue para o linfonodo, resultando em um maior tráfego de células para dentro da linfa eferente. As células dendríticas, descendentes das células-tronco hematopoiéticas através da linhagem mielóide (GOLDSBY et al., 2002), apresentam-se esparsamente distribuídas pelos tecidos. Na presença de mediadores inflamatórios se tornam ativadas (maduras), processam antígenos e tornam-se migratórias com possibilidade de entrar nos órgãos linfóides secundários e induzir a resposta imune dependente de células T (DIELI, 2003).

Durante as fases iniciais do processo de reparo, em decorrência da vasodilatação, a pressão do fluido intersticial aumenta e os filamentos de ancoragem dos vasos linfáticos iniciais são tracionados (SZCZENSNY; OLSZEWSKI, 2003). Essa tração dos filamentos provoca um aumento no diâmetro do lúmen dos vasos linfáticos mantendo abertas as junções intercelulares que facilitam a passagem de fluido, partículas e células para o interior do lúmen linfático (JI, 2006). Nesse momento do processo de reparo a circulação linfática é predominante em detrimento da circulação sanguínea (ALLER et al., 2004b).

A dilatação dos vasos linfáticos e o aumento dos linfonodos regionais sugerem a existência de uma resposta imune na fase inflamatória do reparo de feridas (ALLER et al., 2006). A linfa drenada dos tecidos inflamados contém altos níveis de citocinas e quimiocinas e é o principal meio de deslocamento de bactérias (SZCZENSNY; OLSZEWSKI, 2003).

Os linfonodos, compartimentos linfóides dinâmicos, são afetados pelo estímulo inflamatório (GRETZ et al., 2000) através da migração de macrófagos e monócitos presentes nos tecidos (ALLER et al., 2004a). Durante esse processo migratório, os monócitos se diferenciam em células dendríticas podendo então apresentar peptídeos antigênicos para os linfócitos (KAPLANSKI et al., 2003), contribuindo para a geração de uma resposta imune amplificada (SZCZENSNY; OLSZEWSKI, 2003). Os linfonodos estimulados apresentam um aumento no seu peso e um maior número de células que migram do sangue para o seu interior, quando comparados com linfonodos normais (HAY; HOBBS, 1977).

A ativação imune do sistema linfático estabelece uma ligação entre a resposta imune inata e a resposta imune adquirida. A resposta imune inata cria resposta

inicial à invasão tecidual, mas também serve para ativar e amplificar a resposta imune adaptativa (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004), que é induzida primariamente pela apresentação de antígenos estranhos para as células T (CLARKE et al., 2005). Portanto as células capazes de apresentar antígenos como macrófagos e células dendríticas migram para os linfonodos onde produzem a ativação de células T específicas (CLARKE et al., 2005). As injúrias cirúrgicas ou infecciosas exibem alterações nas respostas hemodinâmicas, metabólicas e imunes e estas são amplamente orquestradas por mediadores endógenos chamados de citocinas (LIN et al., 2000). O TNF, produzido principalmente por macrófagos e monócitos, promove a proliferação de linfócitos T (LIN et al., 2000). A IL-18, que tem sua presença inicial seguinte ao trauma tecidual, demonstra propriedades quimiotáticas para as células T recrutando as mesmas para o local do trauma (KOMAI-KOMA et al., 2003).

O acontecimento da reação imune depende da recirculação de linfócitos do sangue para o interior do linfonodo, o que permite a interação destes linfócitos com os antígenos filtrados da linfa, iniciando a resposta imune humoral e resposta mediada por células (OKADA et al., 2002). A migração de leucócitos é um processo complexo dependente do tipo celular envolvido, do tipo de interação desta célula com o endotélio e do estado de ativação desse endotélio. Os linfócitos T em repouso ou *naïve* (virgens) migram através das vênulas endoteliais para dentro dos tecidos linfáticos (SCHOENMAKERS et al., 2005) sendo sua fixação e transmigração através das VEAs melhoradas na presença da inflamação (DIACOVO et al., 2005), enquanto que os linfócitos ativados migram para os sítios da inflamação (SCHOENMAKERS et al., 2005).



3 PROPOSIÇÃO

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar, em microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de luz, alterações na vasculatura de linfonodos submandibulares em diferentes tempos do processo cicatricial de ferida cirúrgica produzida em ventre de língua de ratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Descrever a vasculatura dos linfonodos submandibulares de ratos *Wistar* através da microscopia eletrônica de varredura e microscopia de luz;

2- Calcular, através da microscopia eletrônica de varredura, a área dos nódulos foliculares de linfonodos submandibulares após realização de ferida cirúrgica no ventre de língua de ratos nos tempos pós-operatórios de 2, 3, 7, 10, 14 e 21 dias;

3- Mensurar, através da microscopia eletrônica de varredura, o diâmetro dos vasos sanguíneos circundantes aos nódulos foliculares de linfonodos submandibulares após realização de ferida cirúrgica no ventre de língua de ratos nos tempos pós-operatórios de 2, 3, 7, 10, 14 e 21 dias;

4- Quantificar, através da microscopia de luz, a vasculatura dos linfonodos submandibulares após realização de ferida cirúrgica no ventre de língua de ratos nos tempos pós-operatórios de 2, 3, 7, 10, 14 e 21 dias.



4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 APROVAÇÃO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

O protocolo de pesquisa foi submetido a apreciação e aprovação pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia (anexo 1) e do Comitê de Ética do Hospital São Lucas (anexo 2) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

4.2 MICROSCOPIA DE LUZ

4.2.1 Amostra

A amostra foi constituída de 60 ratos albinos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*, machos, adultos com idade de 3 meses, e peso médio de 281g. Todos os animais foram criados e mantidos no Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) do Instituto de Ciências Básicas de Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). O experimento foi realizado nas dependências do Laboratório de Neuroanatomia do Departamento de Ciências Morfológicas do mesmo Instituto. Durante a pesquisa os animais foram mantidos no referido laboratório em gaiolas plásticas recebendo alimentação sólida¹ e água *ad libitum*.

4.2.2 Grupos experimentais

Os 60 animais foram divididos aleatoriamente em 6 grupos de dez animais, sendo que em cada grupo, nove ratos foram submetidos a uma ferida cirúrgica produzida em ventre de língua, enquanto um animal serviu como controle. O animal-controle foi submetido somente ao procedimento anestésico e permaneceu com os demais de seu grupo até o momento da morte.

Grupo 1: animais mortos 2 dias após o procedimento cirúrgico.

¹ Ração Nuvilab-Cr 1[®] Nuvital Nutrientes - S.A, São Paulo, Brasil

Grupo 2: animais mortos 3 dias após o procedimento cirúrgico.

Grupo 3: animais mortos 7 dias após o procedimento cirúrgico.

Grupo 4: animais mortos 10 dias após o procedimento cirúrgico.

Grupo 5: animais mortos 14 dias após o procedimento cirúrgico.

Grupo 6: animais mortos 21 dias após o procedimento cirúrgico.

4.2.3 Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados por meio de injeção intraperitoneal de uma solução contendo partes iguais de cloridrato de quetamina² e xilasina³ na dosagem de 0,5ml/Kg. Concluída a anestesia os animais foram pesados (apêndice A) em balança de precisão⁴, posicionados e imobilizados em decúbito dorsal sobre uma mesa operatória. Uma lâmina de vidro, servindo como mesa cirúrgica (VERLI, 2006), foi interposta entre os maxilares do animal e um amarrilho de fio, que envolvia os incisivos inferiores, proporcionou o afastamento dos maxilares e permitiu a realização da ferida cirúrgica (figura 1).

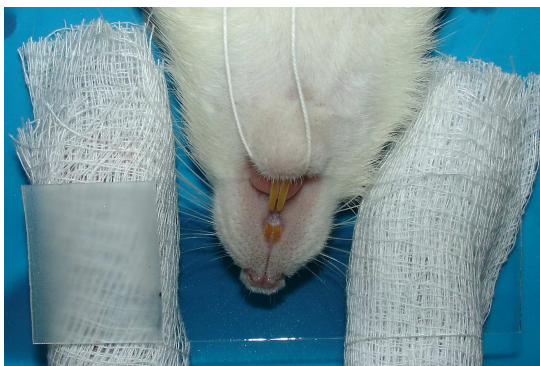


Figura 1: Mesa cirúrgica interposta entre os maxilares e amarrilho envolvendo os incisivos inferiores

Um único operador realizou todas as feridas com o auxílio de um *punch*⁵ de 3mm de diâmetro, colocado perpendicularmente à mucosa na linha média entre o terço apical e médio do ventre lingual. Na porção externa do *punch* foi realizada uma

² Dopamin[®], Laboratório Agribrands, São Paulo, SP, Brasil

³ Anasedan[®] injetável, Laboratório Agribrands, São Paulo, SP, Brasil

⁴ Helmac 3300

⁵ Instrumec[®], Prodesc, Porto Alegre, RS, Brasil

marcação à 1mm da lâmina de corte delimitando a profundidade da ferida (figura 2a e 2b).

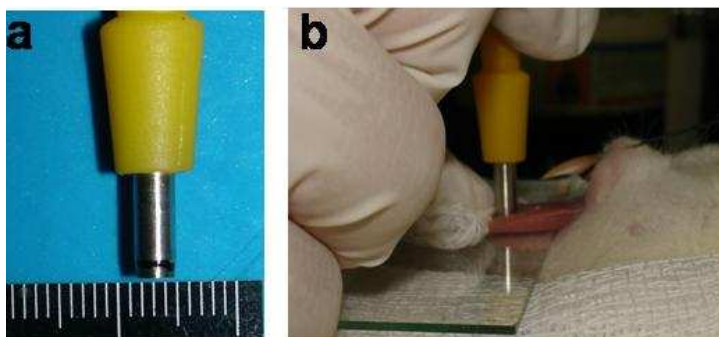


Figura 2: a) Ponta ativa do *punch*; b) posicionamento do *punch* 90° em relação ao ventre lingual

Após o posicionamento do *punch*, foi realizado movimento rotacional no sentido horário e anti-horário possibilitando o corte da mucosa até atingir o limite de profundidade demarcado. Um fragmento de 3mm de diâmetro por 1mm de profundidade foi produzido e sua base liberada por incisão com tesoura cirúrgica (figura 3).

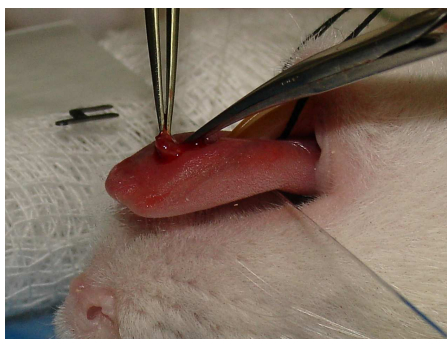


Figura 3: Incisão realizada na base da ferida

Concluído o ato cirúrgico, aguardou-se o tempo necessário para que a hemostasia ocorresse e então o animal foi recolocado na gaiola onde permaneceu por todo o período pós-operatório.

4.2.4 Procedimento cirúrgico de perfusão e morte

Decorrido o tempo pós-operatório de cada grupo, os animais foram anestesiados conforme descrito anteriormente, pesados (apêndice B), posicionados e imobilizados em decúbito dorsal na mesa operatória, conforme descrito anteriormente. Realizou-se uma incisão longitudinal na linha média do ventre do animal e a pele foi divulsionada deixando o tecido muscular evidenciado (figura 4a). Um corte transversal ao longo eixo do animal foi realizado, imediatamente abaixo do osso esterno (figura 4b), possibilitando a incisão do músculo diafragma (figura 4c) e o acesso à caixa torácica e ao coração.

Com o intuito de evitar a coagulação sanguínea injetou-se, diretamente no coração, heparina sódica (5000 UI) na proporção 1ml/kg de peso do animal (figura 4d). Para ampliar o campo de trabalho e possibilitar melhor acesso ao coração, uma incisão relaxante foi efetuada nas costelas do animal, permitindo o rebatimento da porção torácica (figura 4e).

Afastou-se o timo e individualizou-se a artéria aorta ascendente pela passagem de um fio ao seu redor (figura 4f). O pulmão esquerdo foi afastado e a artéria aorta descendente pinçada, de modo que a perfusão ocorresse exclusivamente dessa região em direção à cabeça (figura 4g).

Um cateter para oxigênio número 6⁶ foi acoplado a uma torneira de oxigênio⁷ de mesmo número, e esta, a uma seringa de 50ml contendo soro fisiológico. Incisou-se o ventrículo esquerdo do coração, por onde foi introduzido o cateter até acessar a artéria aorta ascendente, ocasião em que um duplo nó foi dado no fio que previamente individualizara a artéria (figura 4h).

Uma incisão no átrio direito (figura 4i) permitiu o extravasamento do sangue e das soluções seqüencialmente perfundidas via cateter: soro fisiológico (50ml), paraformaldeído a 4% tamponado com fosfato e pH 7,4 (20ml) e novamente soro fisiológico (50ml). A substituição do sangue, presente no sistema vascular, pelo soro fisiológico, foi comprovada pela ausência de sangue nas soluções extravasadas pelo átrio direito e também pela palidez do animal na região de cabeça e pescoço.

⁶ Markmedt®, São Paulo, SP, Brasil

⁷ Sondaplast Materiais Médicos Hospitalares®, Feira de Santana, BA, Brasil

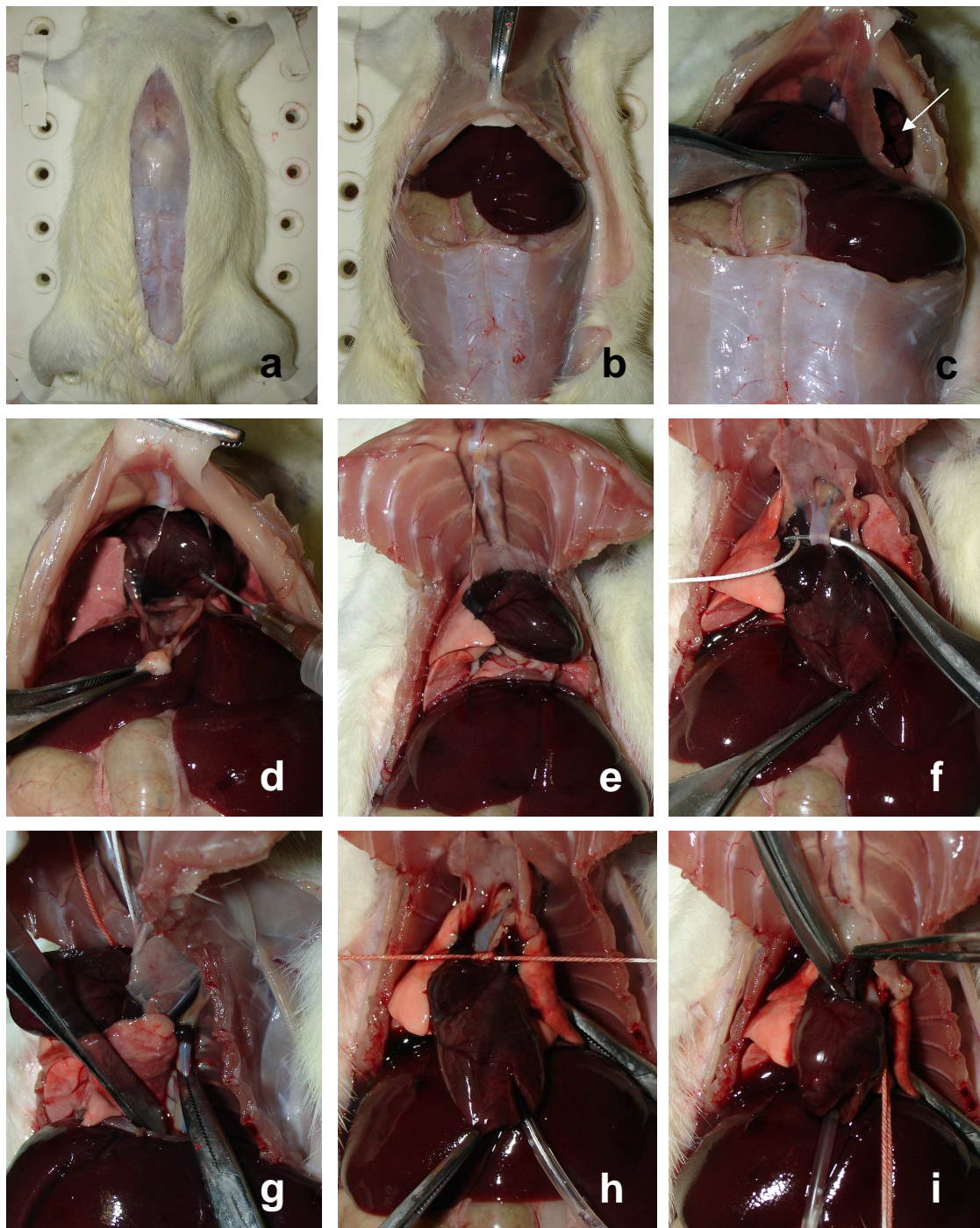


Figura 4: a) Ventre incisionado do animal; b) incisão transversal realizada abaixo do esterno; c) incisão do diafragma (seta); d) injeção da heparina diretamente no coração; e) incisão relaxante realizada nas costelas direitas e esquerdas; f) individualização da artéria aorta ascendente; g) pinçamento da artéria aorta descendente; h) fixação do cateter no interior da artéria aorta ascendente; i) incisão do átrio direito

4.2.5 Dissecação dos linfonodos

As cabeças dos animais perfundidos foram armazenadas individualmente em paraformaldeído 4% por 24 horas. Para a remoção dos linfonodos realizou-se incisão linear desde a sínfise mentoniana até o pescoço (figura 5a) e a pele da região foi divulsionada com auxílio de uma tesoura de ponta romba (figura 5b). Para facilitar o acesso e visualização dos linfonodos foi realizado um corte transversal à primeira incisão, permitindo o afastamento dos tecidos que encobriam os linfonodos (figura 5c e 5d). A peça, contendo linfonodos submandibulares, glândulas sublinguais e glândulas submandibulares bilaterais, foi liberada com auxílio de uma lâmina de bisturi (figura 5e, 5f e 5g). Para deixar essas estruturas em evidência o tecido superficial foi divulsionado com tesoura de ponta romba (figura 6 e 7). Dois linfonodos direitos e dois esquerdos foram retirados de cada animal perfazendo um total de 232 linfonodos que foram devidamente identificados e mantidos em formalina tamponada até o momento do processamento das peças para inclusão em parafina.

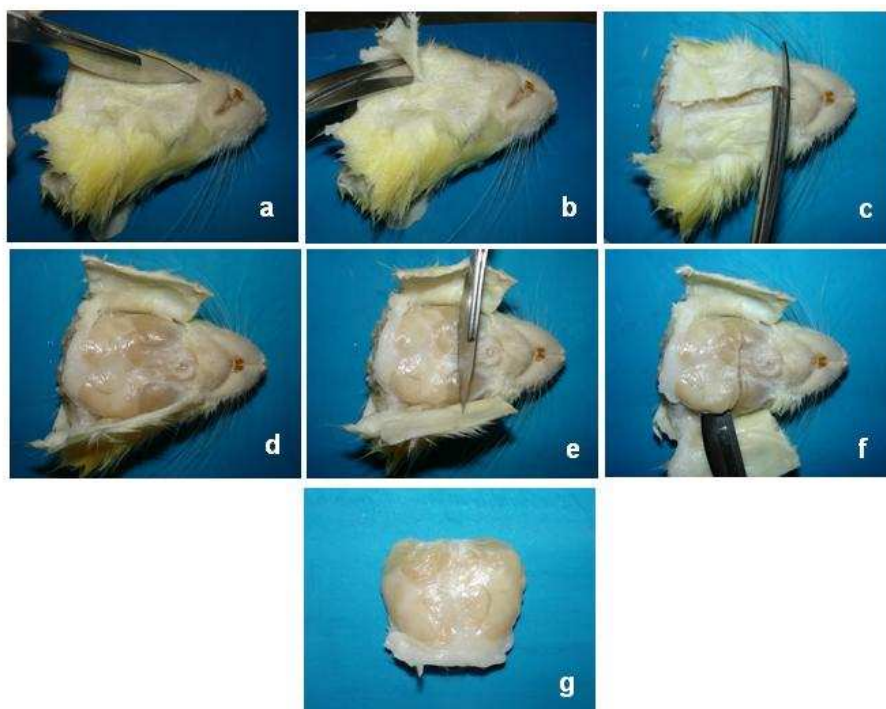


Figura 5: **a)** Incisão linear abaixo da mandíbula até o pescoço; **b)** divulsão da pele com tesoura de ponta romba; **c)** incisão realizada abaixo da mandíbula; **d)** visualização da área contendo os linfonodos; **e)** incisão profunda logo acima dos linfonodos; **f)** incisão realizada nas porções laterais e em profundidade para remoção da peça; **g)** peça contendo linfonodos, glândulas sublinguais e glândulas submandibulares bilaterais

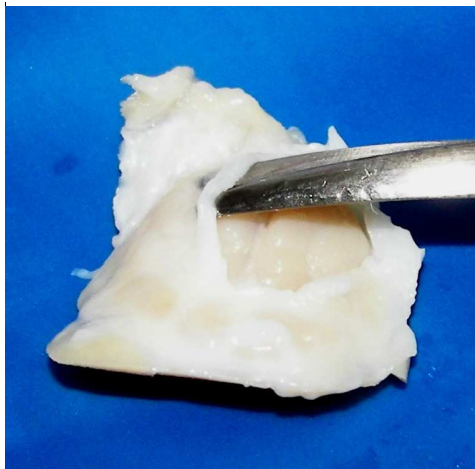


Figura 6: Remoção dos tecidos superficiais com tesoura de ponta romba

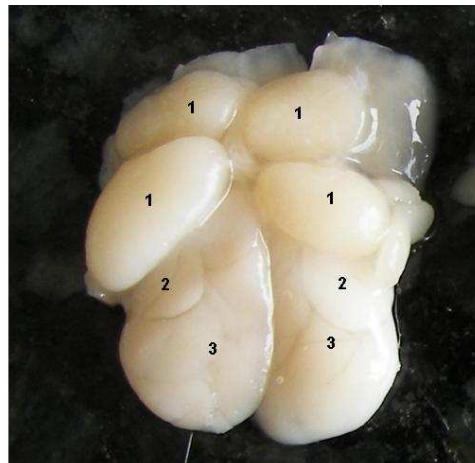


Figura 7: Visualização dos linfonodos (1), das glândulas sublinguais (2), e das glândulas submandibulares (3)

4.2.6 Preparo dos espécimes para análise em microscopia de luz

Os espécimes foram processados, incluídos em parafina e corados com hematoxilina e eosina (HE) no Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia (FO) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Cada linfonodo foi incluído de tal forma que seu hilo e sua face convexa ficassem paralelos a qualquer uma das superfícies laterais do bloco e seu maior eixo paralelo à superfície de corte (figura 8). Os dois linfonodos esquerdos e os dois direitos foram colocados em blocos distintos. Foram realizados cortes de 4 μ m utilizando-se micrótomo de deslize⁸. Coletou-se o décimo primeiro corte de cada bloco para ser corado pela técnica de HE. Durante a coleta dos cortes, os linfonodos direitos foram dispostos o mais próximos da porção fosca da lâmina e os esquerdos na extremidade oposta, possibilitando que todos os linfonodos do mesmo animal fossem visualizados na mesma lâmina. Cada lâmina recebeu uma identificação contendo o número do animal e o grupo experimental ao qual o animal pertencia (apêndice C).

⁸ Leica RM 2165

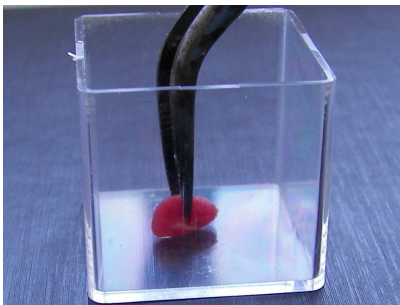


Figura 8: Posição do linfonodo no emblocamento

4.2.7 Análise dos espécimes corados por Hematoxilina e Eosina em microscopia de luz

Cada lâmina recebeu uma etiqueta, sobreposta à identificação inicial, contendo uma numeração aleatória iniciada pelo algarismo um, possibilitando o cegamento tanto no momento da coleta de imagens quanto no momento da avaliação dos dados. O local de observação dos cortes histológicos corados com HE foi a região dos nódulos foliculares e do córtex profundo. Em cada linfonodo, foram avaliados três nódulos foliculares (N1, N2 e N3) e duas regiões de córtex profundo (C1 e C2) (figura 9a). Em cada nódulo folicular foram avaliadas quatro áreas, estando a área 1 (A1) localizada no interior do centro germinativo, área 2 (A2) na lateral direita, área 3 (A3) na lateral esquerda e área 4 (A4) na base do nódulo (área voltada para a região central do linfonodo), perfazendo um total de 14 campos em cada linfonodo (figura 9b).

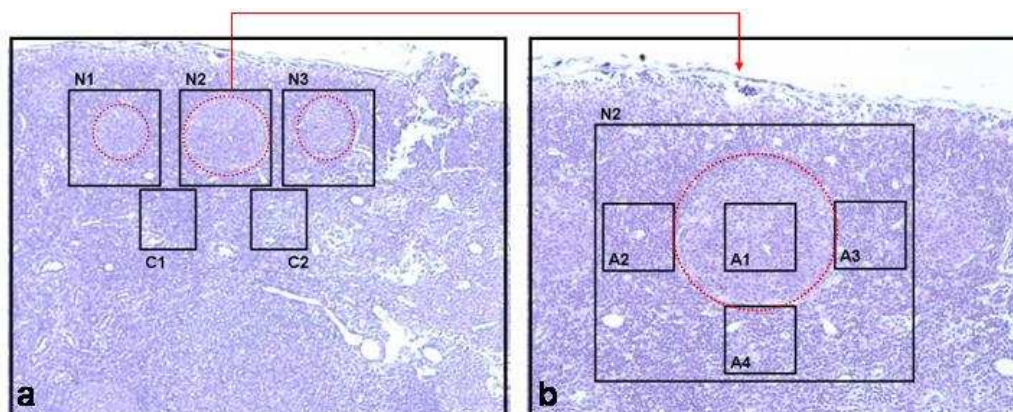


Figura 9: a) Modelo esquemático dos locais avaliados em cada linfonodo. HE, 40X de aumento; b) maior aumento do local N2 demonstrando as áreas avaliadas em cada nódulo folicular. HE, 100X de aumento

4.2.7.1 Análise quantitativa

Procurando-se abranger a maior área possível, em cada local de análise, foram capturadas imagens em aumentos de 200 vezes, utilizando-se microscópio óptico⁹ acoplado ao sistema digital¹⁰ de captação de imagens, por intermédio do Programa Image Pro-Plus¹¹. Esta etapa foi realizada no Laboratório de Patologia da FO-PUCRS. As imagens, correspondentes a cada local de análise, foram inseridas no *software* Image Tool¹² visando a contagem dos vasos sanguíneos, empregando artifício disponibilizado pelo próprio programa (figura 10a e 10b). A coleta e análise das imagens foram realizadas por um único operador, sendo que o mesmo desconhecia o grupo e o animal ao qual a lâmina pertencia. Todas as lâminas foram avaliadas em duplicata, com intervalo de tempo de uma semana entre a primeira e a segunda análise. O número total de vasos sanguíneos foi transferido para uma planilha do Excel. Os espécimes com escores diferentes nas duas observações foram reavaliados e o escore final para cada variável, nesse caso, foi aquele que ocorreu em duas das três avaliações.

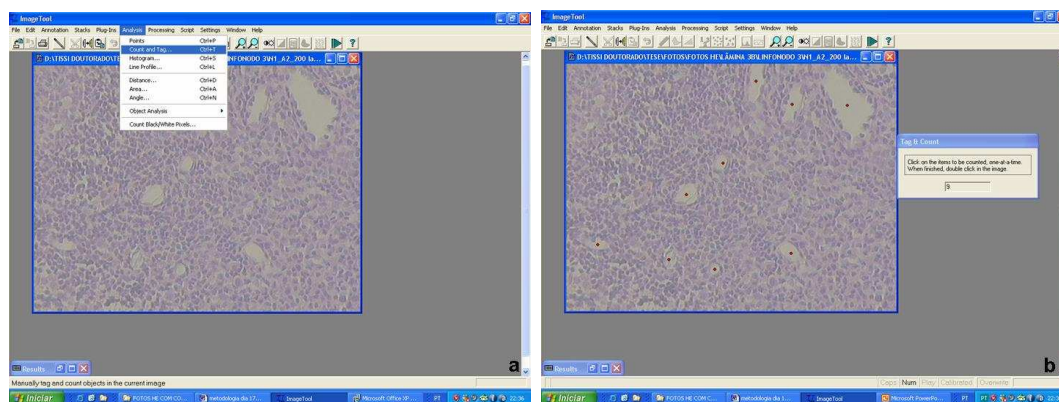


Figura 10: a e b) Imagens demonstrando a seqüência utilizada para a contagem dos vasos sanguíneos

⁹ Olympus BX 50 F4 – Olympus Optical CO. LTD - Japan

¹⁰ Sony DXC 107A – Sony Corporation - Japan

¹¹ Image Pro-Plus 4.5

¹² Image Tool – 3.0

4.2.7.2 Análise qualitativa

Com a intenção de descrever as características da vasculatura de linfonodos nos diferentes tempos pós-operatórios, foram adquiridas imagens em aumentos de 40, 100, 200 e 400 vezes nos mais diversos locais desses órgãos.

4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

4.3.1 Amostra

A amostra para a análise em microscopia eletrônica de varredura foi constituída de 39 ratos albinos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*, machos, com idade de 3 meses e peso entre 250 e 300g. Os 123 linfonodos desses animais já estavam corroídos e foram provenientes de pesquisa realizada anteriormente por Verli (2006). Desses linfonodos, nove foram provenientes de quatro animais saudáveis, ou seja, sem a presença de ferida cirúrgica na língua, que foram utilizados como animais-controle. A metodologia aplicada para a corrosão desses linfonodos é descrita no anexo 3.

4.3.2 Preparo dos espécimes para análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os espécimes corroídos foram fixados em *stubs* de maneira que seu hilo permanecesse em contato com a fita adesiva (figura 11a) e metalizados seguindo o protocolo de metalização com 2 fios de carbono¹³ e 90 segundos de ouro platinado¹⁴. Para aumentar a condutibilidade de elétrons nos espécimes foram colados fios de cobre com 0,2mm de espessura, dobrados em “L”, sendo que o maior segmento do “L” ficava em contato com o espécime e o menor era colado com fita de carbono na borda lateral do *stub* (figura 11b) segundo Verli et al., 2007.

¹³ Electron Microscopy Science, Carbon cord

¹⁴ BAL-TEC, Foil target Au, 54mm de diâmetro

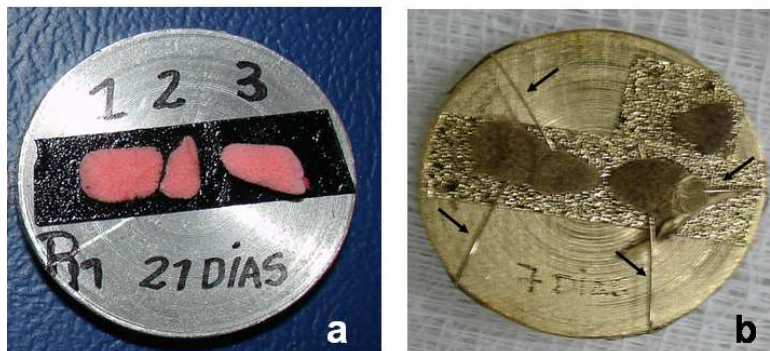


Figura 11: a) Espécimes colados nos *stubs*; b) espécimes metalizados com a utilização de fios de cobre (setas)

4.3.3 Análise dos espécimes em microscopia eletrônica de varredura (MEV)

4.3.3.1 Análise quantitativa

A análise dos linfonodos através da MEV foi realizada no Centro de Microscopia e Microanálise (CEMM) da PUCRS com microscópio eletrônico de varredura¹⁵ com poder de resolução de 3,5nm, faixa de aumentos de 10 a 400.000 vezes e tensão de aceleração de elétrons de 200V a 30kV. Todos os linfonodos foram fotografados em um aumento de 26 vezes e nesta imagem foram aferidas as medidas do maior e menor diâmetro, dividindo-se desta forma o linfonodo em quatro quadrantes (figura 12a).

Dentre os vários nódulos foliculares presentes em cada quadrante, três deles foram escolhidos para serem avaliados, perfazendo um total de 12 nódulos foliculares avaliados em cada linfonodo. Cada nódulo folicular foi fotografado em um aumento de 200 vezes e nessa imagem realizou-se a mensuração do maior diâmetro no eixo X e no eixo Y (figura 12b). Essas medidas tinham como limite externo as vênulas de endotélio alto que contornam cada nódulo folicular.

A área dos nódulos foliculares foi calculada utilizando-se a fórmula para cálculo da área de uma elipse que é: $A = \pi \cdot a \cdot b$ onde π apresenta um valor fixo de 3,141592654, **a** é igual a metade da medida do maior diâmetro e **b** é igual a metade da medida do menor diâmetro.

¹⁵ Philips, modelo XL30

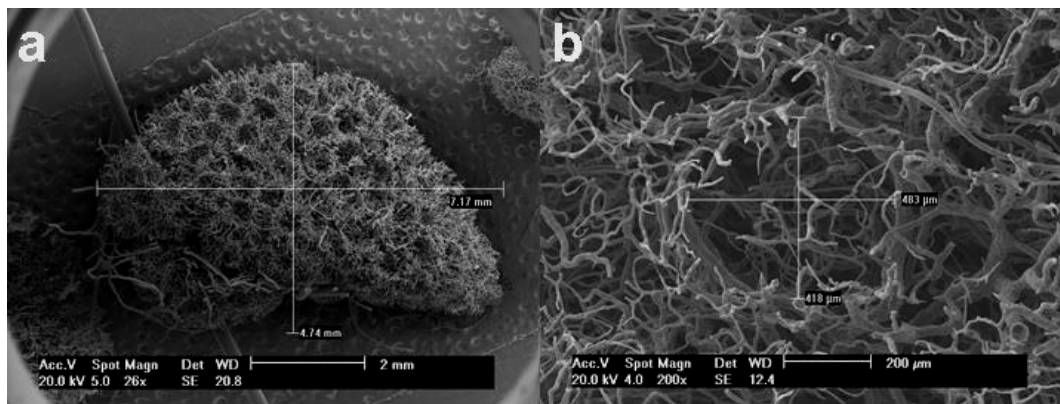


Figura 12: **a)** Eletromicrografia de varredura demonstrando a divisão do linfonodo em quadrantes. 26X de aumento; **b)** eletromicrografia de varredura demonstrando as medidas do diâmetro no eixo X e no eixo Y dos nódulos foliculares. 200X de aumento

Visando avaliar o diâmetro dos modelos vasculares presentes na periferia de cada nódulo folicular, capturou-se imagem com aumento entre 300 a 400 vezes. O diâmetro de três vasos foi mensurado a uma distância de 30μm de sua extremidade livre, sendo que para ser avaliado o vaso deveria estar paralelo à superfície do linfonodo e sem evidências de fraturas (figura 13). Todas as medidas foram cadastradas em planilha do Excel¹⁶ e os dados analisados estatisticamente.

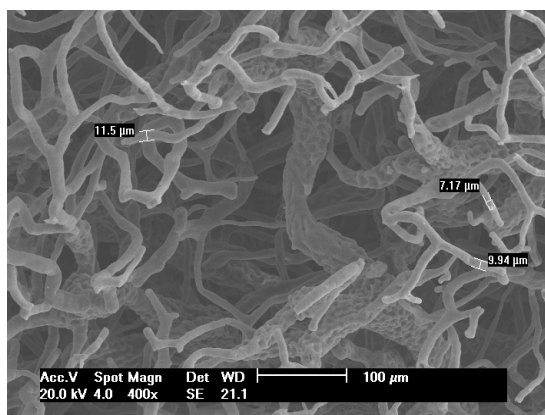


Figura 13: Eletromicrografia de varredura demonstrando a mensuração do diâmetro dos modelos vasculares na superfície do nódulo folicular. 400X de aumento

¹⁶ Microsoft® Excel 2002

4.3.3.2 Análise qualitativa

Com o intuito de descrever a vasculatura de linfonodos nos diferentes tempos pós-operatórios, através da MEV, outras imagens em diferentes aumentos foram adquiridas em toda a superfície do linfonodo.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.4.1 Análise em microscopia de luz

O grau de concordância intra-examinador, na contagem do número de vasos sanguíneos, foi verificado por meio do Coeficiente de Correlação Intra-Classe.

O número médio total de vasos sanguíneos foi comparado entre os diferentes grupos experimentais, excetuando-se o animal-controle, por meio da Análise de Variância (ANOVA) considerando-se um intervalo de confiança de 95%. Nos casos de diferença significativa a ANOVA foi complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, no nível de significância de 5%.

O número médio de vasos sanguíneos presentes nas distintas áreas avaliadas, excetuando-se o animal-controle, foi comparado dentro de cada grupo experimental por meio da ANOVA considerando-se um intervalo de confiança de 95%. Nos casos de diferença significativa a ANOVA foi complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, no nível de significância de 5%.

O número médio total de vasos sanguíneos presentes nos grupos experimentais foram comparados com o o número médio total de vasos sanguíneos do respectivo controle por meio do Teste t considerando-se um intervalo de confiança de 95%.

4.4.2 Análise em microscopia eletrônica de varredura

As áreas dos nódulos foliculares e o diâmetro dos modelos vasculares, nos diferentes tempos pós-operatórios, foram comparados por meio da ANOVA considerando-se um intervalo de confiança de 95%. Nos casos de diferença

significativa a ANOVA foi complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, no nível de significância de 5%.



5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICA DA AMOSTRA

Ao final do período experimental não se observou redução no peso médio total dos animais (tabela 1). No decorrer dos tempos pós-operatório houve morte de dois animais (grupo 1 e 2), ambos no primeiro dia de controle pós-operatório.

Tabela 1: Número de animais e peso médio (g) inicial e final nos grupos experimentais (excetuando-se os animais-controle). Porto Alegre, 2007.

Grupos	Peso médio (g)		n	
	Inicial	Final	Inicial	Final
1 (2 dias)	273,1	274,2	9	8
2 (3 dias)	262,4	272,2	9	8
3 (7 dias)	281,8	285,8	9	9
4 (10 dias)	270	280,2	9	9
5 (14 dias)	303,3	317,3	9	9
6 (21 dias)	292,6	306,7	9	9

5.2 ANÁLISE DOS ESPÉCIMES EM CORTES HISTOLÓGICOS CORADOS COM HEMATOXILINA E EOSINA

5.2.1 Análise quantitativa da vasculatura dos linfonodos nos diferentes grupos experimentais

O Coeficiente de Correlação Intra-classe permitiu verificar que a concordância intra-examinador na contagem de vasos sanguíneos foi excelente (tabela 2).

Tabela 2: Concordância intra-examinador em relação ao número de vasos sanguíneos presentes nas áreas avaliadas. Porto Alegre, 2007.

Área	r_i	p
A1	1,000	-
A2	0,998	<0,001
A3	0,999	<0,001
A4	0,999	<0,001
C1	1,000	-
C2	1,000	-

Através do Coeficiente de Correlação Intra-Classe (r_i) verifica-se uma excelente concordância intra-examinador

Nos diferentes grupos pós-operatórios comparou-se o número médio total de vasos sanguíneos e constatou-se que o grupo 6 apresentou a maior média não

diferindo significativamente dos grupos 1, 3 e 5, contudo diferiu dos grupos 2 e 4 (ANOVA) (tabela 3).

Tabela 3: Número médio total e desvio-padrão (dp) de vasos sanguíneos nos diferentes grupos experimentais, quando excluídos os animais-controle. Porto Alegre, 2007.

Grupos	Número médio total	dp
1 (2 dias)	4,11 ^{AB}	0,49
2 (3 dias)	3,55 ^B	0,61
3 (7 dias)	4,62 ^{AB}	0,72
4 (10 dias)	3,89 ^B	1,23
5 (14 dias)	3,96 ^{AB}	0,64
6 (21 dias)	5,04 ^A	0,57

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem significativamente através da Análise de Variância complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, no nível de significância de 5%.

Foram também verificadas, dentro de cada grupo experimental, as diferenças existentes no número médio de vasos sanguíneos nas distintas áreas, e constatou-se que a área A1 (interior do centro germinativo) apresentou o menor número de vasos sanguíneos, diferindo significativamente das demais áreas em todos os grupos experimentais. Já as áreas localizadas na porção basal do nódulo folicular (área A4) e na região de córtex profundo (C1/C2) apresentaram a maior quantidade de vasos sanguíneos e foram semelhantes estatisticamente entre si em todos os grupos experimentais (ANOVA) (tabela 4).

O teste t, considerando-se um intervalo de confiança de 95%, foi utilizado para comparar o número médio de vasos sanguíneos observados em cada grupo experimental, com o número médio de vasos sanguíneos do respectivo animal-controle e constatou-se uma diferença estatisticamente significativa nos grupos 1, 2, 5 e 6 (2, 3, 14 e 21 dias respectivamente) (tabela 5).

Tabela 4: Número médio e desvio-padrão (dp) de vasos sanguíneos nas diferentes áreas de cada grupo experimental, quando excluídos os animais-controle. Porto Alegre, 2007.

Grupos	Áreas avaliadas							
	A1		A2/A3		A4		C1/C2	
	Nº médio	Dp	Nº médio	dp	Nº médio	dp	Nº médio	dp
1 (2 dias)	0,61 ^C	0,20	4,20 ^B	0,53	5,30 ^A	0,67	5,18 ^A	0,89
2 (3 dias)	0,27 ^B	0,12	3,95 ^A	0,48	4,53 ^A	0,75	4,48 ^A	1,10
3 (7 dias)	1,17 ^C	0,54	4,44 ^B	0,53	6,14 ^A	0,76	5,77 ^A	1,22
4 (10 dias)	0,88 ^B	0,54	4,14 ^A	1,34	4,86 ^A	1,28	4,67 ^A	1,72
5 (14 dias)	0,27 ^C	0,14	4,16 ^B	0,71	5,08 ^A	0,75	5,05 ^A	0,99
6 (21 dias)	0,47 ^C	0,28	5,23 ^B	0,77	6,53 ^A	0,61	6,38 ^A	0,79

Médias seguidas por letras distintas na linha diferem significativamente através da Análise de Variância, complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, no nível de significância de 5%

Tabela 5: Número médio total e desvio-padrão (dp) de vasos sanguíneos presentes nos grupos experimentais comparados com número médio total de vasos sanguíneos do respectivo animal-controle. Porto Alegre, 2007.

Grupos	Número médio total de vasos sanguíneos				P
	Grupos experimentais		Animais-controle		
	Nº médio de vasos sanguíneos	dp			
1 (2 dias)	4,11	0,49	2,91	<0,001	
2 (3 dias)	3,55	0,61	2,89	0,018	
3 (7 dias)	4,62	0,72	4,03	0,055	
4 (10 dias)	3,89	1,23	3,35	0,222	
5 (14 dias)	3,96	0,64	3,15	0,005	
6 (21 dias)	5,04	0,57	2,65	<0,001	

p= nível mínimo de significância do Teste t

5.2.2 Análise qualitativa da vasculatura dos linfonodos nos diferentes grupos experimentais

5.2.2.1 Características da vasculatura da região de córtex externo

Em todos os grupos, inclusive nos animais-controle, poucos capilares foram vistos na zona internodular (área A2 e A3) e na zona basal (voltada para a porção medular) dos nódulos foliculares (área A4). Nesses locais a maioria dos vasos sanguíneos apresentou endotélio cúbico, caracterizando as vênulas de endotélio alto (VEA) (figura 14).

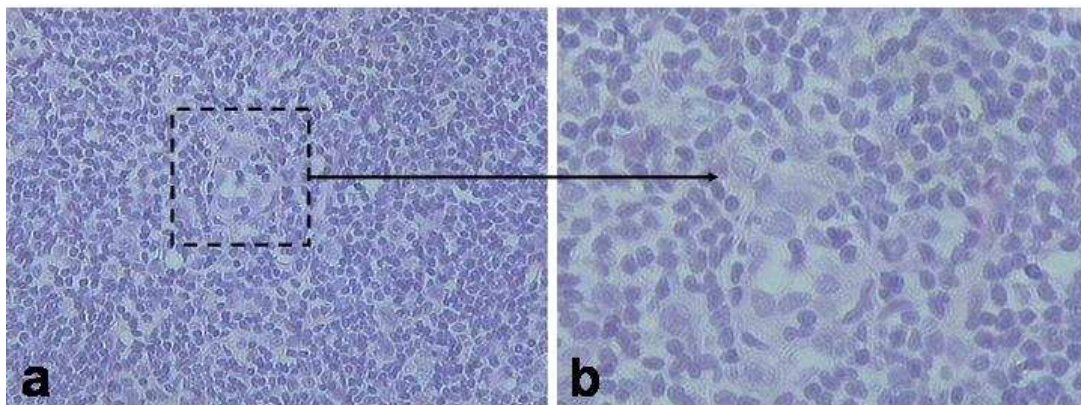


Figura 14: Vaso sanguíneo com endotélio cúbico (VEA), característico das áreas internodulares. **a)** HE, 200X de aumento; **b)** HE, 400X de aumento

No interior do centro germinativo (área A1) dos nódulos foliculares observou-se um número reduzido de capilares de pequeno calibre (figura 15) e ausência total de VEAs. Em poucos linfonodos foram visualizados capilares na porção apical (voltada para a cápsula) dos nódulos foliculares (figura 16).

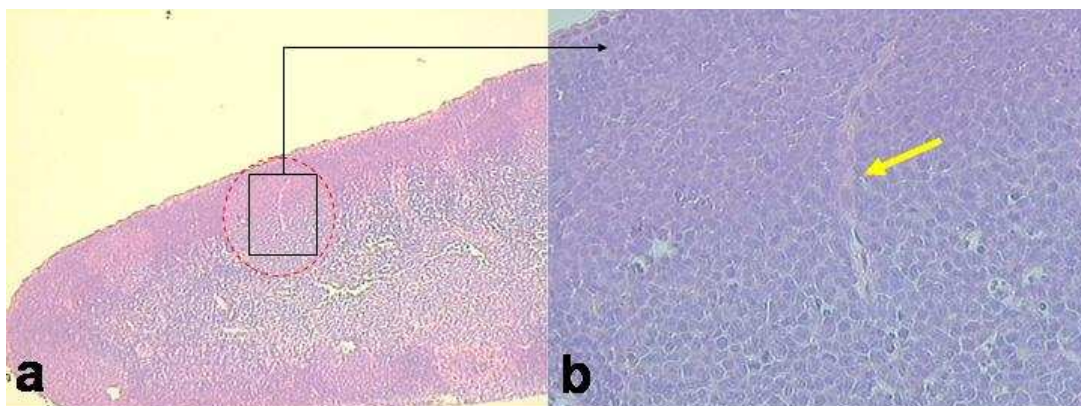


Figura 15: **a)** Figura demonstrando nódulo folicular (círculo) e o local no interior do centro germinativo onde foi realizada a avaliação (retângulo). HE, 40X de aumento; **b)** visão mais aproximada no centro germinativo demonstrando a presença de capilar (seta amarela). HE, 200X de aumento

Na porção basal de alguns poucos nódulos foliculares observou-se que as VEAs formavam uma cadeia vascular com forma de “cesto” com sua parte côncava voltada para o interior do centro germinativo. Os vasos, presentes na porção basal do nódulo folicular, mostraram-se mais calibrosos em consequência da anastomose dos ramos de menor calibre, presentes nas porções laterais dos nódulos (figura 17).

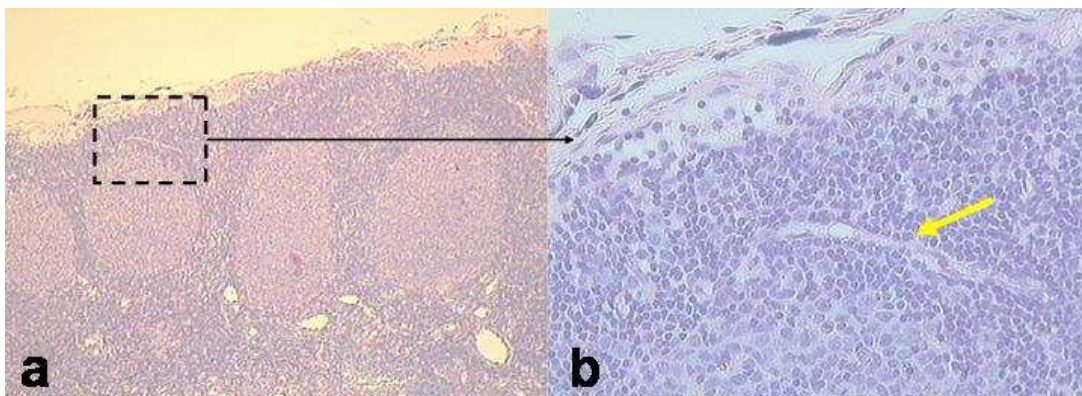


Figura 16: **a)** Figura demarcando a porção apical de um nódulo folicular (retângulo). HE, 40X de aumento; **b)** presença de capilar no interior da área demarcada (seta amarela). HE, 200X de aumento

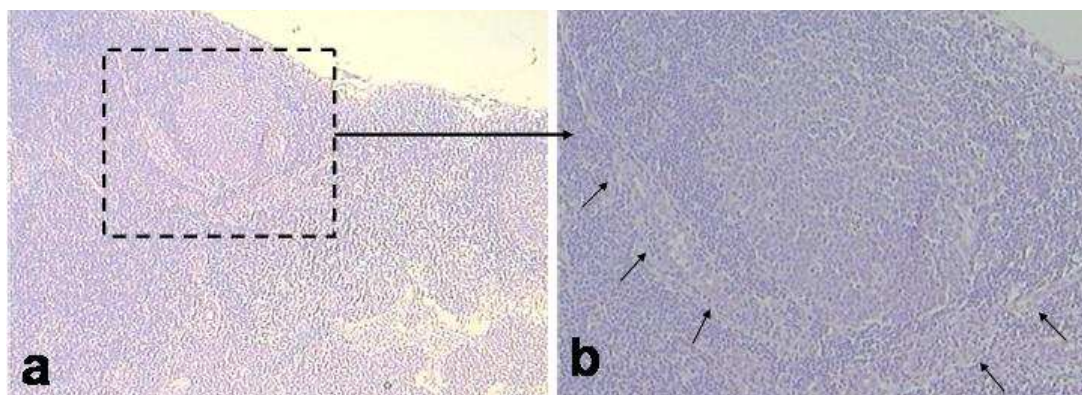


Figura 17: Cadeia vascular em forma de “cesto” circundando o nódulo folicular em suas porções inferior e laterais. **a)** 40X de aumento; **b)** 100X de aumento

As VEAs, quando localizadas nas áreas A2/A3 e A4, apresentavam calibres menores que aquelas localizadas em região de córtex profundo (área C1/C2). No interior dos linfonodos, independente da localização, os vasos apresentavam em seu lúmen uma quantidade variada de linfócitos e raros eritrócitos. Quando as VEAs eram visualizados em animais-controles, constatou-se que na zona internodular (área A2/A3) e na porção basal aos nódulos foliculares (área A4) apresentavam lúmen aberto com linfócitos no seu interior (figuras 18 e 19).

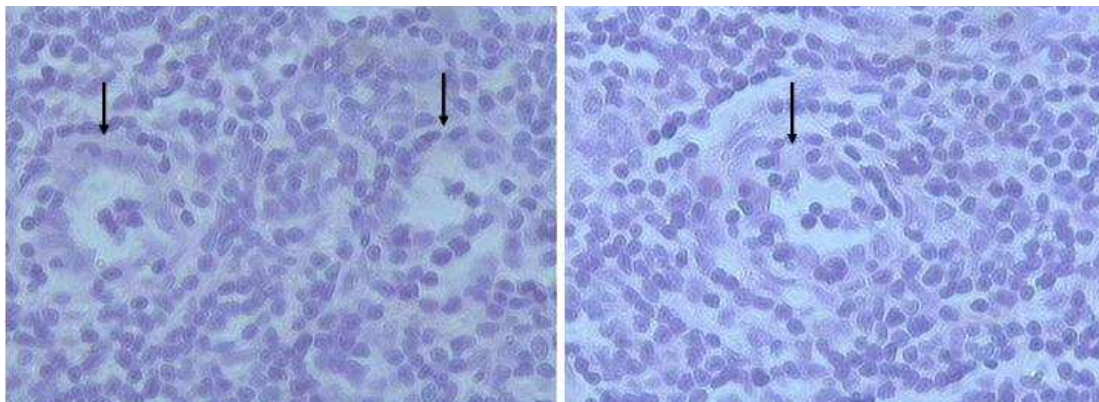


Figura 18: VEAs observadas na zona internodular (área A2/A3) de animais-controle (setas). HE, 400X de aumento

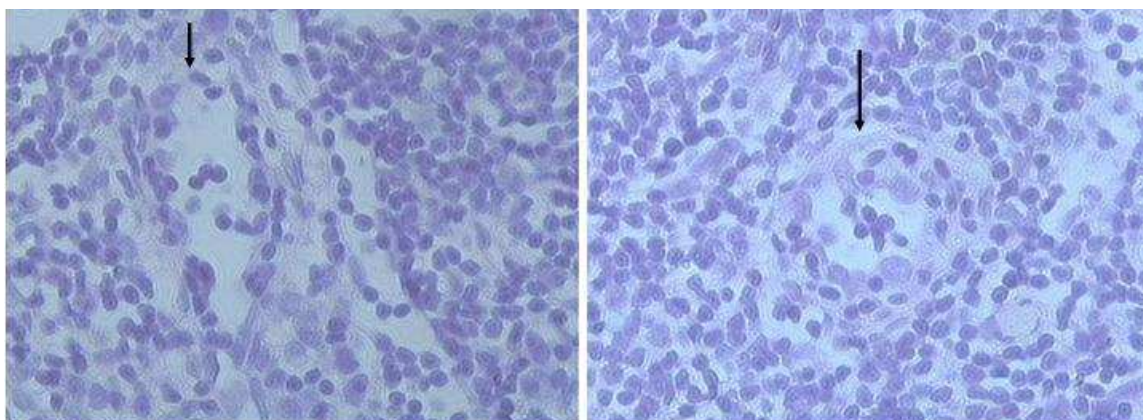


Figura 19: VEAs observadas na porção basal dos nódulos foliculares (área A4) de animais-controle (setas). HE, 400X de aumento

Quando os mesmos locais (áreas A2/A3 e A4) foram visualizadas nos diferentes tempos pós-operatórios observou-se que no grupo 1 (48 horas) as características das VEAs se aproximavam muito daquelas vistas nos animais-controle, enquanto que nos grupos 2, 3, 4, 5 e 6 (72 horas, 7 dias, 10 dias, 14 dias e 21 dias, respectivamente) as VEAs apresentavam um endotélio hipertrofiado e lúmem fechado (figura 20 e 21). No grupo 6 constatou-se a presença de alguns vasos com lúmem aberto e endotélio menos hipertrófico (figura 22).

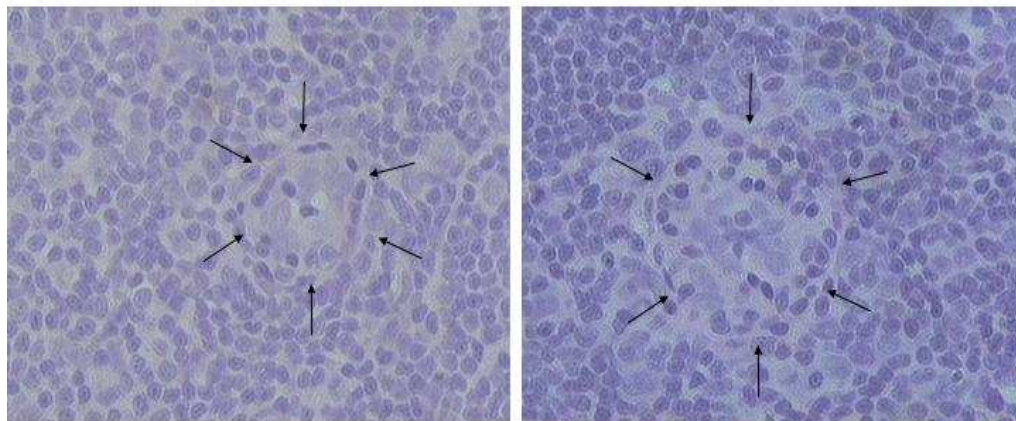


Figura 20: VEAs observadas na zona internodular (área A2/A3) de animais dos grupos 2, 3, 4, 5 e 6. Setas localizadas na periferia das vênulas. HE, 400X de aumento

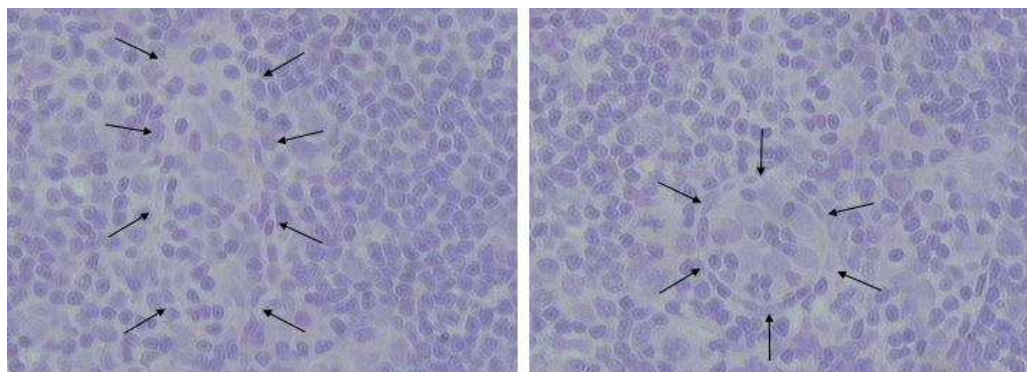


Figura 21: VEAs observadas na porção basal dos nódulos foliculares (área A4) de animais dos grupos 2, 3, 4, 5 e 6. Setas localizadas na periferia das vênulas. HE, 400X de aumento

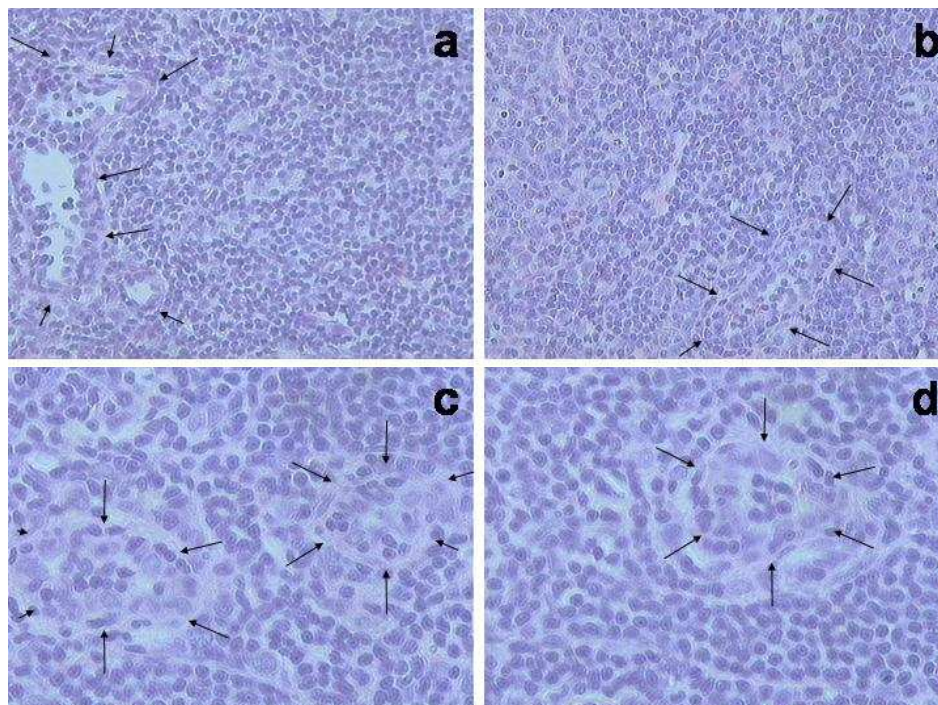


Figura 22: VEAs observadas na zona internodular (área A2/A3) e na porção basal (A4) dos nódulos foliculares de animais do grupo 6. Setas localizadas na periferia das vênulas. **a)** HE, 200X de aumento; **b)** HE, 200X de aumento; **c)** HE, 400X de aumento; **d)** HE, 400X de aumento

5.2.2.2 Características da vasculatura da região de córtex profundo

O córtex profundo foi visualizado abaixo da região do córtex externo, apresentando forma semi-esférica e projetado para o interior do linfonodo (figura 23). Na região de córtex profundo as vênulas de endotélio alto (VEAs) apresentavam calibre e lúmen maiores e menor quantidade de linfócitos em seu interior quando comparadas àquelas vênulas observadas na região internodular. Além disso, quanto mais próximo da porção medular do linfonodo, mais regular tornava-se o endotélio do vaso (figura 24). No interior das VEAs observaram-se alguns linfócitos realizando diapedese, nessa situação o linfócito lança projeções assumindo forma de “raquete” ou “ampulheta” (figura 25).

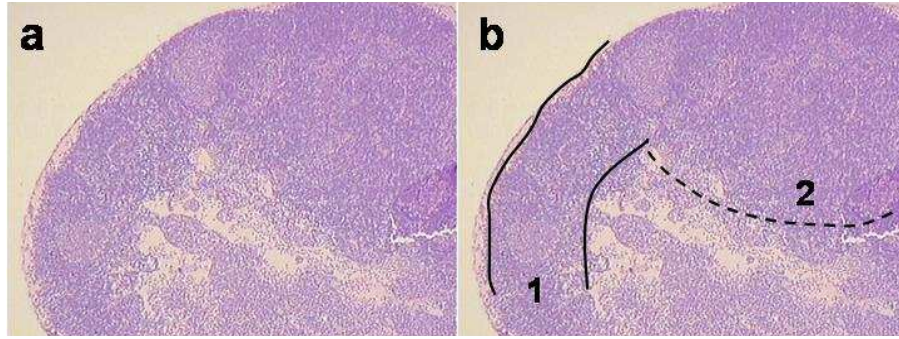


Figura 23: **a)** Imagem demonstrando a presença de córtex profundo. HE, 40X de aumento; **b)** delimitação do córtex externo (1) e do córtex profundo (2). HE, 40X de aumento

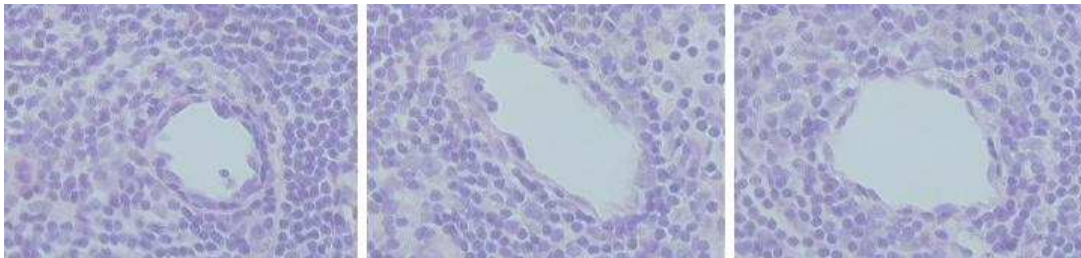


Figura 24: VEAs com endotélio mais regular observadas na região de córtex profundo (área C1/C2). HE, 400X de aumento

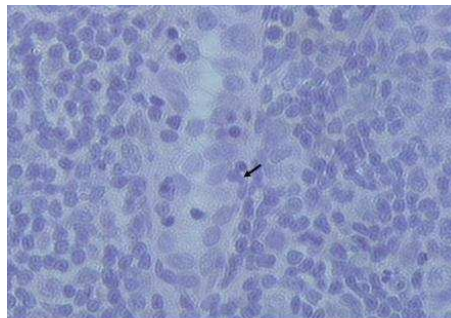


Figura 25: Linfócito realizando diapedese (seta). HE, 400X de aumento

5.2.2.3 Características da vasculatura da região medular

As vênulas de endotélio alto (VEAs) presentes na porção medular do linfonodo apresentam íntima relação com os labirintos linfáticos sendo separadas destes por uma fina camada de espaço intersticial. Além disso, apresentam calibre

amplo, lúmen aberto, e ausência quase que total de linfócitos em seu interior (figura 26).

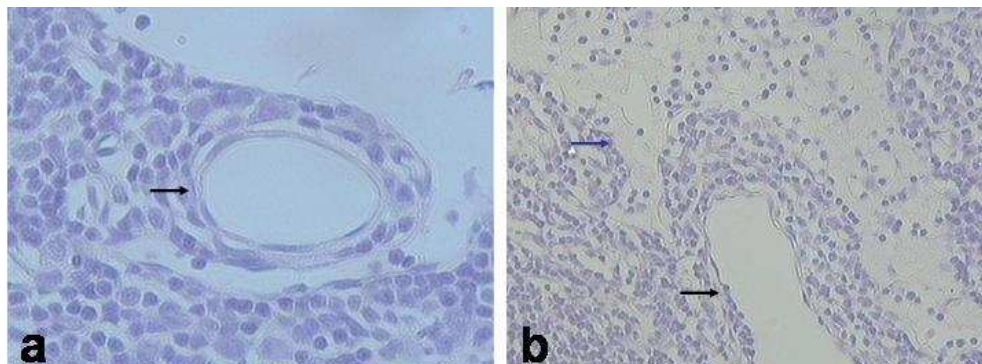


Figura 26: **a)** Endotélio regular das vênulas presentes na zona medular. HE, 400X de aumento; **b)** contato íntimo das vênulas (seta preta) com os cordões medulares (seta azul). HE, 200X de aumento

5.3 ANÁLISE DOS ESPÉCIMES EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

5.3.1 Análise quantitativa da área dos nódulos foliculares nos diferentes grupos experimentais

Verificou-se, através da ANOVA, que a média das áreas dos nódulos foliculares nos grupos 2, 3, 4 e 5 foram significativamente maiores quando comparadas ao grupo-controle, enquanto que as áreas dos grupos 1 e 6 não diferiram dos demais grupos (ANOVA) (tabela 6).

Tabela 6: Média em μm^2 e desvio-padrão (dp) das áreas dos nódulos foliculares nos diferentes grupos experimentais. Porto Alegre, 2007.

Grupo	Área dos nódulos foliculares	
	Média (μm^2)	dp
Controle	93878 ^B	8048
1 (2 dias)	144412 ^{AB}	22689
2 (3 dias)	161567 ^A	24671
3 (7 dias)	166113 ^A	16741
4 (10 dias)	188677 ^A	39857
5 (14 dias)	158170 ^A	32268
6 (21 dias)	144376 ^{AB}	24843

Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem significativamente através da Análise da Análise de Variância complementada pelo Teste de Comparação Múltiplas de Tukey, no nível de significância de 5%.

5.3.2 *Análise quantitativa do diâmetro dos modelos vasculares nos diferentes grupos experimentais*

O diâmetro dos modelos vasculares, presentes na periferia dos nódulos foliculares, foi comparado nos diferentes grupos pós-operatórios e constatou-se que nos grupos 1, 2, 3 e 4 foi significativamente maior que no grupo-controle, enquanto que esse diâmetro nos grupos 5 e 6 não diferiu estatisticamente dos demais grupos (ANOVA) (tabela 7).

Tabela 7: Média em μm e desvio-padrão (dp) dos diâmetros dos modelos vasculares nos diferentes grupos experimentais. Porto Alegre, 2007.

Grupos	Diâmetro dos modelos vasculares	
	Média (μm)	Dp
Controle	7,70 ^B	0,24
1 (2 dias)	9,57 ^A	0,35
2 (3 dias)	9,05 ^A	0,48
3 (7 dias)	9,25 ^A	0,58
4 (10 dias)	9,79 ^A	0,99
5 (14 dias)	8,69 ^{AB}	0,80
6 (21 dias)	8,62 ^{AB}	0,86

Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem significativamente através da Análise de Variância complementada pelo Teste de Comparação Múltiplas de Tukey, no nível de significância de 5%.

5.3.3 *Análise qualitativa da vasculatura dos linfonodos nos diferentes grupos experimentais*

A distinção entre os diferentes tipos de vasos sanguíneos foi feita com base na impressão das células endoteliais sobre os modelos de corrosão quando visualizados em MEV. Em modelos arteriais as impressões seguiam um padrão de ranhuras profundas e os núcleos se apresentavam alongados e orientados longitudinalmente ao vaso sanguíneo (figura 27a). Nos modelos de vênulas regulares, as impressões nucleares seguiam um padrão de núcleos esféricos ou ovóides (figura 27c). Em alguns vasos de maior calibre observou-se, além da impressão do núcleo, a impressão do limite celular (figura 27b). Já os modelos de vênulas de endotélio alto (VEAs) apresentavam irregularidades superficiais exibindo um padrão de marcas profundas e cristas altas (figura 27d).

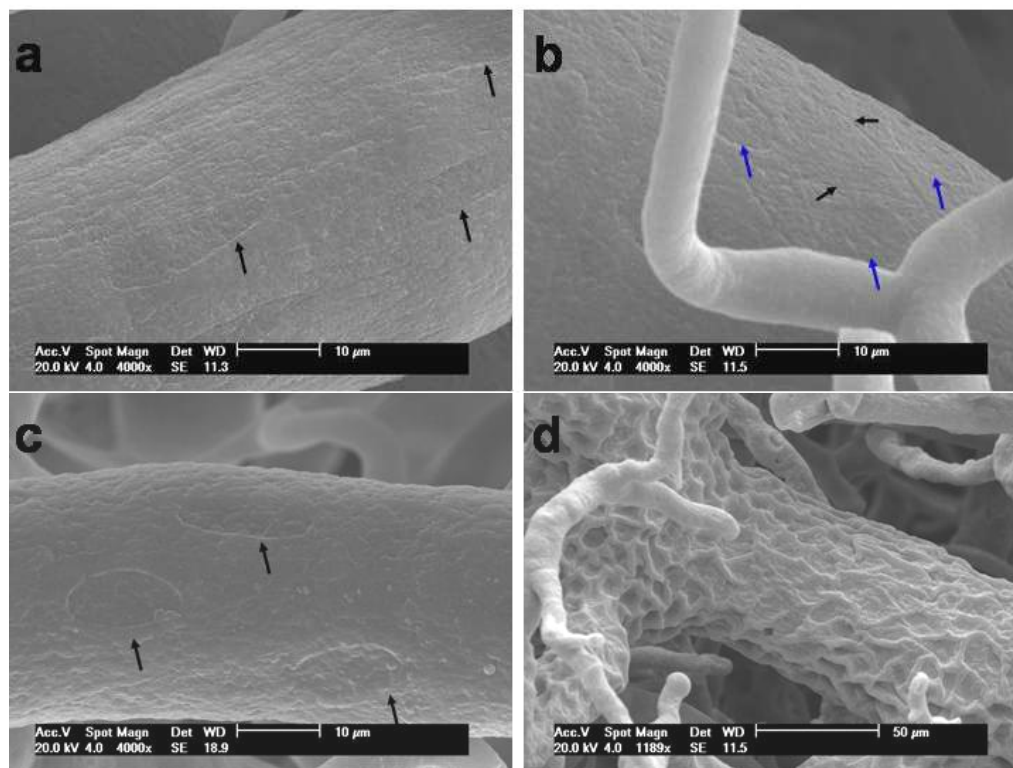


Figura 27: **a)** Eletromicrografia de varredura de modelos arteriais; setas indicam a impressão nuclear. 4000X de aumento; **b)** eletromicrografia de varredura de vasos sanguíneos exibindo impressão nuclear (setas azuis) além da impressão do limite celular (setas pretas). 4000X de aumento; **c)** eletromicrografia de varredura de modelos de vênulas regulares; setas indicam a impressão nuclear. 4000X de aumento; **d)** eletromicrografia de varredura de modelos de VEAs. 1180X de aumento

5.3.3.1 Característica da vasculatura da região de córtex externo

A vasculatura da região do córtex externo apresentou-se como uma densa rede vascular interrompida por depressões de forma ovóide correspondente aos nódulos foliculares (figura 28a), sendo que no interior desses espaços poucos capilares foram observados (figura 28b). Abaixo da cápsula, sobre os nódulos foliculares, os capilares formam um plexo em forma de cúpula (figura 29) e dirigem-se para o interior do linfonodo onde se continuam com as vênulas de endotélio alto (figura 30).

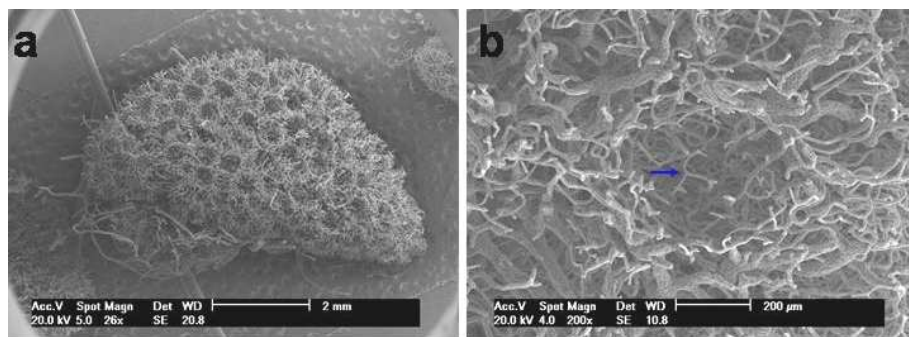


Figura 28: **a)** Eletromicrografia de varredura demonstrando densa rede vascular, interrompida pelos nódulos foliculares, presentes no córtex externo. 26X de aumento; **b)** eletromicrografia de varredura demonstrando o interior dos nódulos foliculares com mínima quantidade de vasos (seta). 200X de aumento

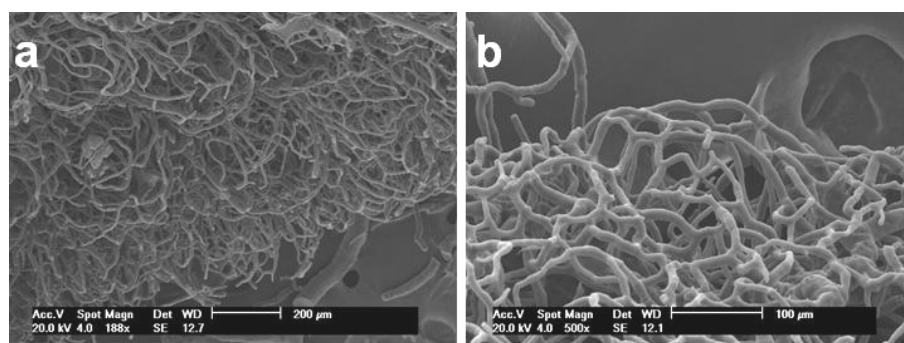


Figura 29: Eletromicrografia de varredura demonstrando a cadeia de capilares formando plexo semelhante à cúpula na superfície externa dos nódulos foliculares; **a)** 188X de aumento; **b)** 500X de aumento

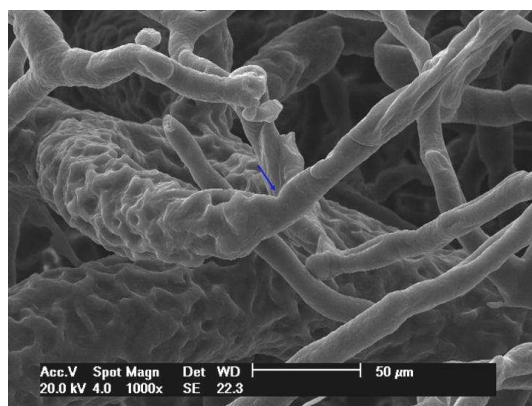


Figura 30: Eletromicrografia de varredura demonstrando encontro entre um capilar e uma VEA (seta). 1000X de aumento

Nas margens laterais dos nódulos foliculares constatou-se a presença de alguns capilares apresentando um padrão de finos chanfros circulares no local de união com as vênulas de endotélio alto (figura 31), sendo essa constrição responsável por uma diminuição brusca no diâmetro do vaso (figura 32).

As VEAs formaram um plexo semelhante a “cesto” circundando os nódulos foliculares nas porções laterais e basal. Alguns capilares presentes na periferia dos nódulos foliculares, particularmente nas margens externas mais próximas à cápsula, apresentam fundo cego (figura 33).

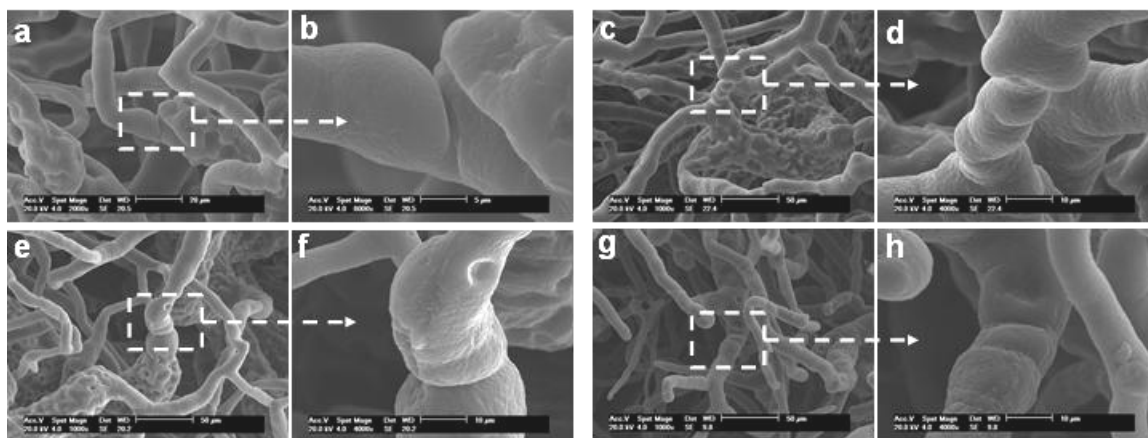


Figura 31: Eletromicrografia de varredura dos diferentes padrões de chanfros circulares observados no encontro de um capilar com uma VEA. **a)** 2000X de aumento; **b)** 8000X de aumento; **c)** 1000X de aumento; **d)** 4000X de aumento; **e)** 1000X de aumento; **f)** 4000X de aumento; **g)** 1000X de aumento; **h)** 4000X de aumento

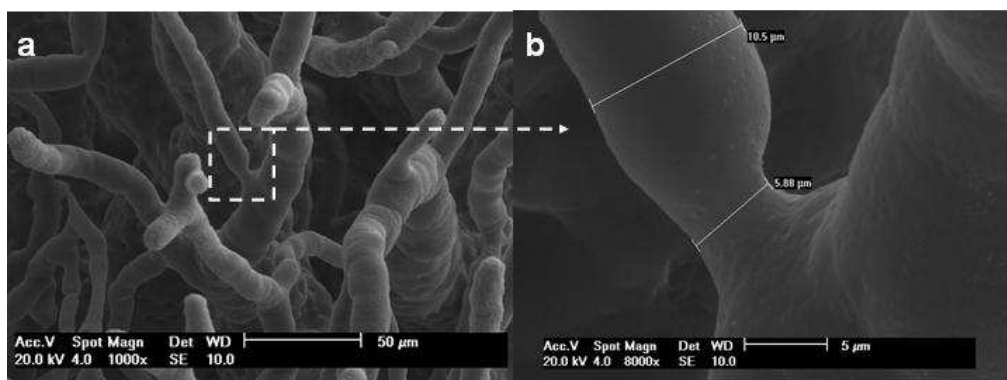


Figura 32: Eletromicrografia de varredura demonstrando área de constrição no calibre vascular na união de um capilar com uma vênula de endotélio alto; **a)** 1000X de aumento; **b)** medidas demonstrando a diminuição do calibre no local de união do capilar com a VEA. 8000X de aumento

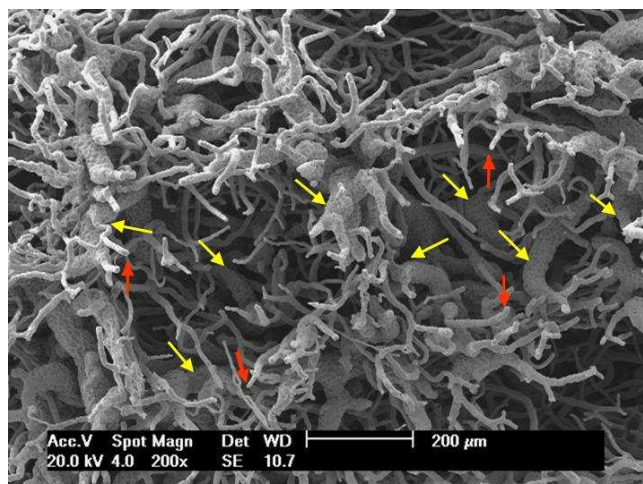


Figura 33: Eletromicrografia de varredura demonstrando característica da rede vascular formada pelas VEAs na base e nas laterais dos nódulos foliculares (setas amarelas) e vasos de fundo cego (setas vermelhas) na periferia dos nódulos foliculares. 200X de aumento

As VEAs iniciais, presentes na zona internodular, fusionam-se e formam vênulas de calibres crescentes a medida que se aproximam da região de córtex profundo (figura 34).

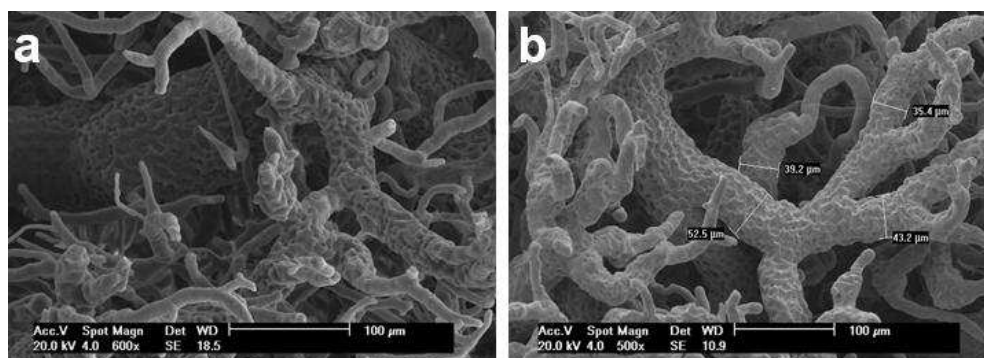


Figura 34: Eletromicrografia de varredura demonstrando a fusão de VEAs de menor calibre formando vênulas de calibre maior na porção mais interna dos linfonodos; **a)** 600X de aumento; **b)** medidas demonstrando o aumento do calibre das VEAs conforme se aproximam do interior do linfonodo. 500X de aumento

Em todos os grupos experimentais as VEAs apresentam o mesmo padrão, exceto no grupo-controle e no grupo 1 onde constatou-se uma superfície menos corrugada e depressões menos profundas (figura 35).

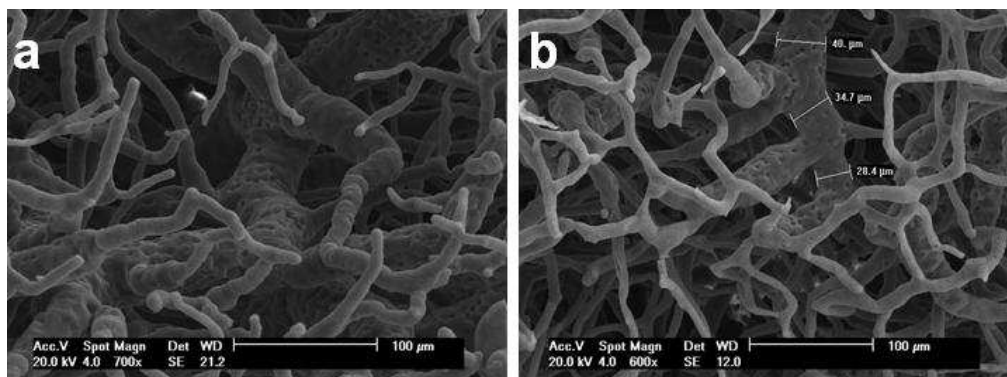


Figura 35: Eletromicrografia de varredura demonstrando característica das VEAs presentes no grupo-controle e no grupo 1; **a)** 700X de aumento; **b)** medidas demonstrando o aumento do calibre das VEAs conforme se aproximam do interior do linfonodo, 600X de aumento

Em alguns linfonodos do grupo 4 (10 dias) e 5 (14 dias), houve cópia do espaço perivascular, sendo que o mesmo apresentava-se como protrusões superficiais irregulares que se interpunham entre os capilares. Esse extravasamento ocorreu sempre na base dos nódulos foliculares e o material projetava-se para o interior desses espaços (figura 36).

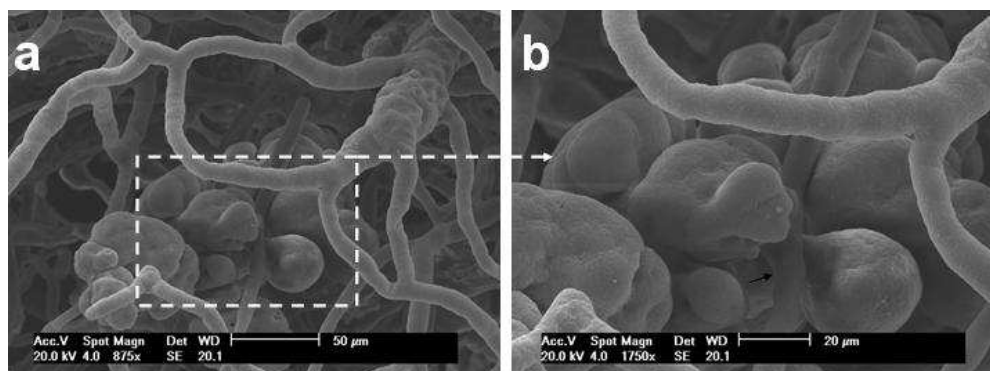


Figura 36: Eletromicrografia de varredura demonstrando a cópia do espaço perivascular; **a)** 875X de aumento; **b)** seta indicando um capilar interposto ao espaço perivascular. 1750X de aumento

Visualizou-se uma quantidade maior de orifícios, compatíveis com a angiogênese por intussuscepção, nos grupos 1 e 2 apesar dessa característica ter sido observada em todos os grupos (tabela 8). Nos animais dos grupos-controle, 1, 2, 3, 4 e 5, esses orifícios eram visualizados nas extremidades dos vasos

sanguíneos (figura 37), enquanto que no grupo 6 esses orifícios eram visualizados em locais de bifurcação dos vasos (figura 38).

Tabela 8: Número total de animais em cada grupo (n) e porcentagem de animais com angiogênese por intussuscepção nos diferentes grupos experimentais. Porto Alegre, 2007.

Grupos	n	Presença de angiogênese por intussuscepção
Controle	3	33,33%
1 (2 dias)	6	83,33%
2 (3 dias)	5	80%
3 (7 dias)	8	25%
4 (10 dias)	5	40%
5 (14 dias)	5	40%
6 (21 dias)	7	42,85%

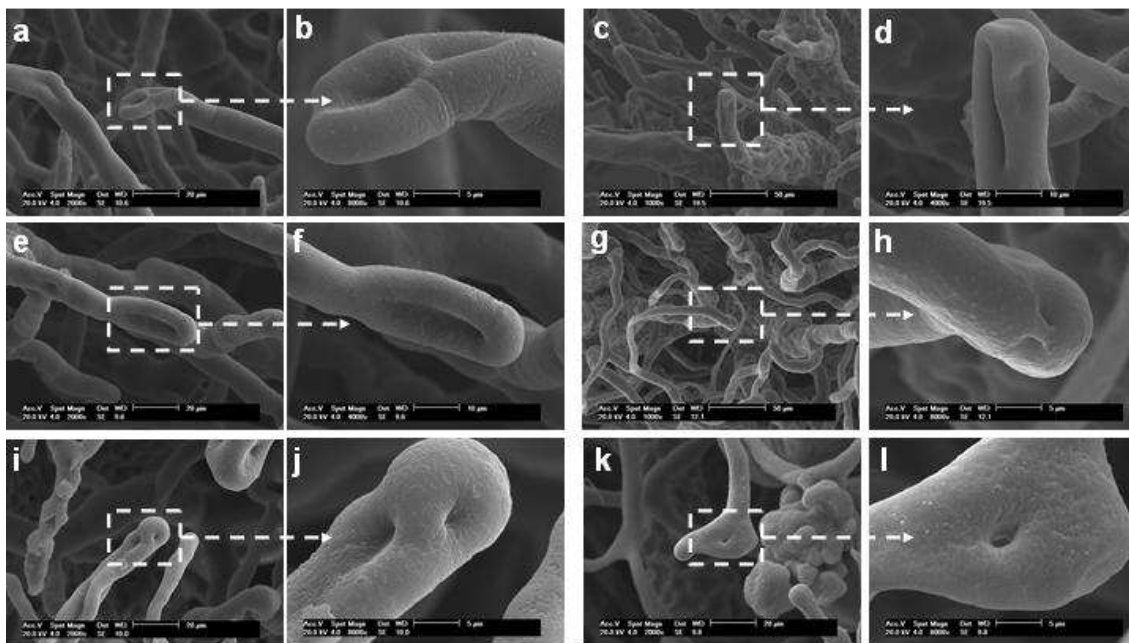


Figura 37: Eletromicrografia de varredura dos diferentes padrões de angiogênese por intussuscepção observados nos modelos vasculares. **a)** 2000X de aumento; **b)** 8000X de aumento; **c)** 1000X de aumento; **d)** 4000X de aumento; **e)** 2000X de aumento; **f)** 4000X de aumento; **g)** 1000X de aumento; **h)** 8000X de aumento; **i)** 2000X de aumento; **j)** 8000X de aumento; **k)** 2000X de aumento; **l)** 8000X de aumento

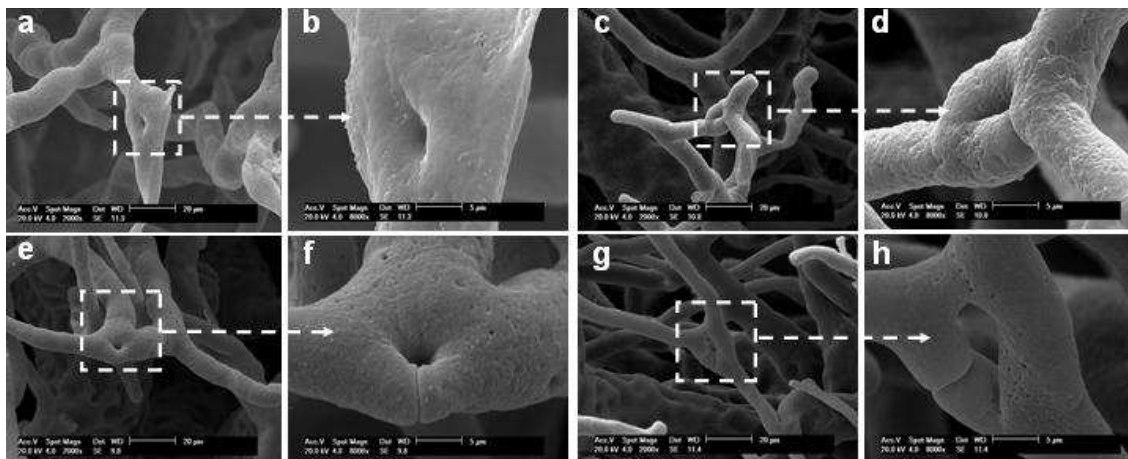


Figura 38: Eletromicrografia de varredura dos diferentes padrões de angiogênese por intussuscepção observados nos modelos vasculares do grupo 6. **a)** 2000X de aumento; **b)** 8000X de aumento; **c)** 2000X de aumento; **d)** 8000X de aumento; **e)** 2000X de aumento; **f)** 8000X de aumento; **g)** 2000X de aumento; **h)** 8000X de aumento

5.3.3.2 Característica da vasculatura da cápsula dos linfonodos

A rede vascular da cápsula foi observada em alguns linfonodos e constatou-se que esta percorre toda a extensão do linfonodo. As veias e artérias se ramificam formando vasos de calibres menores, seguindo trajetos sinuosos dispostos paralelamente a superfície externa do linfonodo e perpendicularmente aos nódulos foliculares, estruturas estas encobertas pela cápsula (figura 39).

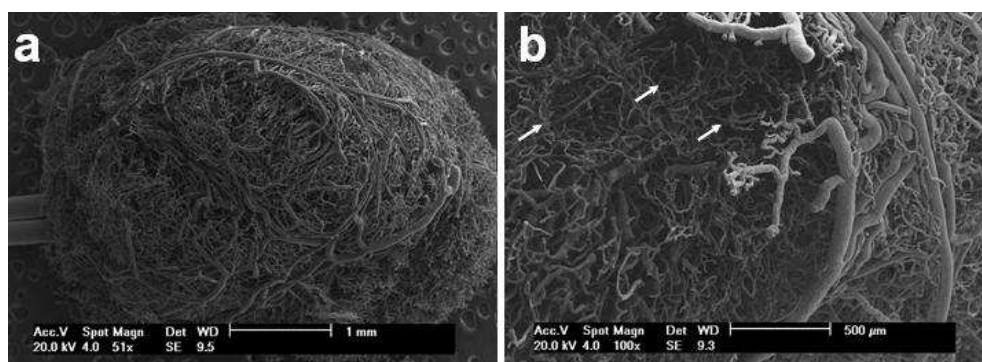


Figura 39: **a)** Eletromicrografia de varredura demonstrando as características dos vasos sanguíneos presentes na cápsula dos linfonodos. 51X de aumento; **b)** eletromicrografia de varredura demonstrando parte da cápsula sobreposta aos nódulos foliculares (setas). 100X de aumento

Alguns linfonodos, mesmo recebendo fluxo arterial pelo hilo, apresentavam vasos arteriais provenientes da vasculatura capsular. Essas artérias lançam ramos de menor calibre que participam da vascularização do córtex externo (figura 40).

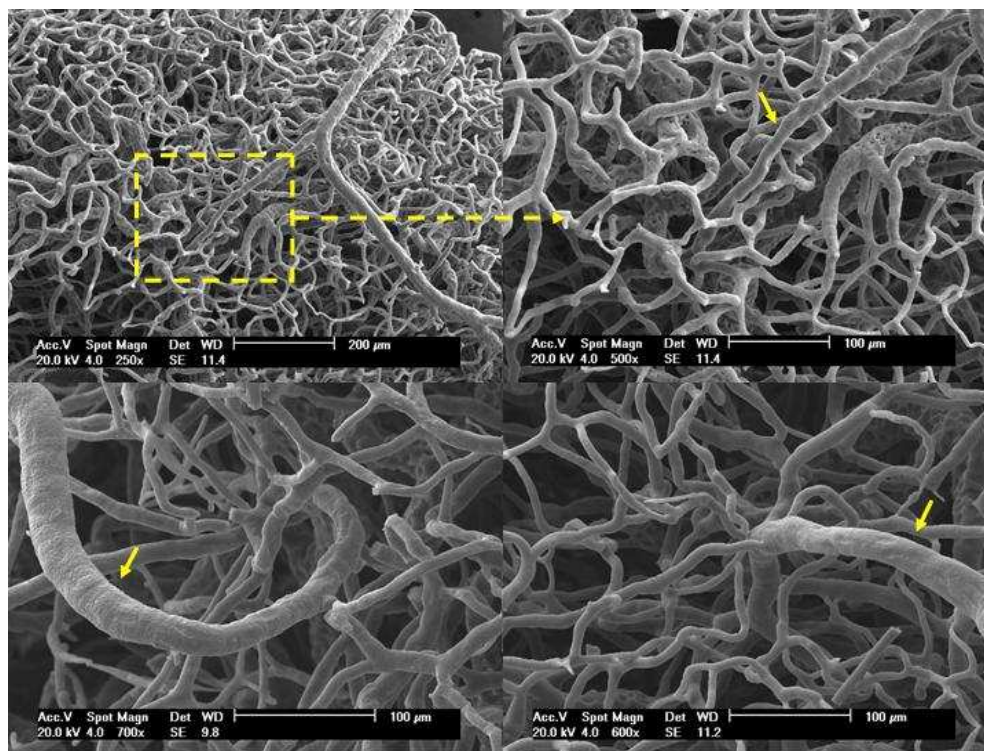


Figura 40: Eletromicrografia de varredura demonstrando artérias da cápsula (setas) lançando ramos de menor calibre para a região de córtex externo; **a)** 250X de aumento; **b)** 500X de aumento; **c)** 700X de aumento; **d)** 600X de aumento

5.3.3.3 Característica da vasculatura da região do hilo

Na região do hilo constatou-se a presença de uma a duas veias de grande calibre acompanhadas por duas a três artérias de pequeno calibre que penetram através dessa região para o interior do linfonodo (figura 40).

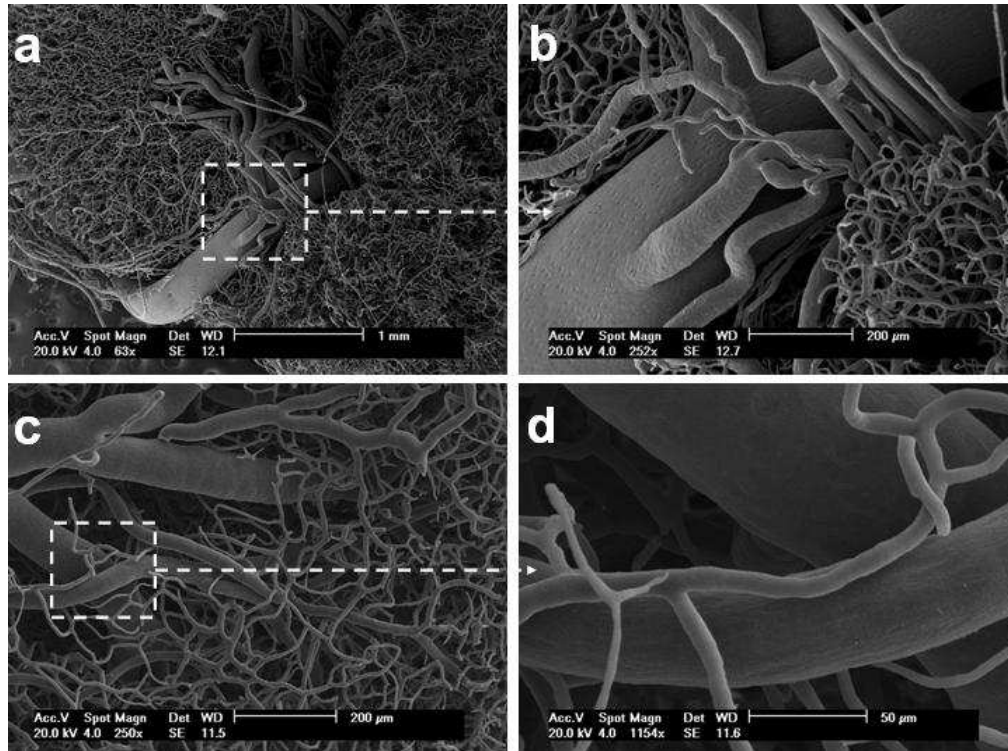


Figura 41: Eletromicrografia de varredura demonstrando as características da vasculatura presente na região do hilo; **a)** 63X de aumento **b)** eletromicrografia de varredura demonstrando veia de grande calibre penetrando no interior do linfonodo através do hilo. 252X de aumento; **c)** 250X de aumento; **d)** eletromicrografia de varredura demonstrando veia e artéria penetrando no interior do linfonodo através do hilo. 1154X de aumento



6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A lesão tissular causada por um ferimento induz a uma complexa seqüência de eventos conhecidos como resposta inflamatória. O médico romano Celsus descreveu os “quatro sinais cardinais da inflamação” como rubor, tumor, calor e dor e outro médico, Galeano, adicionou o quinto sinal: *functio laesa* (perda de função). Esses sinais refletem os três principais eventos de uma resposta inflamatória: a vasodilatação, o aumento da permeabilidade capilar e o influxo de fagócitos dos capilares para o interior dos tecidos (GOLDSBY et al., 2002). Na presente pesquisa a perda de função poderia ter se refletido na perda de peso dos animais, já que o local da ferida, principalmente durante a alimentação, sofre trauma constante pelo contato com os incisivos inferiores. Apesar disso, nenhum grupo apresentou perda de peso, contudo os animais do grupo 1 (2 dias) tiveram o menor ganho de peso (1,1g) quando comparados com os demais grupos (tabela 1). No primeiro dia subsequente ao procedimento cirúrgico a dificuldade de alimentação provavelmente seja maior pela ausência de proteção epitelial sobre a ferida e, por esse motivo os animais poderiam apresentar perda de peso. Essa comprovação poderia ser feita incluindo-se uma avaliação no primeiro dia pós-operatório.

O estudo da anatomia vascular é essencial para a compreensão das alterações fisiológicas e patológicas que possam ocorrer em qualquer órgão ou tecido e, por isso, a vasculatura dos linfonodos de ratos foi avaliada através de microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Uma ferida foi produzida no ventre da língua dos animais e decorridos os tempos de 2, 3, 7, 10, 14 e 21 dias, os linfonodos foram avaliados, procurando verificar alterações vasculares que pudessem estar relacionadas com o processo de cicatrização da ferida. A técnica de corrosão vascular, que representa a obturação de espaços vazios com um material que autopolimerize e resista a ação corrosiva dos agentes utilizados para a maceração e descalcificação dos tecidos (LAMESTCHWANDTNER et al., 1989), tem sido utilizada em modelos animais (CASTENHOLZ, 1989; CASTENHOLZ, 1995; HOSSLER; MONSON, 1998; OKADA et al., 2002) e algumas poucas vezes em modelos humanos (GADRE et al., 1994; SANGIORGI et al., 2004). Essa técnica permite a obtenção de espécimes formados por uma trama de modelos vasculares (SUGIOKA; IKE, 1993) e através da análise desses modelos pode-se

obter a imagem fiel da anatomia vascular (arranjo tridimensional da vascularização, o diâmetro vascular, a impressão das células endoteliais e dos seus núcleos na superfície do modelo vascular) (HOSSLER; DOUGLAS, 2001), bem como a relação espacial entre os diferentes tipos de vasos sanguíneos (CASTENHOLZ, 1989). Embora os modelos obtidos ofereçam percepção sobre a natureza sistêmica da vasculatura, uma avaliação clara dos detalhes morfológicos ainda é limitada, pois toda a avaliação é realizada sobre aspectos indiretos (CASTENHOLZ, 1995) e, além disso, a exata interpretação morfológica só é conseguida quando realizada sobre os modelos que apresentem uma ótima qualidade de réplica (CASTENHOLZ, 1989).

Uma das principais desvantagens da técnica de corrosão vascular é a obtenção de modelos vasculares sem o tecido de sustentação (SUGIOKA; IKE, 1993). Para compensar esse fato e visto que o conhecimento dos vasos a serem estudados deve ser derivado de observações que correlacionem a microscopia de luz e a microscopia eletrônica de varredura (CASTENHOLZ, 1989), empregou-se na presente pesquisa a avaliação de linfonodos regionais de ratos através da microscopia de luz, além da avaliação de modelos de corrosão vascular desses órgãos em MEV.

Durante a análise dos linfonodos em microscopia de luz não foram considerados vasos sanguíneos aqueles que apresentavam em seu interior estruturas compatíveis com válvulas, apesar da ocorrência das mesmas no interior de veias e vênulas (CAGIATI et al., 2006). A diferenciação entre a vasculatura linfática e sanguínea fica dificultada principalmente quando a morfologia histológica é a única base para esta distinção (OLIVER; DETMAR, 2002) e, além disso, segundo Scavelli et al. (2004) esses vasos se tornam indistinguíveis na presença de processos patológicos e precisam ser vistos como integrantes de uma cadeia vascular funcional e intercomunicante.

Através da técnica de corrosão vascular associada a MEV pôde-se constatar a riqueza da vasculatura dos linfonodos, muitas vezes inimaginável através da técnica histológica de rotina. A impossibilidade de visualização de muitos vasos sanguíneos através da técnica histológica provavelmente se deve ao pequeno diâmetro apresentado por esses vasos e também pelo ângulo de corte instituído sobre essas estruturas durante a confecção das lâminas. Portanto, é provável que o número de vasos sanguíneos verificados através da microscopia de luz esteja, nesse estudo, subestimado.

Os modelos vasculares permitiram a análise da vasculatura superficial dos linfonodos, visto que os modelos não foram seccionados para visualização da vasculatura interna. O padrão de impressão endotelial, observado nos modelos de corrosão dos linfonodos, permitiu que a diferenciação entre veias e artérias fosse feita. Nos modelos arteriais os núcleos das células endoteliais apresentaram-se alongados e paralelamente orientados em relação ao longo eixo do vaso, diferentemente das veias que apresentaram um endotélio com células mais arredondadas, compatível com as descrições feitas por Castenholz (1995) e Hossler e Monson (1998). Para Lamestchwandtner et al. (1989) esses padrões de impressão endotelial, deixados sobre os modelos de corrosão vascular, podem ser influenciados, por exemplo, pelo método de fixação dos vasos sanguíneos. Bélisle e Sainte-Marie (1985) estudaram a aparência das vênulas de endotélio alto (VEAs) depois de utilizarem vários métodos de sacrifício dos animais e várias maneiras de remoção e fixação dos linfonodos. Comprovaram que os métodos que envolvem hemorragia (exsanguinação) ou procedimento de rotina (remoção dos linfonodos e colocação em solução fixadora) resultam em um alto número de VEAs com lúmen fechado, enquanto que a fixação *in situ* ou a perfusão evitam o colapso vascular. Baseados nesses achados os vasos sanguíneos foram fixados por perfusão com paraformaldeído a 4% tamponado em ambas as técnicas avaliadas.

Através da MEV constatou-se que a angioarquitetura da cápsula é composta por artérias e veias de calibres variados com trajetos sinuosos que se dispõem paralelamente à superfície externa dos linfonodos e perpendicularmente aos nódulos foliculares, estes últimos totalmente encobertos pela vasculatura capsular. Bélisle e Sainte-Marie (1990) relatam que irrigação capsular é feita por capilares dos tecidos perinodais e não por capilares do linfonodo; e que o seio subcapsular é desprovido de vasos sanguíneos. Esses dois fatores poderiam auxiliar na manutenção do antígeno no interior do linfonodo, impedindo que os mesmos atravessassem a parede externa do seio e se difundissem para o interior da cápsula e tecidos perinodais. Não foi tema deste estudo saber se a irrigação da cápsula é de responsabilidade dos tecidos perinodais, mas se evidenciou que artérias presentes na cápsula lançam ramos de menor calibre que atravessam o seio subcapsular e chegam ao córtex externo auxiliando, conseqüentemente, na irrigação do mesmo. Além disso, a não visualização de artérias de maior calibre no córtex externo leva a

sugerir que, embora existam artérias penetrando nos linfonodos através do hilo, os capilares superficiais dos linfonodos podem ser provenientes das artérias capsulares e não de artérias vindas do interior do órgão, ficando as artérias hilares responsáveis pela irrigação das porções internas dos linfonodos. Essa idéia é reforçada pelos achados de Belz e Health (1995) que comprovam, pela análise através da MEV de modelos vasculares de linfonodos de cães, que além dos linfonodos receberem irrigação pelas artérias hilares, recebem artérias adicionais, algumas delas vindas da cápsula, outras vindas da porção externa da cápsula. Para sanar as dúvidas em relação a presença ou não de suprimento sanguíneo não-hilar, se faz necessário o estudo da vasculatura dos tecidos circundantes aos linfonodos e da angioarquitetura interna desses órgãos, através do secção dos modelos de corrosão. Apesar de Okada et al. (2002) relatarem, após secção de modelos vasculares de linfonodos de ratos, que toda a irrigação desse órgão é proveniente do hilo, maiores informações são necessárias para que essa afirmação seja comprovada, visto que o número de animais utilizados pelos autores foi pequeno e não houve relato sobre a quantidade de linfonodos avaliados. Sabendo que as variações no suprimento sanguíneo podem ocorrer entre diferentes espécies, diferentes grupos de linfonodos e mesmo entre distintos linfonodos do mesmo grupo (BELZ; HEATH, 1995), se faz necessária uma quantidade maior de linfonodos para que uma conclusão definitiva seja obtida. Devido a remoção da cápsula na maioria dos linfonodos, não foi possível verificar se o processo cicatricial promove alterações no padrão vascular dessa estrutura nos diferentes grupos experimentais avaliados.

Constatou-se na região de córtex externo, também através da MEV, a presença de uma rede capilar que se sobrepõe aos nódulos foliculares formando um plexo em forma de cúpula, disposto logo abaixo do seio subcapsular. Esse achado concorda com o relato feito por Bélisle e Sainte-Marie (1990) de que a vasculatura do córtex externo dos linfonodos nunca alcança o seio subcapsular, dispondo-se sempre abaixo deste. A avaliação em microscopia de luz demonstrou raros capilares localizados na porção superior dos nódulos foliculares, evidenciando a limitação da técnica em demonstrar essa rede capilar sobre os nódulos foliculares. Conforme já discutido o reduzido diâmetro vascular e a não inclusão do capilar e das células endoteliais no ângulo de corte utilizado no presente estudo, são fatores que podem dificultar a visualização dessa rede capilar nas lâminas coradas por HE.

No córtex externo, esses capilares que estão sobrepostos aos nódulos foliculares, drenam para o interior das vênulas pós-capilares ou vênulas de endotélio alto (VEAs), vasos sanguíneos característicos dos linfonodos. Externamente, essas vênulas percorrem o espaço logo abaixo do seio subcapsular, como VEAs iniciais de pequeno calibre, e ocupam toda a zona internodular. Essas numerosas VEAs iniciais se fundem formando vasos mais amplos e menos numerosos conforme se aproximam da parte interna do linfonodo.

Quando essas vênulas foram visualizadas em um maior aumento, através da MEV, constatou-se que a superfície do modelo exhibe um padrão de marcas profundas e cristas altas concordando com a descrição feita por Castenholz (1989). Sua visualização se restringe ao córtex externo delimitando os nódulos foliculares em sua base e porções laterais, o que concorda com os achados de Bélisle e Sainte-Marie (1990). Histologicamente, as vênulas de endotélio alto (VEAs) exibem células endoteliais altas, cuja porção apical projeta-se para o lúmen vascular (CASTENHOLZ, 1989). A moldagem dessas células permite a obtenção de modelos totalmente corrugados o que justifica as características irregulares desses vasos quando analisados através da MEV. Para Bélisle e Sainte-Marie (1990) a característica das VEAs, vistas em MEV, pode ser fruto da impressão das células endoteliais hipertrofiadas, já para Castenholz (1989) essa característica pode decorrer da moldagem dos inúmeros leucócitos, a maioria linfócitos, que se encontram aderidos na parede desses vasos. Tanto a hipertrofia endotelial quanto a presença de linfócitos no interior das VEAs foram observações feitas durante a avaliação dos cortes histológicos e, provavelmente, esses aspectos são os responsáveis pelas características das vênulas de endotélio alto (VEAs) visualizadas nos modelos vasculares através da MEV.

Durante a avaliação histológica dos linfonodos, a presença de eritrócitos no lúmen vascular serviria como auxiliar na identificação dos vasos sanguíneos e na diferenciação entre vasos sanguíneos e vasos linfáticos, no entanto a lavagem do sistema vascular realizada durante o preparo dos espécimes impossibilitou tal visualização. Essa lavagem, contudo, não impediu que muitas células permanecessem no interior dos vasos sanguíneos, sendo que algumas delas pareciam estar livres no lúmen vascular. Segundo Selliseth e Selvig (1995), a lavagem do sistema vascular remove as células que não se encontram unidas ao

endotélio. A microscopia intravital utilizada por Warnock et al. (1998) para avaliar o comportamento de linfócitos, mononucleares e polimorfonucleares, permitiu verificar que o processo de rolamento no lúmen das VEAs não é exclusivo dos linfócitos, mas é compartilhado com outros subgrupos de leucócitos, apesar de serem os linfócitos as células que se fixam firmemente no endotélio desses vasos. Segundo Sainte-Marie e Peng (1995), os linfócitos que apresentam aderência firme ao endotélio podem se unir lateralmente por pontes citoplasmáticas a outros linfócitos. Portanto, as células que parecem estar livres no interior das vênulas de endotélio alto (VEAs), podem ser linfócitos indiretamente retidos através da união com outros linfócitos verdadeiramente unidos ao endotélio vascular. A presença das pontes citoplasmáticas pode ser comprovada através da análise dos linfonodos em microscopia eletrônica de transmissão, já que essas estruturas não podem ser visualizadas através da microscopia de luz (SAINTE-MARIE; PENG, 1995). Portanto, sabendo que a maioria dos linfócitos extravasa para o interior dos linfonodos via vênulas de endotélio alto (IRJALA et al., 2003) e que a permanência de células no interior dos vasos sanguíneos pode caracterizar a união firme das mesmas ao endotélio, pode-se sugerir que as células visualizadas através da microscopia de luz no interior dos vasos sanguíneos sejam linfócitos. Contudo, pela possibilidade de alteração no padrão dessas células retidas no interior das VEAs em decorrência do processo cicatricial, se faz necessária a utilização de outros métodos de avaliação além da microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura para comprovação desse fato.

O tráfego de linfócitos, através das vênulas de endotélio alto (VEAs), nos órgãos linfóides é altamente controlado por moléculas presentes na superfície dos linfócitos e pelos receptores dessas moléculas dispostos sobre a superfície das células endoteliais (IRJALA et al., 2003). Em condições fisiológicas o número de linfócitos que entra e sai dos linfonodos está em equilíbrio, mas durante a inflamação ocorre um aumento no número de linfócitos que entra nos linfonodos de drenagem induzindo um aumento dos mesmos (CYSTER, 1999). Observando as vênulas de endotélio alto (VEAs) da porção medular constatou-se que as mesmas contêm poucas células retidas no lúmen quando comparadas àquelas presentes no córtex externo e no córtex profundo, corroborando com os relatos de Sainte-Marie e Peng (1995) e de Warnock et al. (1998) de que a maioria das células visualizadas no interior de vasos sanguíneos de linfonodos estão unidas às VEAs corticais. Apesar

de não ter sido realizada a contagem das células retidas no lúmen vascular nas diferentes áreas dos linfonodos, a especificidade do córtex externo e córtex profundo aos linfócitos poderia permitir que a concentração dessas células fosse maior nesses locais, resultando em um estímulo cortical maior e, conseqüentemente, uma maior produção de elementos de defesa.

Constatou-se pela análise dos modelos vasculares através da MEV, que as características das vênulas de endotélio alto (VEAs) presentes no córtex externo dos grupos 2, 3, 4, 5 e 6 (3, 7, 10, 14 e 21 dias respectivamente) diferiram daquelas observadas no grupo controle e grupo 1 (2 dias). As VEAs desses dois últimos grupos apresentaram-se com depressões menos profundas e conseqüentemente um modelo vascular menos corrugado (figura 35). Conforme exposto anteriormente os aspectos dos modelos de corrosão dessas vênulas, visualizados em microscopia eletrônica de varredura, representam as características do endotélio e a quantidade de células retidas no lúmen vascular. Durante o processo de reparo ocorre o estímulo do endotélio das VEAs (OLUTOYE et al., 2005), permitindo a circulação de linfócitos e a quantidade dessas células circulantes depende do grau de estimulação desse endotélio (SAINTE-MARIE; PENG, 1995). Baseando-se nesses dados e sabendo que o pico de linfócitos no interior do leito cirúrgico se dá no sétimo dia pós-operatório (FISHEL et al., 1987; PARK; BARBUL, 2004), sugere-se que no grupo 1 (2 dias) o número de linfócitos no interior das VEAs dos linfonodos seja menor que nos demais grupos experimentais. No período de dois dias pós-operatório as VEAs podem estar sofrendo a ação de substâncias vasodilatadoras vindas do leito cirúrgico via linfa aferente e, além disso, o estímulo inflamatório pode não ter sido suficiente para causar hipertrofia endotelial. Esses dados, contudo, precisam ser posteriormente confirmados através da mensuração do diâmetro e do lúmen vascular das VEAs e através da contagem das células retidas no interior dessas vênulas nos diferentes grupos experimentais.

Na região do córtex externo constatou-se que as VEAs formam uma cadeia em forma de cesto ao redor de espaços ovóides, que correspondem aos nódulos foliculares, circundando os mesmos em suas porções laterais e basal. Esses achados concordam com a descrição feita previamente por Bélisle e Sainte-Marie (1990) e Okada et al. (2002).

O interior dos nódulos foliculares apresenta uma vasculatura escassa quando comparado com a zona internodular e os poucos capilares encontrados estão dispostos, em sua maioria, na porção basal dos nódulos foliculares. Tanto a microscopia de luz, quanto a microscopia eletrônica de varredura permitiram a visualização da limitada vasculatura no interior dos nódulos foliculares, contudo a MEV possibilita a visualização de uma maior quantidade de vasos quando comparada com a microscopia de luz. Bélisle e Sainte-Marie (1990) relatam que os capilares presentes na porção basal dos nódulos foliculares surgem de pequenas arteríolas que alcançam a porção profunda desses nódulos. Na presente pesquisa a incapacidade de verificar, através da MEV, a presença de tais arteríolas pode ser decorrente do não seccionamento dos modelos vasculares. Esse seccionamento não foi realizado devido a falta de instrumentos adequados para tal fim e por isso a avaliação da vasculatura interna dos linfonodos foi realizada somente através da microscopia de luz. Quando, através de ambas as técnicas, foram comparados os diferentes grupos experimentais não se constatou alteração no aspecto vascular e nenhum vaso sanguíneo de maior calibre foi visualizado no interior dos nódulos foliculares.

Bélisle e Sainte-Marie (1981b), estudando linfonodos de ratos em cortes histológicos corados com prata, que evidencia a trama de fibras reticulares, relatam que as unidades de córtex profundo se apresentam como uma área de forma e tamanho variados, centrada sobre a abertura dos vasos linfáticos aferentes e povoada por pequenos linfócitos. Esta constante associação topográfica sugere que os fatores, presentes na linfa aferente, sejam responsáveis pela topografia e possivelmente pela forma da unidade. O local escolhido para a contagem dos vasos sanguíneos, na região de córtex profundo, foi baseada na descrição de que as VEAs se concentram na periferia das unidades de córtex profundo (BÉLISLE; SAINTE-MARIE 1981c) sendo, excepcionalmente, encontradas no centro dessas unidades (BÉLISLE; SAINTE-MARIE, 1990). Nos cortes histológicos constatou-se que as VEAs do córtex profundo apresentam endotélio mais regular, maior calibre e lúmen mais amplo quando comparadas com aquelas observadas na região de córtex externo.

As vênulas medulares passam a apresentar endotélio regular, com lúmen mais amplo e poucas células no seu interior quando comparadas com as vênulas de endotélio alto (VEAs) da região cortical. Castenholz e Castenholz (1996) relatam, depois de análise de modelos de corrosão de linfonodos do grupo para-aórtico, que as vênulas medulares deixam de apresentar superfície corrugada, passando a apresentar superfície lisa e com impressões ovóides ou redondas. Sainte-Marie e Peng (1991) relatam que as VEAs observadas na região cortical podem se contrair ou dilatar durante a vida dos animais e que quando estimuladas as VEAs presentes na porção do córtex podem apresentar um diâmetro maior que as vênulas da porção medular. Com o aumento do diâmetro das VEAs o recrutamento de linfócitos sanguíneos aumenta, já que o fluxo sanguíneo se torna mais lento possibilitando um maior tempo de contato dos linfócitos com o endotélio vascular. Os mesmos autores no ano de 1995, depois de realizarem a incubação de linfócitos sobre lâminas de linfonodos, constataram que 83% dessas células se encontravam unidas as VEAs corticais e apenas 5% às vênulas medulares. Essa redução na quantidade de células nas vênulas medulares é percebida facilmente nos cortes histológicos, mesmo sem ter sido realizada a contagem dessas células.

No hilo constatou-se a presença de artérias e veias arranjadas em íntimo contato que penetram para o interior dos linfonodos, sendo as artérias sempre menores que as veias. Castenholz e Castenholz (1996) relatam que nessa região as artérias apresentam um padrão de sulcos circulares criados pelas células musculares, fato este não confirmado na presente pesquisa, contudo salienta-se que essa diferença pode ter acontecido em função do hilo ter sido avaliado somente em alguns modelos vasculares. A impossibilidade de avaliação de um número maior de espécimes nessa região ocorreu pela fratura dos modelos durante a tentativa de remoção dos mesmos da superfície do *stub*. É importante lembrar que no desenvolvimento da pesquisa padronizou-se que o modelo vascular do linfonodo fosse colado de tal maneira que a região do hilo ficasse voltada para a superfície do *stub*. A não inclusão do hilo na maioria dos cortes histológicos avaliados impossibilitou uma análise mais aprofundada da vasculatura dessa região através da microscopia de luz e por isso sugere-se a realização de cortes seriados dos linfonodos em estudos posteriores para superar essa dificuldade encontrada.

Nas porções laterais dos nódulos foliculares constatou-se a presença de vasos de fundo cego concordando com os achados de Bélisle e Sainte-Marie (1990). Segundo Grunt et al. (1985), as extremidades cegas presentes nos modelos vasculares podem ser associadas ao preenchimento incompleto do sistema vascular. Para Bélisle e Sainte-Marie (1990) os caminhos venoso e arterial são obturados pela resina simultaneamente e de maneira progressiva desde o hilo até a porção mais periférica dos linfonodos. Se esse fato for verdadeiro a formação de vasos de fundo cego poderia ser explicada pela manutenção da solução de lavagem no interior do sistema vascular nas voltas capilares mais externas, impedindo o preenchimento pelo material de moldagem. A possibilidade de que essas estruturas sejam artefatos de técnica existe, já que estão localizadas no pólo mais distante da vasculatura com relação ao hilo, sendo os últimos locais a receber a resina de infusão. No entanto, protrusões em forma de dedos foram visualizadas nas margens de uma ferida produzida em mucosa palatina de ratos durante o processo de cicatrização (SELLISETH; SELVIG, 1995) e, além disso, Bélisle e Sainte-Marie (1990) constataram a presença de vasos de fundo cego mesmo em animais que receberam um excesso de resina e que tiveram extravasamento do material de moldagem em alguns locais. Esses achados deixam a discussão em aberto sobre a existência dessas estruturas, mas se todos os vasos de fundo cego forem consideradas artefatos de técnica, a angiogênese por brotamento não poderia estar sendo discutida, afinal esta se apresenta nos modelos de corrosão vascular como protusão em forma de dedo, ou seja, de fundo cego.

Em muitos capilares, presentes nas porções laterais dos nódulos foliculares, foram detectados finos chanfros ou entalhes circulares na união dos capilares com as vênulas de endotélio alto (VEAs). Segundo Castenholz (1989) esses entalhes são produzidos por células de músculo liso e raramente são visualizadas na porção venosa. Segundo esse autor a resina Mercox[®] penetra no interior desses chanfros, que são produzidos pelos pericitos, imitando o aspecto morfológico dessas células. Os pericitos são células contráteis que circundam o endotélio capilar capazes de contrair e relaxar sendo funcionalmente posicionados para afetar a permeabilidade capilar (EDELMAN et al., 2006).

Selliseth e Selvig (1993) após estudarem a microvasculatura do dorso da língua de ratos, em modelos de corrosão, detectaram a presença de constrições no

ponto de união de capilares com o plexo venoso. A presença de estruturas semelhantes a esfíncteres na junção de capilares com a vênula de endotélio alto (VEA) ocorre provavelmente pela necessidade de redução drástica do fluxo sanguíneo quando da passagem do sangue dos capilares para as VEAs (CASTENHOLZ; CASTENHOLZ, 1996). No interior do leito cirúrgico, a alteração do tônus pós-capilar poderia produzir uma elevação da pressão sanguínea capilar criando uma hiperemia da língua como parte de uma reação inflamatória. Portanto, o fluxo sanguíneo dos linfonodos pode ser controlado não somente pela alteração na pressão arterial sanguínea ou pela dilatação vascular, mas também pela alteração no tônus pós-capilar. Além disso, convém relatar a possibilidade de que no interior dos linfonodos essas constrições nos diâmetros dos vasos sanguíneos e a diferença de diâmetro entre capilares e VEAs poderiam ser responsáveis pela diminuição do fluxo sanguíneo permitindo aos linfócitos circulantes permanecer mais tempo nas vênulas de endotélio alto facilitando a fixação dos mesmos ao endotélio vascular e posteriormente o processo de migração para o interior dos linfonodos. Contudo os efeitos da contração dos pericitos *in vivo* ainda permanecem desconhecidos (SIMS, 2000).

Em alguns exemplares dos modelos vasculares dos grupos 4 e 5 (10 e 14 dias respectivamente) constatou-se o extravasamento de resina do interior dos vasos sanguíneos copiando o espaço perivascular. Segundo Lametschwandtner et al. (1989) o extravasamento de resina para os tecidos pode ter acontecido em decorrência da ruptura de alguns vasos sanguíneos provocada pelo excesso de força durante a injeção da resina de infusão. Apesar de possível, é pouco provável que essa tenha sido a causa desse extravasamento, já que essa característica não foi uma constante em todos os linfonodos do mesmo animal, o local do extravasamento foi sempre o mesmo e também porque o processo de infusão do material foi realizado manualmente sempre pelo mesmo operador. Segundo Castenholz (1995) o extravasamento da resina para o interstício pode ocorrer através dos espaços criados no endotélio pelos linfócitos durante o movimento de diapedese ou, segundo Okada et al. (2002) esse extravasamento pode ser em decorrência de uma comunicação existente entre vaso sanguíneo e vaso linfático. Na presente pesquisa essa moldagem ocorreu sempre na base dos nódulos foliculares e se projetou para o interior do centro germinativo. Sabendo que as VEAs

se localizam na base dos nódulos foliculares, e a partir dessas os linfócitos migram para o interior dos linfonodos, pode-se sugerir que o espaço criado durante o movimento de diapedese permita o extravasamento de resina moldando o espaço intersticial, no entanto como esse achado foi verificado em poucos exemplares essa afirmação pode não ser verdadeira e necessita posterior comprovação.

A análise dos modelos vasculares revelou também a presença de angiogênese por intussuscepção em todos os grupos experimentais, contudo a maior porcentagem de animais com esse tipo de angiogênese foi vista nos grupos 1 (2 dias) e 2 (3 dias), respectivamente 83,33%, 80% (tabela 8). Djonov e Burri (2005) relatam que a angiogênese por intussuscepção somente pode ser visualizada com segurança através da técnica de corrosão vascular visualizada pela MEV ou através da reconstrução em três dimensões das imagens de cortes seriados avaliados em microscopia eletrônica de transmissão e microscopia de luz. A descrição desse processo somente foi possível através da análise dos modelos de corrosão vascular em microscopia eletrônica de varredura, no entanto a não visualização em microscopia de luz decorre do fato de não ter sido utilizada a análise de cortes histológicos seriados.

A angiogênese é um processo de crescimento e expansão microvascular (DJONOV; BURRI, 2005) evidente em processos fisiológicos e patológicos como o câncer, o processo de cicatrização de feridas e a inflamação (DVORAK, 2005). A angiogênese por intussuscepção ocorre através da divisão do lúmen de um vaso pré-existente pela inserção de um pilar intraluminal (PATAN et al., 2001) e é um processo rápido (BURRI et al., 2004) necessitando somente de 4-5 horas para que o pilar intraluminal esteja completamente formado (DJONOV; BURRI, 2005). A rapidez na formação da angiogênese por intussuscepção pode ser a explicação para a presença de uma maior quantidade desse fenômeno no grupo 1 e 2 (2 e 3 dias respectivamente).

No leito cirúrgico, desde o momento do trauma até aproximadamente 4 a 6 dias, está ocorrendo a fase de hemostasia e inflamação e uma liberação de substâncias como vasodilatadores e fatores de crescimento que possibilitam o início do processo de reparo (BROUGHTON et al., 2006). Patan et al. (2001) relatam que a presença de vasodilatação auxilia na divisão do lúmen vascular, portanto a presença de uma maior quantidade de angiogênese por intussuscepção na

vasculatura dos linfonodos, durante os períodos iniciais do processo de reparo, permite cogitar sobre a possibilidade de que a presença dessas substâncias liberadas no leito cirúrgico não esteja restrita ao local da ferida, mas possam ser transportadas através da circulação linfática aferente até os linfonodos regionais. Contudo se faz necessária a comprovação desse fato através de outros métodos de diagnósticos como a imunohistoquímica.

A presença de pilares intraluminais nos vasos sanguíneos, presentes em maior quantidade nos grupos 1 e 2, pode facilitar o contato das células vindas do sangue com as vênulas de endotélio alto (VEAs), proporcionando uma maior passagem de linfócitos do sangue para o interior dos linfonodos. Segundo Kurz et al. (2003), a divisão que ocorre nos vasos de maior calibre forma dois vasos menores cuja soma dos diâmetros é maior que o diâmetro do vaso de origem, diminuindo o fluxo sanguíneo na periferia do órgão. A progressão da angiogênese permite a formação de alças capilares primárias que, segundo Patan et al. (2001), iniciam sua formação no interior da ferida próximo ao terceiro dia pós-trauma, juntamente com a migração de fibroblastos durante a formação do tecido de granulação. Nos linfonodos, a presença dessas alças capilares não foi avaliada, mas certamente estarão presentes e esse processo pode estar relacionado com a necessidade dos linfonodos regionais reestruturarem sua rede vascular permitindo um maior aporte sanguíneo, um maior contato com as substâncias vindas do leito cirúrgico e conseqüentemente uma maior produção de células de defesa. Os mesmos autores citados relatam que na ferida cirúrgica, aos 7 dias coexistem formação das alças e início do processo de segmentação dos vasos. Na presente pesquisa aos 7 dias houve uma diminuição brusca da angiogênese por intussuscepção no interior dos linfonodos e isso pode ter ocorrido em função da progressão do processo de angiogênese que é a formação de alças capilares e posterior segmentação vascular.

Em todos os grupos a angiogênese por intussuscepção esteve presente na extremidade livre dos vasos sanguíneos, exceto no grupo 6 (21 dias) onde a mesma localizava-se na área de bifurcação desses vasos. Segundo Burri et al. (2004) quando a formação de pilares intraluminais está localizada nas extremidades livres dos vasos ocorre a arborização intussusceptiva, ou seja, a expansão da rede vascular, no entanto, quando ocorrem em bifurcação de vasos induzem a remodelação ou poda dos brotos vasculares. O destino e efeito desses pilares formados na bifurcação de pequenos vasos dependem do tamanho, forma e

localização dos pilares, podendo otimizar as condições hemodinâmicas, adaptar os mecanismos de aumento de fluxo e pressão sanguínea e induzir a completa oclusão, seguido pela regressão, retração e atrofia do broto afetado (BURRI et al., 2004). Diante disso, e sabendo que a angiogênese por intussuscepção não é somente responsável pelo aumento no leito vascular, mas está diretamente envolvida na remodelação estrutural para otimização da forma e função dos vasos (KURZ et al., 2003), sugere-se que angiogênese por intussuscepção constatada nos grupos 1 (2 dias) e 2 (3 dias) seja responsável pela expansão da cadeia vascular dos linfonodos, enquanto que no grupo 6 (21 dias) modifique e otimize a geometria dos vasos e as condições hemodinâmicas dos linfonodos. Patan et al. (2001) avaliaram o processo de reparo no pedículo ovariano depois de realizada a remoção do ovário de ratas e constataram que a partir dos 14 dias pós-operatórios existe uma regressão na quantidade de vasos sanguíneos no interior da ferida e aos 21 dias o tecido cicatricial é menos vascularizado. Portanto a angiogênese por intussuscepção no grupo 6 pode ser responsável pelo remodelamento da vasculatura dos linfonodos redirecionando as células apresentadoras de antígeno no interior desse órgão ou pode representar a redução no número de vasos neoformados, retornando à quantidade de vasos presentes antes da injúria tecidual pela progressão do reparo da ferida presente na língua.

Na superfície dos linfonodos corroídos foram avaliados o maior e menor diâmetro dos nódulos foliculares o que possibilitou o cálculo da área superficial desses nódulos. Para a mensuração dos diâmetros utilizou-se como limite externo dos nódulos foliculares as vênulas de endotélio alto (VEAs), já que as mesmas estão sempre circundando tais nódulos. Os valores das áreas foram analisados estatisticamente e verificou-se que os grupos 2, 3, 4 e 5 (respectivamente 3, 7, 10 e 14 dias) diferiram significativamente do grupo-controle (tabela 6). Quando a mensuração do diâmetro de três capilares localizados na periferia externa de cada nódulo folicular foi realizada, constatou-se uma diferença significativa em relação ao controle nos grupos 1, 2, 3 e 4 (respectivamente 2, 3, 7 e 10 dias) (tabela 7).

Diante desses resultados pôde-se verificar que o aumento do diâmetro dos vasos sanguíneos ocorreu previamente ao aumento da área dos nódulos foliculares. No interior da ferida, logo após a injúria tecidual, inicia-se uma série de eventos objetivando primeiramente cessar o sangramento e na seqüência dar condições

para que a cicatrização ocorra. Durante as fases iniciais do processo de reparo a circulação sanguínea está afetada pelo trauma e a circulação linfática se torna predominante (ALLER et al., 2004b) sendo que esta linfa drenada dos tecidos inflamados aos linfonodos regionais contém altos níveis de citocinas e quimiocinas (SZCZESNY; OLSZEWSKI, 2003). Uma vasoconstrição transitória ocorre no interior da ferida com a intenção de controlar o sangramento, mas logo em seguida uma vasodilatação é causada principalmente pela ação da prostaglandina (BROUGHTON et al., 2006). Avaliando o processo cicatricial de ferida produzida em mucosa palatina de ratos, Selliseth e Sevig (1995) constataram o aumento no diâmetro dos vasos na margem da ferida quando comparado com o tecido não operado. Para esses autores a vasodilatação foi mais pronunciada no segundo dia, diminuindo progressivamente no período pós-operatório de 20 dias, contudo no período avaliado, o calibre vascular não alcançou o diâmetro observado no controle. Na presente pesquisa o diâmetro vascular dos linfonodos também foi maior a partir do segundo dia pós-operatório e ao final do período experimental (21 dias) não atingiu o diâmetro dos vasos dos animais-controle, contudo não foi verificada a diminuição progressiva do calibre vascular.

A ação de substâncias vasoconstritoras nos linfonodos poderia se refletir na presença de capilares com calibre inferior àquele visto nos animais-controle. Esse fato não foi verificado, contudo esse achado pode ter sido em função do tempo decorrido desde o procedimento cirúrgico até a primeira avaliação feita. Para comprovar se os produtos que provocam a vasoconstrição no interior do leito cirúrgico podem influenciar no diâmetro dos capilares dos linfonodos, se faz necessária uma análise da vasculatura dos linfonodos nas primeiras horas pós-cirúrgicas, momento em que essa vasoconstrição está ocorrendo nos vasos traumatizados do leito cirúrgico.

A alteração no diâmetro dos capilares que circundam externamente os nódulos foliculares pode ser causada pela ação de substâncias vasodilatadoras direcionadas até os linfonodos através da linfa aferente, mas também pela ação de mastócitos que se encontram em quantidade aumentada no interior de linfonodos estimulados (SAINTE-MARIE; PENG, 1991). Como para esses autores os produtos degranulados dos mastócitos (serotonina e histamina) influenciam o estado fisiológico das VEAs, pode-se sugerir que a ação dos mesmos não seja restrita a

essas vênulas, mas possa influenciar toda a vasculatura do local onde estão presentes.

Para Steeber e Albrecht (1992), os linfonodos ativados em resposta ao processo inflamatório, aumentam de tamanho e peso devido a mudanças no fluxo sanguíneo, acúmulo de fluidos, migração e proliferação celular no seu interior. O aumento no aporte sanguíneo dos linfonodos pode, segundo Hay e Hobbs (1977), ser decorrente da vasodilatação dos vasos sanguíneos ou também do processo angiogênico. Como o aumento da área dos nódulos foliculares (local que contém o centro germinativo) ocorreu somente depois do aumento do calibre vascular pode-se sugerir que uma ação vasodilatadora esteja ocorrendo. Essa vasodilatação permitiria uma diminuição do fluxo sanguíneo e facilitaria o contato dos linfócitos com o endotélio das VEAs e posteriormente a migração destas células do lúmen vascular para o interior dos linfonodos. Se a maior concentração de linfócitos nos tecidos ocorre entre o quinto e o sétimo dias pós-injúria (PARK; BARBUL, 2004) e se o aumento na área dos nódulos foliculares for representativo de uma maior produção de células de defesa, é esperado que esse aumento ocorra nos primeiros dias pós-operatórios. Conforme progride o reparo, a necessidade de células de defesa diminui e, portanto a produção celular no interior dos linfonodos pode ser diminuída. Essa menor produção de células de defesa pode ser relacionada com a redução na área dos nódulos foliculares visualizada em MEV. Decorridos 21 dias de controle pós-operatório, o diâmetro dos vasos e a área dos nódulos foliculares, apesar de não diferir significativamente, não apresentam valores semelhantes àqueles observados nos animais-controle.

Okada et al. (2002), analisando modelos vasculares através da MEV, fazem menção sobre o tamanho dos nódulos foliculares em linfonodos de animais normais e relatam uma variação entre 70-100 μ m no diâmetro dos mesmos. Os achados da presente pesquisa não concordam com os dados relatados por esses autores, já que em linfonodos submandibulares de animais saudáveis o maior diâmetro variou entre 182-487 μ m e o menor diâmetro entre 159-438 μ m. Como os autores citados não relatam a cadeia linfática utilizada para a análise e nem a padronização feita para adquirir o valor descrito, acredita-se que essa diferença possa ter ocorrido em função da análise de diferentes cadeias linfáticas ou por uma padronização diferente para a realização da medida desse diâmetro.

O transporte de substâncias do leito cirúrgico para o interior dos linfonodos pode causar a alteração no diâmetro dos capilares e posteriormente o aumento da área dos nódulos foliculares, no entanto essas alterações vasculares podem ser decorrentes de mudanças intrínsecas ocorridas nos linfonodos. Por esses motivos sugere-se posterior estudo buscando comprovar a ação nos linfonodos de substâncias oriundas da ferida.

Através da análise dos cortes histológicos foi realizada a contagem dos vasos sanguíneos presentes nos linfonodos e constatou-se que o número médio total de vasos, comparando os diferentes grupos experimentais sem acrescentar os valores dos animais-controle, foi maior no grupo 6 (21 dias) sendo que este não diferiu significativamente dos grupos 1, 3 e 5 (2, 7 e 14 dias respectivamente) (tabela 3). Alguns fatores podem estar relacionados com a maior quantidade de vasos observada nesses períodos. A angiogênese por intussuscepção, vista em maior quantidade no grupo 1 (2 dias), não pode ser responsável pela quantidade de vasos sanguíneos presentes nesse grupo já que esse processo não pode ser visualizado nos cortes histológicos avaliados. Acredita-se que essa quantidade de vasos sanguíneos relatada seja decorrente de uma ação vasodilatadora e não de um aumento real no número de vasos sanguíneos. A visualização dos vasos sanguíneos nos cortes histológicos pode ser facilitada em função de um maior diâmetro.

O número de vasos sanguíneos presentes no grupo 3 (7 dias) pode ser decorrente da segmentação vascular ou da angiogênese por brotamento. A segmentação vascular, processo pelo qual as alças capilares formadas pelo processo de angiogênese por intussuscepção são separadas do vaso “mãe” (aquele que dá origem à alça), ocorre próximo ao sétimo dia pós-operatório (PATAN et al., 2001) e aumenta a chance do vaso ser incluído no corte histológico já que o mesmo apresenta um calibre maior. A angiogênese por brotamento necessita para estar completa: degradação da membrana basal, proliferação de células endoteliais, formação de brotos sólidos de células endoteliais, reestruturação do broto em lúmen coberto por células endoteliais e integração ao sistema vascular (BURRI et al., 2004) e por isso é considerada um processo relativamente lento (DJONOV; BURRI, 2005) podendo ser outra provável causa para o número de vasos vistos no grupo 3.

Segundo Greenhalgh (1998) a apoptose das células da neovascularização inicia próximo ao décimo segundo dia pós-operatório e tem sua máxima expressão entre o décimo sexto e vigésimo quinto dias. Por esse motivo poderia se esperar que uma menor quantidade de vasos sanguíneos estivesse presente nos grupos 5 e 6 (14 e 21 dias respectivamente), no entanto isso não foi verificado. O estímulo antigênico possibilita que uma maior quantidade de VEAs apresente o lúmen fechado e o endotélio hipertrófico (BÉLISLE; SAINTE-MARIE,1985). Com a progressão do processo de reparo das feridas é esperado que o estímulo antigênico presente nos linfonodos seja menor nos grupos 5 e 6 e por esse motivo as VEAs poderiam apresentar o lúmen mais aberto e endotélio menos hipertrófico facilitando a visualização dos mesmos nos cortes histológicos corados com HE. Os valores obtidos no grupo 6, em semelhança ao descrito no grupo 1, não necessariamente significam um aumento real no número total de vasos sanguíneos avaliados. Pode-se sugerir que o número de vasos sanguíneos nos grupos onde as VEAs estejam com lúmen fechado e endotélio hipertrófico, estejam subestimados na avaliação histológica da presente pesquisa.

Uma variação no número de vasos sanguíneos dos linfonodos poderia ocorrer em função da idade ou do peso dos animais e não necessariamente em função da progressão do reparo da ferida. Como na presente pesquisa todos os animais apresentavam a mesma idade a única possibilidade de variação seria no peso dos mesmos. Tomando como base os animais-controle constatou-se que o rato controle do grupo 1 (2 dias) teve uma perda de peso de 14g e o animal-controle do grupo 4 (10 dias) teve o maior ganho de peso (37g). Seguindo o raciocínio de que o peso poderia alterar o número de vasos sanguíneos presentes nos linfonodos o rato controle do grupo 4 deveria apresentar um número maior de vasos, no entanto essa idéia não pôde ser comprovada, já que o animal-controle do grupo 4 não apresentou um número médio de vasos maior que os demais animais do grupo controle.

Verli (2006) verificando a vasculatura de feridas produzidas em ventre lingual através da técnica de corrosão vascular, relatou que a revascularização total da ferida ocorre aos sete dias pós-operatório e que aos 21 dias o padrão dos vasos sanguíneos ainda não é semelhante àquele visualizado em estruturas normais. Nos achados de Selliseth e Selvig (1995), o tempo de revascularização total de uma ferida palatina foi de 20 dias, provavelmente em função da vascularização do palato ser menos intensa que a da língua. Além disso, a localização anatômica da língua

próxima aos ductos das glândulas submandibulares e sublinguais pode ter auxiliado o processo de cicatrização, já que segundo Pammer et al. (1998) e Taichman et al. (1998) a rápida cicatrização de feridas em mucosa oral pode ser explicada pela alta concentração de alguns fatores de crescimento na saliva. FUJISAWA et al. (2003) constataram que a remoção das glândulas submandibulares de coelhos torna crônico o processo de cicatrização de uma ferida produzida em gengiva vestibular e que ulcerações crônicas podem sofrer remissão após a aplicação, por exemplo, do fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) comprovando a ação desse produto sobre o processo cicatricial de lesões produzidas em mucosa oral.

Decorridos 21 dias de controle pós-operatório, o padrão dos vasos sanguíneos no interior do leito cirúrgico ainda não é semelhante àquele visto em línguas normais (VERLI, 2006) e, no mesmo período, a quantidade de vasos sanguíneos dos linfonodos não é semelhante àquela vista em animais-controle. Diante desses dados e sabendo que a fase de remodelamento pode persistir por até um ano (GREENHALGH, 1998), existe a necessidade de um tempo maior de avaliação com a intenção de comprovar se os resultados obtidos nos linfonodos de animais experimentais serão semelhantes àqueles dos animais-controle após o completo remodelamento da ferida.

Quando as diferentes áreas foram comparadas, dentro do mesmo grupo, em relação ao número médio de vasos sanguíneos constatou-se que a área A1 (interior do centro germinativo) teve o menor número de vasos sanguíneos diferindo significativamente das demais áreas em todos os tempos pós-operatórios (tabela 4). Além disso, nesse local observou-se unicamente a presença de vasos de pequeno calibre, não sendo evidenciada nenhuma vênula de endotélio alto, concordando com as descrições feitas por Bélisle e Sainte-Marie (1990). O interior dos nódulos foliculares (área A1) é o local onde os linfócitos B permanecem por um curto período de tempo e a pequena quantidade de vasos sanguíneos poderia refletir uma menor necessidade de substâncias circulantes devido a reduzida atividade das células contidas nesse local. Muitas dessas células, presentes no interior do centro germinativo, podem não estar realmente envolvidas na resposta imune, visto que o acúmulo de linfócitos nessa área ocorre mesmo na ausência virtual de resposta imune em animais “germ-free” segundo Bélisle e Sainte-Marie (1982).

Quando as porções laterais aos nódulos foliculares (área A2/A3) foram avaliadas verificou-se uma quantidade maior de vasos sanguíneos que aquela vista no interior do centro germinativo e menor que aquela encontrada nas áreas A4 (base dos nódulos foliculares) e C1/C2 (região de córtex profundo) diferindo significativamente das mesmas exceto nos grupos 2 e 4 onde os valores foram estatisticamente semelhantes. Essa semelhança estatística entre a área A2/A3 e as áreas A4 e C1/C2 ocorreu em função da diminuição na quantidade de vasos presentes nas áreas A4 e C1/C2 e não em decorrência do aumento no número de vasos sanguíneos na área A2/A3 (tabela 4). Também fica evidente que em relação ao número médio de vasos sanguíneos as áreas A4 e C1/C2 são estatisticamente semelhantes.

Durante a descrição da vasculatura de linfonodos de ratos, Bélisle e Sainte-Marie (1990), apesar de não relatarem a densidade das VEAs, relatam que a zona internodular apresenta uma densidade menor de capilares quando comparada com a periferia do córtex profundo. Na presente pesquisa essas áreas não diferiram significativamente entre si (nos grupos 2 e 4) na quantidade de vasos visualizados em microscopia de luz, mas vale lembrar que os linfonodos avaliados foram provenientes da cadeia submandibular de animais que apresentavam uma ferida cirúrgica produzida em ventre lingual, enquanto que aqueles analisados pelas autoras eram provenientes de outras cadeias ganglionares de animais saudáveis. Para Gadre et al. (1994) o aumento na densidade de capilares dos linfonodos aumenta a área de superfície e conseqüentemente a quantidade de antígeno, melhorando a resposta imunológica. Por isso presume-se que a grande quantidade de vasos sanguíneos localizados na porção basal dos nódulos foliculares e na periferia da unidade de córtex profundo seja decorrente da necessidade abundante de substâncias circulantes e da alta necessidade metabólica apresentada pelas numerosas células que migram nesses locais.

Quando comparado o número médio total de vasos sanguíneos entre os grupos experimentais e seus respectivos animais-controle, constatou-se uma diferença significativa nos grupos 1, 2, 5 e 6 (respectivamente 2, 3, 14 e 21 dias) (tabela 5). Analisando os dados descritos na tabela 5 pode-se observar que nos grupos 3 e 4 (7 e 10 dias respectivamente), onde não houve diferença significativa em relação ao controle, existem valores que destoam dos demais grupos avaliados. Levando em consideração o desvio-padrão dos grupos experimentais pôde-se

observar que o grupo 4 apresenta o maior valor. Sendo o desvio-padrão a mais importante medida de dispersão de valores individuais ao redor da média (MOTTA; WAGNER, 2003), fica evidente a variabilidade de valores apresentados por esse grupo experimental.

No grupo 3 (7 dias) não se constatou diferença significativa no número de vasos sanguíneos em relação ao animal-controle. Esses valores não refletem uma diminuição na quantidade de vasos sanguíneos observados nos animais experimentais, mas sim um número maior de vasos sanguíneos presentes no animal-controle. Quando comparados exclusivamente os animais-controle constata-se que o número de vasos sanguíneos do animal do grupo 3 apresenta uma discrepância de valores quando comparados com os animais-controle dos demais grupos experimentais. Diante desses resultados estatísticos e sabendo que o número de vasos sanguíneos provavelmente esteja subestimado na presente pesquisa, são necessários novos estudos que utilizem um número maior de animais experimentais e controles, além de outros métodos de avaliação que permitam a evidenciação dos vasos sanguíneos, facilitando conseqüentemente a diferenciação entre vasos sanguíneos e vasos linfáticos, deficiência essa observada durante a análise de cortes histológicos corados com HE.



7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

7.1 QUALITATIVAS

- Os vasos sanguíneos observados no interior dos nódulos foliculares foram caracterizados como sendo capilares;
- A zona internodular apresenta vasos sanguíneos caracterizados como vênulas de endotélio alto (VEAs) e estas adquirem um diâmetro maior conforme se aproximam da região de córtex profundo;
- As artérias capsulares lançam ramos que atravessam o seio subcapsular e auxiliam na irrigação do córtex externo;
- A angiogênese por intussuscepção aos 2 e 3 dias pós-operatórios representa a expansão da cadeia vascular dos linfonodos;
- Aos 21 dias pós-operatórios a angiogênese por intussuscepção ocorre na bifurcação dos vasos e é sugestiva de remodelamento vascular;
- As vênulas de endotélio alto (VEAs) apresentam características corrugadas nos modelos vasculares em decorrência da hipertrofia endotelial e do número de linfócitos unidos à parede vascular;
- A presença de modelos vasculares menos corrugados e com depressões menos profundas nas VEAs do grupo-controle e 2 dias pós-operatórios são representativas de um processo inflamatório menos intenso.

7.2 QUANTITATIVAS

- O número de vasos sanguíneos presentes no interior dos nódulos foliculares é pequeno diferindo significativamente das demais áreas dos linfonodos;
- Nos grupos experimentais a porção basal dos nódulos foliculares (área A4) e o córtex profundo (áreas C1/C2) apresentam características semelhantes em relação a quantidade de vasos sanguíneos;
- O valor médio da área dos nódulos foliculares de animais normais foi de $93878\mu\text{m}^2$ enquanto que nos animais experimentais esse valor não foi inferior à $144376\mu\text{m}^2$;
- O diâmetro médio dos modelos vasculares de animais normais foi de $7,70\mu\text{m}$ enquanto que nos animais experimentais o diâmetro médio não foi inferior à $8,62\mu\text{m}$;

- Durante o processo de cicatrização a área dos nódulos foliculares dos linfonodos aumenta somente depois do aumento do diâmetro dos capilares que circundam esses nódulos;
- A angiogênese por intussuscepção foi mais intensa aos 2 e 3 dias pós-operatórios.



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ALLER, M. A. et al. Posttraumatic inflammation is a complex response based on the pathological expression of the nervous, immune and endocrine functional systems. **Exp Biol Med**, v.229, n.2, p.170-181, Feb. 2004a.

ALLER, M. A. et al. Post-traumatic inflammatory response: perhaps a succession of phases with a nutritional purpose. **Med Hypotheses**, v.63, n.1, p.42-46, 2004b.

ALLER, M. A. et al. The inflammatory response: na efficient way of life. **Med Sci Monit**, v.12, n.10, p.RA225-RA234. Sep. 2006.

AL-RAWI, M. A. A. et al. Molecular and cellular mechanisms of lymphangiogenesis. **Eur J Surg Oncol**, v.31, n.2, p.117-121, Mar. 2005.

ANISMAN, H. et al. Neuroimmune mechanisms in health and disease: 2. Disease. **Can Med Assoc J**, v.155, n.8, p.1075-1082, Oct. 1996.

APPLETON, I. Wound repair: the role of cytokines and vasoactive mediators. **J R Soc Med**, v.87, n.9, p.500-502, Sep. 1994.

BARKER, R. N. et al. Antigen presentation by macrophages in enhanced by the uptake of necrotic, but nor apoptotic cells. **Clin Exp Immunol**, v.127, n.2, p.220-225, Feb. 2002.

BÉLISLE, C.; SAINTE-MARIE, G. Tridimensional study of the deep cortex of the rat lymph node: I: Topography of the deep cortex. **Anat Rec**, v.199, n.1, p.45-59, Jan. 1981a.

BÉLISLE, C.; SAINTE-MARIE, G. Tridimensional study of the deep córtex of the rat lymph node. II: Relation of deep cortex units to afferent lymphatic vessels. **Anat Rec**, v.199, n.1, p.61-72, Jan. 1981b.

BÉLISLE, C.; SAINTE-MARIE, G. Tridimensional study of the deep córtex of the rat lymph node. III: Morfology of the deep cortex units. **Anat Rec**, v.199, n.2, p.213-226, Feb. 1981c.

BÉLISLE, C.; SAINTE-MARIE, G. Tridimensional study of the deep cortex of the rat lymph node. VI: the deep cortex units of the germ-free rat. **Am J Pathol**, v.107, n.1, p.70-78, apr. 1982

BÉLISLE, C.; SAINTE-MARIE, G. The narrowing of high endothelial venules of the rat lymph node. **Anat Rec**, v.211, n.2, p.184-191, Feb. 1985.

BÉLISLE, C.; SAINTE-MARIE, G. Blood vascular network of the rat lymph node: tridimensional studies by light and scanning electron microscopy. **Am J Anat**, v.189, n.2, p.111-126, Oct. 1990.

BELZ G.; HEATH, T. J. Pathways of blood flow to and through superficial lymph nodes in the dog. **J Anat**, v.187, pt.2, p.413-421, Oct. 1995.

BROUGHTON, G. et al. The basic science of wound healing. **Plast Reconstr Surg**, v.117, 7 Suppl, p.12S-34S, Jun. 2006.

BROWN, L. F. et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. **J Exp Med**, v.176, n.5, p.1375-1379, Nov. 1992.

BURRI, P. H. et al. Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. **Dev Dyn**, v.231, n.3, p.474-488, Nov. 2004.

CAGGIATI, A. et al. Valves in small veins and venules. **Eur J Vasc Endovasc Surg**, v.32, n.4, p.447-452, Oct. 2006.

CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nat Med**, v.9, n.6, p.653-660, Jun. 2003.

CARMELIET, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. **Nature**, v.438, n.7070, p.932-936, Dec. 2005.

CASTENHOLZ, A. Corrosion cast technique applied in lymphatic pathways. **Scan Electron Microsc**, Pt2, p.599-605.1986.

CASTENHOLZ, A. Interpretation of structural patterns appearing on corrosion casts of small blood and initial lymphatic vessel. **Scanning Microsc**, v.3, n.1, p.315-325, Mar. 1989.

CASTENHOLZ, A. Approach to combine confocal laser scanning microscopy with casting techniques of SEM. **Okajimas Folia Anat Jpn**, v.71, n.6, p.389-391, Mar. 1995.

CASTENHOLZ, A.; CASTENHOLZ, H. E. Casting methods of scanning electron microscopy applied to hemal lymph nodes in rats. **Lymphology**, v.29, n.3, p.95-105, Sep. 1996.

CHAMBERS, R. C.; LAURENT, G. J. Coagulation cascade proteases and tissue fibrosis. **Biochem Soc Trans**, v.30, n.2, p.194-200, Apr. 2002.

CLARKE, J. H. et al. Dendritic cells as therapeutic adjuncts in surgical disease. **Surgery**, v.138, n.5, p.844-850, Nov. 2005.

CYSTER, J. G. Chemokines and the homing of dendritic cells to the T cell areas of lymphoid organs. **J Exp Med**, v.189, n.3, p.447-450, Feb. 1999.

CYSTER, J. G. Leucocyte migration: scent of the T zone. **Curr Biol**, v.10, n.1, p.R30-R33, Jan. 2000.

DIACOVO, T. et al. Adhesive mechanisms governing interferon-producing cell recruitment into lymph nodes. **J Exp Med**, v.202, n.5, p.687-696, Sep. 2005.

DIELI, F. Dendritic cells and the handling of antigen. **Clin Exp Immunol**, v.134, n.2, p.178-180, Nov. 2003.

DI VITA, G. et al. Production of cytokines at the operation site. **G Chir**, v.26, n.6/7, p.241-245, Jun/Jul. 2005.

DJONOV, V. et al. Intussusceptive angiogenesis: its role in embryonic vascular network formation. **Cir Res**, v.86, n.3, p.286-292, Feb. 2000.

DJONOV, V. et al. Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. **Cel Tissue Res**, v.314, n.1, p.107-117, Oct. 2003.

DJONOV, V.; BURRI, P. H. **Basic concepts of intussusceptive angiogenesis.** Book article In SHEPRO, D. *Microvascular Research: Biology and pathology* USA:Elsevier. 2005. p.91-95.

DVORAK, H. F. Angiogenesis: update 2005. **J Thromb Haemost**, v.3, n.8, p.1835-1842, Aug. 2005.

EDELMAN, D. A. et al. Pericytes and their role in microvasculature homeostasis. **J Surg Res**, v.135, n.2, p.305-311, Oct. 2006.

FISHEL, R. S. et al. Lymphocyte participation in wound healing. Morphologic assessment using monoclonal antibodies. **Ann Surg**, v.206, n.1, p.25-29, Jul. 1987.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **J Biol Chem**, v.267, n.16, p.10931-10934, Jun. 1992.

FUJISAWA, K. et al. Basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor reverse impaired ulcer healing of the rabbit oral mucosa. **J Oral Pathol Med**, v.32, n.6, p.358-366, Jul. 2003.

GADRE, A. et al. A scanning electron microscope study of the human cervical lymph node. **Acta Otolaryngol**, v.114, n.1, p.87-90, Jan. 1994.

GAJDUSEK, C. et al. Activation of coagulation releases endothelial cell mitogens. **J Cell Biol**, v.103, n.2, p.419-428, Aug. 1986.

GOLDSBY, R. A. et al. **Kuby imunologia**. 4 ed. Revinter: Rio de Janeiro. 2002. 662p.

GREENHALGH, D. G. The role of apoptosis in wound healing. **Int J Biochem Cell Biol**, v.30, n.9, p.1019-1030, Sep. 1998.

GRETZ, J. E. et al. Lymph-borne chemokines and other low molecular weight molecules reach high endothelial venules via specialized conduits while a functional barrier limits access to the lymphocyte microenvironments in lymph node cortex. **J Exp Med**, v.192, n.10, p.1425-1440, Nov. 2000.

GRUNT, T. W. et al. The vascular pattern of basal cell tumors: light microscopy and scanning electron microscopic study on vascular corrosion casts. **Microvasc Res**, v.29, n.3, p.371-186, May. 1985.

HARTY, M. et al. Regeneration or scarring: a immunologic perspective. **Dev Dyn**, v.226, n.2, p.228-279, Feb. 2003.

HAY, J.; HOBBS, B. The flow of blood to lymph nodes and its relation to lymphocyte traffic and the immune response. **J Exp Med**, v.145, n.1, p.31-44, Jan. 1977.

HOSSLER, F. E.; DOUGLAS, J. E. Vascular corrosion casting: review of advantages and limitations in the application of some simple quantitative methods. **Microsc Microanal**, v.7, n.3, p.253-264, May. 2001.

HOSSLER, F. E.; MONSON F. C. Structure and blood supply of intrinsic lymph nodes in the wall of the rabbit urinary bladder – studies with light microscopy, electron microscopy, and vascular corrosion casting. **Anat Rec**, v.252, n.3, p.477-484, Nov. 1998.

IRJALA, H. et al. The same endothelial receptor controls lymphocyte traffic both in vascular and lymphatic vessels. **Eur J Immunol**, v.33, n.3, p.815-824, Mar. 2003.

Jl, R. C. Characteristics of lymphatic endothelial cells in physiological and pathological conditions. **Histol Histopathol**, v.20, n.1, p.155-175, Jan. 2005.

Jl, R. C. Lymphatic endothelial cells, lymphangiogenesis, and extracellular matrix. **Lymphat Res Biol**, v.4, n.2, p.83-100, Dec. 2006.

KAPLANSKI, G. et al. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. **Trends immunol**, v.24, n.1, p.25-29, Jan. 2003.

KIRSNER, R. S.; EAGLSTEIN, W. H. The wound healing process. **Dermatol Clin**, v.11, n.4, p.629-640, Oct. 1993.

KISUCKA, J. et al. Platelets and platelet adhesion support angiogenesis while preventing excessive hemorrhage. **Proc Natl Acad Sci**, v.103, n.4, p.855-860, Jan. 2006.

KOMAI-KOMA, M. et al. Chemoattraction of Human T Cells by IL-18. **J Immunol**, v.170, n.2, p.1084-1090, Jan. 2003.

KURZ, H. et al. Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: from form to function. **News Physiol Sci**, v.18, p.65-70, Apr. 2003.

LAMETSCHWANDTNER, A. et al. Morphometry of corrosion casts. **Prog Clin Biol Res**, v.295, p.427-433, 1989.

LI, J. et al. Pathophysiology of acute wound healing. **Clin Dermatol**, v.25, n.1, p.9-18, Jan/Feb. 2007.

LIN, E. et al. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v.127, n.2, p.117-126, Feb. 2000.

LINGEN, M. W. Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. **Arch Pathol Lab Med**, v.125, n.1, p.67-71, Jan. 2001.

MOEHLER, M. et. Oncolytic parvovirus H1 induces release of heat-shock protein HSP72 in susceptible human tumor cells but may not affect primary immune cells. **Cancer Gene Ther**, v.10, n.6, p.477-480, Jun. 2003.

MÖHLE, R. et al. Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. **Proc Natl Acad Sci**, v.94, n.2, p.663-668, Jan. 1997.

MOTTA, V. T.; WAGNER, M. B. **Bioestatística**. São Paulo: Robe Editorial, 2003. 201p.

NAGY, J. A. et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. **J Exp Med**, v.196, n.11, p.1497-1506, Dec. 2002.

NISSEN, N. N. et al. Basic fibroblast growth factor mediates angiogenic activity in early surgical wounds. **Surgery**, v.119, n.4, p.457-465, Apr. 1996.

NISSEN, N. N. et al. A. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. **Am J Pathol**, v.152, n.6, p.1445-1452, June. 1998.

OHTANI, O. et al. Fluid and cellular pathways of rat lymph nodes in relation to lymphatic labyrinths and aquaporin-1 expression. **Arch Histol Cytol**, v.66, n.3, p.261-272, Aug. 2003.

OKADA, S. et al. Structural aspects of the lymphocyte traffic in rat submandibular lymph node. **Microsc Microanal**, v.8, n.2, p.116-133, Apr. 2002.

OLIVER, G.; DETMAR, M. The rediscovery of the lymphatic system: old and new insights into the development and biological function of the lymphatic vasculature. **Genes Dev**, v.16, n.7, p.773-783, Apr. 2002.

OLIVER, G. Lymphatic vasculature development. **Nat Rev Immunol**, v.4, n.1, p.35-45, Jan. 2004.

OLUTOYE, O. O. et al. Neutrophil recruitment by fetal porcine endothelial cells: implications in scarless fetal wound healing. **Pediatr Res**, v.58, n.6, p.1290-1294, Dec. 2005.

PAMMER, J. et al. Vascular endothelial growth factor is constitutively expressed in normal human salivary glands and is secreted in the saliva of healthy individuals. **J Pathol**, v.186, n.2, p.186-191, Oct. 1998.

PARK, J. E.; BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **Am J Surg**, v.187, n.5A, p.11S-16S, May. 2004.

PATAN, S. et al. Vascular morphogenesis and remodeling in a model of tissue repair: blood vessel formation and growth in the ovarian pedicle after ovariectomy. **Circ Res**, v.89, n.8, p.723-731, Oct. 2001.

PODGRABINSKA, S. et al. Molecular characterization of lymphatic endothelial cells. **Proc Natl Acad Sci**, v.99, n.25, p.16069-16074, Dec. 2002.

RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. **Nature**, v.386, n.6626, p.671-674, Apr. 1997.

SAINTE-MARIE, G. et al. The deep cortex of lymph node: morphological variations and functional aspects. **Curr Top Pathol**, v.84, Pt 1, p.33-63, 1990.

SAINTE-MARIE, G.; PENG, F. S. Distribution of a diffusible tracer in the subcapsular sinus and the cortex of lymph nodes in the rat. **Rev Can Biol Exp**, v.41, n.3, p.201-208, Nov.1982.

SAINTE-MARIE, G.; PENG, F. S. Dilatation of high endothelial venules in compartments of rat lymph nodes with abundant cortical mast cell. **J Anat**, v.174, p.163-170, Feb. 1991.

SAINTE-MARIE, G.; PENG, F. S. A study on binding of suspended nodal lymphocytes to high endothelial venules in sections of frozen rat lymph nodes. **J Anat**, v.187, Pt 1, p.47-58, Aug. 1995.

SANGIORGI, S. et al. Microvascularization of the human digit as studied by corrosion casting. **J Anat**, v.204, n.2, p.123-131, Feb. 2004.

SANTIAGO-DELPÍN, E. A. The endothelium and early immune activation: new perspective and interactions. **Transplant Proc**, v.36, n.6, p.1709-1713, Jul-Aug. 2004.

SCAVELLI, C. et al. Lymphatics at the crossroads of angiogenesis and lymphangiogenesis. **J Anat**, v.204, n.6, p.433-449, Jun. 2004.

SCHOENMAKERS, S. et al. Blood coagulation factors as inflammatory mediators. **Blood Cells Mol Dis**, v.34, n.1, p.30-37, Jan-Feb. 2005.

SCHROCK, T. et al. Wound and wound healing. **Dis Colon Rectum**, v.25, n.1, p.1-15, Jan-Feb. 1982.

SCHWARTZ-CORNIL, I. et al. Probing leukocyte traffic in lymph from oro-nasal mucosae by cervical catheterization in sheep model. **J Immunol Methods**, v.305, n.2, p.152-161, Oct. 2005.

SELLISETH, N. J.; SELVIG, K. A. Microvasculature of the dorsum of the rat tongue: a scanning electron microscopic study using corrosion casts. **Scand J Dent Res**, v.101, n.6, p.391-397, Dec. 1993.

SELLISETH, N. J.; SELVIG, K. A. Revascularization of an excisional wound in gingival and oral mucosa. A scanning electron microscopic study using corrosion casts in rats. **Scanning Microsc**, v.9, n.2, p.455-468, Jun. 1995.

SENIOR, R. M. et al. Chemotactic activity of platelet alpha granule proteins for fibroblasts. **J Cell Biol**, v.96, n.2, p.382-385, Feb. 1983.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, v.18, n.3, p.385-405, Sep. 2004.

SHIMAMURA, H. et al. Irradiated pancreatic cancer cells undergo both apoptosis and necrosis, and could be phagocytized by dendritic cells. **Eur Surg Res**, v.37, n.4, p.228-234, Jul-Aug. 2005.

SIMS, D. E. Diversity within pericytes. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v.27, n.10, p.842-846, Oct. 2000.

STEEBER, D. A.; ALBRECHT, R. M. Effects of antigen stimulation and irradiation on the blood vascular system of murine lymph nodes. In MOTTA, P. M. et al. **Scanning electron microscopy of vascular casts: Methods and applications**. London: Kluwer academic, 1992. p.313-329.

SUGIOKA, S.; IKE, H. Scanning electron microscopic studies of the palatine mucosa and its microvascular architecture in the rat. **Scanning Microsc**, v.7, n.4, p.1321-1332, Dec. 1993.

SZCZESNY, G.; OLSZEWSKI, W. L. The pathomechanism of posttraumatic edema of the lower limbs: II: changes in the lymphatic system. **J Trauma**, v.55, n.2, p.350-354, Aug. 2003.

SZPADERSKA, A. M.; DIPIETRO, L. A. Inflammation in surgical wound healing: friend or foe? **Surgery**, v.137, n.5, p.571-573, May. 2005.

TAICHMAN, N. S. et al. Vascular endothelial growth factor in normal human salivary glands and saliva: a possible role in the maintenance of mucosal homeostasis. **Lab Invest**, v.78, n.7, p.869-875, Nov. 1998.

THEORET, C. L. The pathophysiology of wound repair. **Vet Clin North Equine Pract**, v.21, n.1, p.1-13, Apr. 2005.

THOMPSON, W. D. et al. Fibrinolysis and angiogenesis in wound healing. **J Pathol**, v.165, n.4, p.311-318, Dec. 1991.

TONNESEN, M. G. et al. Angiogenesis in wound healing. **J Investig Dermatol Symp Proc**, v.5, n.1, p.40-46, Dec. 2000.

Van HINSBERGH, V. W. The endothelium: vascular control of haemostasis. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v.95, n.2, p.198-201, Apr. 2001.

VERLI, F. D. **Angiogênese de ferida cirúrgica em língua de rato – análise por meio de microscopia eletrônica de varredura de modelo vascular**. 2006 147p. Tese (Doutorado Estomatologia Clínica), PUCRS, Porto Alegre, 2006.

Von ANDRIAN U. H.; MENPEL, T. R. Homing and cellular traffic in lymph nodes. **Nat Rev Immunol**, v.3, n.11, p.867-878, Nov. 2003.

YANG, L. et al. Active transforming growth factor-beta in wound repair: determination using a new assay. **Am J Pathol**, v.154, n.1, p.105-111, Jan. 1999.

WARNOCK, R. A. et al. Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. **J Exp Med**, v.187, n.2, p.205-216, Jan. 1998.



APÊNDICES

APÊNDICE A – Peso (g) inicial dos animais nos grupos experimentais

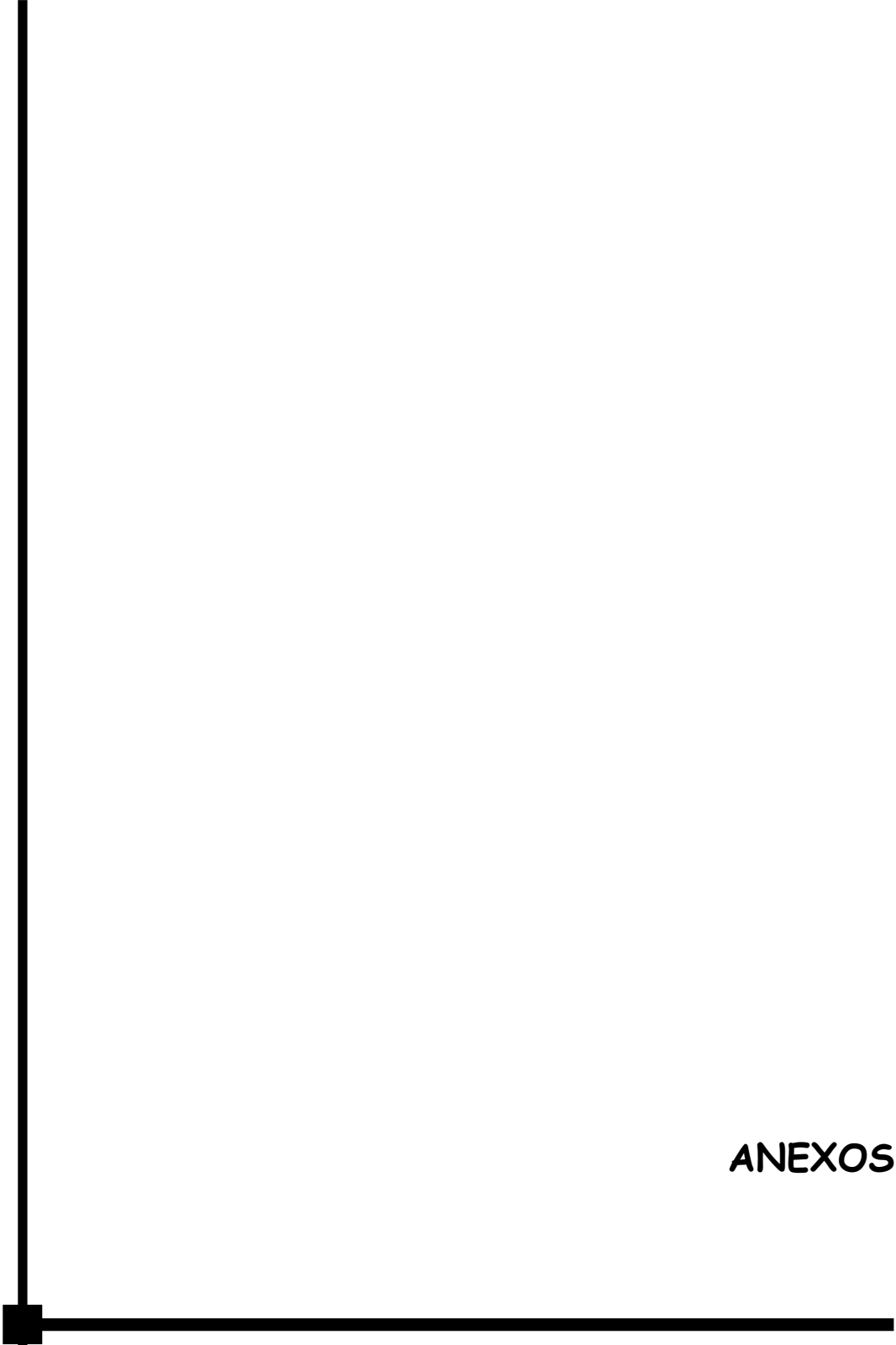
Grupo animal	1	2	3	4	5	6
Rato 1	313	255	309	273	304	304
Rato 2	246	248	280	260	307	270
Rato 3	259	245	327	286	251	312
Rato 4	267	270	289	240	328	295
Rato 5	268	256	261	286	290	257
Rato 6	297	274	280	243	284	290
Rato 7	265	238	274	250	324	294
Rato 8	263	274	245	296	314	308
Rato 9	280	300	272	296	328	304
Rato10 (controle)	268	264	261	320	304	295
Peso médio total	272,6	262,4	279,8	275	303,4	292,9
Peso médio dos animais experimentais	273,1	262,2	281,8	270	303,3	292,6
Peso médio dos animais-controles	285,33					

APÊNDICE B – Peso (g) final dos animais nos grupos experimentais

Grupo	1	2	3	4	5	6
Animal						
Rato 1	307	251	317	293	301	320
Rato 2	249	263	282	274	321	284
Rato 3	257	242	337	305	313	330
Rato 4	278	289	287	275	347	309
Rato 5	277	morreu	258	251	291	288
Rato 6	morreu	274	282	254	288	310
Rato 7	269	260	277	264	344	303
Rato 8	275	281	260	299	321	302
Rato 9	286	320	273	307	330	315
Rato10 (controle)	254	270	269	357	314	307
Peso médio total	245,2	272,2	284,2	287,9	317	306,8
Peso médio dos animais experimentais	274,7	272,5	285,8	280,2	317,3	306,7
Peso médio dos animais-controles	295,17					

APÊNDICE C – Identificação das lâminas coradas por HE, de acordo com o grupo experimental e dia da morte

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
2D R1	3D R1	7D R1	10D R1	14D R1	21D R1
2D R2	3D R2	7D R2	10D R2	14D R2	21D R2
2D R3	3D R3	7D R3	10D R3	14D R3	21D R3
2D R4	3D R4	7D R4	10D R4	14D R4	21D R4
2D R5	morreu	7D R5	10D R5	14D R5	21D R5
morreu	3D R6	7D R6	10D R6	14D R6	21D R6
2D R7	3D R7	7D R7	10D R7	14D R7	21D R7
2D R8	3D R8	7D R8	10D R8	14D R8	21D R8
2D R9	3D R9	7D R9	10D R9	14D R9	21D R9
2D R10	3D R10	7D R10	10D R10	14D R10	21D R10



ANEXO 1



*Comissão Científica e de Ética
Faculdade da Odontologia da PUCRS*

Porto Alegre 07 de abril de 2006

O Projeto de: Tese

Protocolado sob nº: 0149/05
Intitulado: Avaliação da angioarquitetura de linfonodos regionais em diferentes tempos do processo cicatricial de ferida cirurgica em lingua de ratos
Pesquisador Responsável: Profª. Dra. Liliane Soares Yurgel
Pesquisadores Associados: Tissiana Rachel Rossi Schneider
Nível: Doutorado

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 07 de abril de 2006.

Este projeto deverá ser imediatamente encaminhado ao CEP PUCRS.

Profª. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira
Presidente da Comissão Científica e de Ética da
Faculdade de Odontologia da PUCRS

ANEXO 2



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP - PUCRS



Ofício 910/06-CEP

Porto Alegre, 11 de agosto de 2006.

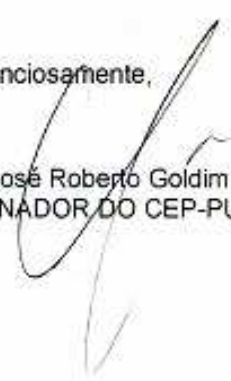
Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 06/03178, intitulado: **"Avaliação da angioarquitetura de linfonodos regionais em diferentes tempos do processo cicatricial de ferida cirúrgica em língua de ratos"**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Relatórios parciais e final da pesquisa devem ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,


Prof. Dr. José Roberto Goldim
COORDENADOR DO CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)
Dout Tissiana Rachel Rossi Schneider
N/Universidade

ANEXO 3

Metodologia aplicada aos animais submetidos à técnica de modelo de corrosão vascular.

A amostra foi constituída de 56 ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus albinus*), machos, adultos, com idade de 3 meses, e peso entre 250 e 300g, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas de Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). A parte experimental foi realizada no Laboratório de Neuroanatomia do Departamento de Ciências Morfológicas.

Todos os animais foram mantidos em gaiolas plásticas e tiveram a sua disposição, durante todo o período experimental, alimento sólido¹⁷ e água *ad libitum*. Os animais foram divididos em sete grupos de oito animais sendo que cada grupo foi sacrificado depois de 1, 2, 3, 7, 10, 14 e 21 dias. Desses animais foram utilizados 123 linfonodos provenientes de 39 animais dos grupos 2, 3, 7, 10, 14 e 21 dias.

Os animais foram anestesiados através de injeção intraperitoneal de proporções iguais de cloridrato de quetamina¹⁸ e xilazina¹⁹ na dosagem de 0,5ml/kg de peso corporal do animal. Cada animal foi disposto sobre uma mesa operatória em decúbito dorsal, a língua posicionada sobre uma mesa cirúrgica e com o auxílio de um *punch*²⁰ de 3 mm de diâmetro posicionado perpendicularmente ao ventre lingual, foi realizada a ferida cirúrgica na linha média entre o terço apical e médio da língua.

Movimentos giratórios foram realizados com o *punch* até que atingisse a profundidade de 1 mm pré-estabelecido na face externa do *punch*. O tecido incisionado foi apreendido por pinça e sua base cortada por uma tesoura cirúrgica. Depois de realizada a incisão a hemostasia foi feita com compressão leve de uma gaze sobre leito cirúrgico.

Decorridos os tempos pré-estabelecidos os animais foram novamente anestesiados para realização da infusão com resina. Realizou-se uma incisão longitudinal linear na linha média do ventre do rato, a pele localizada sobre a região torácica e abdominal foi divulsionada, o tecido muscular localizado abaixo do osso externo foi tracionado e cortado transversalmente. Depois de exposto, o diafragma

¹⁷ Ração Nuvilab-Cr 1[®] Nuvital Nutrientes - S.A, São Paulo, Brasil

¹⁸ Dopamin[®], Laboratório Agribrands, São Paulo, SP, Brasil

¹⁹ Anasedan[®] injetável, Laboratório Agribrands, São Paulo, SP, Brasil

²⁰ Instrumec[®], Prodesc, Porto Alegre.

foi incisado possibilitando a visualização da caixa torácica e aplicação, diretamente no coração, de 1ml/kg de heparina sódica 5000 UI para que não ocorresse coagulação sangüínea. Uma relaxante nas costelas direitas e esquerdas do animal foi realizada para ampliar o campo de trabalho. Depois de afastado o timo a artéria aorta ascendente foi individualizada, com fio de seda 3-0²¹ e o pulmão do lado esquerdo foi afastado para que a artéria aorta descendente fosse pinçada.

O ventrículo esquerdo foi incisado permitindo o acesso de um cateter de oxigênio ao interior do coração chegando até a artéria aorta ascendente onde foi fixado através de um nó realizado no fio que previamente individualizara a artéria. O átrio direito foi incisado para permitir o extravasamento do sangue e das soluções de soro fisiológico (50ml), paraformaldeído a 2% tamponado com fosfato e pH 7,4 (20ml) e novamente de soro fisiológico (50ml), seqüencialmente perfundidas via cateter.

A palidez do animal na região da cabeça e pescoço e a ausência de sangue nas soluções extravasadas pelo átrio direito foram indicativos da substituição do sangue do sistema vascular pelo soro fisiológico, permitindo que a moldagem com resina acrílica de baixa viscosidade²² fosse realizada.

Para essa infusão, foram misturados 0,25g de catalizador e 10g de resina acrílica por um período de 40 segundos e essa mistura foi prontamente transferida para uma seringa. A resina era então injetada manualmente no interior dos vasos via cateter e o tempo decorrido desde o início da infusão até o refluxo pelo átrio direito foi em média 60 segundos. Tão logo o refluxo acontecia, a palidez da região da cabeça e pescoço do animal dava lugar à coloração avermelhada da resina.

Ao final, os animais eram mantidos em temperatura ambiente por 2 horas para que ocorresse a pré-polimerização do material em seguida as cabeças eram submersas em água corrente destilada em temperatura de 40 °C por uma hora para acelerar e finalizar o processo de polimerização do material.

Assim que a resina tomava presa era feita a dissecação da língua e dos linfonodos desses animais. Os linfonodos dissecados eram submersos em 60ml de água destilada em temperatura ambiente onde permaneciam por um período de 18 horas. Depois desse período aspirava-se a água e nova quantidade de água era colocada e novamente aspirada. No interior do pote dispensava-se 60ml de solução

²¹ Ethicon®, Johnson & Johnson

²² Mercocox®, Ldd Research Industries, Williston, USA

de NaOH²³ (hidróxido de sódio) a 5% em temperatura ambiente e então os potes eram acondicionados em estufa em temperatura de 45 °C por 18 horas.

Decorridas as 18 horas a solução era aspirada e dentro de cada pote se dispensava 60ml água destilada em temperatura ambiente com o intuito de lavar o espécime. Para cada espécime foram realizadas três lavagens consecutivas e posteriormente os potes eram preenchidos com 60ml de água destilada em temperatura ambiente e permaneciam por 4 horas. Nesse período em que os espécimes eram mantidos fora da estufa os mesmos eram observados em lupa estereoscópica²⁴ para avaliar o estágio de corrosão em que se encontravam. Decorridas as 4 horas a água destilada era substituída por 60ml da solução de NaOH a 5% e os potes eram recolocados em estufa em temperatura de 45 °C.

Em média, o tempo para corrosão dos linfonodos, foi de 3 dias e tão logo a corrosão fosse suficiente os espécimes eram submersos em água destilada por 6 horas. Logo em seguida essa água era substituída por 60ml de ácido fórmico a 5% em temperatura ambiente. Decorrido o tempo de uma hora cada espécime era colocado sobre um papel filtro e acondicionado em estufa a 37 °C onde permaneceram até o momento da avaliação em microscopia eletrônica de varredura.

²³ Labsynth, São Paulo, SP, Brasil

²⁴ DF Vasconcelos