

JOSY ALVARENGA CAL ROSA

**Avaliação morfofuncional do desenvolvimento da articulação do
joelho em fetos humanos**

São Paulo

2015

JOSY ALVARENGA CAL ROSA

**Avaliação morfofuncional do desenvolvimento da articulação do
joelho em fetos humanos**

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

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti

São Paulo

2015

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.3092
FMVZ

Cal Rosa, Josy Alvarenga
Avaliação morfofuncional do desenvolvimento da articulação do joelho em fetos humanos / Josy Alvarenga Cal Rosa. -- 2015.
129 f. :il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2015.

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

Orientador: Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti.

1. Articulação do joelho. 2. Feto. 3. Cartilagem. 4. Colágeno. 5. Morfometria. I. Título.



São Paulo, 02 de junho de 2014

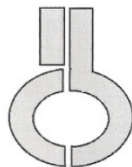
CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "AVALIAÇÃO MORFOFUNCIONAL DO DESENVOLVIMENTO DA ARTICULAÇÃO DO JOELHO EM FETOS HUMANOS", protocolado sob o CEUA nº 2985311013, sob a responsabilidade de Josy Alvarenga Cal Rosa, foi aprovado na reunião de 19/02/2014, e está de acordo com os princípios éticos da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "", protocol number CEUA 2985311013, under the responsibility Josy Alvarenga Cal Rosa, was approved in the meeting of day 02/19/2014, and agree with Ethical Principles adopted by Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 20 de junho de 2013.

PARECER 1121/CEP

A Comissão de *Ética em Pesquisas em Seres Humanos* do ICB, na data de 12.06.2013, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Avaliação Morfofuncional do desenvolvimento da articulação do joelho em fetos humanos*" do pesquisador *EDSON APARECIDO LIBERTI* e aluna *JOSY ALVARENGA CAL ROSA*.

Cabe aos Pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX. 2 letra c., conforme modelo constante no *site.icb.usp.br*.

Ao pesquisador cabe também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **12.06.2014**.

Atenciosamente,

Profa. Dra. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CAL ROSA, Josy Alvarenga

Título: Avaliação morfofuncional do desenvolvimento da articulação do joelho em fetos humanos

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIAS

Á Deus

Dedico este trabalho ao meu Deus, que caminhou comigo a cada dia, me fortalecendo, me orientando e, em muitos momentos me levando em Seus braços. Agradeço a Deus por ser meu refugio, meu Consolador e Protetor. A razão de minha vida.

Em muitos momentos, quando precisei de Seu cuidado, pude me fortalecer em Sua palavra consoladora que me dizia:

“Não temas, porque Eu sou contigo, não te assombres, porque Eu sou o teu Deus; Eu te fortaleço, e te ajudo, e te sustento com a minha destra fiel”.

Isaías 41:10

Este trabalho, eu te dedico, pois Tu és Aquele que faz todas as coisas possíveis, que conhece todos os caminhos e que diriges os meus passos.

Grata sou por Seu cuidado e direcionamento, e em Ti deposito minhas expectativas e o meu futuro. Obrigada Senhor, por seu cuidado de Pai.

DEDICATÓRIAS

*À minha querida mãe,
Sônia Mara Maia Alvarenga*

Dedico a você, mãe, este trabalho e compartilho contigo esta alegria, pois sei que você nunca deixou de acreditar em mim e de orar ao nosso Deus para que a conclusão desta etapa em minha vida fosse possível!

Você sempre esteve ao meu lado, nos momentos difíceis e nos de vitórias, incondicionalmente me amando e me ajudando no que fosse possível. Agradeço cada detalhe de tudo que já fez por mim, para tão somente me ver bem!

Admiro sua força, sua superação e saiba que o motivo de maior orgulho é ter você como minha mãe e amiga! Você é minha inspiração para continuar batalhando e buscando ao Senhor em cada situação da vida. OBRIGADA! TE AMO!

*Ao meu pai,
José Cal-Vidal (em memória)*

Vejo-me concluindo esta etapa em minha jornada acadêmica, mas não o tenho mais aqui para compartilhar desta vitória. Deus, em sua insondável sabedoria, permitiu que nos separássemos, mas quero lhe dedicar em homenagem, este trabalho.

Guardo na memória, pai, seu amor e dedicação à pesquisa, desde que eu era um bebê, sempre ávido pelo saber e por revelar ao mundo suas descobertas!

Sei que é motivo de muito orgulho este momento e agradeço pelo incentivo e pelos ensinamentos profundos transmitidos.

Guardarei com saudades em meu coração todas as melhores lembranças construídas ao longo de minha vida! OBRIGADA!

DEDICATÓRIAS

*Ao meu amado esposo,
Luiz Henrique Leite Rosa*

Meu amor, com muita emoção dedico este trabalho a você, que torceu por mim diariamente, nunca deixando de me incentivar!

É com muito orgulho que o dedico e, agradeço a Deus pelo dia que Ele nos apresentou! Nosso encantamento se transformou em um verdadeiro amor, que cultivamos a cada dia. Você é um verdadeiro companheiro e um grande motivo para minha alegria!

Sou grata a você por cada gesto, cada palavra, cada “empurrão”, sempre buscando me animar para a próxima etapa! Com seu apoio e compreensão, pude vencer os obstáculos, obter sucesso nos desafios empreendidos e colher os frutos!

Admiro muito sua dedicação e sua serenidade, obrigada por ser este companheiro para todas as horas e meu porto seguro! Você é o melhor presente que Deus já me deu!

TE AMO DEMAIS!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS...

À minha **querida irmã Christy Alvarenga Cal**

agradeço a Deus por sua vida e por Ele ter me dado a oportunidade de ter uma irmã tão especial e única, como você! Obrigada pelas palavras de carinho, pela sincera torcida e por toda compreensão! Você é muito querida e especial em minha vida! Admiro sua leveza e espero que todos os seus sonhos se tornem realidade, pois você merece alçar voos cada vez maiores! Eu te amo querida e sou muito grata por seu incentivo!

A todos meus familiares,

agradeço especialmente à Vó Lia, aos meus sogros Emiliana Leite Rosa e Aureliano Rosa, minha cunhada querida Vanessa Rosa, Rodrigo Morales, Ana Elisa (minha sobrinha tão querida, motivo de tanto orgulho e alegria!), ao meu cunhado Alexandre Rosa, Danielle Pedrassoli e também às minhas primas Micheline, Lislely, e tias Cristina e Cida: obrigada pela grande torcida e por tudo que sempre fizeram por mim, obrigada por entenderem muitas vezes minha ausência, pelo incentivo e por sempre me fazerem lembrar que sou muito amada! Amo muito todos vocês!

Ao amigo e orientador **Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti**

agradeço imensamente a oportunidade e a honra de trabalhar sob sua orientação. Admiro muito sua integridade e vejo em ti um ser humano incrível, mais que um brilhante professor. Obrigada pelo relevante tema de estudo proposto e, mais que isto, por toda atenção dispensada não só com a pesquisa, mas com ensinamentos pessoais preciosos que vou levar por toda a vida.

A querida e inesquecível **Profa. Dra. Silvia de Campos Boldrini** (em memória)

por ter aberto as portas do LAFACC para mim! Nunca nos esqueceremos de sua gentileza, seus conselhos sábios e seus nobres valores, que fazem de você alguém especial e insubstituível! Fica a certeza de que será sempre lembrada em nossos corações!

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

por proporcionar a oportunidade de conduzir esta pesquisa e o desenvolvimento científico, profissional e pessoal.

A Profa. Dra. Maria Angélica Miglino

agradeço pela oportunidade preciosa de fazer parte deste grupo especial de pesquisa do Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da FMVZ- USP.

Ao amigo e mestre **Prof. Dr. Gilberto Valente Machado**

Obrigada por ter primeiramente me acolhido no estágio no Laboratório de Anatomia da UFPR- campus Palotina (PR) e por ter despertado em mim o sonho de trilhar uma vida inteira na área da Anatomia! Sonho este que venho buscando e vivendo há muitos anos, graças também ao seu incentivo e primeira menção à buscar o curso de pós-graduação na Anatomia. Muito obrigada, por ter acreditado em mim!

Ao **Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez-Blazquez**

agradeço por sua amizade e por ter dividido seus conhecimentos comigo, por ter primeiramente me orientado no início de minha jornada na pós-graduação, na ocasião do Mestrado.

Ao mestre e amigo **Prof. Dr. Henrique Ribeiro Alves de Resende**

agradeço muito por seu apoio constante, por ter sempre acreditado em mim e pelo incentivo ao longo de minha jornada acadêmica! Sua dignidade e seu amor pela anatomia sempre foram admiráveis e o seu exemplo como professor dedicado me impulsionou desde cedo a seguir com meu sonho de me tornar também uma anatomista! Agradeço também a Flavia Maria pela amizade e pela torcida de vocês!!

Aos professores doutores e amigos **Regina Bolina-Matos, Flávia de Oliveira e Luiz Altruda Filho**

especialmente por terem feito contribuições muito importantes na ocasião de minha Qualificação, as quais foram de grande relevância para esta presente pesquisa. Obrigada pelo apoio e pelo precioso incentivo!

A **todos os meus alunos**, nos variados cursos em que leciono,

mesmo sem saberem, a cada novo dia de nosso convívio, renovam minha certeza de que trabalhar com o que se ama é tão precioso e compensador! Aprendi muito e sigo aprendendo com vocês, e espero poder contribuir cada dia mais no aprendizado de cada um. Lecionar a matéria fascinante da Anatomia é, sem dúvida, um privilégio para mim! Obrigada!

A minha querida amiga **Livia Maria Chamma Davide**

agradeço pela constante torcida, e por nossa forte amizade desde a infância! Saber que sempre posso contar com você faz muita diferença em minha vida e sou grata pelo familiar e incondicional carinho!

A amiga e psicóloga **Maria Cristina Francisco**

agradeço pela amizade, pelo carinho e atenção, pelas sábias ponderações e palavras, que foram tão importantes em vários momentos nesta jornada.

Aos **amigos de Lavras**

mesmo que um pouco distantes no momento, vocês sempre farão parte de minha vida, não somente pelas lembranças agradáveis do período em que estávamos na graduação, mas por toda amizade que construímos. Erika, Giovana, Leandro, Karina, Belami, Flavio, Rafael, Everton, Natália, Janine, Walquiria: meu muito obrigada por toda torcida, vocês serão sempre por mim lembrados.

Aos **amigos** especiais

Fabiano, Débora, Bill, Fernanda, Aline Campos e Luis Campos, por todos os momentos agradáveis que passamos juntos!

E à Família Cavalcanti, missionários em Burkina Faso (África), pelas orações e pelo exemplo de amor ao próximo! Muito obrigada!

Aos **amigos do LAFACC**

àqueles que, de alguma forma, me ajudaram com palavras sábias, me auxiliaram com relação a minhas dúvidas e, mais importante, contribuíram para que houvessem momentos descontraídos e agradáveis no Laboratório, agradeço! Aos amigos que já concluíram suas pesquisas, mas serão sempre por mim lembrados: Regina Bolina-Matos, Ricardo Eustáquio, Thelma Parada, Bruna Caixeta, Ricardo Bandeira, Valquíria Mariotti, Karina do Valle, Eduardo Beber, Josemberg Baptista, Ricardo Fontes, Catarina Tivane, Ivone Benigno, Thiago Habacuque, Lucilene Ferreira, Diana Vono, Adriano Ciena.

E também aos amigos que continuam no Laboratório, aos quais sou muito grata, igualmente, por sua amizade, seu apoio e seus conhecimentos divididos: Cristina Bolina, Paulo Henrique, Flávio Tampelini, Any Kelly, Lílana Ribeiro, Lídia Rocha, Ligia Pelosi, Aline Gonçalves, Aline Rosa, Joice Bertaglia, Jodonai Barbosa, Marcelo Cavalli.

A **Rosana Duarte Prisco**, agradeço pelo conhecimento transmitido e toda paciência e atenção dispensada para a análise estatística dos dados.

A professora Dra. **Rose Eli Rici**, agradeço pelo auxílio com a obtenção das imagens da microscopia eletrônica de varredura.

Aos técnicos e funcionários do ICB-III, em especial á **Marta Righetti, Sônia Yokomizo e Sebastião Boleta**, pela importante ajuda para a condução dos processamentos histológicos no Laboratório de Histologia.

Aos **funcionários do Departamento de Anatomia** da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, em especial ao Maicon Barbosa e Jaqueline Martins Santana, pela atenção e boa vontade em resolver minhas dúvidas e dificuldades.

As bibliotecárias da FMVZ, **Elza Faquim e Neusa Habe**, pela importante e competente ajuda na normalização bibliográfica desta tese.

A todos os **funcionários** responsáveis pela limpeza e segurança das dependências do ICB-III (USP).

Em memória a todos os **fetos utilizados nesta presente pesquisa**, agradeço! Estes tiveram um breve momento de vida, mas nobremente serviram à importante missão de contribuir para a pesquisa sobre a fascinante maravilha que é o corpo humano!

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese, e que, porventura, não estejam citados aqui.

*“Graças te dou, visto que por modo assombrosamente maravilhoso me
formaste; maravilhosas são as tuas obras...
os teus olhos viram o meu corpo ainda informe, e no teu livro todas estas
coisas foram escritas, as quais iam sendo dia a dia formadas...”*

Salmos 139:14,16

RESUMO

CAL ROSA, J. A. **Avaliação morfofuncional do desenvolvimento da articulação do joelho em fetos humanos.** [Morphofunctional evaluation of the knee joint development in human fetuses]. 2015. 129 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A articulação do joelho tem sido vastamente estudada nas últimas décadas. Este intenso interesse pode ser visto sob o foco da complexidade desta articulação e de sua importância clínica. No entanto, nota-se escassa informação a respeito de aspectos morfológicos e ultraestruturais sobre o desenvolvimento desta articulação, em fetos humanos de diferentes faixas etárias, o que poderia servir de base teórica para estratégias de reparo da cartilagem e engenharia de tecidos, bem como contribuir para uma melhor compreensão de doenças e malformações ao longo do desenvolvimento dos componentes articulares. Desse modo, considerando-se a importância do conhecimento sobre aspectos morfofuncionais do desenvolvimento normal dos tecidos cartilagíneos na articulação do joelho humano, realizou-se a presente pesquisa com fetos humanos abrangendo a faixa etária da 16^a a 31^a semanas de vida intrauterina. Foram utilizados 20 fetos, os quais foram divididos em 4 grupos (n=5) da seguinte forma: grupo 1 (G1): 16-19 semanas de vida intrauterina (VIU); grupo 2 (G2): 20-23 semanas VIU; grupo 3 (G3): 24-27 semanas VIU e grupo 4 (G4): 28-31 semanas VIU, em que foram realizadas análises morfométricas da cartilagem das epífises do fêmur e tíbia na articulação do joelho, para os parâmetros: área dos condrócitos, densidade de condrócitos e matriz extracelular, análise estereológica para o volume dos condrócitos, e análise qualitativa da distribuição, organização e tipificação de fibras colágenas com uso de Picro-sirius sob análise com luz polarizada. Também se analisou a ultraestrutura através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Frente à metodologia proposta e os resultados obtidos a respeito da avaliação morfofuncional, concluiu-se que a área e o volume dos condrócitos, bem como a densidade da matriz extracelular, na região média das epífises cartilagíneas, tanto do fêmur quanto da tíbia, aumentaram com o avançar da faixa etária, enquanto a densidade dos condrócitos diminuiu. Na região média das epífises, a cartilagem imatura dos fetos mais jovens, inicialmente com características

de uma zona de proliferação, passa a apresentar, em fetos com idade mais avançada, características de uma zona de maturação, com condrócitos maiores e mais distantes uns dos outros. Na camada superficial da epífise a organização e orientação das fibras de colágeno modificam-se nos diferentes grupos, passando de uma orientação irregular no grupo dos fetos mais jovens, para uma organização pantográfica no grupo de fetos mais desenvolvidos. Finalmente, verifica-se a clara relação entre o amadurecimento da cartilagem e as alterações na organização e orientação das fibras colágenas, as quais contribuem para as propriedades requeridas na cartilagem em cada fase de seu desenvolvimento, tais como resistência à tensão, resistência à compressão e habilidade para distribuir cargas.

Palavras-chave: Articulação do joelho. Feto. Cartilagem. Colágeno. Morfometria.

ABSTRACT

CAL ROSA, J. A. **Morphofunctional evaluation of the knee joint development in human fetuses.** [Avaliação morfofuncional do desenvolvimento da articulação do joelho em fetos humanos]. 2015. 129 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The knee joint has been widely studied in recent decades. This intense interest can be seen from the perspective of the joint complexity and its clinical importance. However, there is little information about morphological and ultrastructural aspects of the development of this joint, particularly in human fetuses within different age, which could serve as a theoretical basis for cartilage repair strategies and tissue engineering, as well as contributing for a better understanding of diseases and malformation during the development of joint components. Thus, considering the importance of morphological and functional aspects of normal cartilaginous tissue development in the human knee joint, this research was performed with human fetuses covering the age range 16 to 31 weeks of intrauterine life. Twenty (20) fetuses were divided into 4 groups (n = 5) as follows: Group 1 (G1): 16-19 weeks, Group 2 (G2): 20-23 weeks, Group 3 (G3): 24-27 weeks and Group 4 (G4): 28-31 weeks. For the femoral and tibial epiphysis cartilage in the knee joint, it was performed morphometric analysis regarding area of chondrocytes, percent density of chondrocytes and extracellular matrix, stereological analysis of the chondrocytes volume and qualitative analysis of the distribution, organization and characterization of collagen fibers using picosirius staining under analysis with polarized light. It was also analyzed the ultrastructure by scanning electron microscopy. Facing the proposed methodology and the results regarding the morphological evaluation of the middle region of both femur and tibia epiphysis, it was concluded that the area and the volume of the chondrocytes, as well as the density of extracellular matrix increased with advancing age, while the percent density of chondrocytes decreased. In the middle region of the epiphysis, immature cartilage of younger fetuses, initially with characteristics of a proliferation zone starts to present, in older fetuses, characteristics of maturation zone, presenting larger chondrocytes and more distant from each other. In the epiphysis cartilage surface, the organization and orientation

of the collagen fibers changed in different groups, from an irregular orientation in the younger fetuses group, to a pantograph organization in the most developed fetuses group. Finally, it was observed the relationship between the cartilage development and the changes in the collagen fibers organization and orientation in order to obtain the cartilage properties required at each stage of the development, such as tensile strength, resistance to compression and ability to distribute loads.

Keywords : Knee joint. Fetus. Cartilage. Collagen. Morphometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Articulação do joelho direito em vista lateral e medial.....	29
Figura 2 - Meniscos na AJ, na face articular proximal da tibia direita, numa vista superior.....	35
Figura 3 - Locais de fixação dos meniscos na face articular proximal da tibia direita, numa vista superior.....	36
Figura 4 - Articulação do joelho direito numa vista anterior.....	40
Figura 5 - Estrutura molecular da matriz da cartilagem hialina.....	45
Figura 6 - Esquema representando a composição molecular da cartilagem hialina.....	47
Figura 7 - Diagrama e fotomicrografia da cartilagem articular, mostrando a divisão em zonas, no indivíduo adulto.....	48
Figura 8 - Diagrama esquemático de um osso longo em desenvolvimento.....	52
Figura 9 - Representação dos cortes feitos nos joelhos direito e esquerdo.....	57
Figura 10 - Representação dos métodos de coloração histológica utilizados.....	58
Figura 11 - Representação de parte da articulação do joelho de feto do grupo 01.....	60
Figura 12 - Quantificação de células para medição de área de condrócitos.....	61
Figura 13 - Fotografia do monitor do computador, utilizando-se o <i>software</i> para obtenção das medidas das áreas.....	62
Figura 14 - Obtenção de campos para determinação da densidade de condrócitos e MEC.....	63
Figura 15 - Representação do campo contendo o sistema teste para determinação da densidade de condrócitos e MEC.....	64
Figura 16 - Os três sistemas testes utilizados no método do <i>Nucleator</i>	65
Figura 17 - Representação dos 3 sistemas testes sobrepostos à fotomicrografia analisada no método do nucleator.....	67
Figura 18 - Tabela utilizada no método do nucleator.....	68
Figura 19 - Exemplo de ordenação e atribuição de postos no teste de Kruskal-Wallis.....	70

Figura 20 - Representação gráfica das médias das áreas (μm^2) dos condrócitos no fêmur, nos grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5)	74
Figura 21 - Distribuição de frequência para a área dos condrócitos no fêmur, entre os grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5)	74
Figura 22 - Posições dos fetos dispostos de forma crescente segundo a área dos condrócitos no fêmur	76
Figura 23 - Representação gráfica das médias das áreas (μm^2) dos condrócitos na tíbia, nos grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5)	78
Figura 24 - Distribuição de frequência para área dos condrócitos na tíbia, entre os grupos G1, G2, G3 e G4.....	78
Figura 25 - Posições dos fetos dispostos de forma crescente segundo a área dos condrócitos na tíbia	79
Figura 26 - Densidade dos condrócitos e de matriz extracelular (MEC) do fêmur entre os grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5)	81
Figura 27 – Ilustração da densidade dos condrócitos e de matriz extracelular (MEC) do fêmur entre os grupos G1 e G4 através de fotomicrografias.....	82
Figura 28 - Densidade dos condrócitos e de matriz extracelular (MEC) na tíbia entre os grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5)	84
Figura 29 - Comparação percentual no volume dos condrócitos do fêmur entre os grupos G1, G2, G3 e G4.....	87
Figura 30 - Comparação percentual no volume dos condrócitos da tíbia entre os grupos G1, G2, G3 e G4.....	90
Figura 31 - Representação das camadas superficial e média da cartilagem da epífise do fêmur, nos diferentes grupos	93
Figura 32 - Representação do tipo e disposição das fibras colágenas na cápsula articular (camadas fibrosa e sinovial), nos grupos G1 e G4.....	94
Figura 33 - Representação do tipo de fibras colágenas no menisco nos diferentes grupos (G1 a G4).....	95
Figura 34 - Eletromicrografia de varredura de superfície articular, parte média da cartilagem e cápsula articular, nos grupos representativos (G1 e G4)	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplo de determinação da posição média para cada grupo, no teste de Kruskal-Wallis.....	70
Tabela 2 - Médias das áreas (μm^2) dos condrócitos no fêmur, nos grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5).....	73
Tabela 3 - Teste de Kruskal-Wallis - valores médios das posições encontradas para cada grupo segundo a área dos condrócitos no fêmur	76
Tabela 4 - Médias das áreas (μm^2) dos condrócitos na tíbia, nos grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5).....	77
Tabela 5 - Teste de Kruskal-Wallis - valores médios das posições encontradas para cada grupo segundo a área dos condrócitos na tíbia.....	80
Tabela 6 – Densidade dos condrócitos e de matriz extracelular no fêmur para os grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5)	81
Tabela 7 - Teste de Kruskal-Wallis - valores médios das posições encontradas para cada grupo segundo a densidade dos condrócitos no fêmur	83
Tabela 8 – Densidade dos condrócitos e de matriz extracelular na tíbia para os grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5)	84
Tabela 9 - Teste de Kruskal-Wallis - valores médios das posições encontradas para cada grupo segundo a densidade dos condrócitos na tíbia	85
Tabela 10 - Médias dos volumes dos condrócitos no fêmur, nos grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5).	86
Tabela 11 - Teste de Kruskal-Wallis - valores médios das posições encontradas para cada grupo segundo o volume dos condrócitos no fêmur	88
Tabela 12 - Médias dos volumes dos condrócitos na tíbia, nos grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5)	89
Tabela 13 - Teste de Kruskal-Wallis - valores médios das posições encontradas para cada grupo segundo o volume dos condrócitos na tíbia	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJ	articulação do joelho
COS	centro de ossificação secundário
DP	desvio padrão
G1	Grupo de fetos na faixa etária de 16 a 19 semanas
G2	Grupo de fetos na faixa etária de 20 a 23 semanas
G3	Grupo de fetos na faixa etária de 24 a 27 semanas
G4	Grupo de fetos na faixa etária de 28 a 31 semanas
GAG	glicosaminoglicanas
HE	Hematoxilina e Eosina
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
LAFACC	Laboratório de anatomia funcional aplicada à clínica e à cirurgia
MEC	matriz extracelular
MEV	microscopia eletrônica de varredura
p	probabilidade estatística
USP	Universidade de São Paulo
VIU	vida intrauterina
\bar{V}_N	volume médio

LISTA DE SÍMBOLOS

μm	micrômetro (unidade de comprimento)
μm^2	micrômetro quadrado (unidade de área)
μm^3	micrômetro cúbico (unidade de volume)
=	igual
<	menor que
>	maior que
Σ	somatório
/	dividido por
π	pi = 3,1416...
α	alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISAO DE LITERATURA	28
2.1	ASPECTOS DA ANATOMIA DA ARTICULAÇÃO DO JOELHO	28
2.1.1	Superfícies articulares	30
2.1.2	Cartilagem articular	31
2.1.3	Cápsula articular	32
2.1.4	Membrana sinovial	33
2.1.5	Meniscos	34
2.1.6	Ligamentos	37
2.2	ASPECTOS DA EMBRIOLOGIA DA AJ	40
2.3	ASPECTOS HISTOLÓGICOS DA CARTILAGEM E OSSIFICAÇÃO ENDOCONDRA.....	42
2.3.1	Cartilagem articular	46
2.3.2	Ossificação endocondral	50
3	OBJETIVOS	54
3.1	OBJETIVO GERAL.....	54
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
4	MATERIAL E MÉTODOS	56
4.1	SEPARAÇÃO DOS GRUPOS E PREPARAÇÃO DO MATERIAL PARA HISTOLOGIA.....	56
4.2	MORFOMETRIA.....	59
4.2.1	Área dos condrócitos	59
4.2.2	Densidade de condrócitos e de matriz extracelular (MEC)	62
4.3	ESTEREOLOGIA – MÉTODO DO NUCLEATOR.....	64
4.4	TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	69
4.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	71
5	RESULTADOS	73
5.1	RESULTADOS QUANTITATIVOS: ÁREA DOS CONDRÓCITOS	73
5.1.1	Dados da área dos condrócitos no fêmur	73
5.1.2	Teste de Kruskal-Wallis para área dos condrócitos no fêmur	75
5.1.3	Dados de área dos condrócitos na tíbia	77

5.1.4	Teste de Kruskal-Wallis para área dos condrócitos na tíbia	79
5.2	RESULTADOS QUANTITATIVOS: DENSIDADE DOS CONDRÓCITOS E DE MEC	80
5.2.1	Dados da densidade dos condrócitos e da MEC no FÊMUR	81
5.2.2	Teste de Kruskal-Wallis para densidade de condrócitos no fêmur	82
5.2.3	Dados da densidade dos condrócitos e da MEC na tíbia	84
5.2.4	Teste de Kruskal-Wallis para densidade de condrócitos na tíbia	85
5.3	RESULTADOS QUANTITATIVOS: VOLUME DOS CONDRÓCITOS (MÉTODO DO NUCLEATOR)	86
5.3.1	Dados de volume dos condrócitos no fêmur	86
5.3.2	Teste de Kruskal-Wallis para volume dos condrócitos no fêmur	88
5.3.3	Dados de volume dos condrócitos na tíbia.....	89
5.3.4	Teste de Kruskal-Wallis para volume dos condrócitos na tíbia	90
5.4	RESULTADOS QUALITATIVOS	92
5.4.1	Análise de fibras colágenas	92
5.4.2	Análise com uso de microscopia eletrônica de varredura (MEV)	96
6	DISCUSSÃO	99
6.1	CONSIDERAÇÕES SOBRE A MORFOMETRIA E ESTEREOLOGIA DOS CONDRÓCITOS E MEC DA CARTILAGEM PRESENTE NAS EPÍFISES DO FÊMUR E TÍBIA EM FETOS HUMANOS.....	99
6.2	CONSIDERAÇÕES SOBRE OS ASPECTOS QUALITATIVOS ENCONTRADOS NOS COMPONENTES DA ARTICULAÇÃO DO JOELHO	106
7	CONCLUSÕES	112
	REFERÊNCIAS.....	115
	ANEXOS	127

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Joelho é a denominação dada a um complexo articular formado pelas articulações tibiofemoral medial, tibiofemoral lateral e femoropatelar (CLEATHER; SOUTHGATE; BULL, 2014). Kapandji (1990) denomina as três articulações citadas como articulações funcionais que, juntas, formam o complexo do joelho.

O complexo do joelho localiza-se na transição entre a coxa e a perna e é considerada a mais complexa articulação do corpo humano (WILLIAMS et al., 1995; AUMÜLLER et al., 2009; COSTA et al., 2010; CLEATHER; SOUTHGATE; BULL, 2014).

Há várias décadas uma abundância de informação sobre o desenvolvimento de ossos e articulações têm sido publicadas (BARDEEN, 1907; WALMSLEY, 1940; WHILLIS, 1940; HAINES, 1947; GRAY; GARDNER, 1950; GARDNER; O'RAHILLY, 1968; ARCHER; DOWTHWAITE; FRANCIS-WEST, 2003; LIU et al., 2013).

Entretanto, a maior parte dos trabalhos pesquisados sobre o desenvolvimento da articulação do joelho, envolvem estudos no período embrionário e/ou até a 14^a semana de vida intra-uterina. Nota-se escassa informação a respeito de aspectos morfológicos e ultraestruturais desta articulação, em fetos humanos de diferentes faixas etárias.

Tem sido dada atenção ao desenvolvimento da articulação do joelho mais do que qualquer outra articulação. Este intenso interesse pode ser visto sob o foco da complexidade desta articulação e de sua importância clínica, como, por exemplo, a crescente busca por terapias que sejam efetivas no reparo da cartilagem (ARCHER; DOWTHWAITE; FRANCIS-WEST, 2003; ZUSCIK et al., 2008) e avanços na engenharia de tecidos (HILLEL et al., 2009).

A anatomia da articulação do joelho apresenta algumas características que explicam a frequência de lesões e alterações degenerativas do joelho: a) o joelho conecta as alavancas mais longas do esqueleto, b) apresenta pouco revestimento por partes moles e c) as faces articulares apresentam pouca congruência, isto é, seu encaixe não é perfeito (AUMÜLLER et al., 2009; NEUMANN; STALDER; SCHUSTER, 2014). Um dos motivos da ocorrência frequente de lesão no complexo do joelho é o fato de estar localizado entre dois braços longos de alavanca, o fêmur

e a tíbia, formando o elo entre os elementos da cadeia cinética do membro inferior e acaba sendo submetido a grandes forças (HOPPENFELD, 1980; SMITH; WEISS; LEHMKUHL, 1997; WHITING; ZERNICKE, 1998).

Segundo Fukazawa et al. (2009), o estudo descritivo e morfométrico acerca do desenvolvimento normal de componentes articulares torna-se necessário para melhor compreensão da morfologia anormal e de possíveis malformações ao longo do desenvolvimento destas estruturas. Além disto, planos adequados para o tratamento de defeitos congênitos requerem um preciso conhecimento das etapas do desenvolvimento normal (MCCARTHY, 1993; TECKLENBURG et al., 2006).

Além disto, destaca-se a importância da morfometria na caracterização da densidade e organização de condrócitos, durante o crescimento e maturação da cartilagem, uma vez que constitui um importante passo para a compreensão da dinâmica de crescimento em nível tecidual (JADIN et al., 2005).

Este estudo é pertinente devido ao interesse crescente e importância da compreensão na formação de componentes articulares e ao fato de que vários aspectos morfofuncionais a respeito do desenvolvimento normal da articulação do joelho ainda permanecem sem esclarecimentos. Além disso, o conhecimento sobre o desenvolvimento normal dos tecidos cartilagíneos na articulação do joelho humano durante a vida intrauterina pode servir de base teórica para estratégias de reparo da cartilagem e contribuir para uma melhor compreensão de doenças e malformações ao longo do desenvolvimento dos componentes articulares (CLUZEL et al., 2013).

O propósito deste estudo é avaliar, sob o aspecto morfofuncional, especialmente o desenvolvimento da cartilagem dos componentes da articulação do joelho (AJ) em fetos humanos, desde a 16^a até a 31^a semanas de vida intrauterina, a fim de verificar correlações entre as alterações sofridas pelo tecido cartilagíneo e o desenvolvimento dos fetos em diferentes faixas etárias.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISAO DE LITERATURA

Este capítulo apresenta literatura referente a elementos presentes na articulação do joelho, a qual forneceu aspectos de relevância sobre a embriologia, anatomia e histologia e deu suporte científico para a condução deste estudo.

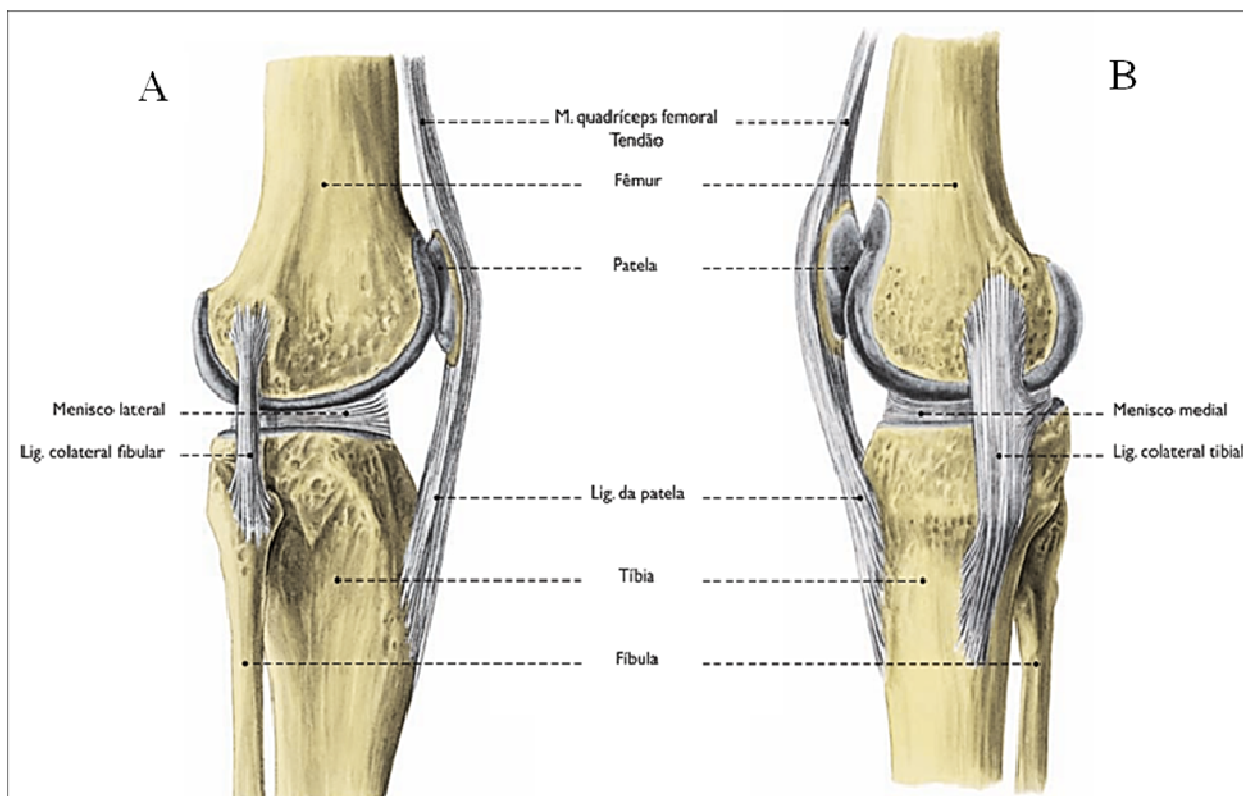
Ressalte-se que, sempre que necessário, buscou-se corrigir a nomenclatura de acordo com a Terminologia Anatômica (2001).

2.1 ASPECTOS DA ANATOMIA DA ARTICULAÇÃO DO JOELHO

A articulação do joelho (AJ) constitui um importante exemplo dentre as articulações sinoviais (também conhecidas como diartroses) e apresenta mobilidade (ARCHER; DOWTHWAITE; FRANCIS-WEST, 2003).

A complexa AJ é constituída por três ossos: o fêmur, a tíbia e a patela (CLEATHER; SOUTHGATE; BULL, 2014), além de componentes fibrosos: ligamentos, cápsula articular, membrana sinovial; e componentes cartilagíneos: meniscos, cartilagem articular (WILLIAMS et al., 1995; ARCHER; DOWTHWAITE; FRANCIS-WEST, 2003; GARDNER; GRAY; O'RAHILLY, 2008). A figura 1 ilustra a AJ, em vistas lateral e medial, apontando-se alguns de seus constituintes.

Figura 1 - Articulação do joelho direito em vista lateral e medial



Fonte: (KÖPF-MAIER, 2006)

Legenda: Articulação do joelho direito em vista lateral (A) e medial (B), mostrando alguns constituintes da AJ. A cápsula articular foi removida.

Segundo Williams et al. (1995), apesar de sua cavidade única no homem, é conveniente descrevê-la como duas articulações condilares entre o fêmur e a tibia e como uma articulação em sela entre a patela e o fêmur. As primeiras são parcialmente divididas pelos meniscos entre as faces articulares correspondentes. Estritamente, esta articulação é também classificada como complexa (KAPANDJI, 1990). Segundo Testut (1967), do ponto de vista mecânico, esta articulação é classificada como uma articulação troclear.

De acordo com Gardner, Gray e O'Rahilly (2008), a articulação do joelho é classificada como condilar, sendo complexos seus movimentos. As formas e curvaturas das superfícies articulares são tais que, os movimentos de dobradiça (flexão e extensão) são combinados com o deslizamento e rolamento e com a rotação em torno de um eixo vertical (DANGELO; FATTINI, 2007).

2.1.1 Superfícies articulares

As superfícies articulares presentes na AJ são: o fêmur, a tíbia e a patela (CLEATHER; SOUTHGATE; BULL, 2014).

O fêmur é um osso longo localizado no membro inferior. Contribui para duas articulações: a articulação do quadril na sua extremidade (epífise) proximal e o complexo do joelho na sua extremidade (epífise) distal. A tíbia também é um osso longo do membro inferior que, juntamente com a fíbula, forma o esqueleto da perna. A tíbia localiza-se medialmente, e a fíbula, lateralmente. A fíbula, apesar de não fazer parte do complexo do joelho (TESTUT, 1967; COSTA et al., 2010), é um osso importante por servir de ponto de fixação para várias estruturas relacionadas a esta articulação. A figura 4 ilustra alguns dos constituintes da AJ.

A patela é considerada o maior osso sesamóide do corpo humano e forma a articulação patelofemoral juntamente com a face patelar do fêmur (GRABINER, 1991; SMITH; WEISS; LEHMKUHL, 1997; TECKLENBURG et al., 2006). A face articular da patela é adaptada à face anterior articular do fêmur. Um sulco oblíquo, que desce um pouco lateralmente, divide a face patelar do fêmur em uma área lateral maior e uma área medial. A lateral é mais larga, passa mais íngreme sobre a protuberância anterior saliente do côndilo lateral (WILLIAMS et al., 1995). Há uma crista arredondada, quase vertical, que divide a face articular da patela em áreas lateral maior e medial. Esta crista se encaixa no sulco correspondente do fêmur, mas as duas áreas não são completamente congruentes com aquelas do fêmur (NEUMANN; STALDER; SCHUSTER, 2014).

A patela serve como um braço de alavanca biomecânico e, por conseguinte, melhora a capacidade de extensão efetiva do músculo quadríceps femoral por aumentar a força do tendão patelar (TECKLENBURG et al., 2006; CLEATHER; SOUTHGATE; BULL, 2014). Também centraliza as forças divergentes do músculo quadríceps femoral e transmite a tensão em torno do fêmur para o tendão patelar (FULKERSON; HUNGERFORD, 1990; AGLIETTI; BUZZI; INSALL, 1993). A patela também protege a articulação tibiofemoral através da formação de um escudo ósseo (TECKLENBURG et al., 2006). Ainda, assume-se que esta também atue como uma polia lisa, de tal forma que a força no tendão do quadríceps seja acompanhada pelo

tendão patelar durante todo o movimento do joelho (CLEATHER; SOUTHGATE; BULL, 2014).

As superfícies articulares dos ossos envolvidos na articulação do joelho são bastante incongruentes. Na epífise distal do fêmur, localizam-se os côndilos femorais, quase completamente convexos, revestidos por cartilagem articular. As faces articulares (côndilos) da epífise proximal da tíbia também são áreas revestidas por cartilagem, separadas pela área intercondilar, sendo levemente escavadas no centro e achatadas perifericamente onde repousa um menisco. A face articular lateral da tíbia é quase circular e menor e a face medial é oval, com um eixo ântero-posterior mais longo (WILLIAMS et al., 1995; STANDRING, 2008).

Os côndilos do fêmur apresentam uma curvatura em espiral, com raio de curvatura maior na face anterior. Isto significa que, com o joelho flexionado, a área de contato entre os côndilos do fêmur e da tíbia é menor do que quando o joelho é estendido (AUMÜLLER et al., 2009). A fossa intercondilar localiza-se, posteriormente, entre os côndilos, enquanto que, na face anterior, os côndilos femorais são conectados pelo sulco de deslizamento da patela, denominado face patelar e revestida por cartilagem (CLEATHER; SOUTHGATE; BULL, 2014). Na face lateral, aproximadamente no centro dos côndilos, localizam-se os epicôndilos medial e lateral, que formam protuberâncias e servem como pontos de inserção para músculos e ligamentos (LIU et al., 2013).

2.1.2 Cartilagem articular

A cartilagem articular é um tipo de tecido conjuntivo, constituído de cartilagem hialina, que reveste as superfícies ósseas que compõem as articulações sinoviais e atua como um material resiliente, para diminuir o atrito, suportar cargas, e assim contribuir para o movimento articular (ZUSCIK et al., 2008; ALEXOPOULOS et al., 2009). Segundo Aumüller et al. (2009), a incongruência entre os ossos é parcialmente compensada pela espessura das cartilagens articulares, permitindo um movimento mais adequado e com menor atrito entre os mesmos. Além disto, a cartilagem articular também tem como função absorver choques intra-articulares

(COSTA et al., 2010). A presença da cartilagem evita, ou diminui o desgaste das superfícies ósseas que formam a articulação. Além disto, a cartilagem articular fornece uma superfície de rolamento de baixo atrito para a transmissão e distribuição de cargas mecânicas na superfície articular (KIANI et al., 2002; MAUCK et al., 2002; WILLIAMSON et al., 2003; KELLY et al., 2007; NADEEN et al., 2013).

O desenvolvimento da cartilagem articular se processa através de crescimento aposicional, impulsionado por uma população de células progenitoras que reside na superfície articular (ARCHER; DOWTHWAITE; FRANCIS-WEST, 2003).

A cartilagem articular possui uma composição primária única de colágeno tipo II e agrecanas, os quais fornecem resistência à tensão e compressão, respectivamente (KIANI et al., 2002; MAUCK et al., 2002; KELLY et al., 2007). Com a idade, esta composição muda, alterando as propriedades mecânicas da cartilagem (ARMSTRONG; MOW, 1982; WILLIAMSON et al., 2003; BOBACZ et al., 2004).

2.1.3 Cápsula articular

As articulações sinoviais caracterizam-se pela presença de uma cavidade articular, delimitada pela cápsula articular. A cápsula articular é um tecido conjuntivo que se fixa aos ossos envolvidos na articulação, mantendo-os conectados. No caso da articulação do joelho, ela é reforçada por retináculos e ligamentos (STANDRING, 2008; COSTA et al., 2010).

A cápsula articular, ou cápsula fibrosa, como descrita em Williams et al. (1995), é complexa, parcialmente deficiente e parcialmente aumentada por expansões dos tendões adjacentes. Suas fibras verticais posteriores estão inseridas, proximalmente, nas margens posteriores dos côndilos femorais e na fossa intercondilar e, distalmente, nas margens posteriores dos côndilos tibiais e na área intercondilar; proximalmente, de cada lado, ela se funde com as inserções do músculo gastrocnêmio e é reforçada, no centro, pelo ligamento poplíteo oblíquo. As fibras capsulares mediais estão inseridas nos côndilos femorais e tibiais logo posteriormente as suas margens articulares, onde a cápsula se funde com o

ligamento colateral tibial. Entre o epicôndilo medial e a borda convexa do menisco lateral, encontra-se um espessamento capsular, um componente profundo do ligamento colateral tibial (LAST, 1948). As fibras capsulares laterais, inseridas no fêmur, descem sobre o tendão do poplíteo até o côndilo tibial e a cabeça da fíbula (KOZHANOVA et al., 2013).

A face anterior da cápsula articular é completada anteriormente, pela patela, superiormente, pelo tendão do músculo quadríceps femoral e inferiormente, pelo ligamento da patela (LEVANGIE; NORRIN, 2001). As faces anteromedial e anterolateral da cápsula são conhecidas como retináculo extensor ou retináculo medial e lateral da patela (WILLIAMS et al., 1995).

As principais funções da cápsula são manter a estabilidade (integridade) articular e limitar a amplitude do movimento articular (COSTA et al., 2010).

2.1.4 Membrana sinovial

A membrana sinovial é uma membrana que reveste internamente a cápsula articular. Está aderida à parede interna da membrana fibrosa da cápsula articular, exceto posteriormente, onde a membrana sinovial invagina anteriormente, seguindo o contorno da fossa intercondilar do fêmur (LEVANGIE; NORRIN, 2001).

A membrana sinovial do joelho é a mais extensa e complexa do corpo. Na borda proximal da patela, ela forma uma grande bolsa suprapatelar entre o quadríceps femoral e o corpo inferior do fêmur. Ao longo da patela, a membrana estende-se abaixo das aponeuroses dos músculos vastos, mais extensamente sob o medial. Distal à patela, a membrana sinovial é separada do ligamento da patela pelo corpo adiposo infrapatelar, e a parte que cobre o coxim projeta-se no interior da articulação como duas pregas alares. Nos lados da articulação, a membrana sinovial desce do fêmur, revestindo a cápsula até os meniscos, cujas faces não possuem revestimento sinovial (WILLIAMS et al., 1995; STANDRING, 2008). Sua principal função é produzir e liberar o líquido sinovial para a cavidade articular, o qual irá lubrificar a articulação e permitir que os movimentos sejam realizados com menor

atrito entre as cartilagens articulares (HUNZIKER; ROSENBERG, 1996; KOZHANOVA et al., 2013).

A membrana sinovial constitui a fonte de células mesenquimais que levam à cicatrização de defeitos de espessura parcial na cartilagem (HUNZIKER; ROSENBERG, 1996).

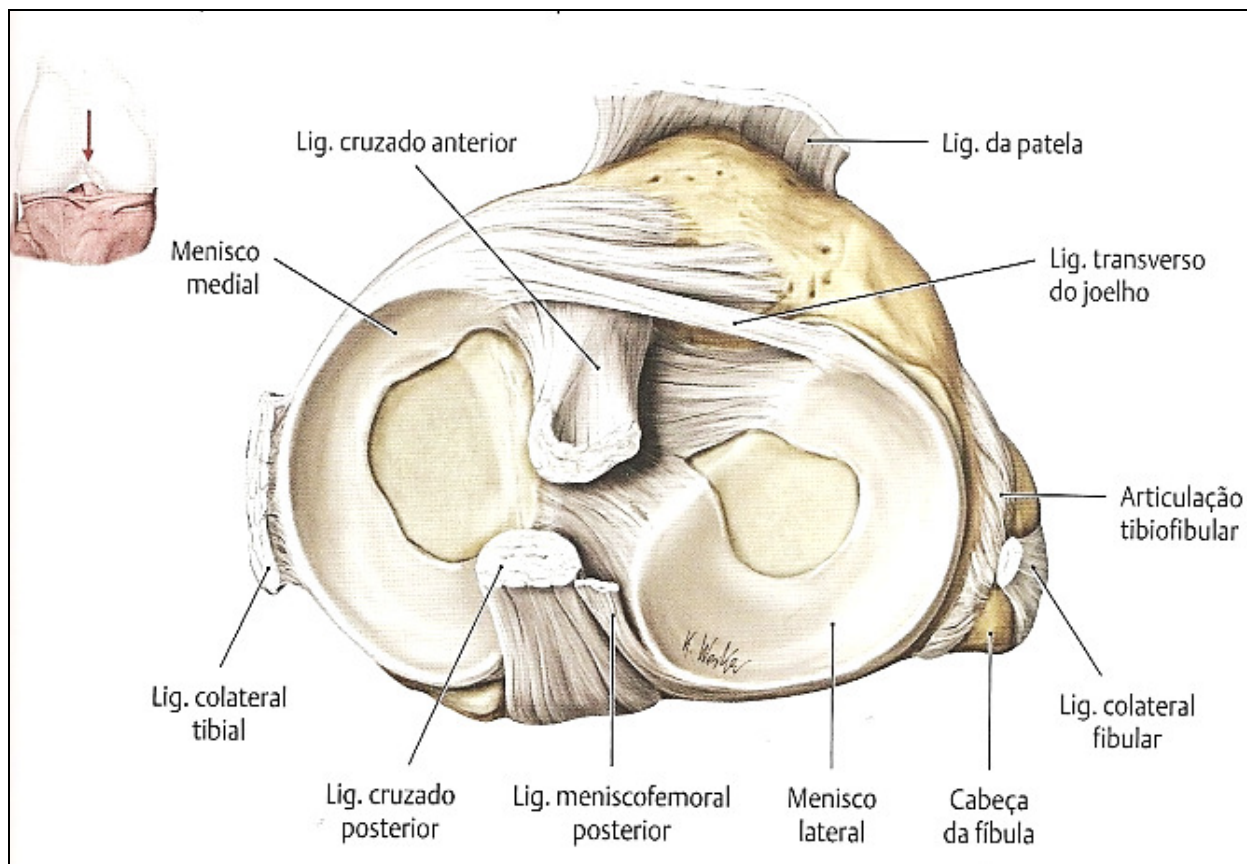
2.1.5 Meniscos

Os meniscos são compostos por fibrocartilagem e contribuem para a estabilidade estática da articulação do joelho na posição ortostática assim como na estabilidade dinâmica durante a extensão e flexão da articulação do joelho (WALKER; ERKMAN, 1975; LEVY et al., 1989).

Sobre o côndilo medial da tíbia localiza-se o menisco medial, e sobre o côndilo lateral da tíbia localiza-se o menisco lateral. O menisco lateral é menor que o menisco medial e mais fechado, quase em forma de “O”, enquanto o menisco medial é maior e mais aberto, caracterizando melhor o formato de “C” ou de meia lua, atribuído a essas estruturas (COSTA et al., 2010; MURLIMANJU et al., 2010).

A figura 2 mostra os meniscos da AJ, numa vista superior.

Figura 2 - Meniscos na AJ, na face articular proximal da tíbia direita, numa vista superior

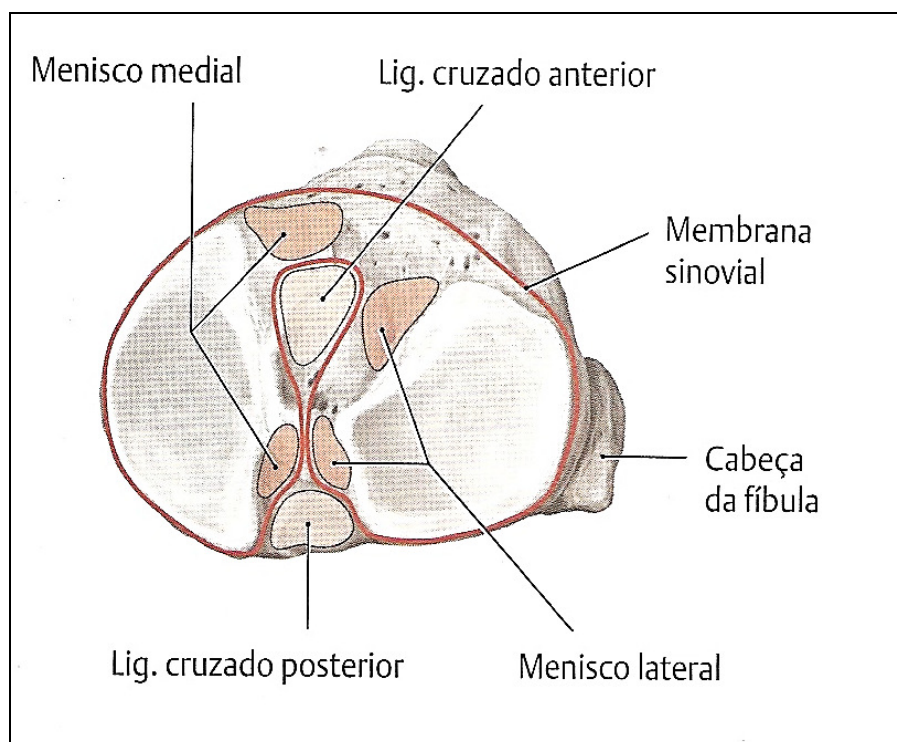


Fonte: (GILROY, 2014)

Legenda: Visualização dos meniscos, numa vista superior, na face articular proximal da tíbia direita. Podem também ser visualizados alguns ligamentos presentes na AJ.

O menisco lateral tem seu corno anterior inserido anteriormente à eminência intercondilar, posterolateral à fixação do ligamento cruzado anterior, e seu corno posterior se fixa posteriormente à eminência intercondilar, anteriormente ao corno posterior do menisco medial. O menisco medial tem seu corno anterior inserido na parte anterior da área intercondilar anterior do côndilo tibial, anteriormente á fixação do ligamento cruzado anterior, e seu corno posterior na área intercondilar posterior do côndilo tibial entre as fixações do ligamento cruzado posterior e do corno posterior do menisco lateral (COSTA et al., 2010). A figura 3 ilustra os locais de fixação dos meniscos na face articular proximal da tíbia.

Figura 3 - Locais de fixação dos meniscos na face articular proximal da tíbia direita, numa vista superior



Fonte: (GILROY, 2014)

Legenda: Visualização dos locais de fixação dos meniscos e dos ligamentos cruzados, numa vista superior, na face articular proximal da tíbia direita. Podem também ser visualizados alguns ligamentos presentes na AJ. A linha vermelha indica a fixação da membrana sinovial na tíbia.

Além de suas inserções ósseas, várias outras fixações reforçam a estrutura dos meniscos. Os cornos anteriores dos dois meniscos são unidos pelo ligamento transverso do joelho e são conectados aos retináculos da patela por meio de faixas fibrosas. As margens meniscais são reforçadas pela inserção na face interna da cápsula articular. O menisco medial se fixa ao ligamento colateral tibial, seu corno posterior recebe fibras do tendão do músculo semimembranáceo, e no seu corno anterior se fixam fibras do ligamento cruzado anterior (MURLIMANJU et al., 2010). O menisco lateral recebe, em seu corno posterior, fibras do músculo poplíteo e fibras posteriores do ligamento cruzado posterior que formam o ligamento meniscofemoral (KAPANDJI, 1990; SMITH; WEISS; LEHMKUHL, 1997; WATKINS, 2001).

O menisco melhora a congruência femorotibial. Conforme descrito em Williams et al. (1995), o côndilo lateral do fêmur possui em sua porção anterior um leve sulco, que repousa sobre a borda periférica do menisco lateral na extensão

plena. Um sulco semelhante aparece no côndilo medial, porém não alcança sua borda lateral, onde uma estreita faixa faz contato com a face articular medial da patela na flexão plena. Estes sulcos demarcam as faces condilar e patelar do fêmur, com a primeira articulando-se somente com a tíbia e com os meniscos. Os contornos distais das faces do fêmur adaptam-se às faces articulares meniscotibiais (MURLIMANJU et al., 2010).

2.1.6 Ligamentos

De acordo com Williams et al. (1995), os ligamentos da AJ são: sua cápsula fibrosa, o ligamento da patela, os ligamentos colaterais tibial e fibular, poplíteos oblíquo e arqueado, cruzados anterior e posterior e ligamento transverso do joelho. A figura 4 ilustra alguns dos ligamentos da AJ.

Em relação às funções dos ligamentos, embora sejam de alguma forma complexas, seu papel primário é o de restringir movimentos anormais (ESPREGUEIRA-MENDES; SILVA, 2006; CLEATHER; SOUTHGATE; BULL, 2014).

Em relação aos ligamentos relacionados a esta articulação, Williams et al. (1995), descrevem o ligamento da patela como sendo o feixe central do tendão do músculo quadríceps femoral, continuando distalmente da patela até a tuberosidade da tíbia. Suas fibras superficiais são contínuas sobre a patela com o tendão do quadríceps femoral, cujas partes medial e lateral descem em direção à tuberosidade da tíbia, fundindo-se com a cápsula fibrosa, como os retináculos medial e lateral da patela. Este ligamento é separado da membrana sinovial por um grande corpo adiposo infrapatelar.

O ligamento poplíteo oblíquo estende-se a partir do tendão do músculo semimembranáceo, funde-se parcialmente com a cápsula e sobe lateralmente até o côndilo lateral do fêmur. Este ligamento limita a rotação lateral e evita, juntamente com os ligamentos cruzados, a hiperextensão do joelho (AUMÜLLER et al., 2009). O ligamento poplíteo arqueado é uma massa de fibras capsulares, em forma de Y, tem um tronco inserido na cabeça da fíbula. Seu ramo anterior, algumas vezes ausente, estende-se até o epicôndilo lateral do fêmur, está unido à cabeça lateral do músculo

gastrocnêmio e é também denominado de *ligamento lateral curto do joelho* (WILLIAMS et al., 1995).

Os dois ligamentos colaterais, que estabilizam lateralmente o joelho são: o ligamento colateral tibial e o colateral fibular. Em relação ao primeiro, consiste em duas porções: a porção anterior, que envia longas fibras desde o epicôndilo medial do fêmur, obliquamente, para frente, até a face medial da tíbia, inferiormente, à tuberosidade da tíbia; a porção posterior, mais profunda, projeta-se desde o epicôndilo, obliquamente, para trás, até o côndilo medial da tíbia. O ligamento colateral tibial evita a abertura medial da articulação do joelho; sua porção anterior limita a rotação lateral e a porção posterior limita a rotação medial (AUMÜLLER et al., 2009).

O ligamento colateral fibular é extracapsular e estende-se desde o epicôndilo lateral do fêmur até a cabeça da fíbula. Segundo Aumüller et al. (2009), evita a deformidade em varo (adução). Este ligamento constitui o maior limitador para a rotação lateral do joelho flexionado e também controla a rotação axial da tíbia, em conjunto com estruturas posterolaterais próximas (ESPREGUEIRA-MENDES; SILVA, 2006). Como o ligamento tibial, é tensionado com o joelho estendido e relaxado com o joelho flexionado. O ligamento colateral fibular é separado da cápsula por tecido adiposo e pelo nervo e vasos inferiores laterais do joelho (WILLIAMS et al., 1995).

Os ligamentos cruzados (anterior e posterior) localizam-se – tanto topograficamente (fossa intercondilar) quanto funcionalmente (relacionado a eixos de rotação) – no centro da articulação do joelho. Situam-se internamente à cápsula articular, suas superfícies anteriores e laterais são revestidas pela membrana sinovial, contudo, são considerados elementos extra-sinoviais (DUTHON et al., 2006).

A principal função dos ligamentos cruzados consiste na limitação dos deslizamentos entre a tíbia e o fêmur, no plano sagital (AUMÜLLER et al., 2009).

O ligamento cruzado anterior é considerado uma estrutura chave na AJ, porque resiste à rotação anterior tibial e é uma das estruturas mais lesionadas durante atividades esportivas de alto impacto (DUTHON et al., 2006; CLEATHER; SOUTHGATE; BULL, 2014; NARAGHI; WHITE, 2014). É fixado na face posterior e interna do côndilo lateral do fêmur e projeta-se, obliquamente, ântero-inferiormente e

medialmente, até a área intercondilar anterior da tíbia (AUMÜLLER et al., 2009; NARAGHI; WHITE, 2014). Possui uma microestrutura de fibras colágenas de múltiplos tipos (principalmente do tipo I) e uma matriz formada por uma rede de proteínas, glicoproteínas, fibras elásticas com múltiplas interações funcionais (DUTHON et al., 2006).

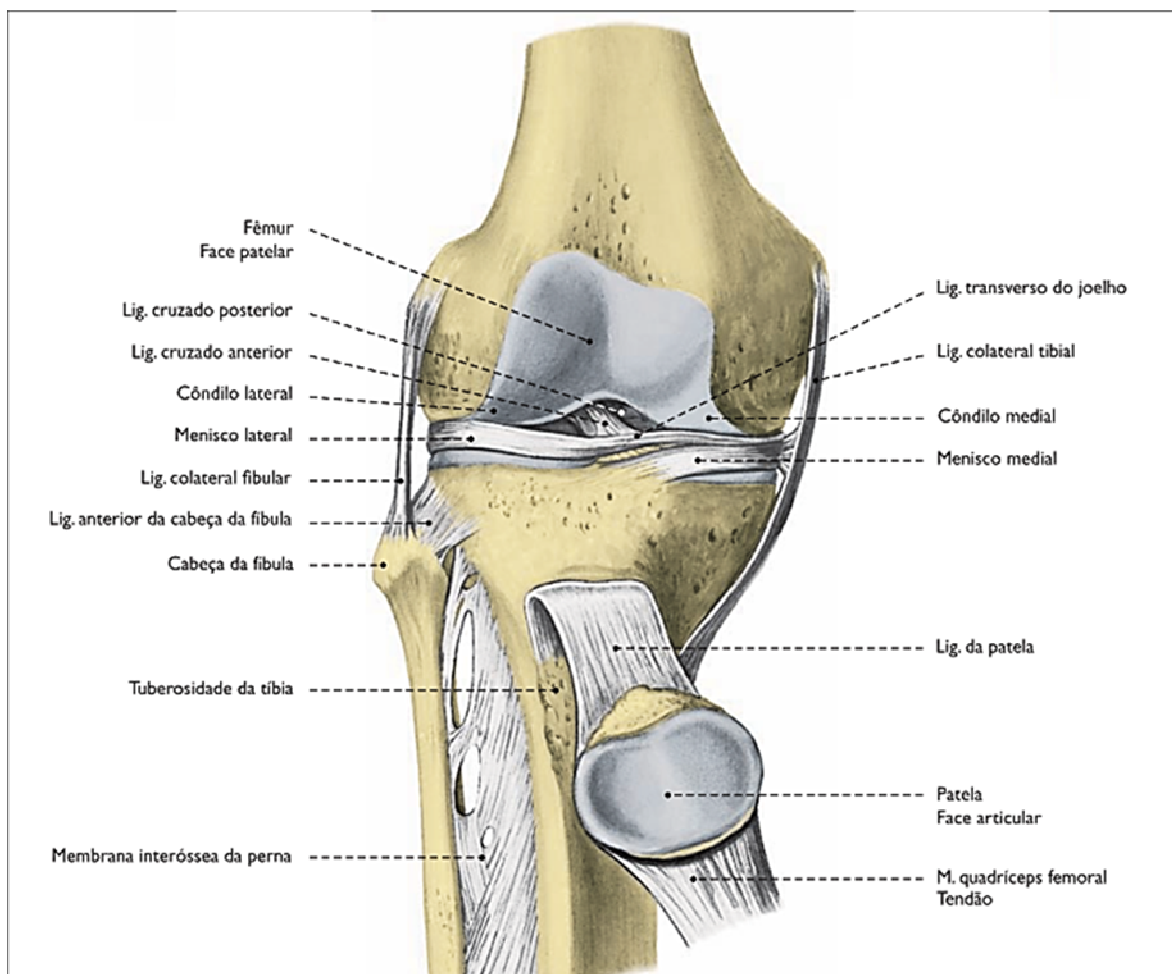
O ligamento cruzado posterior situa-se anteriormente, a partir da face interna do côndilo medial do fêmur e segue póstero-inferiormente e lateralmente, até alcançar a área intercondilar posterior da tíbia. Com o joelho flexionado os ligamentos torcem sobre si mesmos, durante a rotação medial e durante a rotação lateral, posicionando-se mais paralelamente (NARAGHI; WHITE, 2014).

A arquitetura das fibras dos ligamentos cruzados faz com que, em qualquer posição do joelho, alguma porção dos ligamentos seja mantida tensionada. No joelho flexionado, quando os demais ligamentos responsáveis pela estabilização passiva estão relaxados, os ligamentos cruzados representam a única possibilidade de estabilização ligamentar (DUTHON et al., 2006).

O ligamento transversal do joelho, uma faixa fibrosa delgada, une-se aos cornos anteriores dos meniscos, fixando-os um ao outro durante movimentos do joelho (MOORE; DALLEY, 2007).

A figura 4 ilustra alguns dos constituintes da AJ.

Figura 4 - Articulação do joelho direito numa vista anterior



Fonte: (KÖPF-MAIER, 2006)

Legenda: Articulação do joelho direito, numa vista anterior, mostrando alguns constituintes da AJ. A cápsula articular foi removida e a patela rebatida inferiormente.

2.2 ASPECTOS DA EMBRIOLOGIA DA AJ

Segundo Moore e Persaud (2008), os brotos dos membros surgem inicialmente como elevações das paredes ventrolaterais do corpo no final da quarta semana de vida intrauterina (VIU). O desenvolvimento dos membros se inicia com a ativação de um grupo de células mesenquimais no mesoderma lateral. Os brotos dos membros superiores são visíveis no 26º ou 27º dia e desenvolvem-se no nível dos segmentos cervicais caudais e os brotos dos membros inferiores no nível dos

segmentos sacrais craniais, surgindo um ou dois dias mais tarde, por volta da 4ª semana (GARDNER; O'RAHILLY, 1968).

Durante a condrogênese, o processo de desenvolvimento da cartilagem, células mesenquimais condroprogenitoras começam a agregar-se para formar uma massa de células arredondadas intimamente apostas, em torno de 5 semanas de VIU (BHOSALE; RICHARDSON, 2008). Estas células começam a secretar matriz cartilaginosa e são então chamadas de condroblastos. Estes mesmos autores também afirmam que, durante o desenvolvimento, a matriz extracelular é produzida gradualmente e que, as células envolvidas por esta matriz especializada são chamadas de condrócitos.

As articulações sinoviais começam a se desenvolver com o aparecimento do mesênquima interzonal (ou interzona), uma região não cartilaginosa (ARCHER; DOWTHWAITE; FRANCIS-WEST, 2003) durante a sexta semana e, já ao final da oitava semana elas se assemelham a articulações adultas (MOORE; PERSAUD, 2008).

Segundo proposto por Streeter (1951) e revisado por O'Rahilly e Muller (2010), o período de desenvolvimento embrionário possui 23 estágios, compreendendo as primeiras 7 a 8 semanas após a fertilização. O surgimento dos brotos dos membros inferiores ocorre no estágio 13 (embriões com 4 semanas) e a 5 semanas após fertilização partes do esqueleto do membro inferior estão começando a condrificação, em seqüência proximodistal. No estágio 18 (aproximadamente 6 semanas após fertilização) inicia-se a condrificação do fêmur, tíbia e fíbula (GARDNER; O'RAHILLY, 1968).

Ao final da 6ª semana, todo o esqueleto do membro é cartilaginoso (MOORE; PERSAUD, 2008).

Segundo Merida-Velasco et al. (1997a), no estágio 20 (aproximadamente 7 semanas após fertilização) os côndilos do fêmur e tíbia estão evidentes, e é visível uma condensação de tecido mesenquimal representando a futura patela. No estágio 22 (8 semanas após fertilização) inicia-se a formação de uma banda densa de tecido conjuntivo pericondral que marca o primeiro sinal de surgimento da cartilagem articular. Além disto, neste estágio: as partes laterais da interzona articular se tornam densas e começam a formar os meniscos; a cápsula articular começa a se fixar perifericamente ao menisco; inicia-se a formação de cavidades entre o menisco e os

côndilos do fêmur e tíbia; ocorre condrificação da patela e cavitação da interzona femoropatelar (ARCHER; DOWTHWAITE; FRANCIS-WEST, 2003) e o início de formação da área intercondilar da tíbia e, superior a esta, surge a inserção do ligamento cruzado posterior.

A cápsula articular está visível no estágio 23 (8 semanas). Na 9ª semana após fertilização há a visualização das cavidades articulares femoromeniscal e meniscotibial. Ainda nesta semana o espaço triangular, formado inferiormente à patela e ocupado com tecido mesenquimal, pode representar o primeiro sinal de formação do tecido adiposo (MERIDA-VELASCO et al., 1997a). Segundo Merida-Velasco et al. (1997b), a formação do corpo adiposo infrapatelar ocorre durante a 14ª semana de gestação.

Entre as semanas 10 e 11 o menisco lateral já encontra-se bem evidente e há continuação do desenvolvimento do menisco medial (MERIDA-VELASCO et al., 1997a). Segundo Fukazawa et al. (2009), o estudo descritivo e morfométrico acerca do desenvolvimento normal dos meniscos torna-se necessário para melhor compreensão de sua morfologia anormal. De acordo com estes autores, na 25ª semana de gestação, a camada contendo orientação bem organizada de suas fibras tornava-se bem visível no menisco lateral, enquanto no menisco medial as fibras eram orientadas aleatoriamente.

Segundo Moore e Persaud (2008), a osteogênese de ossos longos tem início na sétima semana nos centros primários de ossificação na diáfise destes ossos. Os centros primários de ossificação estão presentes em todos os ossos longos durante a 12ª semana. Na semana 14 inicia-se a ossificação da patela, com canais de cartilagem penetrando das superfícies anterior e superior (MERIDA-VELASCO et al., 1997a).

2.3 ASPECTOS HISTOLÓGICOS DA CARTILAGEM E OSSIFICAÇÃO ENDOCONDRAIS

A cartilagem é um tecido conjuntivo composto principalmente de células chamadas de condrócitos e uma matriz extracelular altamente especializada,

contendo colágenos, agregados de proteoglicanas contendo glicosaminoglicanas (GAG) e glicoproteínas multiadesivas (ZUSCIK et al., 2008). A matriz extracelular na cartilagem é sólida e firme, mas um tanto maleável, contribuindo assim para sua elasticidade (ROSS; PAWLINA, 2012; YUE GAO et al., 2014).

De acordo com Loeser (2000), os condrócitos são os tipos celulares mais frequentemente encontrados na cartilagem articular, e estas células são responsáveis pela síntese, manutenção e modificação gradual da matriz extracelular. Na cartilagem formada, os constituintes da matriz extracelular são continuamente substituídos, e, deste modo, a integridade da matriz é dependente da viabilidade dos condrócitos (YOUNG et al., 2007; ZUSCIK et al., 2008).

Os condrócitos são células altamente especializadas e responsáveis pela síntese de todos os componentes da cartilagem bem como regulação do metabolismo da matriz (BHOSALE; RICHARDSON, 2008).

Responte, Natoli e Athanasiou (2007) relatam que o componente estrutural mais abundante do tecido conjuntivo são as fibras de colágeno, compostas de proteínas estruturais, consistindo em longas cadeias polipeptídicas. Estas fibras são flexíveis e apresentam uma resistência a tensão acentuadamente alta. Ainda, estes autores ponderam que a estrutura da rede de colágeno contribui largamente para a integridade mecânica da cartilagem, particularmente para as propriedades de resistência à tensão.

As fibras colágenas representam uma família de proteínas que servem primariamente como elemento de suporte na estrutura tecidual e contribuem para a resistência elástica e estabilidade, além de regularem a migração celular e o remodelamento tecidual durante a morfogênese, diferenciação, crescimento e cicatrização tecidual (MYLLYHARJU; KIVIRIKKO, 2004).

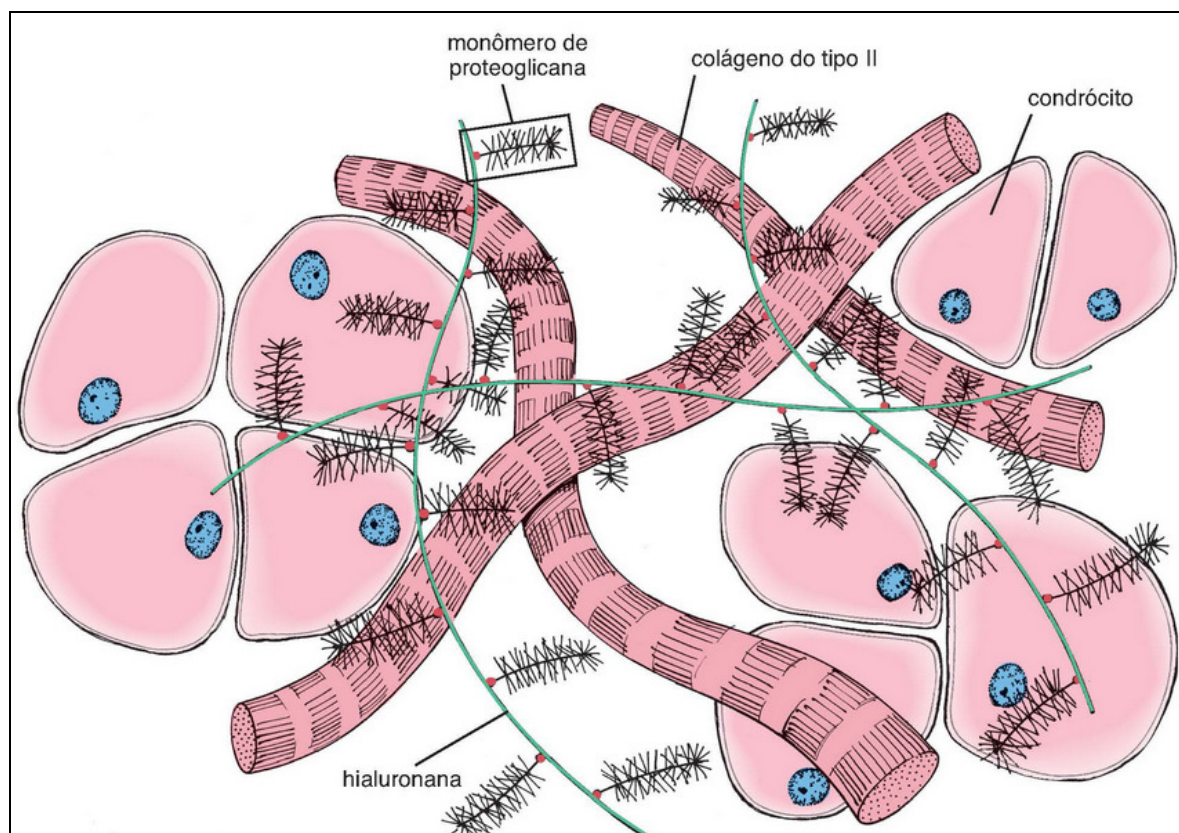
Segundo Gelse, Pöschl e Aigner (2003), a família dos colágenos é composta por mais de vinte tipos geneticamente diferentes e, em especial, citam-se: o colágeno tipo I, mais abundante, sendo amplamente distribuído no organismo e que proporciona resistência à força, tensão e estiramento; o colágeno tipo II apresenta estriações transversais pouco evidentes e encontra-se arranjado em uma rede tridimensional de finas fibrilas e proporciona resistência à pressão intermitente (YOUNG et al., 2007; BHOSALE; RICHARDSON, 2008) e o colágeno tipo III, formando fibras reticulares, arranjadas como uma rede frouxa de finas fibras,

propicia uma plataforma de sustentação para as células especializadas de vários órgãos e vasos sanguíneos. No osso, suas fibras estão organizadas em um padrão específico e se tornam calcificadas para criar a rigidez associada a este tecido.

A maior parte do colágeno total do corpo encontra-se nos tecidos conjuntivos especializados do sistema esquelético na forma de colágenos fibrilares dos tipos I, II, e III. Cada um destes colágenos são sintetizados como procolágenos contendo três cadeias α (SANDBERG; VUORIO, 1987). Estas três cadeias α são cadeias polipeptídicas de colágeno, enroladas umas nas outras, formando um tipo de corda aparentemente torcida (LEE et al., 1999).

Outro importante componente da matriz cartilágnea são as proteínas proteoglicanas contendo GAG, que se apresentam em grande proporção em relação às fibras de colágeno, como pode ser visualizado no diagrama esquemático presente na figura 5. Os 3 tipos de GAG presentes na substancia fundamental da cartilagem são: hialuronana, sulfato de condroitina e sulfato de queratana. Estes 2 últimos, na matriz cartilágnea, são unidos a uma proteína central para formar um monômero de proteoglicana, sendo a agrecana, de maior importância na cartilagem (ROSS; PAWLINA, 2012). Além de proverem resistência à compressão para a cartilagem, tornando-a bem adaptada a suportar peso, como nas articulações sinoviais (BHOSALE; RICHARDSON, 2008), as proteoglicanas permitem a difusão de substâncias entre os vasos sanguíneos no tecido conjuntivo circunvizinho e os condrócitos na matriz e contribuem para manutenção da viabilidade do tecido (RESPONTE; NATOLI; ATHANASIOU, 2007).

Figura 5 - Estrutura molecular da matriz da cartilagem hialina



Fonte: (ROSS; PAWLINA, 2012)

Legenda: Diagrama esquemático mostrando a relação dos agregados de proteoglicanas com as fibrilas de colágeno do tipo II na matriz da cartilagem hialina. A molécula de hialuronana formando um agregado linear com muitos monômeros de proteoglicanas (como a agregcana) está entremeadada com uma rede de fibrilas de colágeno.

Dependendo da composição e característica de sua matriz, a cartilagem do corpo humano pode ser classificada em três tipos: 1) cartilagem hialina, 2) cartilagem elástica e 3) fibrocartilagem (BHOSALE; RICHARDSON, 2008), sendo que os três tipos de cartilagem se diferem na aparência e nas propriedades mecânicas. A **cartilagem hialina** caracteriza-se por apresentar uma matriz contendo fibras de colágeno predominantemente do tipo II, agregados de proteoglicana e glicoproteínas de adesão múltipla, a **cartilagem elástica** caracteriza-se por apresentar fibras elásticas e lamelas elásticas, além do material da matriz da cartilagem hialina e a **fibrocartilagem** caracteriza-se por abundantes fibras de colágeno do tipo I, além do material da matriz da cartilagem hialina.

Segundo Van der Kraan e Van den Berg (2012) a cartilagem hialina pode ser classificada em cartilagem temporária e permanente. Sendo que a chamada cartilagem temporária é aquela encontrada nos estágios iniciais de ossos

endocondrais, a qual será, por fim substituída pelo osso. Já a cartilagem permanente, entre outros, presente nas cartilagens articulares, não sofre diferenciação terminal em condições normais.

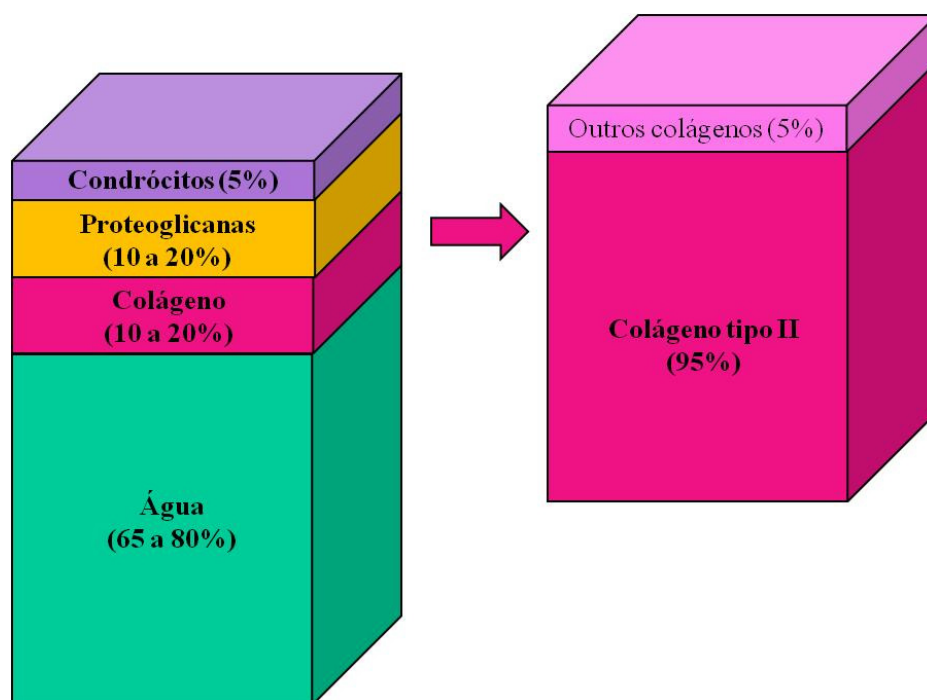
2.3.1 Cartilagem articular

As superfícies lisas das articulações sinoviais são revestidas com um tipo especializado de cartilagem hialina chamada cartilagem articular. Esta cartilagem provê para a articulação uma superfície de baixo atrito, com resistência à compressão e resistência ao desgaste (BHOSALE; RICHARDSON, 2008).

De acordo com Hunziker (1988) e Goldring (2012), a cartilagem articular representa parte da epífise embrionária que não é repostada por osso durante a ossificação endocondral.

No que se refere à sua estrutura, a cartilagem articular hialina é aneural e avascular. Os condrócitos formam apenas menos de 5% do volume da cartilagem, ou seja, mais de 95% do volume da cartilagem é formada pela MEC (BHOSALE; RICHARDSON, 2008; ROSS; PAWLINA, 2012). O colágeno contribui com um percentual do peso líquido que varia entre 10 a 20% e seu componente principal é o colágeno do tipo II (95%), as proteoglicanas também formam de 10 a 20% do peso líquido e a água contribui com um percentual que varia entre 65% até 80% do peso líquido da cartilagem, sendo que o percentual maior de água é encontrado nas regiões mais superficiais (BHOSALE; RICHARDSON, 2008), conforme representado esquematicamente na figura 6.

Figura 6 - Esquema representando a composição molecular da cartilagem hialina



Fonte: (CAL ROSA, 2015)

Legenda: A cartilagem contém 65 a 80% do peso líquido de água, 10 a 20% do peso total é atribuído às moléculas de colágeno, das quais as de colágeno do tipo II são as mais abundantes (cerca de 95%). Os condrócitos ocupam cerca de 5% da massa total da cartilagem.

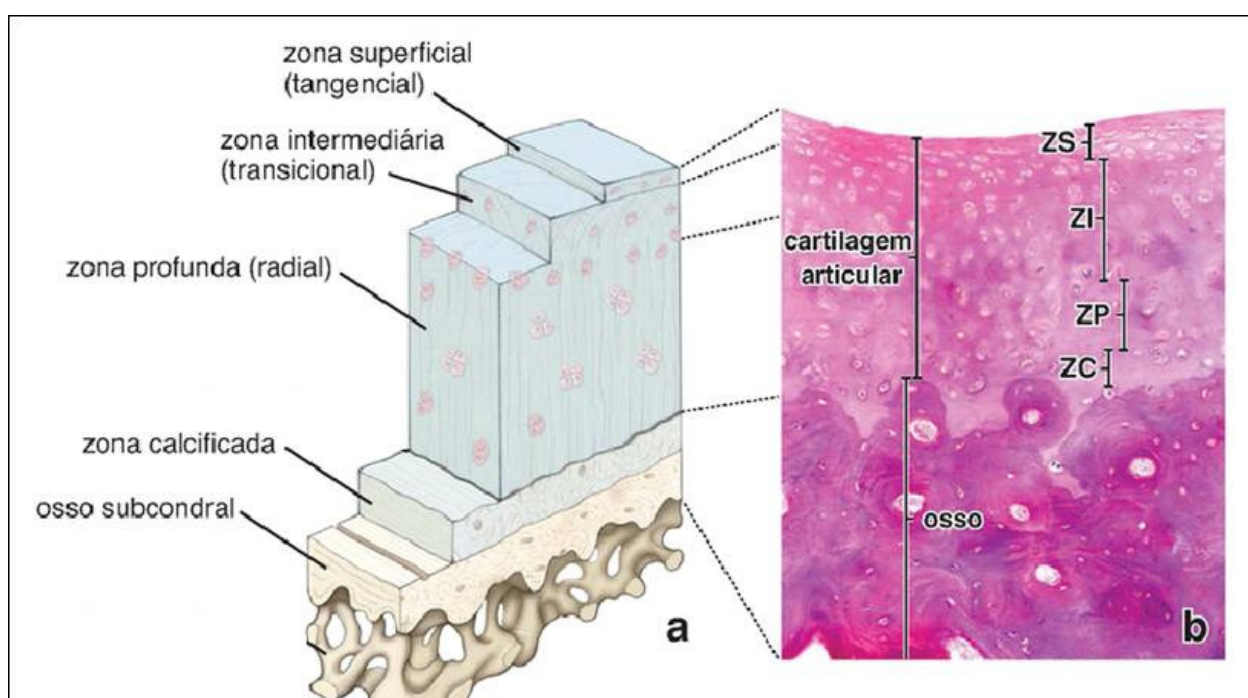
Segundo Hunziker, Quinn e Häuselmann (2002) e Bhosale e Richardson (2008) a cartilagem articular em indivíduos adultos pode ser dividida em quatro zonas que, ordenadas da mais superficial para a mais profunda, são:

1. Zona Superficial;
2. Zona de Transição;
3. Zona Média ou Profunda;
4. Zona Calcificada.

A zona superficial é a mais fina, os condrócitos se organizam densamente e as fibras de colágeno estão arranjadas de forma paralela à superfície, conferindo maior resistência à tensão e cisalhamento. De acordo com Bhosale e Richardson (2008) lesões nesta zona alteram as propriedades mecânicas da cartilagem articular e assim contribuem para o desenvolvimento de osteoartrites no indivíduo adulto. Na zona de transição os condrócitos se apresentam de forma menos densa comparativamente à zona superficial e são envolvidos por uma matriz extracelular abundante, com fibras colágenas arranjadas aleatoriamente. Na zona profunda os

condrócitos são esparsos, com formato esferóide e arranjados perpendicularmente à superfície, apresentando a menor densidade dentre todas as outras zonas, e as fibras colágenas apresentam os maiores diâmetros. De acordo com Castaño Oreja et al. (1995), nesta zona profunda, as fibras colágenas apresentam-se em arranjo radial. Na zona calcificada os condrócitos apresentam-se hipertróficos, em menor volume, envolvidos por uma matriz calcificada e exibem uma atividade metabólica muito baixa (BHOSALE; RICHARDSON, 2008). Esta divisão em zonas, da cartilagem articular em indivíduos adultos, está representada na figura 7, a seguir.

Figura 7 - Diagrama e fotomicrografia da cartilagem articular, mostrando a divisão em zonas, no indivíduo adulto



Fonte: (ROSS; PAWLINA, 2012)

Legenda: Representação da divisão em zonas, da cartilagem articular normal no adulto, mostrado em um diagrama (a) e numa fotomicrografia (b). Estão representadas a zona superficial (ZS), zona intermediária ou de transição (ZI), a zona profunda (ZP) e a zona calcificada (ZC). Aumento: 160 X.

De forma semelhante, Jadin et al. (2005), no trabalho sobre a variação da densidade e da organização de condrócitos em diferentes camadas da cartilagem articular durante o desenvolvimento de bovinos, constataram diferenças substanciais entre a camada superficial, a região média e a região profunda. Na camada superficial os condrócitos se apresentavam muito próximos e se tornavam mais esparsos nas demais regiões.

Chen et al. (1995), pesquisando sobre o programa de diferenciação de condrócitos no desenvolvimento de cartilagem, discutem as diferentes zonas da cartilagem. Segundo os autores, a cartilagem articular de um indivíduo adulto pode ser dividida em três zonas, classificadas pelo grau de diferenciação, organização dos condrócitos e da MEC. Estas três diferentes zonas, ordenadas da mais superficial para a mais profunda, são:

1. Zona de Proliferação;
2. Zona de Maturação;
3. Zona Hipertrófica.

Os condrócitos da zona de proliferação, localizada em uma região mais próxima da superfície, encontram-se nos estágios iniciais de seu desenvolvimento, se apresentam organizados densamente e possuem tamanho menor se comparados com os condrócitos das outras zonas. Já na zona de maturação, localizada na região média da cartilagem, os condrócitos encontram-se no segundo estágio de desenvolvimento, possuem tamanho relativamente maior e mais distante uns dos outros. A zona hipertrófica é a mais profunda das três, os condrócitos estão arranjados de forma esparsa e seu tamanho aumenta dramaticamente (CHEN et al., 1995).

Se, de um lado, diferentes zonas podem ser observadas na cartilagem articular de indivíduos adultos, com diferenças em suas características ao longo da profundidade estudada, de outro, estas zonas não são nitidamente observadas em cartilagens imaturas, as quais se apresentam de forma relativamente homogênea, sem uma região com as características estruturais da camada profunda da cartilagem madura (HUNZIKER, 1992; NAMBA et al., 1998).

De acordo com Rivas e Shapiro (2002), há uma relação estreita e uma transição gradual entre a cartilagem articular e a cartilagem epifisária subjacente, onde a interface cartilagem epifisária / cartilagem articular é, histologicamente, indistinguível durante todo o período de desenvolvimento.

2.3.2 Ossificação endocondral

A ossificação endocondral é um processo de diferenciação cartilágnea que leva à formação dos ossos longos e crescimento no vertebrado em desenvolvimento, bem como a reparação esquelética no adulto (ZUSCIK et al., 2008).

Relativamente ao desenvolvimento dos ossos longos, a cartilagem hialina tem papel fundamental, uma vez que fornece um molde para o desenvolvimento do osso endocondral, um processo que envolve maturação de condrócitos e mineralização da matriz (MURPHY et al., 1999; ZUSCIK et al., 2008), além de modificações na expressão de tipos de colágenos (SANDBERG; VUORIO, 1987).

Os condrócitos existentes no molde cartilágneo, dividem-se, depositam matriz cartilágnea contendo fibras colágenas do tipo II (SANDBERG; VUORIO, 1987; ZUSCIK et al., 2008), hipertrofiam, diferenciam-se terminalmente, degeneram e sofrem apoptose (GIBSON, 1998; SHAPIRO et al., 2005). Após a morte e degradação dos condrócitos, sua matriz cartilágnea residual serve como um suporte para posterior deposição mineral e formação óssea (ZUSCIK et al., 2008; GARTNER; HIATT, 2014).

A MEC torna-se calcificada e nos espaços recém-formados por lacunas cartilágneas, a matriz é invadida por vasos sanguíneos, células mesenquimais e células osteoprogenitoras. Estas últimas se diferenciam em osteoblastos, que produzem e depositam matriz óssea na superfície da cartilagem calcificada, contendo colágeno do tipo I (SANDBERG; VUORIO, 1987; GARTNER; HIATT, 2014). Os osteoblastos, acompanhando a invasão vascular, depositam osso endocondral para substituir a cartilagem (YANG LIU et al., 2014).

Na diáfise, a ossificação da região central do osso longo recebe o nome de centro de ossificação primário. Nas epífises, a ossificação se dará através do centro de ossificação secundário (COS) (ROSS; PAWLINA, 2012).

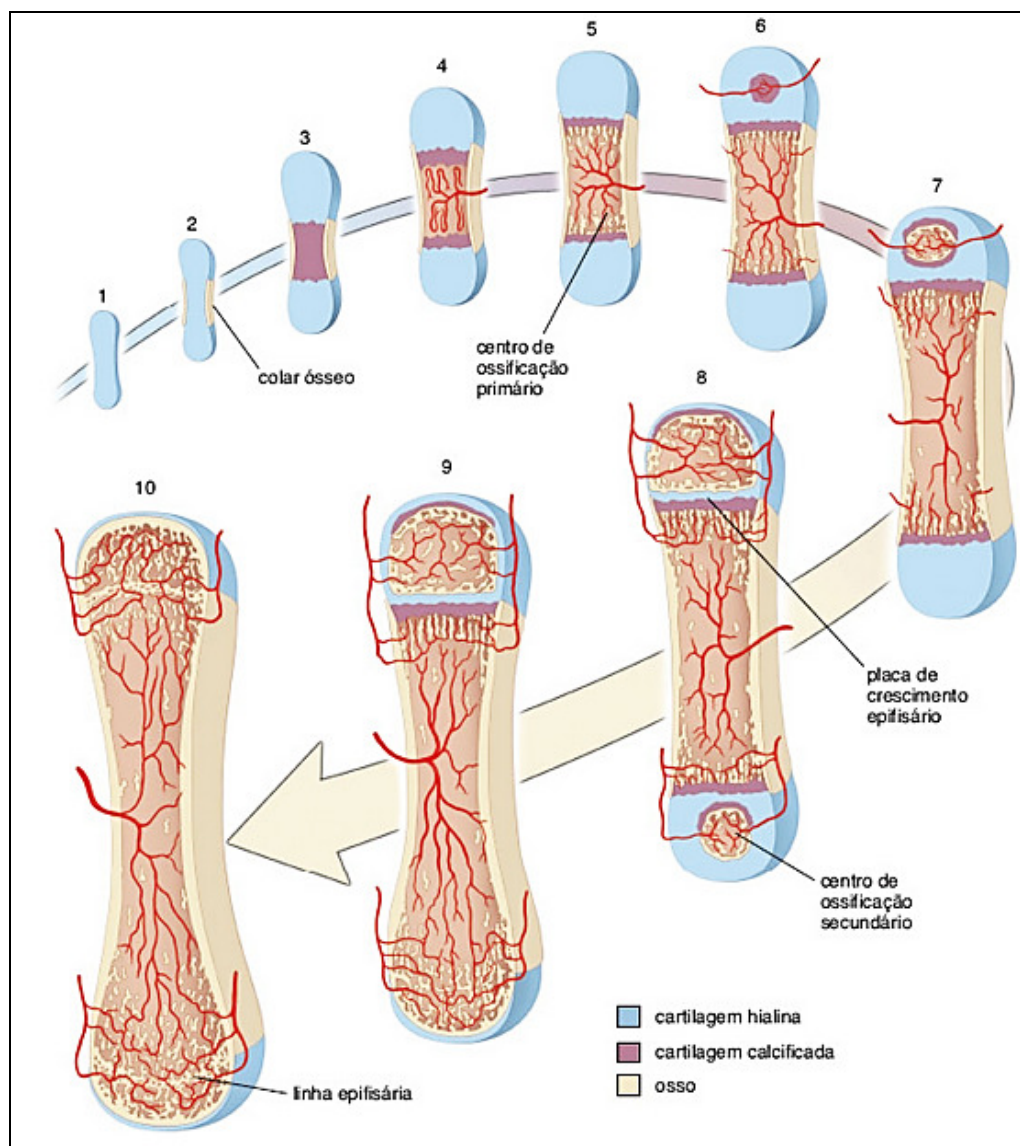
Segundo Hojo et al. (2010), os condrócitos hipertróficos são responsáveis pela invasão vascular. Com a invasão vascular, uma complexa rede de canais de cartilagem se forma durante o desenvolvimento embrionário das epífises. Os canais são extensões do pericôndrio (tecido conjuntivo mesenquimal) e com estes canais, células mesenquimais e vasos migram para o COS, localizados nas epífises

(BLUMER et al., 2006). De acordo com Rivas e Shapiro (2002), os canais de cartilagem estão presentes várias semanas antes da formação do COS. Estes autores estudaram o desenvolvimento de ossos longos e epífises em coelhos, e afirmaram também que o padrão de formação destes ossos e das epífises é o mesmo tanto no coelho como em humanos e em outras espécies de mamíferos, incluindo o cordeiro, porco e a vaca. Segundo Hall (2005), durante o desenvolvimento de ossos longos em humanos os canais de cartilagem surgem durante a 12^a semana de VIU e facilitam o desenvolvimento dos COS. Com o início da formação do COS, os vasos dos canais de cartilagem passam para a massa celular hipertrófica e vão servir como uma fonte de células mesenquimais para formação do osso.

O COS, no período pós-natal, separa as duas áreas cartilagíneas remanescentes em ossos longos: a cartilagem articular, revestindo as superfícies ósseas e a cartilagem epifisial (também conhecida como placa de crescimento), responsável pelo crescimento ósseo em comprimento (ZUSCIK et al., 2008; GARTNER; HIATT, 2014).

Na figura 8 está esquematizada a ossificação endocondral de osso longo em desenvolvimento.

Figura 8 - Diagrama esquemático de um osso longo em desenvolvimento



Fonte: (ROSS; PAWLINA, 2012)

Legenda: As ilustrações 1 a 10 mostram cortes longitudinais através de osso longo. O processo inicia-se com a formação de um modelo cartilágneo (1); em seguida, um colar periosteal (pericondral) forma-se ao redor da diáfise (corpo do osso) do modelo cartilágneo (2); logo depois, a matriz cartilágnea na diáfise começa a se calcificar (3). Os vasos sanguíneos e as células do tecido conjuntivo, então, sofrem erosão e invadem a cartilagem calcificada (4), criando uma cavidade medular primitiva. À medida que o centro de ossificação primário se desenvolve, o osso endocondral é formado sobre a cartilagem calcificada. O osso periosteal continua a se formar (5). Os vasos sanguíneos e as células perivasculares invadem a epífise cartilágnea (6), e um centro de ossificação secundário é estabelecido nas epífises proximais (7). Um centro de ossificação secundário epifisário semelhante forma-se na extremidade distal do osso (8), e uma cartilagem epifisial é, assim, formada entre cada epífise e a diáfise. Com o crescimento continuado do osso longo, a cartilagem epifisial distal desaparece (9), e finalmente com a cessação do crescimento, a cartilagem epifisial proximal desaparece (10). As linhas epifisárias permanecem onde a placa epifisária outrora existiu.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

O conhecimento sobre o desenvolvimento normal dos tecidos cartilagíneos na articulação do joelho (AJ) humano durante a vida intrauterina é de grande relevância, pois pode servir de base teórica para estratégias de reparo da cartilagem e engenharia de tecidos e contribuir para uma melhor compreensão de doenças e malformações ao longo do desenvolvimento dos componentes articulares.

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar, sob o aspecto morfofuncional, o desenvolvimento da cartilagem dos componentes da (AJ) em fetos humanos, desde a 16^a até a 31^a semanas de vida intrauterina, a fim de estabelecer correlações entre as alterações sofridas pelo tecido cartilagíneo e o desenvolvimento dos fetos em diferentes faixas etárias.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar, na cartilagem das epífises do fêmur e da tíbia na AJ, a área dos condrócitos;
2. Avaliar a densidade de condrócitos e de matriz extracelular dessas epífises;
3. Avaliar a variação no volume dos condrócitos dessas epífises;
4. Analisar qualitativamente a distribuição e organização dos tipos de fibras colágenas na constituição das superfícies articulares, da cápsula articular e dos meniscos;
5. Analisar, através da microscopia eletrônica de varredura, a ultraestrutura da superfície articular e cápsula articular da AJ.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Anatomia Funcional Aplicada a Clínica e à Cirurgia (LAFACC) do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas III da Universidade de São Paulo (ICB III – USP).

Para a formação dos grupos experimentais foram utilizados 20 (vinte) fetos humanos com idades compreendidas entre 16 e 31 semanas de vida intrauterina (VIU), previamente fixados em solução de formol a 10% e conservados em glicerina, pertencentes ao Biorrepositório do acervo didático do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB III - USP), conforme documentos de Declaração sobre Biorrepositório e autorização para utilização das amostras do biorrepositório nos anexos A e B.

Este experimento foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas / USP de acordo com Parecer número 1121/CEP e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (Protocolo nº 2985311013).

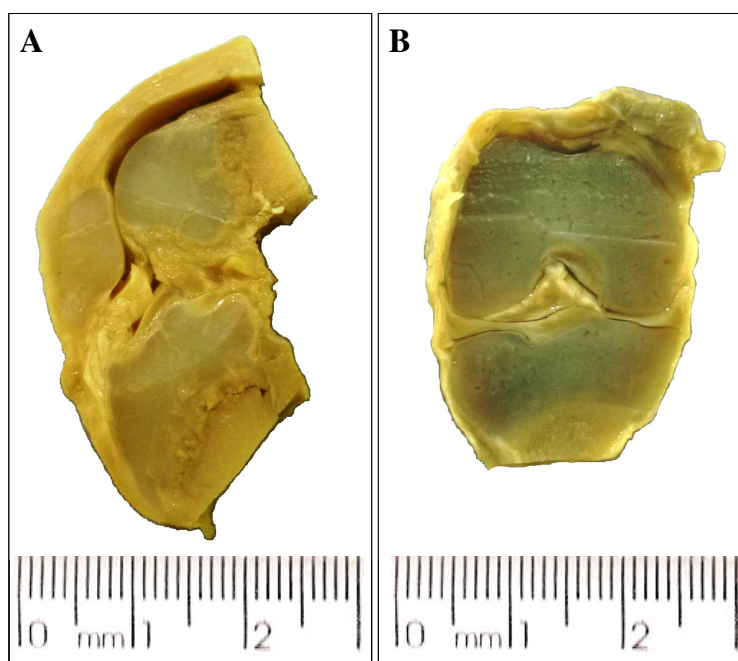
4.1 SEPARAÇÃO DOS GRUPOS E PREPARAÇÃO DO MATERIAL PARA HISTOLOGIA

Os fetos, pertencentes ao Biorrepositório do acervo didático do Departamento de Anatomia, já se encontravam previamente separados, de acordo com a idade. Foram separados 20 (vinte) fetos, os quais foram divididos em 04 (quatro) grupos (n=5), da seguinte forma: **grupo 1 (G1)**: 16-19 semanas de vida intrauterina (VIU); **grupo 2 (G2)**: 20-23 semanas VIU; **grupo 3 (G3)**: 24-27 semanas VIU e **grupo 4 (G4)**: 28-31 semanas VIU.

Em todos os fetos, a região dos joelhos foi cuidadosamente dissecada bilateralmente, sendo limitada em suas partes proximal e distal, cerca de 0,5 cm nos grupos G1 e G2, e de 1 cm em G3 e G4.

Os joelhos dos lados direito e esquerdo de todos os grupos foram inicialmente submetidos a um corte sagital e frontal em sua parte média, respectivamente, conforme ilustra a figura 9. Em seguida, todas as metades dos joelhos de cada feto foram submetidas à descalcificação por imersão em solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 7%, desidratados em série crescente de álcoois (70% ao absoluto), diafanizados em xilol e incluídos rotineiramente em parafina, para processamento histológico.

Figura 9 - Representação dos cortes feitos nos joelhos direito e esquerdo

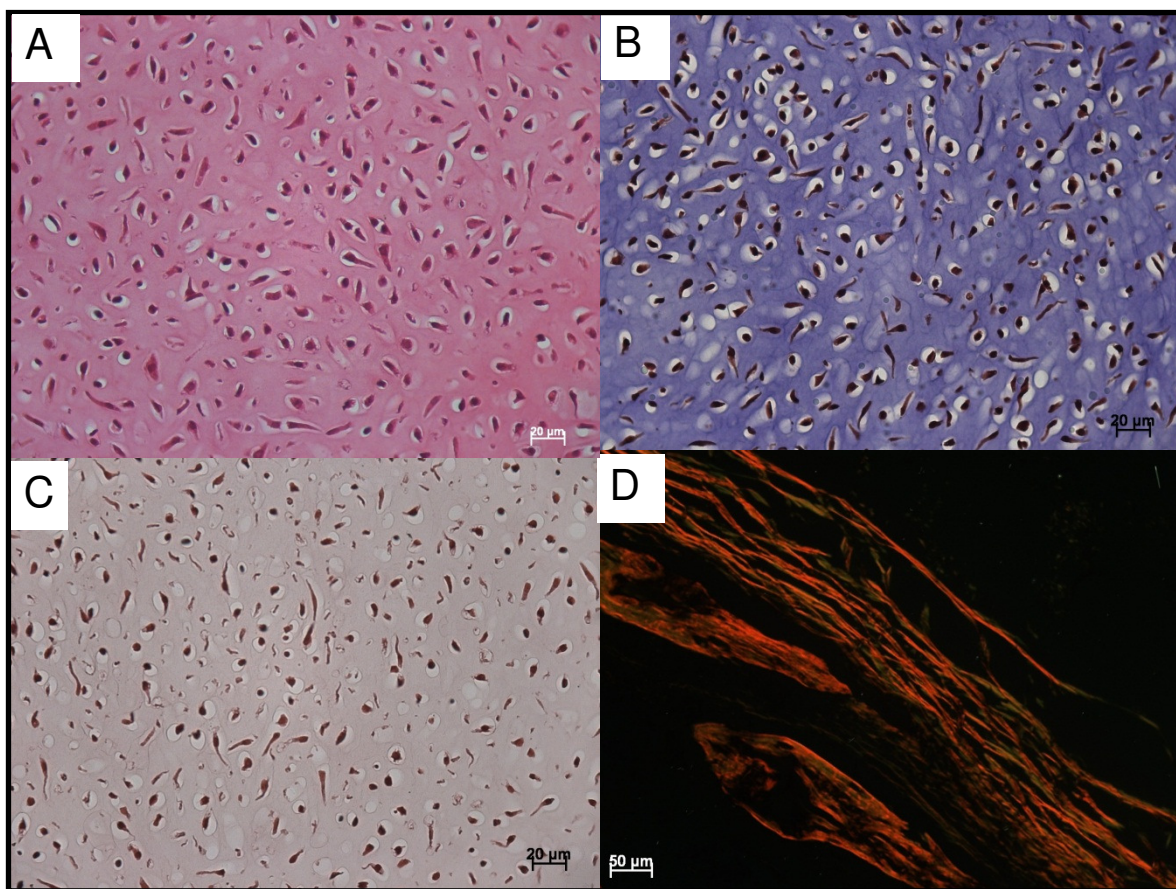


Fonte: (CAL ROSA, 2015).

Legenda: Fotografia de joelho direito, em corte sagital (A) e de joelho esquerdo, em corte frontal (B).
Fetos do grupo 4 com 31 semanas VIU.

Cortes seriados de 5 μm (micrômetros) de espessura foram corados pelos métodos de Hematoxilina e Eosina (HE) e do Tricromo de Masson (ROMEIS, 1968) para evidenciação da estrutura geral; Safranina-O para avaliação da matriz cartilágnea (LUNA, 1968), e do Picro-sirius, analisado sob luz polarizada, para a distinção do sistema de fibras colágenas (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979), conforme ilustrado na figura 10.

Figura 10 - Representação dos métodos de coloração histológica utilizados



Fonte: (CAL ROSA, 2015).

Legenda: Fotomicrografias ilustrando as colorações histológicas utilizadas. Hematoxilina e Eosina - HE (A); Tricromo de Masson (B); Safranina-O (C); Picro-sirius analisada sob luz polarizada (D). Fetos pertencentes ao grupo 01. Aumento: 40X (A, B, C); 20X (D).

Os dados foram avaliados e documentados em um sistema de imagens (Carl Zeiss Microimaging, modelo Axioscope 40) e câmera AxioCam, ligados ao *software* de quantificação Axiovision Rel. 4.8 (Zeiss) do Laboratório de Anatomia Funcional Aplicada a Clínica e à Cirurgia - LAFACC - ICB/USP.

4.2 MORFOMETRIA

Os parâmetros morfométricos foram determinados relativamente à área dos condrócitos e densidade de condrócitos e MEC.

4.2.1 Área dos condrócitos

Para a determinação da área dos condrócitos nos 5 fetos de cada grupo, foram escolhidos 2 cortes, sagital no joelho direito (lâmina 01) e frontal no joelho esquerdo (lâmina 02). Em cada lâmina foram obtidos 5 campos, nos quais determinou-se a área (em μm^2) de 5 condrócitos/campo, escolhidos aleatoriamente, localizados na parte média da epífise distal do fêmur e na epífise proximal da tíbia, conforme ilustra a figura 11.

Figura 11 - Representação de parte da articulação do joelho de feto do grupo 01

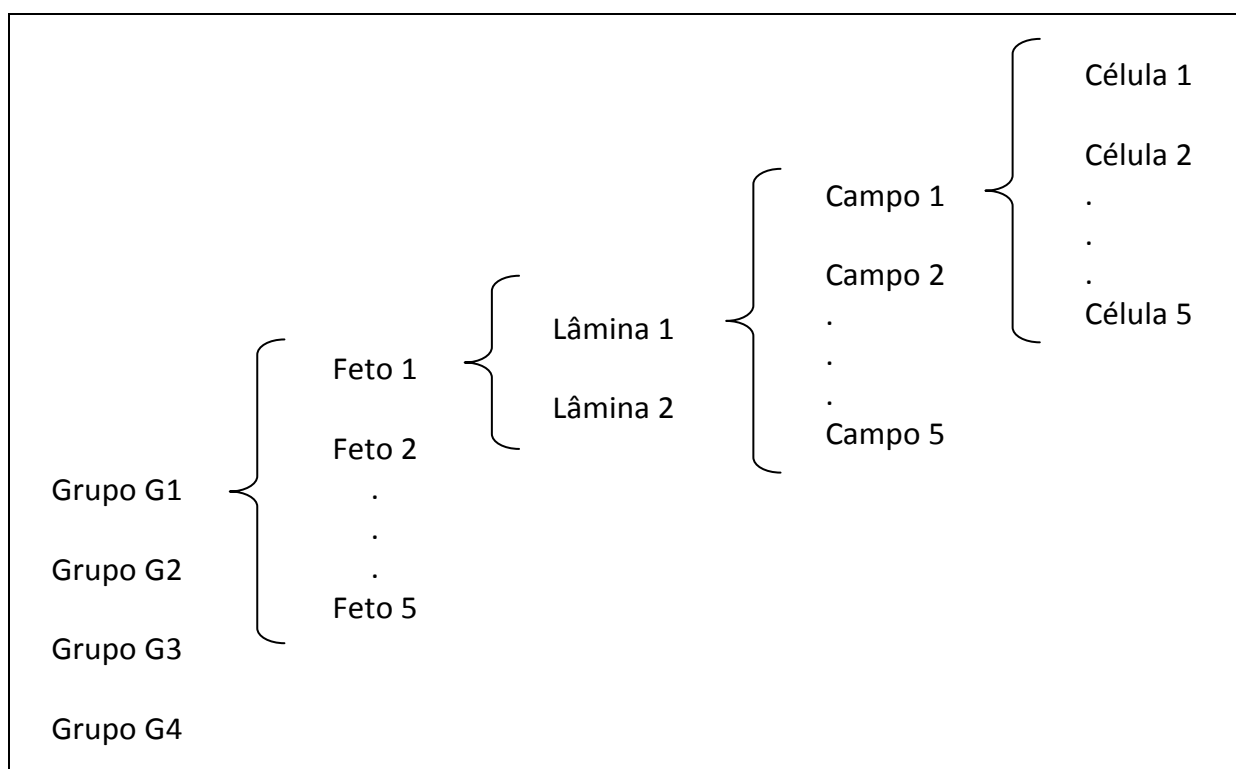


Fonte: (CAL ROSA, 2015).

Legenda: Visualização de parte da articulação do joelho, mostrando uma área da epífise distal do fêmur (F) e da epífise proximal da tíbia (T), representando exemplos de locais onde foram obtidos campos (quadrados verdes) para medição da área dos condrócitos. Sendo fêmur (F), tíbia (T), menisco (M), cápsula articular (CA) em feto do G1. Aumento: 5X. Técnica histológica utilizada: Hematoxilina e Eosina – HE.

No total foram medidos 250 condrócitos/ grupo. O esquema da figura 12 ilustra o método para a quantificação de células para medição da área de condrócitos, tanto para o fêmur quanto para a tíbia.

Figura 12 - Quantificação de células para medição de área de condrócitos

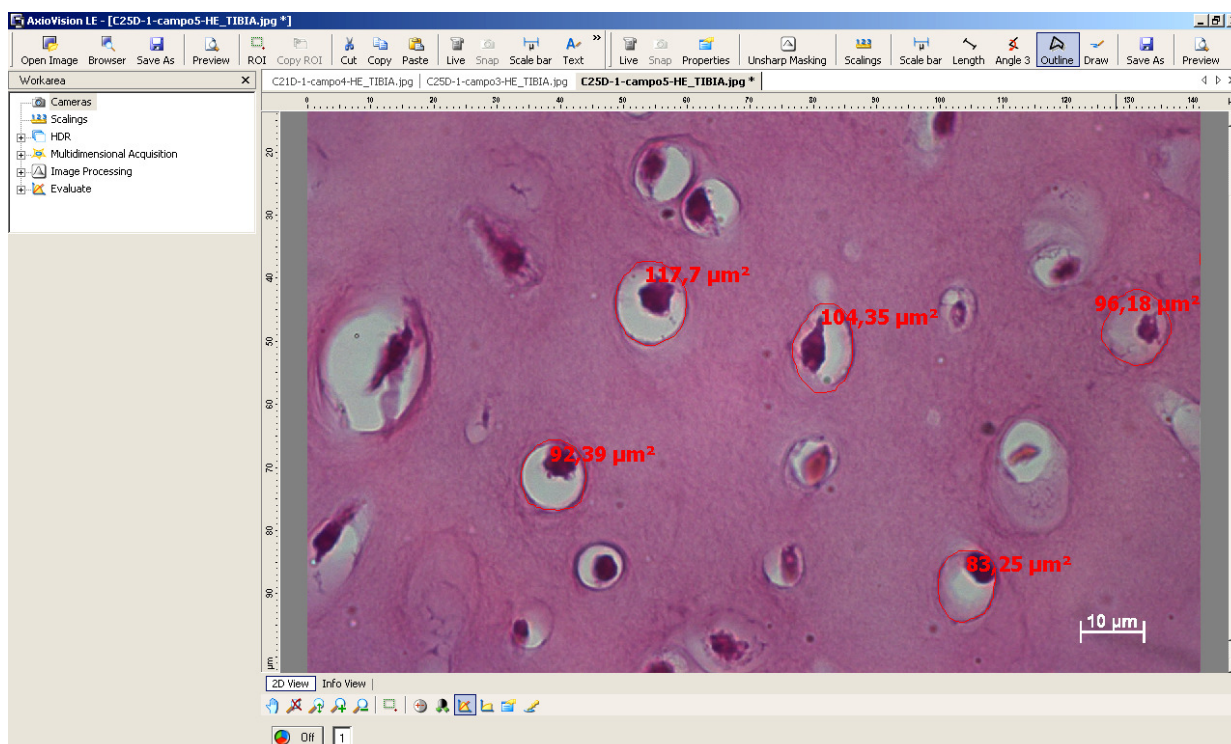


Fonte: (CAL ROSA, 2015)

Legenda: Representação esquemática do método de quantificação de células para medição da área de condrócitos, tanto para o fêmur quanto para a tíbia.

Foram utilizadas lâminas coradas pelo método de Hematoxilina e Eosina – HE, fotografadas com aumento de 100X. Após obtenção das imagens, as mesmas eram abertas no monitor do computador, e utilizava-se o *software* de quantificação Axiovision Rel. 4.8, para a medição das áreas (em μm^2), conforme ilustra a figura 13.

Figura 13 - Fotografia do monitor do computador, utilizando-se o *software* para obtenção das medidas das áreas



Fonte: (CAL ROSA, 2015)

Legenda: Procedimento mostrando a medição das áreas (em μm^2) de 05 condrócitos, utilizando-se o software de quantificação Axiovision Rel. 4.8. Aumento: 100X. Técnica histológica utilizada: Hematoxilina e Eosina – HE.

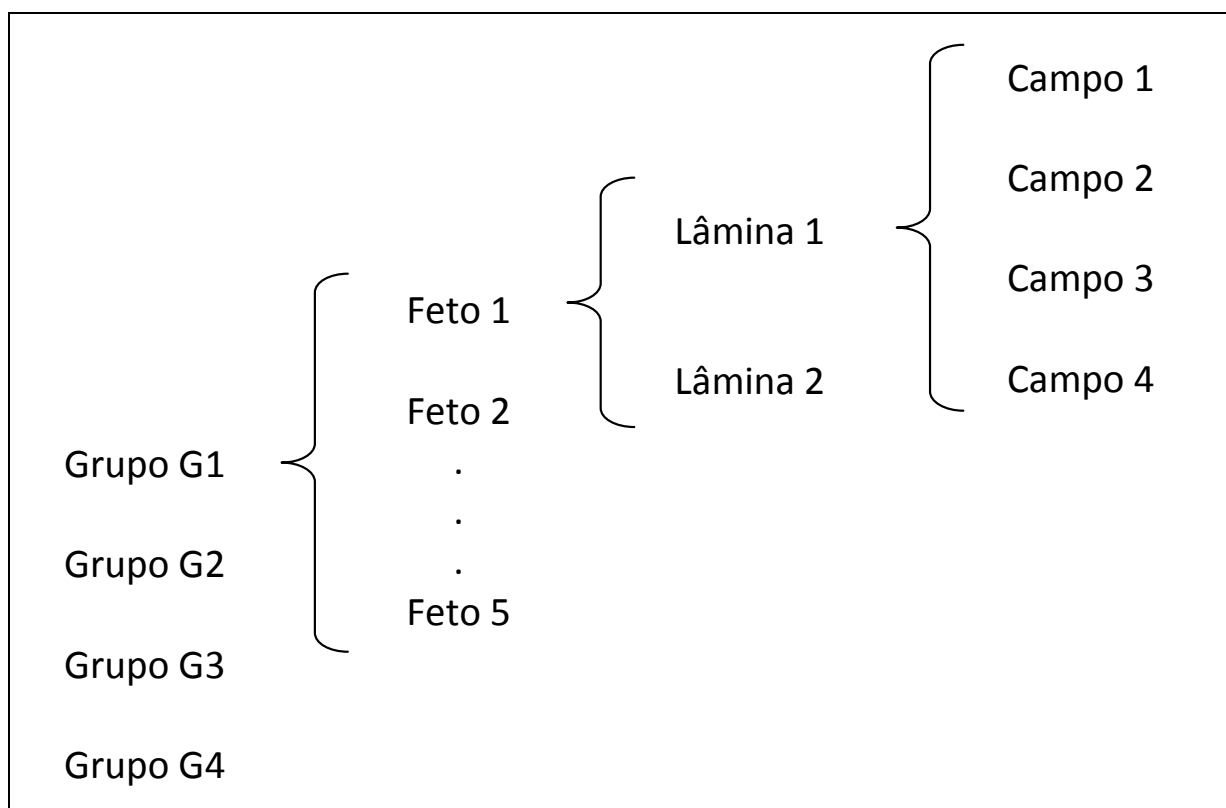
4.2.2 Densidade de condrócitos e de matriz extracelular (MEC)

Para avaliação destes parâmetros, no fêmur e tibia, nos 5 fetos de cada grupo, foram escolhidos 2 cortes (sagital no joelho direito - lâmina 01; frontal no joelho esquerdo - lâmina 02), corados pelo método de Safranina O, fotografados com aumento de 40X.

De acordo com o esquema apresentado na figura 14, em cada lâmina foram obtidos 4 campos, nos quais foi determinada a densidade de condrócitos e da MEC com o auxílio de um sistema teste de 100 (cem) pontos eqüidistantes, sobreposto à imagem, conforme ilustra a figura 15. Desta forma, foram contados os pontos que incidiram sobre essas estruturas que, transformados em porcentagem de

condrócitos e de MEC, foram comparados estatisticamente entre os diferentes grupos.

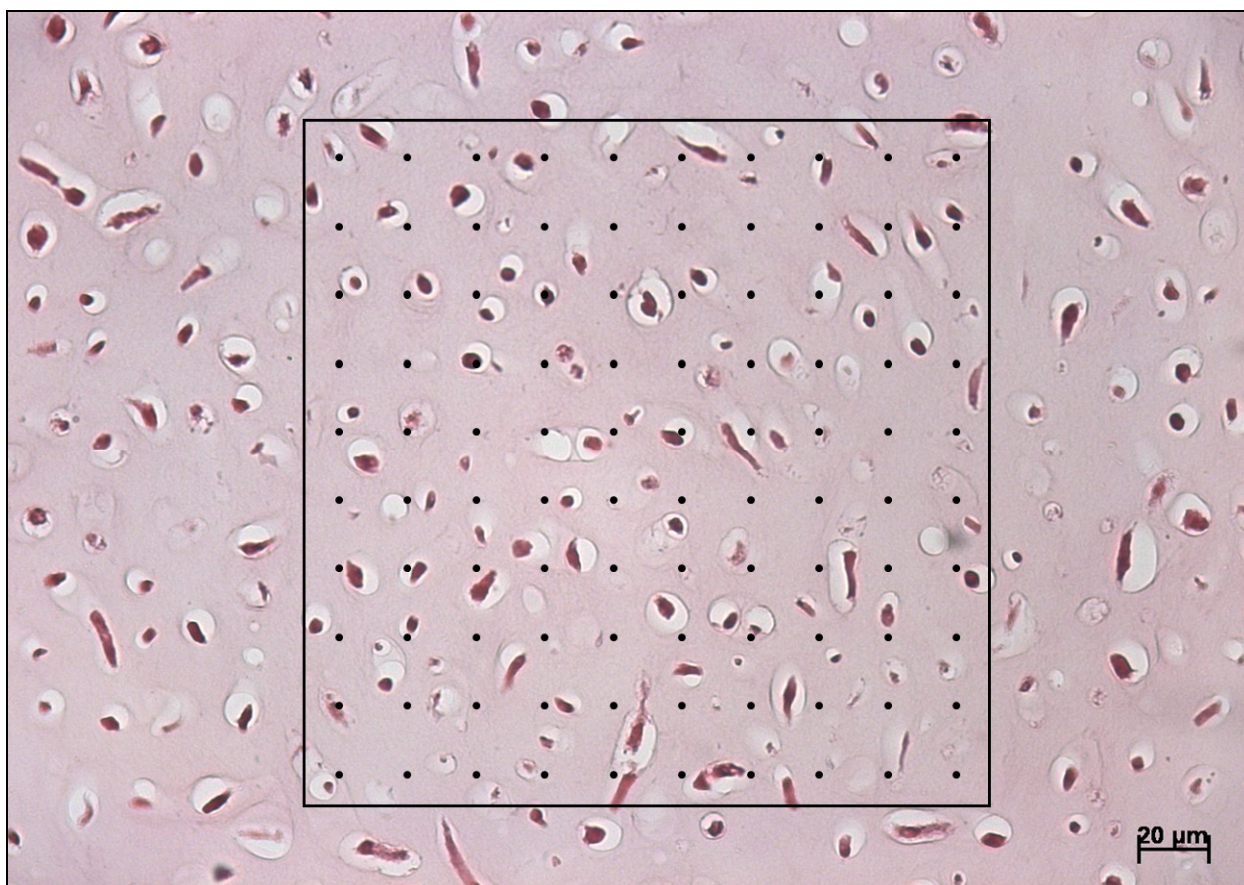
Figura 14 - Obtenção de campos para determinação da densidade de condrócitos e MEC



Fonte: (CAL ROSA, 2015)

Legenda: Representação esquemática do método de obtenção de campos para determinação da densidade de condrócitos e MEC, tanto para o fêmur quanto para a tíbia.

Figura 15 - Representação do campo contendo o sistema teste para determinação da densidade de condrócitos e MEC



Fonte: (CAL ROSA, 2015)

Legenda: Representação do sistema teste de 100 pontos equidistantes sobreposto à imagem e utilizado na determinação da porcentagem de condrócitos e de MEC. Aumento: 40X. Técnica histológica utilizada: Safranina O.

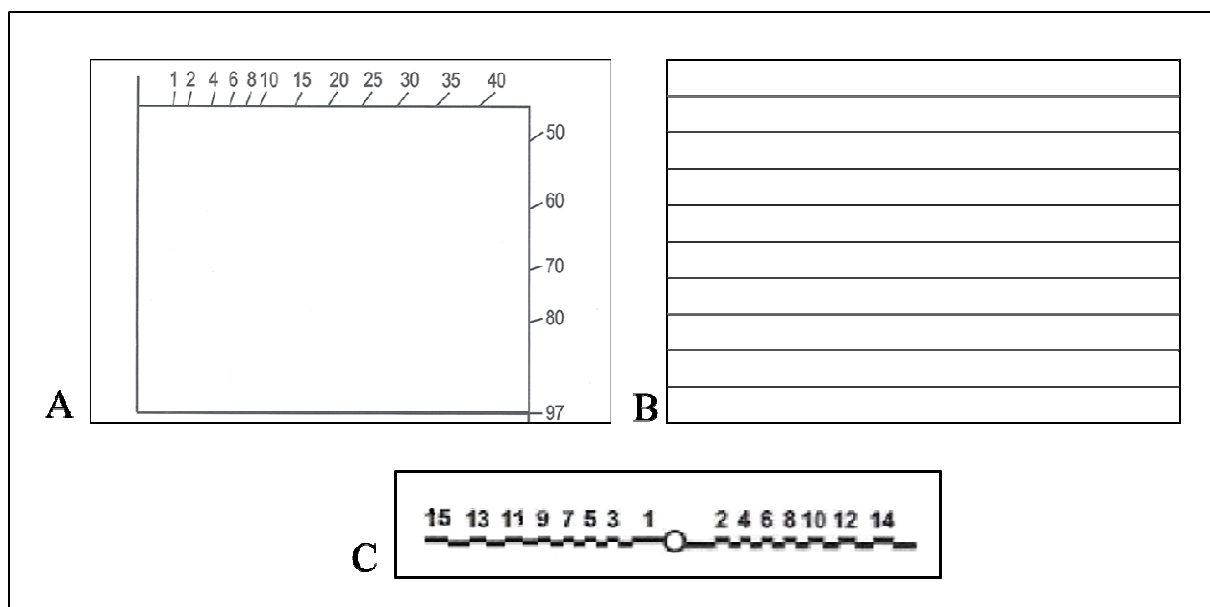
4.3 ESTEREOLOGIA – MÉTODO DO NUCLEATOR

O nucleator constitui-se de um método que permite estimar, de forma imparcial, o volume de formatos variados de células, remetendo-se a uma reconstrução em formato tridimensional (3D) das mesmas para estimativa do seu volume (μm^3) (GUNDERSEN, 1988). Nos cortes analisados, cada célula tem a mesma probabilidade de ser selecionada, independentemente da sua forma, orientação, ou tamanho, uma vez que são escolhidas aleatoriamente.

No método do nucleator são utilizados três sistemas testes em conjunto. O 1º sistema teste (Figura 16 A) determina a angulação a ser adotada para os demais

sistemas teste do método, o 2º sistema teste (Figura 16 B) é constituído de retas paralelas que deverão ser alinhadas no ângulo definido no primeiro sistema e servirão de base para o 3º sistema teste (Figura 16 C), também chamado de “régua”. Esta “régua” é construída de forma bidimensional, com distâncias já elevadas ao cubo e expressas em escala logarítmica (na base 10) e que representam, na realidade, classes de medida.¹ Vale mencionar que as régua podem ter tamanhos variados, adaptados às necessidades da pesquisa. Neste trabalho utilizou-se uma relação entre tamanho de imagem e tamanho de régua de forma que a maioria dos dados não estivessem limitados somente à classe 1 e tivessem uma distribuição mais uniforme.

Figura 16 - Os três sistemas testes utilizados no método do *Nucleator*



Fonte: (Apostila do 2nd ISS Brazilian Stereology Course, 2007).

Legenda: Os 3 sistemas testes utilizados para o método do *Nucleator*. O 1º sistema teste determina a angulação a ser seguida (A); o 2º sistema teste – linhas (B), o qual é sobreposto ao 1º, seguindo a angulação determinada. O 3º sistema teste (C) que determina os domínios da célula.

O aumento escolhido para análise de todas as lâminas foi de 100x.

¹ 2nd ISS Brazilian Stereology Course, 2007. Apostila do curso.

Para realização do método primeiramente determina-se a quantidade de células a serem contadas. Assim, na presente pesquisa, foram analisadas 50 células/feto, perfazendo um total de 250 células para cada osso (fêmur e tíbia) por grupo.

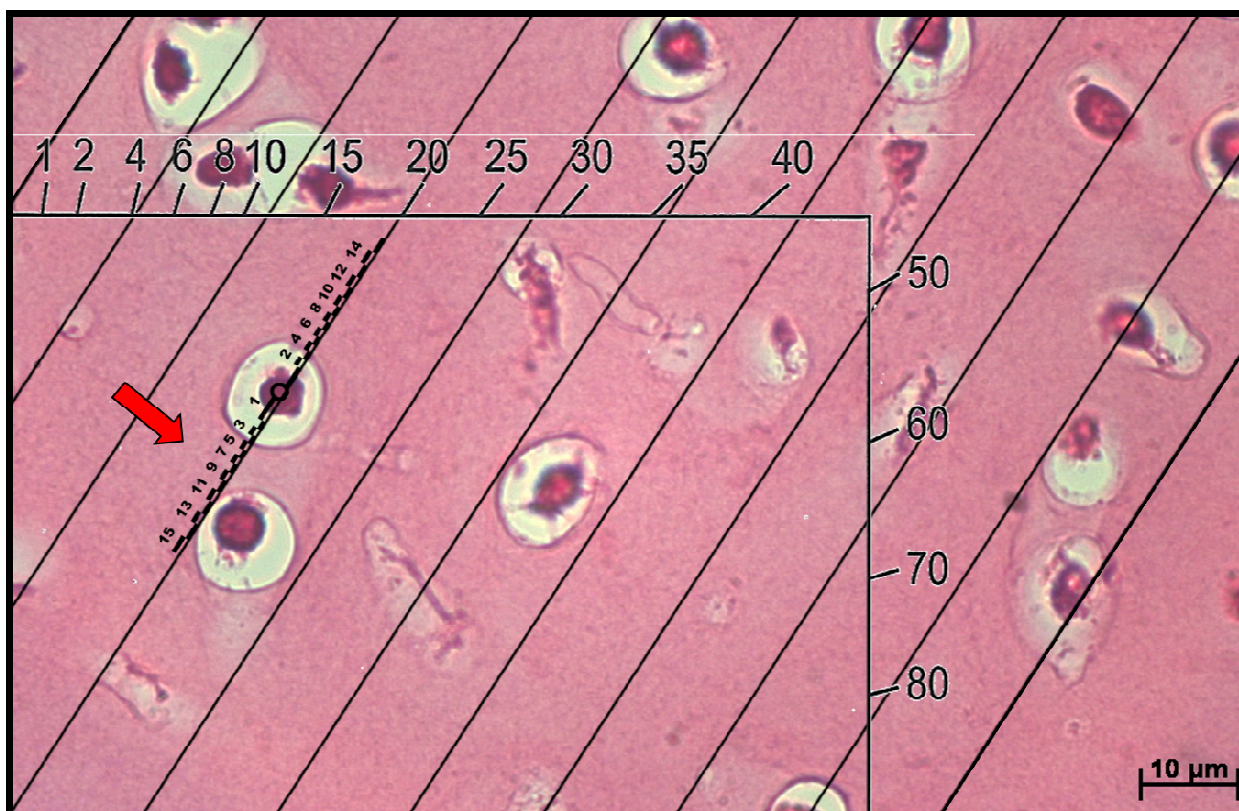
Após definido a quantidade de células/ espécime, utilizou-se a Tabela de números randômicos (Anexo C) para escolha aleatória de números, os quais são necessários para utilizar o 1º sistema teste do nucleator, que determina a angulação a ser adotada nos demais sistemas teste do método.

Com a angulação definida, o 1º sistema teste é colocado sobre a imagem, sobrepondo-se a ele, o 2º sistema teste. Em seguida, o 3º sistema teste é sobreposto aos demais, obedecendo-se a angulação inicial. Para uso deste último, o seu centro deve permanecer sobre o núcleo da célula, onde são marcados dois domínios, relativos aos números da “régua” que incidem sobre as margens da célula, sempre opostos um ao outro.

De modos sistemáticos e uniformemente alocados, estes sistemas testes foram sobrepostos sobre cada uma das imagens utilizadas. Este procedimento é ilustrado na figura 17.

Em seguida, utiliza-se o quadro (Figura 18) criado para facilitar a coleta e tratamento de dados. Nas colunas A e F desse quadro estão representadas as 15 classes (ou domínios) correspondentes à “régua”, a coluna E apresenta os comprimentos médios das classes já elevadas ao cubo, a coluna G apresenta as anotações dos dois domínios (à direita e à esquerda do centro da régua) em cada classe, obtidos para cada célula de um mesmo espécime. Multiplicando-se os valores constantes na coluna G pelos valores correspondentes na coluna E, obtêm-se valores que são anotados na coluna H.

Figura 17 - Representação dos 3 sistemas testes sobrepostos à fotomicrografia analisada no método do nucleator



Fonte: (CAL ROSA, 2015)

Legenda: Representação dos 3 sistemas testes sobrepostos à fotomicrografia analisada pelo método do nucleator. Seta: demonstração do posicionamento do 3º sistema teste. Angulação de 20°. Aumento: 100X. Técnica histológica utilizada: Hematoxilina e Eosina – HE.

O volume médio celular para cada espécime, na escala da “régua” utilizada, é determinado aplicando-se a seguinte fórmula:

$$\bar{V}_N = \frac{4\pi}{3} \cdot \frac{\sum H}{\sum G} = \text{_____ } \mu m^3$$

Onde:

Somatório de H é a soma de todos os valores da coluna H e Somatório de G é a soma de todos os valores da coluna G.

Figura 18 - Tabela utilizada no método do nucleator

A	B	C	D	E	F	G	#Obs. digital	H
Class	Upper limit			Class middle	Class	Obs (check marks)		E • G
	physical length mm	length ³ mm ³	tissue length ³ μm ³	length ³ μm ³				
1	5.1	134	487	243	1	☐☐☐☐		4860
2	6.8	310	1130	809	2	☐☐☐☐☐		17798
3	8.2	544	1982	1556	3	☐☐☐☐		31120
4	9.5	853	3107	2544	4	☐☐☐☐☐		43248
5	10.8	1262	4595	3851	5	☐☐☐☐		53914
6	12.2	1803	6563	5579	6	☐		27895
7	13.6	2517	9166	7865	7			
8	15.1	3462	12608	10887	8	☐		21774
9	16.8	4712	17159	14883	9			
10	18.5	6365	23177	20168	10			
11	20.4	8551	31136	27156	11			
12	22.5	11441	41660	36398	12			
13	24.8	15263	55577	48618	13			
14	27.3	20317	73980	64778	14			
15	30.0	27000	98316	86148	15			
						Σ 100		200609

Fonte: (Apostila do 2nd ISS Brazilian Stereology Course, 2007).

Legenda: Tabela utilizada no método do nucleator, para marcação das "classes" ou domínios (coluna G). Para exemplificação, estão representados os dados obtidos para o feto 1 do G1, para o fêmur.

Desta forma são obtidos os volumes médios dos condrócitos, tanto do fêmur quanto da tíbia, para os grupos G1, G2, G3 e G4.

Finalmente, para melhor compreensão da variação percentual do volume dos condrócitos nos diferentes grupos, os valores obtidos podem ser normalizados tomando um dos grupos como base. Neste trabalho, atribuiu-se o valor 100% para o grupo G1 (menor faixa etária), o qual foi tomado como base para os demais grupos, dividindo-se os valores dos demais grupos pelo valor de G1.

4.4 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Com os dados obtidos para os grupos G1, G2, G3 e G4 nos itens 4.2.1, 4.2.2 e 4.3, foram calculadas as médias (com desvio padrão) de cada um dos parâmetros: área dos condrócitos no fêmur, área dos condrócitos na tíbia, densidade dos condrócitos e MEC no fêmur, densidade dos condrócitos e MEC na tíbia, volume dos condrócitos no fêmur e volume dos condrócitos na tíbia. Além disso, para a área dos condrócitos no fêmur e na tíbia foram calculadas as distribuições de freqüência com intuito de fazer inferências sobre o comportamento deste parâmetro ao longo do crescimento.

A técnica não-paramétrica denominada teste de Kruskal-Wallis (KRUSKAL; WALLIS, 1952) permitiu a verificação de diferenças significativas entre todas as faixas etárias.

O teste de Kruskal-Wallis é uma prova útil para verificar se k amostras independentes provêm de populações diferentes, ou seja, se possuem diferenças significativas entre as observações independentes (SIEGEL, 1956). Os valores amostrais quase que invariavelmente diferem entre si e o problema é decidir se essas diferenças entre as amostras significam diferenças efetivas entre as populações, ou se representam apenas variações casuais, que podem ser esperadas entre amostras aleatórias de uma mesma população.

No cálculo da prova de Kruskal-Wallis cada uma das “ n ” observações é substituída por um posto. Isto é, todos os valores das k amostras combinadas são dispostos em uma única série de postos. Ao menor valor atribui-se o posto 1, ao seguinte o posto 2 e assim sucessivamente até o maior posto que é “ n ”, onde n = número total de observações independentes nas k amostras. Um exemplo de ordenação e atribuição de postos é apresentado na figura 19 a seguir:

Figura 19 - Exemplo de ordenação e atribuição de postos no teste de Kruskal-Wallis

Posto	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Grupo	G1	G1	G1	G2	G1	G2	G2	G3	G2	G3	G3	G3
Parâmetro	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₅	V ₆	V ₇	V ₈	V ₉	V ₁₀	V ₁₁	V ₁₂

Fonte: (CAL ROSA, 2015)

Legenda: Exemplo da atribuição de postos para os grupos G1, G2, G3 ordenados pelo valor do parâmetro estudado, onde $V_1 < V_2 < \dots < V_{12}$.

Feito isso, determina-se a média dos valores dos postos obtidos para cada grupo, conforme apresentado na tabela 1 abaixo.

Tabela 1 - Exemplo de determinação da posição média para cada grupo, no teste de Kruskal-Wallis

Grupo	Tamanho da amostra	Posição média
G1	4	$(1+2+3+5) / 4 = 2,75$
G2	4	$(4+6+7+9) / 4 = 6,50$
G3	4	$(8+10+11+13) / 4 = 10,5$

Fonte: (CAL ROSA, 2015)

Legenda: Apresentação da posição média para os grupos fictícios G1, G2 e G3, com 4 amostras.

A prova então testa se estas posições médias são tão diferentes entre si que não seja provável que tenham sido todas retiradas de uma mesma população.

O nível de significância adotado foi de 5% (ZAR, 1984), ou seja, resultados foram considerados como significativos quando a probabilidade (p) foi menor que 0,05. Neste exemplo, se a probabilidade de $G1=G2=G3$ calculada for menor que 0,05, pode-se dizer que $G1 \neq G2$, $G1 \neq G3$ e $G2 \neq G3$ com 95% de nível de confiança estatística.

4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A estrutura tridimensional através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi analisada em espécimes previamente submetidos à micro-dissecções realizadas com o uso de material oftalmológico sob lupa cirúrgica .

Para essa metodologia, foram utilizadas as metades medial e anterior dos joelhos de 2 espécimes por grupo, a fim de se avaliar, naquelas, a superfície articular, e nestas, a cápsula, os meniscos e os ligamentos.

Os espécimes foram lavados em água corrente por um período de 24 horas, fixados por 8 horas a 4°C em solução de Karnovsky modificada com glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 2% em tampão fosfato de sódio a 0,1M (pH 7,3), lavados em água destilada a 4°C por 12 horas, pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio (OsO₄) a 1% por 2 horas a 4°C, lavados em água destilada e desidratados em série crescente de álcoois (do 70° ao absoluto) de acordo com a técnica de Ushiki e Ide (1988). Após secagem em um aparelho de ponto crítico², utilizando dióxido de carbono (CO₂) líquido, as amostras foram montadas em bases metálicas apropriadas e metalizadas com íons de ouro³.

A análise foi realizada em um microscópio eletrônico de varredura (LEO, modelo 435 VP, do Departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia).

² BAL-TEC CPD 030 – Oerlikon Balzers; Schalksmühle, Alemanha. Departamento de Anatomia, ICB/USP.

³ BALZERS SCD 040 - Oerlikon Balzers; Schalksmühle, Alemanha. Departamento de Anatomia, ICB/USP.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Neste item serão descritos para todos os grupos experimentais (G1, G2, G3, e G4), tanto para o fêmur, quanto para a tíbia, os dados e análises estatísticas dos seguintes parâmetros: área dos condrócitos, densidade dos condrócitos e de matriz extracelular (MEC); e volume dos condrócitos.

5.1 RESULTADOS QUANTITATIVOS: ÁREA DOS CONDRÓCITOS

Neste item serão apresentados os dados e análises estatísticas para o parâmetro área dos condrócitos.

5.1.1 Dados da área dos condrócitos no fêmur

Na tabela 2 e na figura 20, estão expressos os dados obtidos para o parâmetro área dos condrócitos do fêmur, relativos aos grupos G1, G2, G3 e G4.

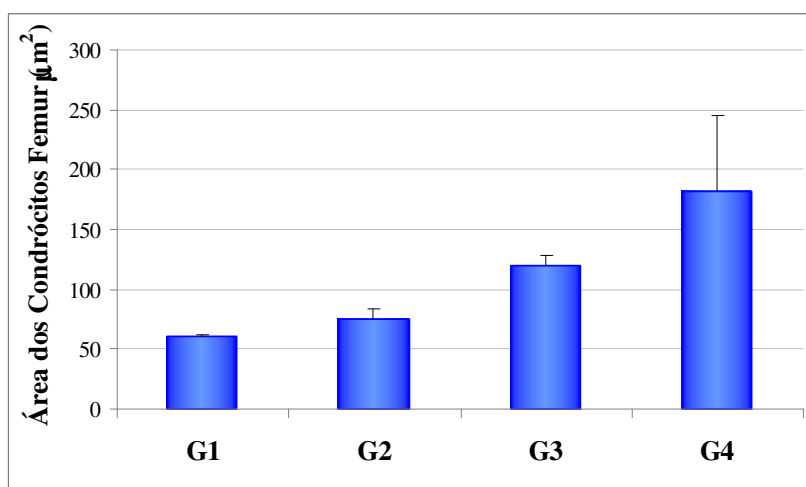
Tabela 2 - Médias das áreas (μm^2) dos condrócitos no fêmur, nos grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5)

Grupos	Médias das áreas
G1	60,7 ± 1,3
G2	74,8 ± 9,0
G3	120,0 ± 9,0
G4	181,8 ± 63,2

Fonte: (CAL ROSA, 2015)

Legenda: Média (\pm DP) das áreas dos condrócitos (μm^2) no fêmur, nos grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5).

Figura 20 - Representação gráfica das médias das áreas (μm^2) dos condrócitos no fêmur, nos grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5)

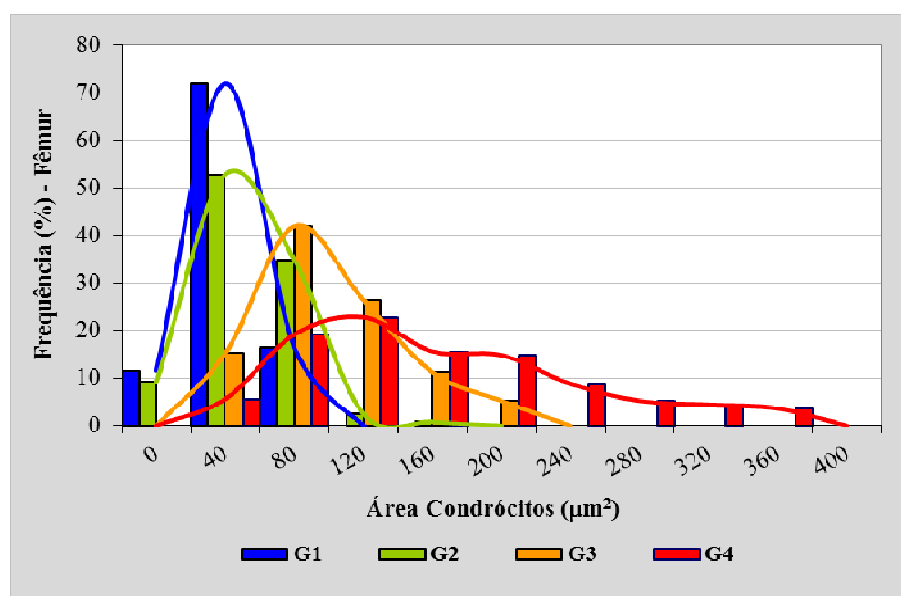


Fonte: (CAL ROSA, 2015)

Legenda: Média (\pm DP) das áreas dos condrócitos (μm^2) no fêmur, nos grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5).

A figura 21 apresenta a distribuição de freqüência para a área dos condrócitos no fêmur, entre os grupos G1, G2, G3 e G4.

Figura 21 - Distribuição de freqüência para a área dos condrócitos no fêmur, entre os grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5)



Fonte: (CAL ROSA, 2015)

Legenda: Distribuição de freqüência para a área dos condrócitos (μm^2), no fêmur, nos grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5), gráficos de barra e linha (envoltória).

Observando-se a distribuição de frequência para a área dos condrócitos do fêmur, algumas inferências podem ser obtidas tomando-se o valor de área de $80 \mu\text{m}^2$ como referência, a saber:

- a) O grupo G1 apresentou uma concentração de valores entre 0 e $120 \mu\text{m}^2$, sendo que 83,6% dos condrócitos são menores que $80 \mu\text{m}^2$ e 16,4 % dos condrócitos são maiores que $80 \mu\text{m}^2$.
- b) No grupo G2 os valores se concentram entre 0 e $160 \mu\text{m}^2$, sendo que 62% dos condrócitos são menores que $80 \mu\text{m}^2$ e 38 % dos condrócitos são maiores que $80 \mu\text{m}^2$.
- c) O grupo G3 apresentou uma concentração de valores entre 40 e $240 \mu\text{m}^2$, sendo que 15,2% dos condrócitos são menores que $80 \mu\text{m}^2$ e 84,8% dos condrócitos são maiores que $80 \mu\text{m}^2$.
- d) Já no grupo G4, a concentração de valores está compreendida entre 40 e $400 \mu\text{m}^2$, sendo que apenas 5,6% dos condrócitos são menores que $80 \mu\text{m}^2$ e 94,4% dos condrócitos são maiores que $80 \mu\text{m}^2$.

Desta forma, verifica-se nítida diferenciação entre, de um lado, os grupos G1 e G2 e, de outro, G3 e G4.

Visando a verificação de diferenças significativas entre todas as faixas etárias, apresenta-se a seguir a análise estatística não-paramétrica de Kruskal-Wallis para melhor caracterização do parâmetro.

5.1.2 Teste de Kruskal-Wallis para área dos condrócitos no fêmur

A figura 22 abaixo apresenta as posições de cada um dos 20 fetos dispostos de forma crescente segundo a área média de seus condrócitos.

Figura 22 - Posições dos fetos dispostos de forma crescente segundo a área dos condrócitos no fêmur

Posição	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Grupo	G1	G1	G1	G1	G1	G2	G2	G2	G2	G2	G4	G3	G3	G3	G3	G4	G3	G4	G4	G4
Área (μm^2)	58,6	60,6	60,9	61,5	61,9	62,5	70,5	74,0	81,9	85,0	98,1	110,6	112,5	120,3	124,0	131,4	132,8	216,6	219,6	243,3

Fonte: (CAL ROSA, 2015)

Legenda: Atribuição de postos para os fetos dos grupos G1 à G4 ordenados de forma crescente segundo a área dos condrócitos no fêmur.

Para o teste de Kruskal-Wallis são calculados os valores médios das posições encontradas para cada grupo, conforme apresentado na tabela 3 a seguir:

Tabela 3 - Teste de Kruskal-Wallis - valores médios das posições encontradas para cada grupo segundo a área dos condrócitos no fêmur

Grupo	Tamanho da amostra	Posição média
G1	5	3
G2	5	8
G3	5	14,2
G4	5	16,8

Fonte: (CAL ROSA, 2015)

Legenda: Teste de Kruskal-Wallis - valores médios das posições encontradas para cada grupo segundo a área dos condrócitos no fêmur.

Para os dados estatísticos acima apresentados, o teste de Kruskal-Wallis apresentou $p=0,000872703$. Sendo $p < 0,05$, pode-se inferir, com 95% de nível de confiança estatística, que existe diferença significativa entre os grupos.

Na comparação entre cada um dos grupos, o teste de Kruskal-Wallis também apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os seguintes grupos:

- G1 \neq G2, $p < 0,05$
- G1 \neq G3, $p < 0,05$
- G1 \neq G4, $p < 0,05$
- G2 \neq G3, $p < 0,05$
- G2 \neq G4, $p < 0,05$
- G3 \neq G4, $p < 0,05$

Desta forma, no que se refere à área dos condrócitos do fêmur, temos $G1 < G2 < G3 < G4$, ou seja, quanto maior a faixa etária dos fetos, maior a área dos condrócitos no fêmur.

5.1.3 Dados de área dos condrócitos na tíbia

Na tabela 4 e na figura 23 estão expressos os dados obtidos para o parâmetro Área dos condrócitos na tíbia, relativos aos grupos G1, G2, G3 e G4.

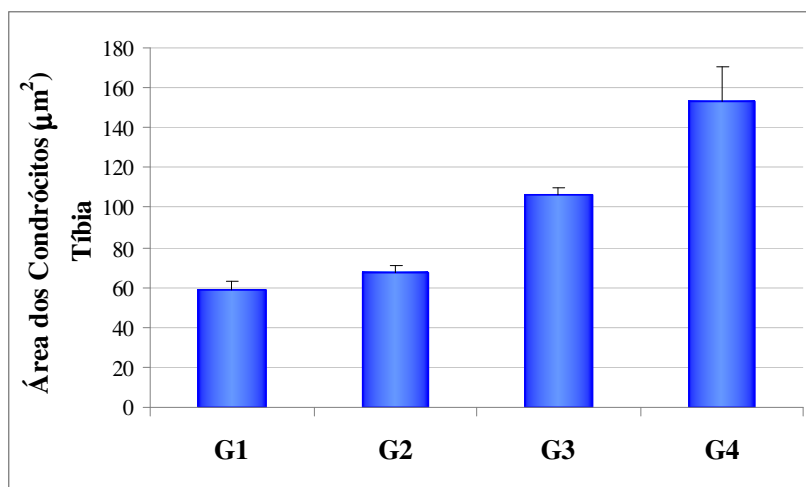
Tabela 4 - Médias das áreas (μm^2) dos condrócitos na tíbia, nos grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5)

Grupos	Médias das áreas
G1	58,7 \pm 4,5
G2	67,3 \pm 4,0
G3	106,6 \pm 3,6
G4	152,9 \pm 17,3

Fonte: (CAL ROSA, 2015)

Legenda: Média (\pm DP) das áreas dos condrócitos (μm^2) na tíbia, nos grupos G1, G2, G3 e G4.

Figura 23 - Representação gráfica das médias das áreas (μm^2) dos condrócitos na tíbia, nos grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5)

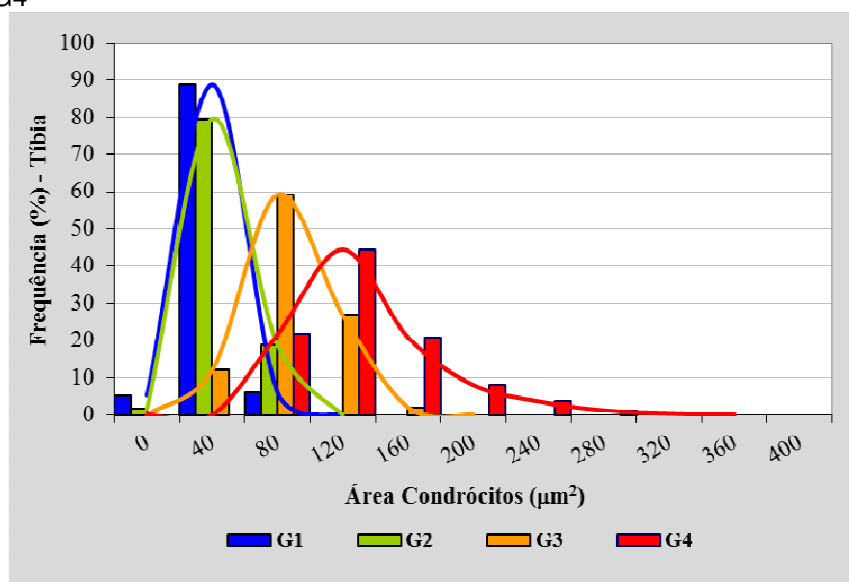


Fonte: (CAL ROSA, 2015)

Legenda: Média (\pm DP) das áreas dos condrócitos (μm^2) na tíbia, nos grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5).

A figura 24 a seguir apresenta a distribuição de frequência para a área dos condrócitos na tíbia, entre os grupos G1, G2, G3 e G4.

Figura 24 - Distribuição de frequência para área dos condrócitos na tíbia, entre os grupos G1, G2, G3 e G4



Fonte: (CAL ROSA, 2015)

Legenda: Distribuição de frequência para a área dos condrócitos (μm^2), na tíbia, nos grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5), gráficos de barra e linha (envoltória).

Observando-se a distribuição de frequência para a área dos condrócitos da tíbia, algumas inferências podem ser obtidas tomando-se o valor de área de $80 \mu\text{m}^2$ como referência, a saber:

- a) O grupo G1 apresentou uma concentração de valores entre 0 e 120 μm^2 , sendo que 94% dos condrócitos são menores que 80 μm^2 e apenas 6 % dos condrócitos são maiores que 80 μm^2 .
- b) No grupo G2 os valores se concentram entre 0 e 120 μm^2 , sendo que 81,2% dos condrócitos são menores que 80 μm^2 e 18,8 % dos condrócitos são maiores que 80 μm^2 .
- c) O grupo G3 apresentou uma concentração de valores entre 40 e 200 μm^2 , sendo que 12% dos condrócitos são menores que 80 μm^2 e 88 % dos condrócitos são maiores que 80 μm^2 .
- d) Já no grupo G4, a concentração de valores está compreendida entre 80 e 360 μm^2 , sendo que 100% dos condrócitos apresentam área maior que 80 μm^2 .

Desta forma, verifica-se nítida diferenciação entre, de um lado, os grupos G1 e G2 e, de outro, G3 e G4.

Visando a verificação de diferenças significativas entre todas as faixas etárias, apresenta-se a seguir a análise estatística não-paramétrica de Kruskal-Wallis para melhor caracterização do parâmetro.

5.1.4 Teste de Kruskal-Wallis para área dos condrócitos na tíbia

A figura 25 apresenta as posições de cada um dos 20 fetos dos grupos G1 à G4 dispostos de forma crescente segundo a área média de seus condrócitos.

Figura 25 - Posições dos fetos dispostos de forma crescente segundo a área dos condrócitos na tíbia

Posição	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Grupo	G1	G1	G1	G1	G2	G2	G1	G2	G2	G2	G3	G3	G3	G3	G3	G4	G4	G4	G4	G4
Área (μm^2)	55,3	56,0	56,4	59,7	61,8	65,0	66,1	67,8	69,7	72,2	103,0	104,0	105,8	108,5	111,8	135,2	138,2	151,9	162,5	176,9

Fonte: (CAL ROSA, 2015)

Legenda: Atribuição de postos para os fetos dos grupos G1 à G4 ordenados de forma crescente segundo a área dos condrócitos na tíbia.

Para o teste de Kruskal-Wallis são calculados os valores médios das posições encontradas para cada grupo, conforme apresentado na tabela 5 seguir:

Tabela 5 - Teste de Kruskal-Wallis - valores médios das posições encontradas para cada grupo segundo a área dos condrócitos na tíbia

Grupo	Tamanho da amostra	Posição média
G1	5	3,4
G2	5	7,6
G3	5	13
G4	5	18

Fonte: (CAL ROSA, 2015)

Legenda: Teste de Kruskal-Wallis - valores médios das posições encontradas para cada grupo segundo a área dos condrócitos na tíbia.

Para os dados estatísticos acima apresentados, o teste de Kruskal-Wallis apresentou $p=0,00060404$. Sendo $p < 0,05$, pode-se inferir, com 95% de nível de confiança estatística, que existe diferença significativa entre os grupos.

Na comparação entre cada um dos grupos, o teste de Kruskal-Wallis também apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os seguintes grupos:

- G1 \neq G2, $p < 0,05$
- G1 \neq G3, $p < 0,05$
- G1 \neq G4, $p < 0,05$
- G2 \neq G3, $p < 0,05$
- G2 \neq G4, $p < 0,05$
- G3 \neq G4, $p < 0,05$

Desta forma, no que se refere à área dos condrócitos na tíbia, temos $G1 < G2 < G3 < G4$, ou seja, quanto maior a faixa etária dos fetos, maior a área dos condrócitos na tíbia.

5.2 RESULTADOS QUANTITATIVOS: DENSIDADE DOS CONDRÓCITOS E DE MEC

Neste item serão apresentados os dados e análises estatísticas para os parâmetros densidade dos condrócitos e de MEC.

5.2.1 Dados da densidade dos condrócitos e da MEC no FÊMUR

Na tabela 6 e na figura 26 são apresentados os dados para o parâmetro densidade dos condrócitos e de matriz extracelular (MEC) entre os grupos.

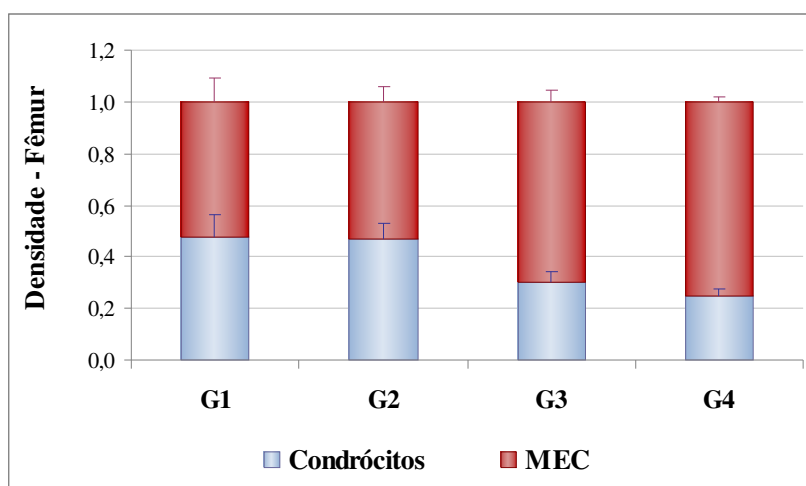
Tabela 6 – Densidade dos condrócitos e de matriz extracelular no fêmur para os grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5)

Grupos	Densidade - condrócitos (%)	Densidade - MEC (%)
G1	47,4 ± 9,2	52,6 ± 9,2
G2	46,8 ± 6,0	53,2 ± 6,0
G3	30,2 ± 4,3	69,8 ± 4,3
G4	25,1 ± 2,2	74,9 ± 2,2

Fonte: (CAL ROSA, 2015)

Legenda: Média (± DP) da densidade percentual dos condrócitos e de matriz extracelular no fêmur para os grupos G1, G2, G3 e G4.

Figura 26 - Densidade dos condrócitos e de matriz extracelular (MEC) no fêmur para os grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5)



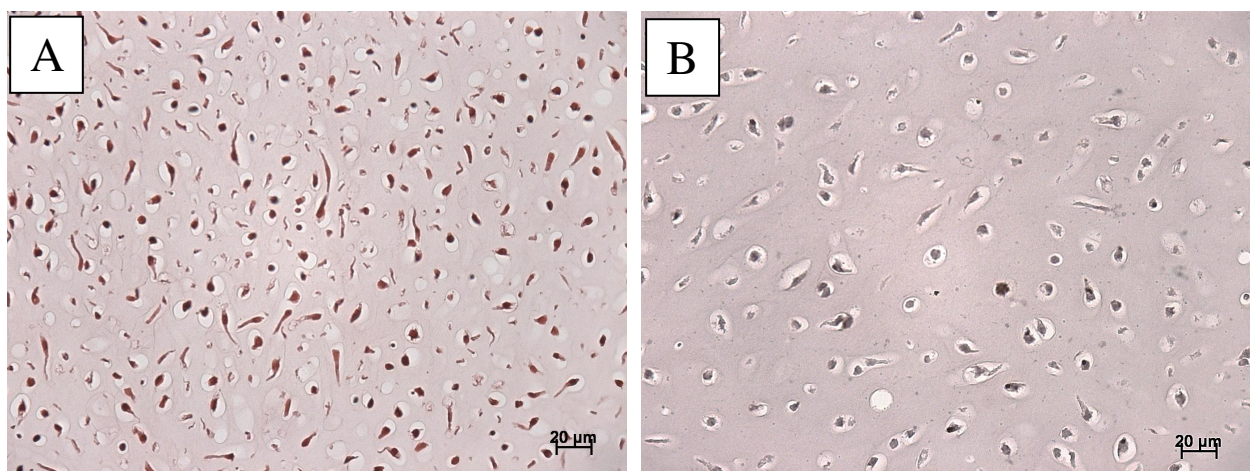
Fonte: (CAL ROSA, 2015)

Legenda: Densidade percentual dos condrócitos e de matriz extracelular (MEC) do fêmur entre os grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5).

No gráfico anterior é possível observar que a densidade de condrócitos diminui do grupo G1 ao grupo G4, ou seja, com o aumento da faixa etária e, em contrapartida, há um aumento da densidade de MEC.

Para ilustrar o resultado acima são apresentadas as fotomicrografias obtidas para os grupos G1 (menor faixa etária) e G4 (maior faixa etária) na figura 27 a seguir.

Figura 27 – Ilustração da densidade dos condrócitos e de matriz extracelular (MEC) do fêmur entre os grupos G1 e G4 através de fotomicrografias



Fonte: (CAL ROSA, 2015)

Legenda: Fotomicrografias ilustrando a nítida diferença na densidade dos condrócitos e de matriz extracelular (MEC) no fêmur, entre os grupos G1 (A) e G4 (B). Aumento: 40X. Técnica histológica utilizada: Safranina O.

Visando a verificação de diferenças significativas entre todas as faixas etárias, apresenta-se a seguir a análise estatística não-paramétrica de Kruskal-Wallis para melhor caracterização do parâmetro densidade de condrócitos.

5.2.2 Teste de Kruskal-Wallis para densidade de condrócitos no fêmur

Para o teste de Kruskal-Wallis são calculados os valores médios das posições encontradas para cada grupo, conforme apresentado na tabela 6 a seguir:

Tabela 7 - Teste de Kruskal-Wallis - valores médios das posições encontradas para cada grupo segundo a densidade dos condrócitos no fêmur

Grupo	Tamanho da amostra	Posição média
G1	5	15,4
G2	5	15,4
G3	5	7,6
G4	5	3,6

Fonte: (CAL ROSA, 2015)

Legenda: Teste de Kruskal-Wallis - valores médios das posições encontradas para cada grupo segundo a densidade dos condrócitos no fêmur.

Para os dados estatísticos acima apresentados, o teste de Kruskal-Wallis apresentou $p=0,000791777$. Sendo $p < 0,05$, pode-se inferir, com mais de 95% de nível de confiança estatística, que existe diferença significativa entre os grupos.

Na comparação entre cada um dos grupos, o teste de Kruskal-Wallis também apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os seguintes grupos:

- G1 \neq G3, $p < 0,05$
- G1 \neq G4, $p < 0,05$
- G2 \neq G3, $p < 0,05$
- G2 \neq G4, $p < 0,05$
- G3 \neq G4, $p < 0,05$

Verifica-se que o teste de Kruskal-Wallis não encontrou diferença significativa entre os grupos G1 e G2.

Desta forma, no que se refere à densidade dos condrócitos no fêmur, temos G1 e G2 $>$ G3 $>$ G4, ou seja, quanto maior a faixa etária dos fetos, menor a densidade dos condrócitos do fêmur, porém sem alteração significativa do parâmetro na passagem da faixa etária de G1 para G2.

Analogamente, tendo em vista o caráter complementar da densidade da MEC em relação à densidade dos condrócitos, temos G1 e G2 $<$ G3 $<$ G4, ou seja, quanto maior a faixa etária dos fetos, maior a densidade da MEC no fêmur.

5.2.3 Dados da densidade dos condrócitos e da MEC na tibia

Na tabela 8 e na figura 28 são apresentados os dados para o parâmetro densidade dos condrócitos e de matriz extracelular (MEC) entre os grupos.

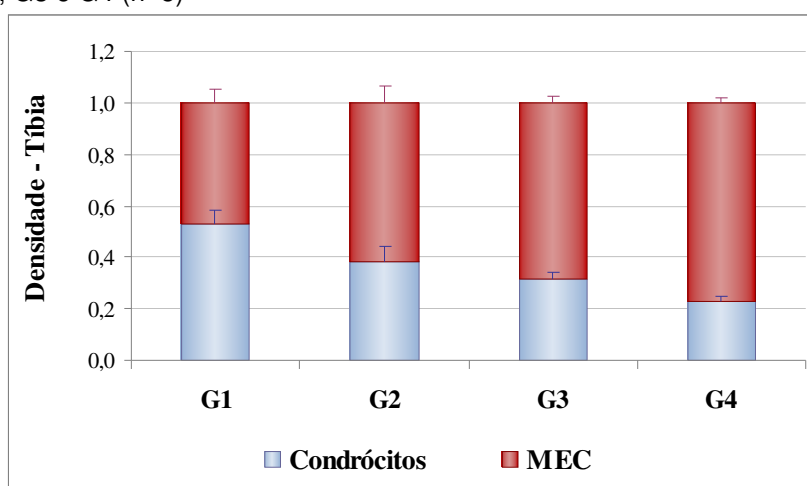
Tabela 8 – Densidade dos condrócitos e de matriz extracelular na tibia para os grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5)

Grupos	Densidade - condrócitos (%)	Densidade - MEC (%)
G1	52,9 ± 5,2	47,1 ± 5,2
G2	37,9 ± 6,3	62,1 ± 6,3
G3	31,5 ± 2,3	68,5 ± 2,3
G4	23,0 ± 1,9	77,0 ± 1,9

Fonte: (CAL ROSA, 2015)

Legenda: Média (± DP) da densidade percentual dos condrócitos e de matriz extracelular na tibia para os grupos G1, G2, G3 e G4.

Figura 28 - Densidade dos condrócitos e de matriz extracelular (MEC) na tibia entre os grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5)



Fonte: (CAL ROSA, 2015)

Legenda: Densidade dos condrócitos e de matriz extracelular (MEC) na tibia entre os grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5).

No gráfico anterior é possível observar que a densidade de condrócitos diminui do grupo G1 ao grupo G4, ou seja, com o aumento da faixa etária e, em contrapartida, há um aumento da densidade de MEC.

Visando a verificação de diferenças significativas entre todas as faixas etárias, apresenta-se a seguir a análise estatística não-paramétrica de Kruskal-Wallis para melhor caracterização do parâmetro densidade de condrócitos.

5.2.4 Teste de Kruskal-Wallis para densidade de condrócitos na tíbia

Para o teste de Kruskal-Wallis são calculados os valores médios das posições encontradas para cada grupo, conforme apresentado na tabela 9 a seguir:

Tabela 9 - Teste de Kruskal-Wallis - valores médios das posições encontradas para cada grupo segundo a densidade dos condrócitos na tíbia

Grupo	Tamanho da amostra	Posição média
G1	5	17,6
G2	5	13
G3	5	8,4
G4	5	3

Fonte: (CAL ROSA, 2015)

Legenda: Teste de Kruskal-Wallis - valores médios das posições encontradas para cada grupo segundo a densidade dos condrócitos na tíbia.

Para os dados estatísticos acima apresentados, o teste de Kruskal-Wallis apresentou $p=0,000791777$. Sendo $p < 0,05$, pode-se inferir, com 95% de nível de confiança estatística, que existe diferença significativa entre os grupos.

Na comparação entre cada um dos grupos, o teste de Kruskal-Wallis também apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os seguintes grupos:

- G1 \neq G2, $p < 0,05$
- G1 \neq G3, $p < 0,05$
- G1 \neq G4, $p < 0,05$
- G2 \neq G3, $p < 0,05$

- $G2 \neq G4$, $p < 0,05$
- $G3 \neq G4$, $p < 0,05$

Desta forma, no que se refere à densidade dos condrócitos da tíbia, temos $G1 > G2 > G3 > G4$, ou seja, quanto maior a faixa etária dos fetos, menor a densidade dos condrócitos da tíbia.

Analogamente, tendo em vista o caráter complementar da densidade da MEC em relação à densidade dos condrócitos, temos $G1 < G2 < G3 < G4$, ou seja, quanto maior a faixa etária dos fetos, maior a densidade da MEC na tíbia.

5.3 RESULTADOS QUANTITATIVOS: VOLUME DOS CONDRÓCITOS (MÉTODO DO NUCLEATOR)

Neste item serão apresentados os dados e análises estatísticas para o parâmetro volume dos condrócitos.

5.3.1 Dados de volume dos condrócitos no fêmur

Após aplicação do método estereológico do Nucleator, foram obtidos os dados relativos aos grupos G1, G2, G3 e G4 apresentado na tabela 10 a seguir.

Tabela 10 - Médias dos volumes dos condrócitos no fêmur, nos grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5).

Grupos	Volume dos condrócitos
G1	8.194,06 \pm 1.277,68
G2	10.684,13 \pm 897,71
G3	15.645,74 \pm 3.569,48
G4	30.795,69 \pm 4.894,41

Fonte: (CAL ROSA, 2015)

Legenda: Médias (\pm DP) dos volumes (μm^3) dos condrócitos no fêmur, nos grupos G1, G2, G3 e G4.

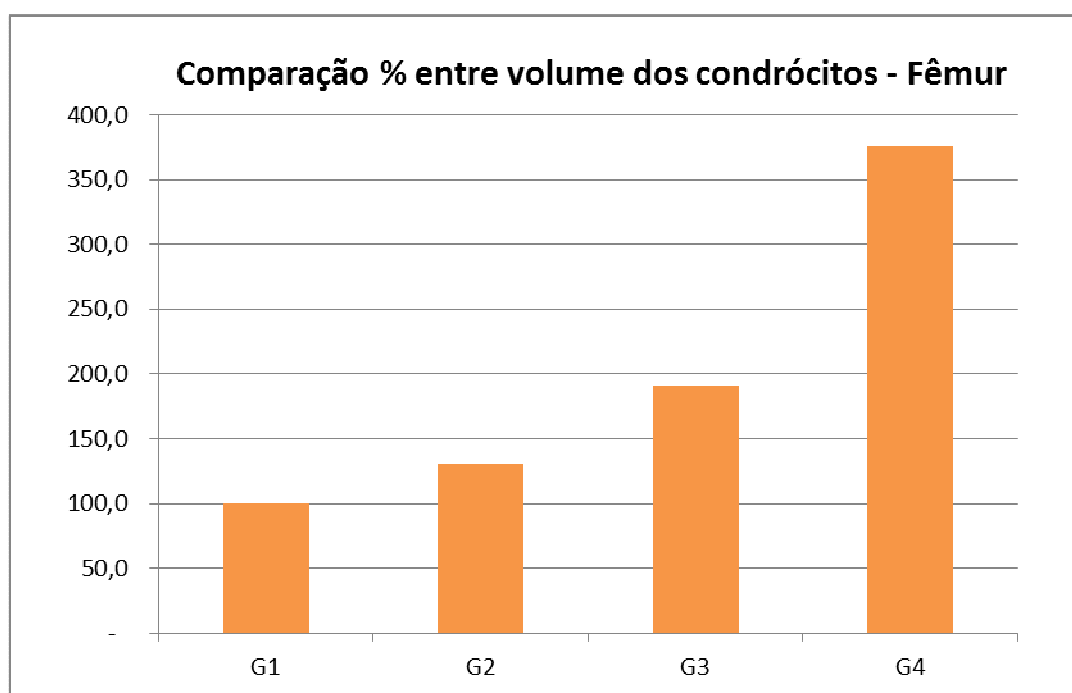
Nota-se, pelos dados apresentados, que a média do volume dos condrócitos do fêmur aumenta com o avançar da idade.

Tomando-se o grupo G1 (menor faixa etária) como base, verificam-se as seguintes alterações de volume dos condrócitos do fêmur:

- Aumento de 30% no volume médio de G2 em relação ao de G1
- Aumento de 91% no volume médio de G3 em relação ao de G1
- Aumento de 276% no volume médio de G4 em relação ao de G1

Estas variações de volume podem ser observadas no gráfico na figura 29 a seguir, a qual apresenta a comparação percentual do volume dos condrócitos tomando o grupo G1 (menor faixa etária) como base (100%).

Figura 29 - Comparação percentual no volume dos condrócitos do fêmur entre os grupos G1, G2, G3 e G4



Fonte: (CAL ROSA, 2015)

Legenda: Comparação percentual dos volumes dos condrócitos no fêmur, nos grupos G1, G2, G3 e G4, onde G1 é tomado como base (100%).

Visando a verificação de diferenças significativas entre todas as faixas etárias, apresenta-se a seguir a análise estatística não-paramétrica de Kruskal-Wallis para melhor caracterização do parâmetro.

5.3.2 Teste de Kruskal-Wallis para volume dos condrócitos no fêmur

Para o teste de Kruskal-Wallis são calculados os valores médios das posições encontradas para cada grupo, conforme apresentado na tabela 11 a seguir:

Tabela 11 - Teste de Kruskal-Wallis - valores médios das posições encontradas para cada grupo segundo o volume dos condrócitos no fêmur

Grupo	Tamanho da amostra	Posição média
G1	5	3,2
G2	5	7,8
G3	5	13,0
G4	5	18,0

Fonte: (CAL ROSA, 2015)

Legenda: Teste de Kruskal-Wallis - valores médios das posições encontradas para cada grupo segundo o volume dos condrócitos no fêmur.

Para os dados estatísticos acima apresentados, o teste de Kruskal-Wallis apresentou $p=0,000536152$. Sendo $p < 0,05$, pode-se inferir, com 95% de nível de confiança estatística, que existe diferença significativa entre os grupos.

Na comparação entre cada um dos grupos, o teste de Kruskal-Wallis também apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os seguintes grupos:

- G1 \neq G2, $p < 0,05$
- G1 \neq G3, $p < 0,05$
- G1 \neq G4, $p < 0,05$
- G2 \neq G4, $p < 0,05$
- G3 \neq G4, $p < 0,05$

Desta forma, no que se refere ao volume dos condrócitos no fêmur, temos $G1 < (G2 \text{ e } G3) < G4$, ou seja, quanto maior a faixa etária dos fetos, maior o volume dos condrócitos do fêmur.

5.3.3 Dados de volume dos condrócitos na tíbia

Após aplicação do método estereológico do Nucleator, foram obtidos os dados relativos aos grupos G1, G2, G3 e G4 apresentado na tabela 12 a seguir.

Tabela 12 - Médias dos volumes dos condrócitos na tíbia, nos grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5)

Grupos	Volume dos condrócitos
1	7.681,73 ± 726,92
2	12.883,83 ± 3229,76
3	19.195,01 ± 2359,97
4	30.547,29 ± 6855,94

Fonte: (CAL ROSA, 2015)

Legenda: Médias (\pm DP) dos volumes (μm^3) dos condrócitos na tíbia, nos grupos G1, G2, G3 e G4.

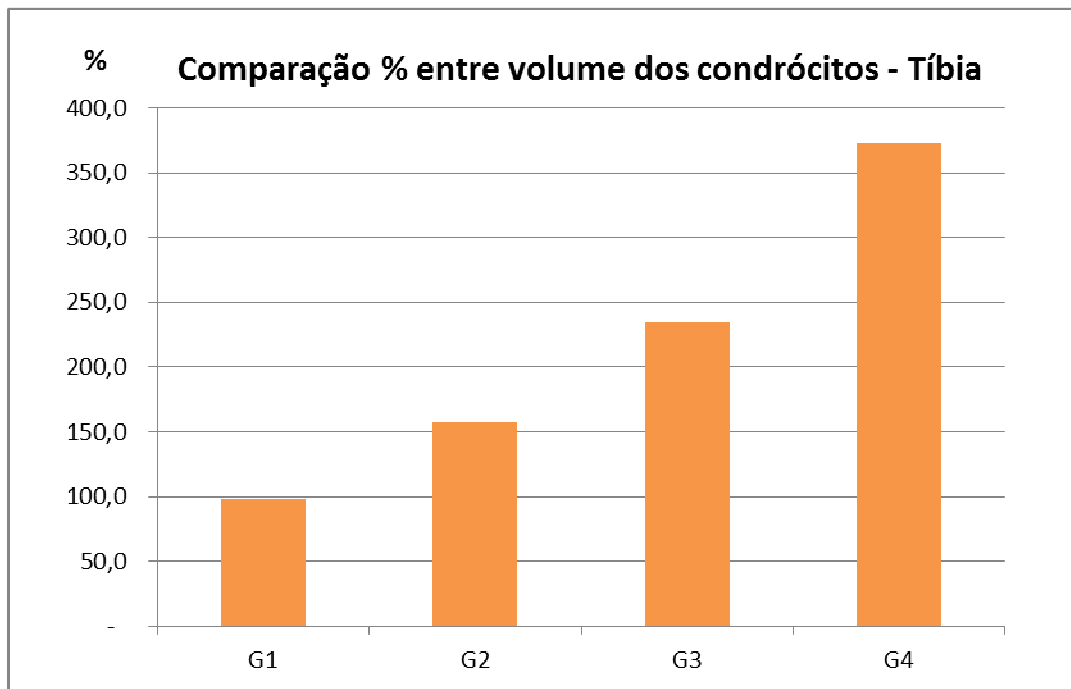
Nota-se, pelos dados apresentados, que a média do volume dos condrócitos da tíbia aumenta com o avançar da idade.

Tomando-se o grupo G1 (menor faixa etária) como base, verificam-se as seguintes alterações de volume dos condrócitos da tíbia:

- Aumento de 61% no volume médio de G2 em relação ao de G1
- Aumento de 140% no volume médio de G3 em relação ao de G1
- Aumento de 281% no volume médio de G4 em relação ao de G1

Estas variações de volume podem ser observadas no gráfico na figura 30 a seguir, a qual apresenta a comparação percentual do volume dos condrócitos tomando o grupo G1 (menor faixa etária) como base (100%).

Figura 30 - Comparação percentual no volume dos condrócitos da tíbia entre os grupos G1, G2, G3 e G4



Fonte: (CAL ROSA, 2015)

Legenda: Comparação percentual dos volumes dos condrócitos na tíbia, nos grupos G1, G2, G3 e G4, onde G1 é tomado como base (100%).

Visando a verificação de diferenças significativas entre todas as faixas etárias, apresenta-se a seguir a análise estatística não-paramétrica de Kruskal-Wallis para melhor caracterização do parâmetro.

5.3.4 Teste de Kruskal-Wallis para volume dos condrócitos na tíbia

Para o teste de Kruskal-Wallis são calculados os valores médios das posições encontradas para cada grupo, conforme apresentado na tabela 13 a seguir:

Tabela 13 - Teste de Kruskal-Wallis - valores médios das posições encontradas para cada grupo segundo o volume dos condrócitos na tíbia

Grupo	Tamanho da amostra	Posição média
G1	5	3,0
G2	5	8,4
G3	5	12,6
G4	5	18,0

Fonte: (CAL ROSA, 2015)

Legenda: Teste de Kruskal-Wallis - valores médios das posições encontradas para cada grupo segundo o volume dos condrócitos na tíbia.

Para os dados estatísticos acima apresentados, o teste de Kruskal-Wallis apresentou $p=0,000600318$. Sendo $p < 0,05$, pode-se inferir, com 95% de nível de confiança estatística, que existe diferença significativa entre os grupos.

Na comparação entre cada um dos grupos, o teste de Kruskal-Wallis também apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os seguintes grupos:

- G1 \neq G2, $p < 0,05$
- G1 \neq G3, $p < 0,05$
- G1 \neq G4, $p < 0,05$
- G2 \neq G3, $p < 0,05$
- G2 \neq G4, $p < 0,05$
- G3 \neq G4, $p < 0,05$

Desta forma, no que se refere ao volume dos condrócitos da tíbia, temos $G1 < G2 < G3 < G4$, ou seja, quanto maior a faixa etária dos fetos, maior o volume dos condrócitos na tíbia.

5.4 RESULTADOS QUALITATIVOS

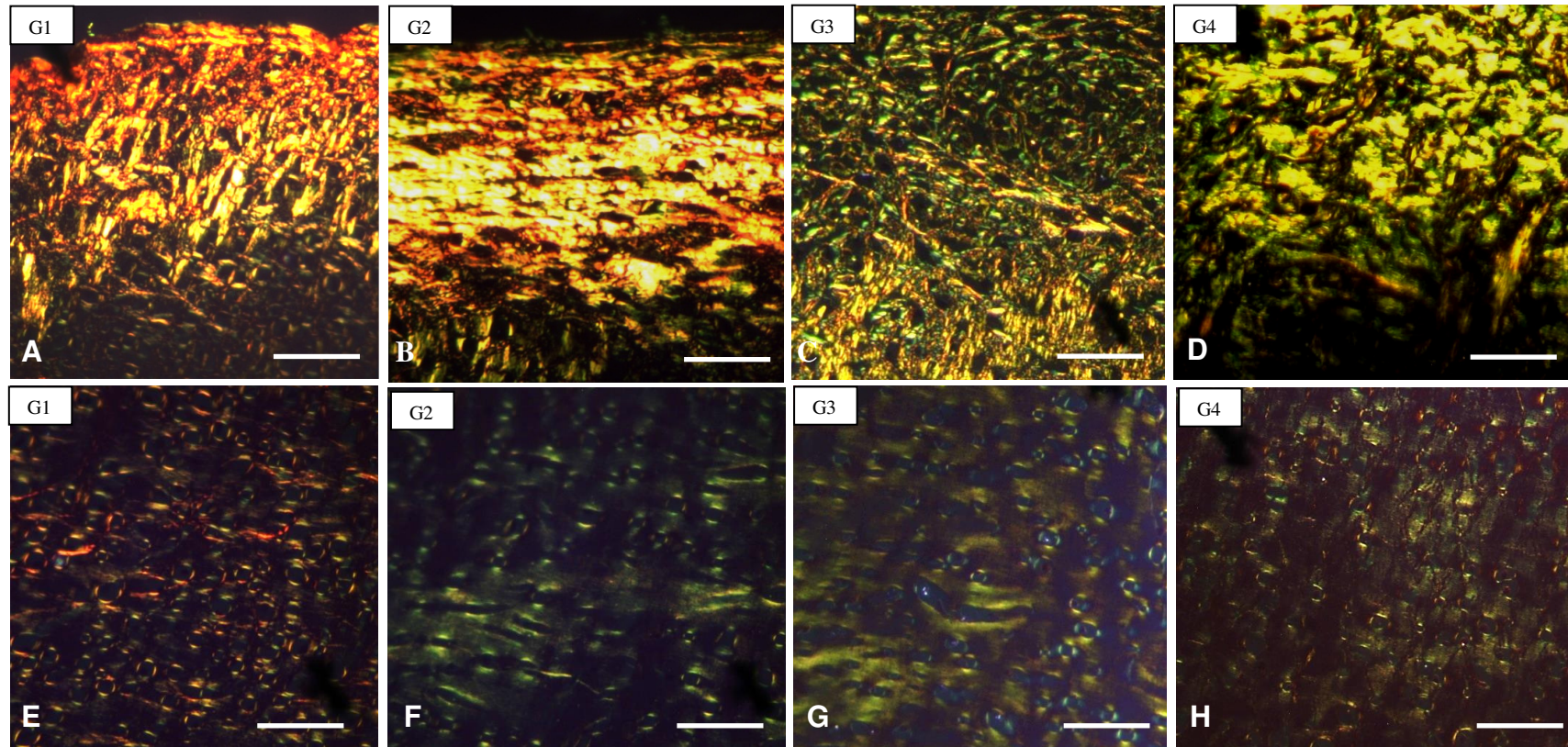
Neste item são apresentados os resultados qualitativos referentes a tipos e organização de fibras colágenas e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

5.4.1 Análise de fibras colágenas

Com o uso da coloração com Picro-sirius analisada sob luz polarizada verificou-se, inicialmente, os aspectos característicos que permitiram diferenciar cada grupo, no que se refere à organização, orientação e os tipos predominantes de fibras colágenas.

Assim, ao se avaliar a **camada superficial da epífise**, tanto do fêmur como da tíbia, em G1 o predomínio foi de fibras do tipo I (vermelha, laranja, amarela) orientadas em malha espessa e irregular; já em G2 verificou-se que as fibras do tipo I exibiram um padrão de orientação transversal, organizadas de forma compacta. Os fetos de G3 caracterizaram-se por exibir uma grande quantidade de fibras do tipo III (verdes) entremeadas a fibras delgadas do tipo I, todas formando uma malha de aspecto irregular. Nos fetos mais velhos (G4), as fibras espessas do tipo I foram predominantes, organizando-se nitidamente em uma malha pantográfica (Figura 31 A-D).

Figura 31 - Representação das camadas superficial e média da cartilagem da epífise do fêmur, nos diferentes grupos



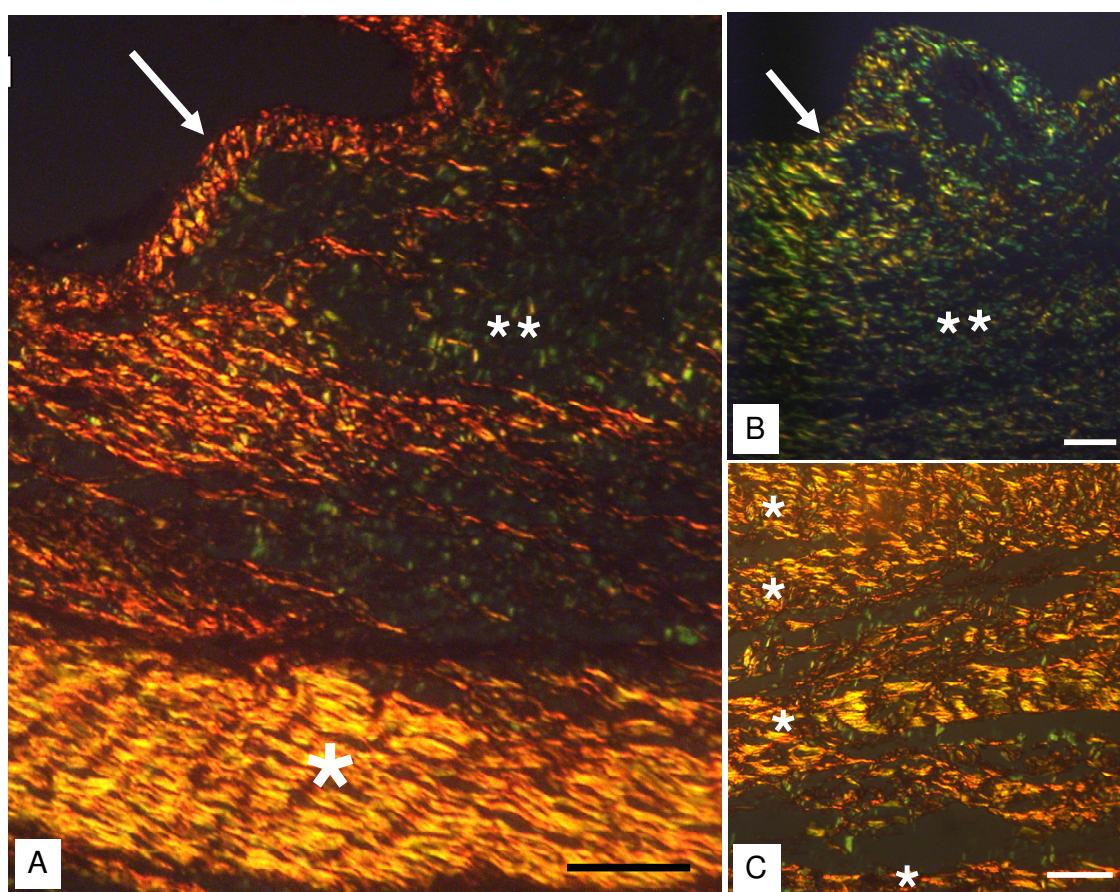
Fonte: (CAL ROSA, 2015).

Legenda: Representação da camada superficial da cartilagem na epífise (A-D) e da camada média da cartilagem na epífise (E-H), nos grupos G1, G2, G3 e G4. Técnica histológica utilizada: Picro-sirius analisada sob luz polarizada. Barra de calibração: 50 μ m.

Na região média da cartilagem dos ossos aqui avaliados (fêmur e tibia) o predomínio foi de fibras colágenas do tipo II (azuladas ou esverdeadas), em todos os grupos. A principal diferença foi em G1, onde entremeado a essas fibras, detectou-se a presença de fibras do tipo I (Figura 31 E-H).

Relativamente à disposição dessas fibras nos constituintes da **cápsula articular** (camadas fibrosa e sinovial), foram detectadas diferenças expressivas entre os dois extremos, ou seja, os grupos 1 e 4. (Figura 32).

Figura 32 - Representação do tipo e disposição das fibras colágenas na cápsula articular (camadas fibrosa e sinovial), nos grupos G1 e G4

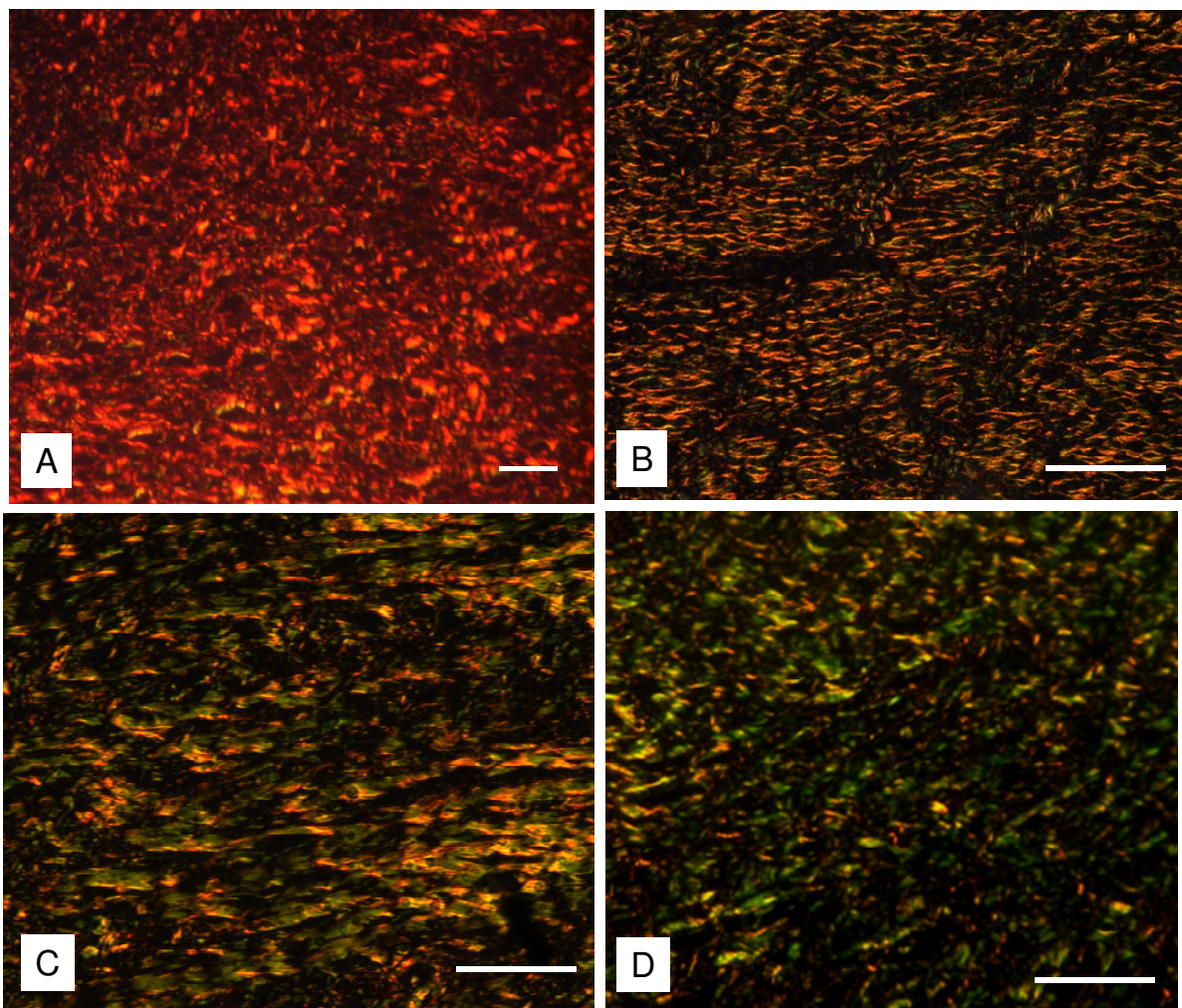


Fonte: (CAL ROSA, 2015).

Legenda: Representação do tipo e disposição das fibras colágenas na cápsula articular dos fetos dos grupos 1 (A) e 4 (B, C). Notar a membrana fibrosa única no grupo 1, e em camadas sobrepostas nos fetos do grupo 4 (*), e a membrana sinovial (**setas**) exibindo uma camada limitante formada por fibras do tipo I no grupo 1, e do tipo III no grupo 4. Em ambos os grupos, o tecido conjuntivo frouxo internamente à membrana sinovial, está formado por fibras do tipo III (**). Técnica histológica utilizada: Picro-sirius analisada sob luz polarizada. Barra de calibração: 50µm.

Nos **meniscos**, verificou-se que as fibras colágenas do tipo I predominaram em G1 e G2; fibras do tipo III foram observadas em G3 e G4, entremeadas às fibras do tipo I (Figura 33).

Figura 33 - Representação do tipo de fibras colágenas no menisco nos diferentes grupos (G1 a G4)



Fonte: (CAL ROSA, 2015).

Legenda: Representação do tipo de fibras colágenas no menisco dos fetos dos grupos **G1 (A) e G2 (B)**, com predominância de fibras do tipo I e, nos grupos **G3 (C) e G4 (D)** notar fibras do tipo III, entremeadas às fibras do tipo I. Técnica histológica utilizada: Picro-sirius analisada sob luz polarizada. Barra de calibração: A: 20 μm , B, C, D: 50 μm .

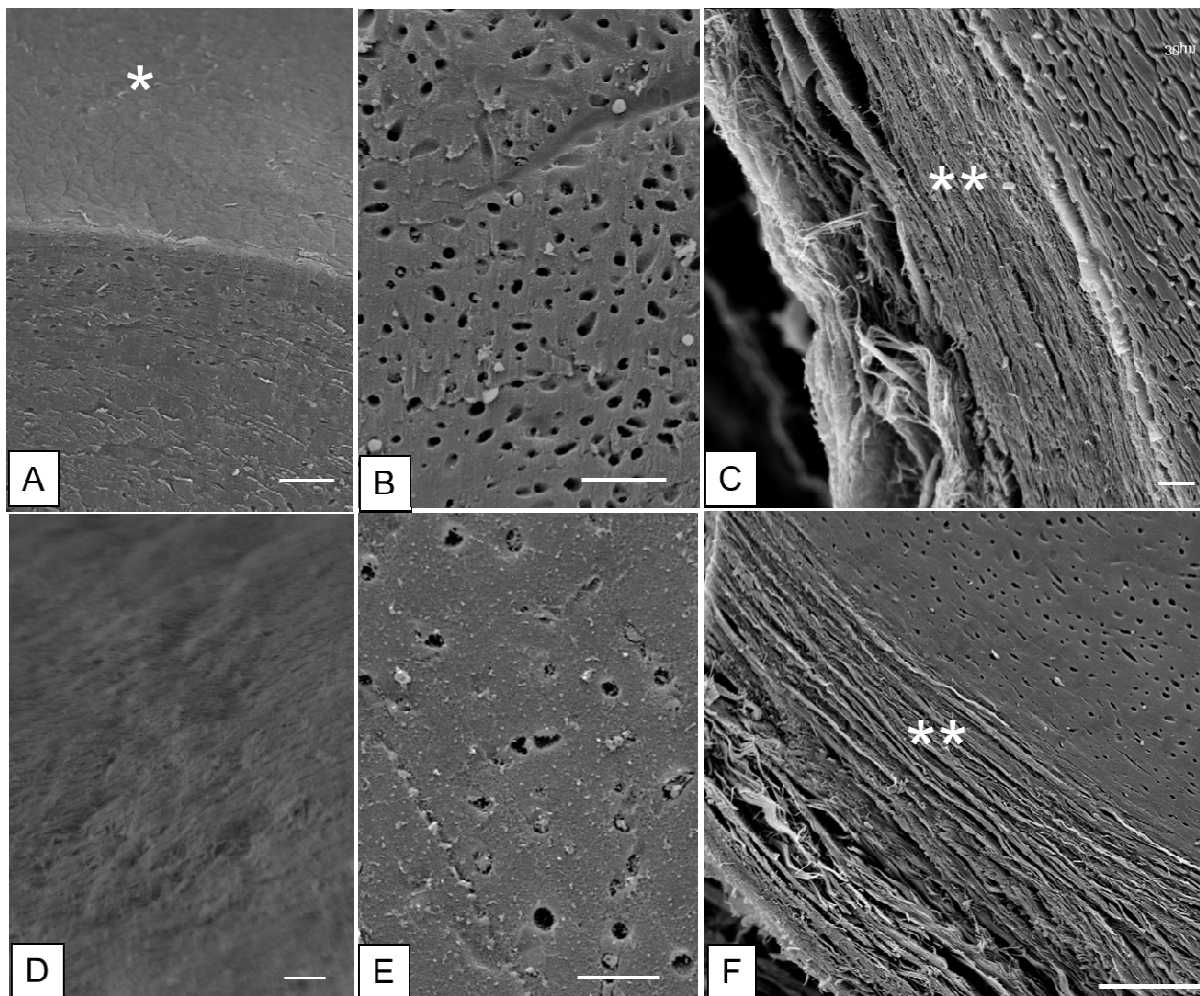
5.4.2 Análise com uso de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Também aqui, cabe a distinção entre os fetos mais jovens (G1) e os mais velhos (G4), uma vez que nos demais grupos (G2 e G3) não foram notadas diferenças significativas quanto ao aspecto tridimensional. No geral, em ambos os grupos, notou-se a presença de uma superfície articular irregular que, em maior aumento, demonstrou um aspecto poroso, provavelmente para permitir a difusão do líquido sinovial (Figura 34 A, D).

Ao se avaliar a parte média da cartilagem, em ambos os ossos, foi nítida a diferença de densidade dos condrócitos, verificada em G1 e G4 (Figura 34 B, E). Em G1 observa-se uma maior densidade de condrócitos em comparação a G4.

Relativamente à cápsula articular, além da maior espessura em G4, deve-se ressaltar a disposição das camadas, delgadas e compactadas em G1, espessas e mais afastadas entre si em G4 (Figura 34 C, F).

Figura 34 - Eletromicrografia de varredura de superfície articular, parte média da cartilagem e cápsula articular, nos grupos representativos (G1 e G4)



Fonte: (CAL ROSA, 2015).

Legenda: Superfície articular (*) do fêmur (A) e, em maior aumento (D), demonstrando um aspecto poroso, em feto do G4. Parte média da cartilagem (B e E), onde é observada a diferença de densidade dos condrócitos. Observa-se maior densidade de condrócitos em G1 (B) e uma menor densidade em G4 (E). Aspecto da cápsula articular, com camadas (***) delgadas e compactadas em G1 (C) e espessas e mais afastadas entre si em G4 (F). Barra de calibração: A, B, C, E - 30µm; D - 3 µm; F - 100µm.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Visando uma melhor compreensão das discussões propostas e aderência ao formato dos resultados apresentados nesta pesquisa, optou-se por dividir a discussão em duas partes. A primeira considera a morfometria e a estereologia dos condrócitos e da MEC, procurando-se inferir correlações com alterações ocorridas no tecido e com os aspectos funcionais da cartilagem presente nas epífises do fêmur e tíbia durante o desenvolvimento de fetos humanos. Na segunda parte são desenvolvidas considerações sobre os aspectos qualitativos encontrados nos componentes da articulação do joelho.

6.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE A MORFOMETRIA E ESTEREOLOGIA DOS CONDRÓCITOS E MEC DA CARTILAGEM PRESENTE NAS EPÍFISES DO FÊMUR E TÍBIA EM FETOS HUMANOS

A importância das características da população de condrócitos na cartilagem, para o crescimento, reparação, manutenção de uma superfície resistente ao desgaste e manutenção da capacidade de suportar cargas, ainda necessita ser totalmente elucidada (JADIN et al., 2005).

Um dos resultados obtidos na análise morfométrica da cartilagem nas epífises do fêmur e tíbia, relacionado a uma importante característica da população de condrócitos neste tecido, é a variação da densidade percentual dos condrócitos e da MEC nos diferentes grupos de fetos pesquisados. Esta característica também foi observada nos resultados qualitativos com uso da MEV.

Nos resultados estatísticos para estes parâmetros, tanto no fêmur quanto na tíbia, verificou-se diferença significativa entre os grupos e a constatação de que, de um lado, a densidade dos condrócitos diminui com o avançar da faixa etária e, de outro, a densidade da MEC aumenta. No caso do fêmur, verificou-se que a densidade dos condrócitos passa de aproximadamente 47% no grupo G1 para apenas 25% no grupo G4. Em relação à tíbia, de forma semelhante, a densidade

dos condrócitos passa de aproximadamente 53% no grupo G1 para apenas 23% no grupo G4.

Do ponto de vista morfofuncional, uma correlação pode ser obtida comparando-se aspectos histológicos e morfológicos com as características e funcionalidades do tecido durante seu desenvolvimento e, para tanto, torna-se necessário conhecer a sequência precisa dos eventos histológicos e quando ocorrem (RIVAS; SHAPIRO, 2002).

Desta forma, verifica-se que o amadurecimento do tecido cartilágneo ocorrido durante o desenvolvimento dos fetos, particularmente na região das epífises estudadas, está relacionado com as alterações na organização do tecido cartilágneo tornando os condrócitos mais esparsos. Esta afirmação encontra apoio nas descrições dos autores a seguir.

Em seus estudos sobre maturação da cartilagem e diferenciação de condrócitos, Chen et al. (1995) constataram que o desenvolvimento temporal dos condrócitos pode ser dividido em três estágios, os quais se relacionam com as diferentes zonas de uma cartilagem: proliferação, maturação e hipertrofia, ordenadas da mais superficial para a mais profunda. No estágio inicial de seu processo de diferenciação, os condrócitos se organizavam densamente, como aqueles presentes na zona de proliferação, enquanto que no segundo estágio, equivalente à zona de maturação da cartilagem, os condrócitos se apresentavam mais distantes uns dos outros.

Jadin et al. (2005), pesquisando sobre a densidade e organização de condrócitos na cartilagem articular imatura e madura em bovinos, verificaram que para uma mesma profundidade do tecido, na cartilagem imatura, obtida de feto bovino, existe maior proximidade entre os condrócitos se comparada com os tecidos cartilágneos mais maduros obtidos de bezerro e bovino adulto.

Nas pesquisas de Hillel et al. (2009), análises histomorfométricas foram realizadas em condrócitos da cartilagem humana de feto (15 semanas VIU), de adulto e da cartilagem artificial desenvolvida no âmbito da pesquisa. Segundo os autores, na tentativa de se obter um tecido artificial com características semelhantes ao tecido fetal, compararam os tecidos fetal, adulto e artificial e, dentre os resultados obtidos, a densidade dos condrócitos (área de condrócitos / área total) no tecido fetal

apresentou valor médio aproximadamente 4 vezes maior que a densidade no tecido adulto, sendo que a cartilagem artificial apresentou um valor intermediário.

Neste contexto, uma correlação pertinente poderia ser obtida comparando-se os resultados sobre densidade de condrócitos, variando com as diferentes faixas etárias dos grupos, e a diferença no poder de reparação entre tecidos cartilagíneos imaturos e maduros.

Segundo Namba et al. (1998), em seu trabalho sobre a investigação da capacidade de reparação da cartilagem articular fetal em cordeiros, os tecidos cartilagíneos imaturos possuem melhor capacidade de reparação se comparado aos tecidos cartilagíneos mais maduros. Além disso, a cartilagem articular já madura rege-se com dificuldade de lesões e, frequentemente, de modo incompleto (NAMBA et al., 1998).

De acordo com Temenoff e Mikos (2000), dentre as técnicas utilizadas para reparação de lesões na cartilagem articular, destacam-se aquelas que, através de transplante de condrócitos e células tronco mesenquimais, procuram melhorar as propriedades regenerativas do tecido, intrínseca de cartilagens imaturas.

Assim, pode-se inferir que a maior densidade de condrócitos encontrada na cartilagem da epífise do fêmur e da tíbia dos fetos mais jovens, está relacionada com o maior poder de reparação desta cartilagem imatura, que depende de tal característica para seu crescimento e diferenciação (HILLEL et al., 2009), ao contrario da cartilagem dos fetos de maior faixa etária aqui estudados, que apresentam condrócitos mais distanciados e esparsos e com uma densidade maior de MEC, caminhando para um tecido cartilagíneo típico de uma zona de maturação.

Nas discussões de Jadin et al. (2005), sobre a cartilagem articular de bovinos, também é inferido que o poder de reparação dos tecidos cartilagíneos imaturos se deve à maior proximidade dos núcleos celulares de condrócitos vizinhos, enquanto que para a cartilagem madura, que apresenta maior parte de seus condrócitos relativamente esparsos, pode ser crítico manter a homeostasia normal da articulação, uma vez que com o aumento da distância entre as células, algumas regiões do tecido sofrem declínio no metabolismo da matriz (QUINN et al., 1999; ALEXOPOULOS et al., 2009).

Assim, se, de um lado, a densidade dos condrócitos é menor nos fetos mais jovens comparada com a densidade naqueles mais velhos, de outro, a densidade da

MEC aumenta com o avançar das faixas etárias, o que corrobora com o descrito por Jadin et al. (2005), que, dentre outros resultados, também verificaram o distanciamento dos condrócitos, concomitantemente ao preenchimento dos espaços pela MEC, durante o amadurecimento do tecido cartilágneo do feto bovino para o bezerro e para o indivíduo adulto.

O amadurecimento da cartilagem que ocorre nos grupos G1, G2, G3 e G4 e a progressiva variação na organização dos condrócitos e da MEC, permite inferir que esta nova organização contribui para a obtenção das propriedades requeridas para a cartilagem em cada fase de seu desenvolvimento, tais como a resistência à compressão (TEMENOFF; MIKOS, 2000; WILLIAMSON et al., 2003) e a habilidade para distribuir cargas (COHEN; FOSTER; MOW, 1998; BUCKWALTER; MANKIN, 1998; MURPHY et al., 1999).

A maior densidade de MEC encontrada na cartilagem dos grupos de maior faixa etária se traduz em uma maior quantidade de colágeno de tipo II, quando comparada aos grupos mais jovens. Este colágeno, disposto numa forma de rede fibrilar, provê as características de resistência à tensão e compressão (BUCKWALTER; MANKIN, 1998) e esta característica contribui para que a cartilagem suporte o aumento das pressões na articulação durante o desenvolvimento do feto e após o nascimento, com a sustentação do peso do corpo e esforços na articulação (WHITING; ZERNICKE, 1998). De fato, Murphy et al. (1999), focando seus estudos nas alterações da matriz que ocorrem durante a maturação da cartilagem articular, afirmam que esta é exposta a forças mecânicas ainda dentro do útero e que o suporte de carga é aumentado no período neonatal.

No contexto das transformações que ocorrem no interior da cartilagem, além daquelas observadas na densidade de condrócitos e MEC, outro parâmetro estudado, a área dos condrócitos, também apresentou diferenças para cada faixa etária.

Pode-se observar, pelos resultados estatísticos obtidos na análise morfométrica da área dos condrócitos no fêmur e na tíbia dos diferentes grupos de fetos, que houve aumento da área com o avançar das faixas etárias. O aumento da área dos condrócitos e a sua correlação direta com o amadurecimento dos fetos também puderam ser verificados pela análise de distribuição de frequência das áreas de condrócitos nas epífises desses ossos.

Segundo Chen et al. (1995), os condrócitos da cartilagem, durante a formação do osso endocondral, amadurecem e progridem ao longo do tempo segundo um programa de diferenciação regulado, antes de serem substituídos por osso. No que diz respeito ao tamanho dos condrócitos, em seu estágio inicial de diferenciação, os condrócitos são menores se comparados com os estágios seguintes. No terceiro estágio, de hipertrofia, os condrócitos encontrados haviam crescido dramaticamente, enquanto que no segundo estágio, o de maturação, os condrócitos possuíam tamanho intermediário.

Esta diferenciação temporal dos condrócitos também é mencionada por Van der Kraan e Van den Berg (2012), que consideram dois tipos de cartilagem hialina: a temporária e a permanente, sendo que a primeira, encontrada nos estágios iniciais de ossos de natureza endocondral, será, por fim, substituída pelo osso. Já a cartilagem permanente, presente nas cartilagens articulares, não sofre diferenciação terminal em condições normais. Segundo os autores, a origem celular tanto de uma como da outra é semelhante, porém a rota padrão de diferenciação dos condrócitos na cartilagem temporária é a hipertrofia.

Vale dizer que a região de condrócitos estudada está situada na parte média das epífises, tanto no fêmur quanto na tíbia, nas quais, particularmente durante o período fetal, ainda não se pode diferenciar áreas de cartilagem permanente e temporária, pois trata-se ainda de uma região relativamente homogênea, com organização celular típica de tecidos imaturos (NAMBA et al., 1998) onde se desenvolverá o centro de ossificação secundário da epífise.

Desta forma, pode-se inferir que uma parcela dos condrócitos esteja se diferenciando e preparando esta região da epífise para a ossificação, ou seja, com o avançar da faixa etária dos fetos, a região está sendo tomada por condrócitos cada vez mais maduros, que estão crescendo em tamanho como os condrócitos presentes em zonas de maturação, seguindo uma trajetória de hipertrofia (VAN DER KRAAN; VAN DEN BERG, 2012), o que está de acordo com Hojo et al. (2010), ao afirmarem que os condrócitos hipertróficos por desempenharem um papel essencial no processo de ossificação endocondral, cronologicamente, aparecem antes da formação óssea que, espacialmente, ocorre nas adjacências de condrócitos hipertróficos.

O estudo estereológico para o volume dos condrócitos também pode ser utilizado para auxiliar na interpretação sobre a correlação entre a evolução no tamanho dos condrócitos e as faixas etárias dos fetos (HUNZIKER; QUINN; HAUSELMANN, 2002). Através da metodologia empregada (nucleator), foi possível observar alterações no volume dos condrócitos nos diferentes grupos, que aumenta com o avançar da idade. Entretanto, a explicação para o grande crescimento ocorrido especialmente na passagem da faixa etária do grupo G3 (24 à 27 semanas VIU) para o grupo G4 (28 à 31 semanas VIU) pode encontrar fundamento nas teorias a seguir.

Uma possível inferência para este salto no volume dos condrócitos, quando na comparação entre os grupos G3 e G4, provavelmente encontra-se na correlação com os acontecimentos que ocorrem na cartilagem durante este período da VIU.

Segundo Nemeč et al. (2013), os ossos longos dos fetos humanos, em especial suas epífises, são sujeitos a várias alterações ainda dentro do útero. Nesse trabalho, através da análise de imagens de ressonância magnética em 253 fetos com faixa etária entre 19 e 35 semanas VIU, verificaram que nas primeiras semanas a epífise era formada apenas por cartilagem, e que somente na 29^a semana verificou-se um percentual considerável (25%) de espécimes com centros de ossificação secundária nas epífises distais de cada fêmur. É interessante notar que a observação desses centros de ossificação na 29^a semana acontece no mesmo período em que ocorre o grande aumento de volume dos condrócitos verificado na passagem da faixa etária do grupo G3 para o G4, sendo que o aumento do volume do condrócito é o primeiro passo para sua diferenciação terminal (ZUSCIK et al., 2008; VAN DER KRAAN; VAN DEN BERG, 2012). Desta forma, pode-se intuir que, neste período de vida fetal, os condrócitos desta área da epífise estão se preparando para o crescimento do centro de ossificação secundário, uma vez que é primordial para esta fase da ossificação endocondral a hipertrofia dos condrócitos (ROACH; BAKER; CLARKE, 1998; HOJO et al., 2010).

Na pesquisa de Rivas e Shapiro (2002) sobre os estágios estruturais no desenvolvimento de ossos longos e suas epífises, verificou-se que cada epífise, inicialmente formada completamente por cartilagem, diferencia-se progressivamente em três regiões histologicamente distintas, sendo que a cartilagem da região média da epífise formará o centro de ossificação secundário logo após a invasão vascular e

de células osteoprogenitoras. Segundo os autores, a cartilagem epifisial imediatamente periférica à região de condrócitos hipertróficos, se transformará na placa de crescimento do COS. Neste processo de ossificação, os condrócitos se ampliam, diferenciam-se terminalmente, mineralizam e, finalmente, sofrem apoptose. Com a morte e degradação dos condrócitos, sua matriz cartilaginosa residual serve como um suporte para posterior deposição mineral e formação óssea, sendo invadida por osteoblastos e osteoclastos (ZUSCIK et al., 2008)

É geralmente aceito que a morte, por apoptose ou autofagia prolongada, seja o destino final de condrócitos hipertróficos (GIBSON, 1998; SHAPIRO et al., 2005; ZUSCIK et al., 2008). No entanto, a possibilidade de que condrócitos hipertróficos, em diferenciação terminal, possam sobreviver e se tornar osteoblastos *in vivo* tem sido debatida por mais de um século (YANG LIU et al., 2014).

A fim de acompanhar o destino de condrócitos hipertróficos, Yang Liu et al. (2014), empregando uma abordagem de recombinação genética, utilizaram marcadores específicos para estas células. Seus resultados mostraram que os condrócitos hipertróficos podem sobreviver à transição de cartilagem para osso, e tornarem-se células osteogênicas em ossos endocondrais fetais e pós-natais, e persistir na vida adulta.

Roach (1992) sugeriu que condrócitos hipertróficos podem originar células osteoprogenitoras num processo chamado transdiferenciação. Na pesquisa de Zhou et al. (2014), demonstrou-se que osteoblastos transdiferenciados a partir de condrócitos hipertróficos representam uma fração substancial das células formadoras de osso em ratos.

Por último, vale mencionar que, apesar de não terem sido realizadas análises estatísticas comparando as cartilagens do fêmur com relação a tíbia, ambas apresentaram o mesmo padrão de diferenciação, durante o avanço da idade.

Neste contexto, as etapas de crescimento e hipertrofia dos condrócitos continuam tendo importante papel no processo de ossificação endocondral, seja antecedendo a mineralização e apoptose do condrócito (ZUSCIK et al., 2008) ou antes da transdiferenciação em célula osteoprogenitora (YANG LIU et al., 2014).

6.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE OS ASPECTOS QUALITATIVOS ENCONTRADOS NOS COMPONENTES DA ARTICULAÇÃO DO JOELHO

São discutidos neste item tanto a organização quanto os tipos predominantes de fibras colágenas presentes em alguns constituintes da AJ, tais como as camadas superficial e média da cartilagem da epífise, a cápsula articular, a membrana sinovial e o menisco.

Ao se avaliar o padrão das fibras colágenas na camada superficial da cartilagem das epífises do fêmur e da tíbia, foram verificadas diferenças entre os grupos quanto à orientação das mesmas. Em G1 observou-se uma orientação das fibras em forma de malha espessa e irregular e, em G2, observou-se que as fibras estavam dispostas numa orientação paralela à superfície e organizadas de forma mais compacta. A partir do G3, identificou-se uma grande quantidade de fibras colágenas formando uma malha de aspecto irregular e em G4 as fibras se apresentam mais espessas e intrinsecamente entrelaçadas.

De acordo com Archer, Dowthwaite e Francis-West (2003) um dos aspectos intrigantes sobre o desenvolvimento e maturação de cartilagem articular é a mudança na orientação do colágeno de uma disposição imatura essencialmente isotrópica que se orienta geralmente paralelamente à superfície articular, para um arranjo não isotrópico com padrão de "arcada", conforme foi proposto por Benninghof (1925), em que a orientação das fibras dispõem-se perpendicularmente à superfície articular.

Na presente pesquisa, comparativamente aos achados de Archer, Dowthwaite e Francis-West (2003), verifica-se ao longo do desenvolvimento dos fetos uma nítida mudança na orientação e organização das fibras encontradas nas cartilagens, que apresentam diferentes níveis de maturação. Entretanto, não foi observado nos fetos de maior faixa etária (G4) o padrão de "arcada", com uma ordenação das fibras no sentido perpendicular à superfície, mas pode-se observar uma organização em malha pantográfica que exibia diferentes orientações quanto ao entrelaçamento das fibras colágenas, que neste grupo, apresentam-se mais espessas. O termo pantográfico foi utilizado por Pernambuco et al. (1983) para descrever a organização do colágeno formando uma rede densa de fibras em várias

direções, em seu estudo sobre a veia mesentérica superior. Segundo estes autores este arranjo pode estar relacionado com a resistência das paredes do órgão á pressões.

Williamson et al. (2003) apresentaram a hipótese de que as propriedades biomecânicas de tração da camada superficial da cartilagem articular mudam durante o desenvolvimento e que esta alteração funcional está relacionada a alterações na disposição da rede de colágeno. A análise sobre função, organização e composição suporta a noção geral de que a integridade da cartilagem é dependente da rede de colágeno.

No que diz respeito aos tipos de colágeno da camada superficial da cartilagem das epífises, não foram verificadas grandes diferenças entre os grupos, ou seja, o tipo predominante em todas as faixas etárias foi de colágeno tipo I, ressaltando o aparecimento do colágeno tipo III no grupo G3.

Relativamente ao tipo de colágeno encontrado nesta região superficial da epífise, Treilleux et al. (1992), em seu trabalho sobre a localização dos colágenos tipo I, II e III durante o desenvolvimento da cartilagem articular utilizando cabeças femorais de fetos de 22 semanas de idade, verificaram que os colágenos tipos I e II estão presentes na superfície articular, semelhantemente aos achados na presente pesquisa.

Nesse sentido, ressalta-se que o colágeno tipo I tem seu papel funcional, relacionado principalmente com a propriedade de resistência à tração do tecido (GELSE; PÖSCHL; AIGNER, 2003), durante todo desenvolvimento da cartilagem na camada superficial da epífise.

Além disso, no que se refere ao tipo e organização das fibras de colágeno desta região, principalmente com relação às mudanças observadas entre G2 e G3, nota-se um claro aumento na quantidade de fibras do tipo III, entremeadas ao colágeno tipo I, o que nos leva a pensar que existe relação entre o aparecimento do colágeno tipo III e a remodelação tecidual nesta fase do desenvolvimento, envolvendo não só o tipo de fibras colágenas, mas a organização e orientação destas fibras nesta fase do desenvolvimento.

Com efeito, segundo reportado em experimentos de Treilleux et al. (1992) e de Bland e Ashhurst (1996), fibras colágenas dos tipos I, II, III e V estão presentes

na camada superficial de epífise cartilaginosa durante os períodos pré-natal e de crescimento.

Com relação à região média da cartilagem da epífise, em uma região próxima à superfície, comparando-se os grupos G1 a G4, destacou-se a predominância de colágeno tipo II em todos os grupos, porém, deve-se destacar a presença de fibras do tipo I no grupo G1, entremeadas às fibras do tipo II, que depois não se verificou nos grupos mais velhos G2, G3 e G4.

Com relação ao tipo de colágeno encontrado na região supracitada, estudos conduzidos por Sandberg e Vuorio (1987), visando identificar o local de maior produção de colágeno tipo II, nas diferentes zonas de cartilagem, durante o desenvolvimento de ossos longos, revelaram que os mais altos níveis de produção deste colágeno estão na zona proliferativa, localizada inferiormente à superfície da cartilagem, corroborando com as observações na presente pesquisa.

O trabalho de Treilleux et al. (1992) revelou que, no indivíduo recém nascido, condrócitos localizados imediatamente subjacentes ao pericôndrio haviam produzido colágenos tipos I, II, III e que, por outro lado, só fibras do tipo II puderam ser detectadas em camadas mais profundas na cartilagem.

No que diz respeito às observações sobre a presença do colágeno tipo I especialmente no grupo G1, ou seja, nos tecidos cartilagíneos imaturos, resultados semelhantes foram observados por Bland e Ashhurst (1996). Segundo os autores, em seu trabalho sobre o desenvolvimento da cartilagem articular na AJ de coelhos, verificou-se que o colágeno tipo I é encontrado na cartilagem da epífise no início do desenvolvimento, mas desaparece 6 semanas após o nascimento.

Além disso, Responde, Natoli e Athanasiou (2007), em seus estudos sobre o colágeno da cartilagem articular e sobre a importância de sua estrutura para a engenharia de tecidos, relatam que o colágeno tipo I é produzido em muitos tecidos conjuntivos diferentes do corpo, mas que não é normalmente encontrado na cartilagem hialina articular madura, exceto nos processos de reparação fibrocartilaginosa que preenchem defeitos de cartilagem articular danificada.

Estes resultados sugerem que a presença de colágeno na cartilagem mais superficial e nas diferentes camadas da cartilagem de superfícies articulares é sujeita a diferentes mecanismos de regulação durante o desenvolvimento.

Ainda na cartilagem da epífise, em sua região média, pode-se observar finas fibras colágenas adjacentes à cada célula, densamente compactadas em torno de cada um dos condrócitos. Esta formação também foi descrita na mesma região por Bland e Ashhurst (1996), quando uma malha de fibras finas foi verificada formando uma cápsula em torno de condrócitos articulares. O termo "chondron" foi utilizado por Poole (1997) para designar a estrutura formada por condrócitos e esta cápsula pericelular que os circunda.

Quando observados os constituintes da cápsula articular (membranas fibrosa e sinovial) relativamente à disposição das fibras, foram detectadas diferenças entre os dois extremos, ou seja, os grupos G1 e G4.

Pode-se observar, tanto na avaliação com microscopia de luz, quanto com a avaliação por meio de MEV, que a membrana fibrosa, nos fetos mais jovens é mais delgada e compactada em comparação aos fetos mais desenvolvidos, onde se apresenta mais espessa e com interconexões entre suas camadas. Este último arranjo, associado ao predomínio de colágeno tipo I pode proporcionar à membrana fibrosa da cápsula maior firmeza e resistência à força, tensão e estiramento (GELSE; PÖSCHL; AIGNER, 2003).

Relativamente à membrana sinovial, observou-se uma superfície delgada formada por fibras colágenas do tipo I no grupo 1, e predominantemente do tipo III no grupo 4. Entre as membranas fibrosa e sinovial, visualizou-se um preenchimento de tecido conjuntivo frouxo, com predominância de fibras do tipo III. Esta apresentação está de acordo com Sandberg e Vuorio (1987), que afirmam que a produção do colágeno do tipo III pode ser observada junto à produção de colágeno do tipo I durante o desenvolvimento de tecidos, tais como o perióstio, pericôndrio, tendão, ligamentos e tecido sinovial. Ainda, Eyre e Muir (1975) relatam que a membrana sinovial consiste primariamente de colágeno dos tipos I e III.

Tanto na membrana sinovial quanto no menisco, observou-se predomínio de colágeno tipo III nos grupos de maior faixa etária (G3 e G4). Tendo em vista que o colágeno do tipo III tende a ser mais concentrado em regiões dinâmicas dos tecidos, além de contribuir para migração celular e remodelamento tecidual durante o desenvolvimento (MYLLYHARJU; KIVIRIKKO, 2004) e, considerando as alterações no tamanho e organização das fibras de colágeno observadas, podemos inferir que

estes achados estão relacionados com o amadurecimento, tanto da membrana sinovial quanto do menisco, e um remodelamento das fibras, envolvendo organização e tipo de colágeno, durante o desenvolvimento dos fetos.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Frente à metodologia proposta e os resultados obtidos a respeito da avaliação morfofuncional durante o desenvolvimento da cartilagem nos componentes ósseos (fêmur e tíbia) da AJ em fetos humanos, desde a 16^a até a 31^a semanas de vida intrauterina, concluiu-se que:

1. A área dos condrócitos na região média das epífises cartilagíneas, tanto do fêmur quanto da tíbia, aumentou com o avançar da faixa etária dos fetos.

2. A densidade dos condrócitos diminuiu com o avançar das faixas etárias e, em contrapartida, a MEC aumentou.

3. Na região média das epífises, a cartilagem imatura dos fetos mais jovens, inicialmente com características de uma zona de proliferação, passa a apresentar, em fetos com idade mais avançada, características de uma zona de maturação, com condrócitos maiores e mais distantes uns dos outros.

4. O volume dos condrócitos aumentou com o avançar das faixas etárias, com destaque para a transição do G3 para G4.

5. Durante o desenvolvimento, a diferenciação do tecido cartilagíneo na região estudada está relacionada com os estágios precedentes à ossificação endocondral.

6. Na camada superficial da epífise, a organização e orientação das fibras de colágeno modificam-se nos diferentes grupos, passando de uma orientação irregular em G1 para uma disposição paralela a superfície em G2 e, finalmente, para uma organização pantográfica em G4.

7. O colágeno do tipo I foi predominante na camada superficial das epífises em todas as faixas etárias, contribuindo para a propriedade de resistência a tração durante todo o período de desenvolvimento da cartilagem, especialmente em G4, onde suas fibras apresentaram-se mais espessas.

8. Com relação à membrana fibrosa da cápsula articular ocorrem alterações significativas entre os grupos G1 e G4, passando de um tecido delgado e compactado nos fetos mais jovens para uma camada fibrosa mais espessa e com interconexões entre suas camadas nos fetos mais desenvolvidos.

9. Durante o desenvolvimento do feto, o amadurecimento da cartilagem contempla aumento na densidade da MEC e alteração na organização e na orientação das fibras colágenas, contribuindo para obtenção das propriedades requeridas para a cartilagem em cada fase de seu desenvolvimento, tais como resistência à tensão, resistência à compressão e habilidade para distribuir cargas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

AGLIETTI, P.; BUZZI, R.; INSALL, J. Disorders of the patellofemoral joint. In: INSALL, J.; SCOTT, W. (Ed.). **Surgery of the knee**. 2. ed. New York: Churchill Livingstone, 1993. p. 246–251.

ALEXOPOULOS, L. G.; YOUN, I.; BONALDO, P.; GUILAK, F. Developmental and osteoarthritic changes in col6a1 knockout mice: the biomechanics of collagen VI in the cartilage pericellular matrix. **Arthritis & Rheumatology**, v. 60, n. 3, p. 771–779, Mar. 2009.

ARCHER, C. W.; DOWTHWAITE, G. P.; WEST, P. F. Development of Synovial Joints. **Birth Defects Research**, v. 69, p. 144–155, 2003.

ARMSTRONG, C. G.; MOW, V. C. Variations in the intrinsic mechanical properties of human articular-cartilage with age, degeneration and water-content. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 64, n. 1, p. 88-94, Jan. 1982.

AUMÜLLER, G.; AUST, G.; DOLL, A.; ENGELE, J.; KIRSCH, J.; MENSE, S.; REIBIG, D.; SALVETTER, J.; SCHIMIDT, W.; SCHIMITZ, F.; SCHULTE, E.; SPANEL-BOROWSKI, K.; WOLFF, W.; WURZINGER, L. J.; ZILCH, H. G. **Anatomia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p. 346-363.

BARDEEN, C. Studies of the development of the human skeleton. **American Journal of Anatomy**, v. 4, p. 265–302, 1907.

BENNINGHOF, A. Spaltlinien am Knochen, eine Methode zur Ermittlung der Architektur platter Knochen. **Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft**, v. 34, p. 189, 1925.

BHOSALE, A. M.; RICHARDSON, J. B. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. **British Medical Bulletin**, v. 87, p. 77-95, 2008.

BÍBLIA sagrada: leitura, devocional, estudo. Tradução: Almeida Revista e Atualizada. 2. ed. Barueri, SP: Sociedade Bíblica do Brasil, 2009. 2176 p.

* Conforme as Diretrizes para apresentação de dissertações e teses na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 5. ed. rev. atual. ampl. São Paulo: FMVZ-USP, 2013. 89 p.

- BLAND, Y. S.; ASHHURST, D. E. Development and ageing of the articular cartilage of the rabbit knee joint: distribution of the fibrillar collagens. **Anatomy and Embryology**, v. 194, p. 607-619, 1996.
- BLUMER, M. J. F.; SCHWARZER, C.; PÉREZ, M. T.; KONAKCI, K. Z.; FRITSCH, H. Identification and location of bone-forming cells within cartilage canals on their course into the secondary ossification centre. **Journal of Anatomy**, v. 208, p. 695–707, 2006.
- BOBACZ, K.; ERLACHER, L.; SMOLEN, J.; SOLEIMAN, A.; GRANINGER, W. Chondrocyte number and proteoglycan synthesis in the aging and osteoarthritic human articular cartilage. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 63, n. 12, p. 1618-1622, Dec. 2004.
- BUCKWALTER, J. A.; MANKIN, H. J. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. **Instructional Course Lectures**, v. 47, p. 477-486, 1998.
- CASTAÑO OREJA, M.T.; RODRIGUEZ, M. Q.; ABELLEIRA, A. C.; GARCIA, M. A. G.; GARCIA M. A. S.; BARREIRO, F. J. J. Variation in articular cartilage in rabbits between weeks six and eight. **Anatomical Record**, v. 241, p. 34–38, 1995.
- CHEN, Q.; JOHNSON, D. M.; HAUDENSCHILD, D. R.; GOETINCK, P. F. Progression and recapitulation of the chondrocyte differentiation program: cartilage matrix protein is a marker for cartilage maturation. **Developmental Biology**, v. 172, n. 1, p. 293-306, Nov. 1995.
- CLEATHER, D. J.; SOUTHGATE, D. F. L.; BULL, A. M. J. On the Role of the Patella, ACL and Joint Contact Forces in the Extension of the Knee. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1-12, 2014.
- CLUZEL, C.; BLOND, L.; FONTAINE, P.; OLIVE, J.; LAVERTY, S. Foetal and postnatal equine articular cartilage development: magnetic resonance imaging and polarised light microscopy. **European cells & Materials**, v. 26, p. 33-47, Aug. 2013.
- COHEN, N. P.; FOSTER, R. J.; MOW, V. C. Composition and dynamics of articular cartilage: structure, function, and maintaining healthy state. **Journal of Orthopaedic and Sports Physical Therapy**, v. 28, n. 4, p. 203-215, Oct. 1998.

COSTA, P. H. L.; SERRÃO, F. V.; LIMA, C. S.; SUDA, E. Y.; SACCO, I. C. N.; NAVEGA, M. T.; VIOTTO, M. J. S. **Movimento articular**: aspectos morfológicos e funcionais. São Paulo: Manole, 2010. v. 2, p. 71-181.

DANGELO, J. G.; FATTINI, C. A. **Anatomia humana sistêmica e segmentar**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2007. 763 p.

DUTHON, V. B.; BAREA, C.; ABRASSART, S.; FASEL, J. H.; FRITSCHY, D.; MENETREY, J. Anatomy of the anterior cruciate ligament. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 14, n. 3, p. 204-213, 2006.

ESPREGUEIRA-MENDES, M.; SILVA, V. Anatomy of the lateral collateral ligament: a cadaver and histological study. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**. v. 14, p. 221–228, 2006.

EYRE, D. R.; MUIR, H. Type III collagen: a major constituent of rheumatoid and normal human synovial membrane. **Connective Tissue Research**, v. 4, p. 11–16, 1975.

FUKAZAWA, I.; HATTA, T.; UCHIO, Y.; OTANI, H. Development of the meniscus of the knee joint in human fetuses. **Congenital Anomalies**, v. 49, p. 27–32, Mar. 2009.

FULKERSON, J. P.; HUNGERFORD, D. S. **Biomechanics of the patellofemoral joint in disorders of the patellofemoral joint**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1990. p. 25–41.

GARDNER, E. D.; GRAY, D. J.; O'RAHILLY, R. **Anatomia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 218-221.

GARDNER, E.; O'RAHILLY, R. The early development of the knee joint in staged human embryos. **Journal of Anatomy**, v. 102, n. 2, p. 289–299, Jan. 1968.

GARTNER, P. L.; HIATT, J. L. **Atlas Colorido de Histologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. 494 p.

GELSE, K.; PÖSCHL, E.; AIGNER, T. Collagens - structure, function, and biosynthesis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 1531-1546, 2003.

GIBSON, G. Active role of chondrocyte apoptosis in endochondral ossification. **Microscopy Research and Technique**, v. 43, p. 191–204, 1998.

GILROY, A. M. **Atlas de Anatomia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. 685 p.

GOLDRING, M. B. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. **Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease**, v. 4, p. 269–285, 2012.

GUNDERSEN, H. J. G. The nucleator. **Journal of Microscopy**, v. 151, n. 1, p. 3-21, Jul. 1988.

GRABINER, M. D. A articulação do joelho. In: RASCH, P. J. **Cinesiologia e anatomia aplicada**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

GRAY, D. J.; GARDNER, E. Prenatal development of the human knee and superior tibiofibular joints. **American Journal of Anatomy**, v. 86, n. 2, p. 235–287, Mar. 1950.

HAINES, R. W. The development of joints. **Journal of Anatomy**, v. 81, n. 1, p. 33–55, Jan. 1947.

HALL, B. K. **Bones and cartilage: developmental and evolutionary skeletal biology**. San Diego: Elsevier Academic Press. 2005. 760 p.

HILLEL, A. T.; TAUBE, J. M.; CORNISH, T. C.; SHARMA, B.; HALUSHKA, M.; MCCARTHY, E. F.; HUTCHINS, G. M.; ELISSEEFF, J. H. Characterization of human mesenchymal stem cell-engineered cartilage: analysis of its ultrastructure, cell density and chondrocyte phenotype compared to native adult and fetal cartilage. **Cells Tissues Organs**, v. 191, n. 1, p. 12-20, Jun. 2009.

HOJO, H.; OHBA, S.; YANO, F.; CHUNG, U. Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by hypertrophic chondrocytes in endochondral bone development. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**. v. 28, p. 489–502, 2010.

HOPPENFELD, S. **Propedêutica ortopédica - coluna e extremidades**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1980.

HUNZIKER, E. B. Growth plate structure and function. **Pathology and Immunopathology Research**, v. 7, p. 9–13, 1988.

HUNZIKER, E. B. Articular cartilage structure in humans and experimental animals. In: KUETTNER, K. E.; SCHLEYERBACH, R.; PEYRON, J. G.; HASCALL, V. C. **Articular cartilage structure and osteoarthritis**. New York: Raven Press, 1992. p. 183-199.

HUNZIKER, E. B.; ROSENBERG, L. C. Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. **The Journal of Bone and Joint Surgery American Volume**, v. 78, n. 5, p. 721-33, May, 1996.

HUNZIKER, E. B.; QUINN, T. M.; HÄUSELMANN, H. J. Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 10, n. 7, p. 564-572, Jul. 2002.

JADIN K. D.; WONG, B. J.; BAE, W. C.; LI, K. W.; WILLIAMSON, A. K.; SCHUMACHER B. L.; PRICE J. H.; SAH, R. L. Depth-varying density and organization of chondrocytes in immature and mature bovine articular cartilage assessed by 3D imaging and analysis. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 53, n. 9, p. 1109–1119, Sept. 2005.

JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. Picrosirius staining plus polarization microscopy: A specific method for collagen detection in tissues sections. **Journal of Histochemical**, v. 11, n. 4, p. 447-445, Jul. 1979.

KAPANDJI, J. A. **Fisiologia articular**: esquemas comentados de mecânica humana. São Paulo: Manole, 1990.

KELLY, D. J.; CRAWFORD, A.; DICKINSON, S. C.; SIMS, T. J.; MUNDY, J.; HOLLANDER, A. P.; PRENDERGAST, P. J.; HATTON, P. V. Biochemical markers of the mechanical quality of engineered hyaline cartilage. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, n. 2, p. 273-281, Feb. 2007.

KIANI, C.; CHEN, L.; WU, Y. J.; YEE, A. J.; YANG, B. B. Structure and function of aggrecan. **Cell Research**, v. 12, n. 1, p. 19-32, Mar. 2002.

KÖPF-MAIER, P. **Wolf-Heidegger atlas de anatomia humana**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

KOZHANOVA, T. G.; POLIAKOVA, V. S.; MKHITARIAN, E. E.; MESHCHERIAKOV, K. N. Morphological peculiarities of the synovial membrane of human knee joint in mature age. **Morfologiia**, v. 144, n. 5, p. 50-53, 2013.

KRUSKAL, W. H.; WALLIS, W. A. Use of ranks in one-criterion variance analysis. **Journal of the American Statistical Association**, v. 47, n. 260, p. 583–621, Dec. 1952.

LAST, R. J. Some anatomical details of knee joint. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 30B, n. 4, p. 683-688, Nov. 1948.

LEE, M. A.; PALACE, J.; STABLER, G.; FORD, J.; GEARING, A.; MILLER, K. Serum gelatinase B, TIMP-1 and TIMP-2 levels in multiple sclerosis. A longitudinal clinical and MRI study. **Brain**, v. 2, p. 191-197, Feb. 1999.

LEVANGIE, P. K.; NORKIN, C. C. **Joint Structure and function**. 3. ed. Philadelphia: F. A. Davis Company, 2001.

LEVY, I. M.; TORZILLI P. A.; GOULD, J. D.; WARREN, R. F. The effect of lateral meniscus on motion of the knee. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 71, n. 3, p. 401–406, Mar. 1989.

LIU, R. W.; ARMSTRONG, D. G.; LEVINE, A. D, GILMORE A; THOMPSON G. H. , COOPERMAN, D. R. An anatomic study of the distal femoral epiphysis. **Journal of Pediatric Orthopaedics**, v. 33, n. 7, p. 743-749, Nov. 2013.

LOESER, R. F. Chondrocyte integrin expression and function. **Biorheology**, v. 37, p. 109-116, 2000.

LUNA, L. G. **Histologic staining methods of the armed forces institute of pathology**. 3. ed. New York: Mc Graw-Hill, 1968. p. 62.

MAUCK, R. L.; SEYHAN, S. L.; ATESHIAN, G. A.; HUNG, C. T. Influence of seeding density and dynamic deformational loading on the developing structure/function relationships of chondrocyte-seeded agarose hidrogels. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 30, n. 8, p. 1046-1056, Sept. 2002.

MCCARTHY, D. J. Anatomical basis for congenital deformities of the lower extremities. Part II. The knee and leg. **Journal of the American Podiatric Medical Association**, v. 83, n. 3, p. 130-138, 1993.

MERIDA-VELASCO, J. A.; SANCHEZ-MONTESINOS, I.; ESPIN-FERRA, J.; RODRIGUEZ-VÁZQUEZ, J. F.; MERIDA-VELASCO, J. R.; JIMENEZ-COLLADO, J. Development of the human knee joint. **The Anatomical Record**, v. 248, n. 2, p. 269–278, June 1997a.

MERIDA-VELASCO, J. A.; SANCHEZ-MONTESINOS, I.; ESPIN-FERRA, J.; RODRIGUEZ-VÁZQUEZ, J. F.; MERIDA-VELASCO, J. R.; JIMENEZ-COLLADO, J. Development of the human knee joint ligaments. **The Anatomical Record**, v. 248, p. 259–268, June 1997b.

MOORE, K. L.; DALLEY, A. F. **Anatomia orientada para a clínica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia básica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 248-251.

MURLIMANJU, B. V.; NAIR, N.; PAI, M. M.; KRISHNAMURTHY, A.; PHILIP, X. C. Morphology of the medial meniscus of the knee in human fetuses. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 51, n. 2, p. 347–351, 2010.

MURPHY, J. M.; HEINEGÅRD, R.; MCINTOSH, A.; STERCHI, D.; BARRY, F. P. Distribution of cartilage molecules in the developing mouse joint. **Matrix Biology**, v.18, n. 5, p. 487-497, Oct. 1999.

MYLLYHARJU, J.; KIVIRIKKO, K. I. Collagens modifying enzymes and their mutation in humans, flies and worms. **Trends Genetic**, v. 20, p. 33-43, 2004.

NADEEN, O. C.; BLANCHETTE, C.; THOMAS, C. B.; LU, J.; HAUDENSCHILD, D.; LOOTS, G. G. Effect of age and cytoskeletal elements on the indentation-dependent mechanical properties of chondrocytes. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1-12, Apr. 2013.

NAMBA, R. S.; MEULI, M.; SULLIVAN, K. M.; LE, A.; ADZICK, N. S. Spontaneous repair of superficial defects in articular cartilage in a fetal lamb model. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 80, n. 1, p. 4–10, Jan. 1998.

NARAGHI, A.; WHITE, L. M. MR Imaging of Cruciate Ligaments. **Magnetic Resonance Imaging Clinics of North America**, v. 22, n. 4, p. 557-580, Nov. 2014.

NEMEC, U.; NEMEC, S. F.; WEBER, M., BRUGGER, P. C.; KASPRIAN, G.; BETTELHEIM, D.; RIMOIN, D. L.; LACHMAN, R. S.; MALINGER, G.; PRAYER, D. Human long bone development in vivo: analysis of the distal femoral epimetaphysis on MR images of fetuses. **Radiology**, v. 267, n. 2, p. 570-580, May 2013.

NEUMANN, M. V.; STALDER, M.; SCHUSTER, A. J. Reconstructive surgery for patellofemoral joint incongruency, **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 9, Oct. 2014.

O'RAHILLY, R.; MÜLLER, F. Developmental Stages in Human Embryos: Revised and New Measurements. **Cells Tissues Organs**, v. 192, p. 73–84, 2010.

PERNAMBUCO, J. R. B.; CARVALHO, C. A. F.; SOUZA, R. R.; RODRIGUES, A. J. Functional Architecture of the Human Superior Mesenteric Vein. **Okajimas Folia Anatomica Japonica**, v. 59, n. 6, p. 351-362, Mar. 1983.

POOLE, C. A. Articular cartilage chondrons: form, function and failure. **Journal of Anatomy**, v. 191, p. 1-13, Jul. 1997.

QUINN, T. M.; MAUNG, A. A.; GRODZINSKY, A. J.; HUNZIKER, E. B.; SANDY, J. D. Physical and biological regulation of proteoglycan turnover around chondrocytes in cartilage explants. Implications for tissue degradation and repair. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 878, p. 420-441, June 1999.

RESPONTE, D. J.; NATOLI, R. M.; ATHANASIOU, K. A. Collagens of articular cartilage: structure, function, and importance in tissue engineering. **Biomedical Engineering**, v. 35, n. 5, p. 363-411, 2007.

RIVAS, R.; SHAPIRO, F. Structural stages in the development of the long bones and epiphyses: a study in the New Zealand white rabbit. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 84A, n. 1, p. 85-100, Jan. 2002.

ROACH, H. I. Trans-differentiation of hypertrophic chondrocytes into cells capable of producing a mineralized bone matrix. **Bone and Mineral**, v. 19, n. 1, p. 1-20. Oct. 1992.

ROACH, H.I.; BAKER, J. E.; CLARKE, N. M. Initiation of the bony epiphysis in long bones: chronology of interactions between the vascular system and the chondrocytes. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 13, n. 5, p. 950-961, June 1998.

ROMEIS, B. **Mikroskopische technik**. Munchen, Wien: R. Ouldenbourg Verlag. 1968.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histologia: texto e atlas**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. cap. 7, p. 204-223.

SANDBERG, M.; VUORIO, E. Localization of types I, II, and III collagen mRNAs in developing human skeletal tissues by in situ hybridization. **The Journal of Cell Biology**, v. 104, p. 1077-1084, Apr. 1987.

SHAPIRO, I. M.; ADAMS, C. S.; FREEMAN, T.; SRINIVAS, V. Fate of the hypertrophic chondrocyte: microenvironmental perspectives on apoptosis and survival in the epiphyseal growth plate. **Birth Defects Research**, v. 75, p. 330–339, 2005.

SIEGEL, S. **Nonparametric statistics for the behavioral sciences**. New York: McGraw-Hill Book Company, Inc., 1956. 312 p.

SMITH, L.; WEISS, E.; LEHMKUHL, L. D. **Cinesiologia clinica de Brunnstrom**. 5. ed. São Paulo: Manole, 1997.

STANDRING, S. **Gray's anatomy**. 40. ed. London: Churchill Livingstone Elsevier, 2008. P. 1393-1410.

STREETER, G. L. **Developmental horizons in human embryos**. Age groups XI to XXIII. Washington, D.C.: Carnegie Institution, 1951. v. 2.

TECKLENBURG, K.; DEJOUR, D.; HOSER, C; FINK, C. Bony and cartilaginous anatomy of the patellofemoral joint. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 14, p. 235–240, 2006.

TEMENOFF, J. S.; MIKOS, A. G. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. **Biomaterials**, v. 21, n. 5, p. 431-440, Mar. 2000.

TERMINOLOGIA ANATÔMICA. **SBA - Sociedade Brasileira de Anatomia**. Barueri: Manole, 2001. 248 p.

TESTUT, L. **Tratado de anatomía humana**. Barcelona: Salvat Editores, 1967. T. 1, p. 676-703.

TREILLEUX, I.; MALLEIN-GERIN, F.; GUELLEC, D.; HERBAGE, D. Localization of the expression of type I II III collagen, and aggrecan core protein genes in developing human articular cartilage. retrieved no results. **Matrix**. v. 12, n. 3, p. 221-32, June 1992.

USHIKI, T.; IDE, C. A modified KOH-collagenase method applied to scanning electron microscopic observations of peripheral nerves. **Archives of Histology and Cytology**, v. 51, n. 3, p. 223-232, Jul. 1988.

VAN DER KRAAN, P. M.; VAN DEN BERG, W. B. Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration? **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 20, n. 3, p. 223-232, Mar. 2012.

WALKER, P. S.; ERKMAN, M. J. The role of the meniscus in force transmission across the knee. **Clinical Orthopaedics**, n. 109, p.184–192, 1975.

WALMSLEY, R. The development of the patella. **Journal of Anatomy**, v. 74, n. 3, p. 360–368, Apr. 1940.

WATKINS, J. **Estrutura e função do sistema músculo-esquelético**. Porto Alegre: Artmed, 2001.

WHILLIS, F. The development of synovial joints. **Journal of Anatomy**, v. 74, n. 2, p. 277–283, Jan. 1940.

WHITING, W. C.; ZERNICKE, R. F. **Biomechanics of musculoskeletal injury**. Champaign: Human Kinetics, 1998.

WILLIAMS, P. L.; WARWICK, R.; DYSON, M.; BANNISTER, L. H. **Gray Anatomia**. 37. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. p. 484-493.

WILLIAMSON, A. K.; CHEN, A. C.; MASUDA, K.; THONAR, E. J.; SAH, R. L. Tensile mechanical properties of bovine articular cartilage: variations with growth and relationships to collagen network components. **Journal of Orthopaedic Research**. v. 21, n. 5, p. 872-880, Sept. 2003.

YANG LIU; KWOK YEUNG TSANGA; HOI CHING TANG; DANNY CHAN; CHEAH, K. S. E. Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation. **PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences)**. v. 111, n. 33, p. 12097–12102, 2014.

YOUNG, B.; LOWE, J. S.; STEVENS, A.; HEATH, J. W. **Wheater Histologia Funcional**: texto e atlas em cores. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p. 186-204.

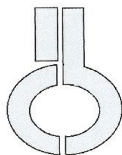
YUE GAO; SHUYUN LIU; JINGXIANG HUANG; WEIMIN GUO; JIFENG CHEN; LI ZHANG; BIN ZHAO; JIANG PENG; AIYUAN WANG; YU WANG; WENJING XU; SHIBI LU; MEI YUAN; QUANYI GUO. The ECM-Cell Interaction of Cartilage Extracellular Matrix on Chondrocytes. **BioMed Research International**, May 2014. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/648459/>>. Acesso em: 19/01/2015.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 2. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1984. p.191-195.

ZHOU, X.; VON DER MARK, K.; HENRY, S.; NORTON, W.; ADAMS, H.; DE CROMBRUGGHE, B. Chondrocytes transdifferentiate into osteoblasts in endochondral bone during development, postnatal growth and fracture healing in mice. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 12, p.e. 1004820, Dec. 2014.

ZUSCIK, M. J.; HILTON, M. J.; ZHANG, X.; CHEN, D.; O'KEEFE, R. J. Regulation of chondrogenesis and chondrocyte differentiation by stress. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, p. 429–438, 2008.

ANEXOS

ANEXO A – Declaração sobre biorrepositório

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEP SH. 026 /13.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Of. CEP SH. 143.11 de 26.09.11, informo que esta Comissão aprova *ad referendum* a alteração do título do biorrepositório formado por "Amostras de seguimentos vertebrados de 30 indivíduos, retirados em necropsia de rotina no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital -(SVC/SP)" para "Amostras de partes esqueléticas retiradas de indivíduos de diferentes idades pertencentes ao acervo didático do Departamento de Anatomia do ICB/USP" sob a responsabilidade do Prof.Dr. Edson Aparecido Liberti.

São Paulo, 29 de maio de 2013.

Prof. Dr. Paolo M.A. Zanotto
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

ANEXO B – Autorização para utilização de amostras do biorrepositório

Prof. Titular Edson Aparecido Liberti
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 –
São Paulo, SP, Brasil. CEP 05508-900.
Tel: 55 -11 3091-7847 Fax: 55 -11 3091-7366.
E-mail: eaibert@icb.usp.br - eaibert@usp.br



São Paulo, 30 de maio de 2013

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Paolo A. M. Zannoto

*(DD. Coordenador da Comissão de Ética
Com Seres Humanos – ICB/USP)*

Senhor Coordenador,

Venho, através do presente, informar a V. Sa. que autorizo a aluna Josy Alvarenga Cal Rosa, aluna regularmente matriculada no Curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da FMVZ/USP, a utilizar os espécimes constantes do Biorepositório *“Amostras de partes esqueléticas retiradas de indivíduos de diferentes idades pertencentes ao acervo didático do Departamento de Anatomia do ICB/USP”*, a fim de desenvolver o seu projeto de Doutorado intitulado *“Avaliação morfofuncional do desenvolvimento da articulação do joelho em fetos humanos”*, sob minha orientação. NADA MAIS.

Atenciosamente,

Edson Aparecido Liberti

(MS-6 do Depto. de Anatomia do ICB/USP)

ANEXO C – Tabela de números randômicos

ISS STEREOLOGY COURSE

You are looking for a random number R fulfilling $1 \leq R \leq 57$.

- Take the first unused digit in the first (unnumbered) blocks- and cross it out! (= 9)
 - In the block with that number read the unused digits in pairs until a pair fulfill the criterion. (= 26)
- Cross out all read pairs. If the upper limit of the number you are looking for is => 100 you deal with triplets in stead, etc.

Random Numbers

72137	73850	32733	35321	80647	39713	61060	57865	88049	20557	43375	50914	83628	73935	72502	48174	62551	91222	22375	96488	46596	51960	02957	18424	18672	02994	30960	02489	53079	72789	22662	30359	38220	13972	86115	17196	24569
04254	60099	30564	10361	51911	3613	01549	96531	83915	72222	83222	84841	44933	12839	20750	47116	58973	99018	27769	32928	66296	15570	31407	45988	78749	16135	82797	31296	93268	10104	95016	82818	85756	51156	74037	12501	
49093	50734	57995	41467	26834	08059	22945	72193	36677	82577	16210	76092	97730	90049	02115	37096	20505	91937	62976	69403	50948	47276	54307	20170	13045	65527	30528	72163	66728	81091	52307	78952	60261	11207	73063	48286	50757
19910	26772	89693	38394	84119	68486	17622	30953	78267	31566	58288	88922	17043	98059	07255	90786	95246	15280	61692	45137	17539	31799	64780	78707	57821	28240	64908	30432	78760	36880	02564	96978	62332	77522	92228	53849	20578
62060	44784	47993	86231	82711	79266	47763	36183	65869	64355	91271	49295	98354	28005	67992	01480	51587	70726	35862	73907	94657	72927	46249	61325	50908	25601	30038	78786	65107	62823	18169	72967	53031	47906	99501	27753	
77708	81761	89238	86231	82711	79266	47763	36183	65869	64355	91271	49295	98354	28005	67992	01480	51587	70726	35862	73907	94657	72927	46249	61325	50908	25601	30038	78786	65107	62823	18169	72967	53031	47906	99501	27753	
90715	65115	12870	89922	24926	44062	94896	97561	96490	35454	51623	98381	11055	32951	28363	16451	67912	66404	76254	75495	07446	66408	19958	65159	11338	39231	72802	70390	87356	16385	16385	16385	16385	16385	16385	16385	
79666	48119	38525	82189	34921	49538	47558	92345	47408	99542	44247	12702	54688	74321	36224	85619	16238	23374	13653	25345	47870	55448	14158	43451	58729	42430	42234	04905	83274	22459	75032	93544	10482	34277	40177	01081	
53294	49761	76235	53814	29900	03796	73326	94291	10739	36087	32326	52225	72447	77804	57045	27562	72387	34001	87362	66764	84269	35324	33508	49481	56478	30246	41771	61398	38154	61644	12405	45037	68034	08561	46747	30635	
02878	83197	94318	47993	85252	91124	32939	75043	40325	53522	81775	09457	83810	46392	02705	85591	63127	80852	42030	51725	60273	84903	84374	31438	36959	83719	40702	79038	68659	63329	93821	58095	62204	69319	00672	96037	
44422	78305	76369	20601	39701	80769	17322	78280	42376	64899	62390	68375	42921	28545	33167	85710	11035	40171	04840	69848	52704	71441	50581	65979	37957	17182	60733	11765	09203	70076	40751	05846	80277	92450	60888	18689	
12601	54432	65017	91431	80691	31834	32401	11994	97820	06553	27477	61564	22681	02280	33815	47479	44017	37563	19020	09099	08316	32781	89731	52148	09111	64205	77930	32391	69076	13459	59896	78185	60268	03650	36814		
05664	73669	24910	25458	23699	86413	19985	49355	24358	02915	81533	92012	50435	73814	96290	86827	81430	45597	82296	28947	19442	94873	36976	30366	65815	66895	27222	17378	59399	00055	66780	54939	78369	04163	77573		
18363	66512	94398	22384	87756	66396	63646	50963	90909	62895	02022	48494	49974	33534	94657	71126	71770	16092	03942	90111	39523	74227	51895	39733	29426	76485	93548	87546	07687	47338	12240	32277	23015	54261	95020		
00491	53688	72033	68063	86104	90376	04119	65531	30304	29202	82110	82254	03669	03281	11613	36336	98297	48100	11594	52667	01201	85057	93409	81200	21176	78459	18960	85182	02245	11566	52527	62992	55171	85448	12545	75992	
60147	99378	58310	34655	48242	38656	30544	01860	08322	70476	85419	93017	28087	42243	41699	58582	78400	24190	39798	89863	52118	65337	13461	18438	16099	57330	05018	92605	10316	07351	78020	86361	30286	06434	50229		
79435	52143	12322	12524	94314	98550	58315	78036	24355	85222	44424	88508	66190	74060	93206	29840	44833	81146	64006	62975	92324	84115	77848	38006	45600	02181	79261	49705	31491	25318	52586	72494	66687	05344	14633		
04758	90920	30230	72006	24268	77817	10524	60304	79352	31942	95067	93666	66861	17820	50756	80608	35695	72641	26306	76298	32332	22644	06863	18610	91045	72642	42684	32419	12825	58785	84563	62071	17999	86994	41635		
53841	28758	93442	42983	25254	96336	16570	89358	36619	72838	10933	99864	13468	17211	48046	51122	92668	96364	10205	37022	05607	59772	37141	63390	48093	02366	05407	08325	52046	87494	95585	25547	53300	45448			
07626	78473	17708	35059	33584	52451	11575	55992	83288	38546	49559	71671	53603	24491	97570	90789	32932	67449	05115	45941	71637	80269	83299	89743	94628	26784	17792	69214	53781	90102	25774	92525	32501	25923	76556		
40645	27008	16341	98286	47204	90286	40601	90286	47204	90286	30391	92039	71664	40219	97907	93975	66981	19556	24605	52169	35790	19603	31212	34419	34728	47391	93272	09887	34196	98251	06534	17768	36086	05468	41631		
82666	14127	94390	07069	39152	10357	94612	36748	75428	28101	49543	54214	48928	32818	51963	87333	15994	29529	87305	01361	91987	72525	34402	51105	09825	54728	37514	24437	01316	04770	06334	17768	36086	05468	41631		
60147	99378	58310	34655	48242	38656	30544	01860	08322	70476	85419	93017	28087	42243	41699	58582	78400	24190	39798	89863	52118	65337	13461	18438	16099	57330	05018	92605	10316	07351	78020	86361	30286	06434	50229		
61479	68781	91423	86645	02925	51327	41022	76993	20200	82747	97297	74420	18783	03471	89055	56413	77817	10655	52915	68198	54419	65493	88741	89609	10789	00973	30238	46126	85306	37114	22718	50584	92291	56375	24075		
23361	66672	52451	03774	06365	94880	70978	57385	70532	46978	87390	53819	90135	01541	47831	80786	11284	49160	79852	72845	48899	36483	40835	11654	75047	22938	12938	13073	32066	49098	75738	94910	15403	89151	73322		
33008	59661	70966	24937	36559	98856	12907	41684	20288	19783	82215	53810	39852	43975	21530	96315	55657	76473	08217	46810	01828	48113	60055	97083	90000	02346	89182	27750	63314	87302	40472	24885	79506	60638	07132		
24079	01177	02666	35515	24819	73382	50172	23114	28745	12249	35844	63265	26451	06986	08707	39521	02626	74779	96285	31998	89871	81320	05251	25993	67320	11895	16187	03303	40287	52435	23926	92544	54099	51497	03863		
50495	87947	20592	91917	59895	55083	43112	94833	72864	58785	53473	06308	56778	30474	57277	23425	27029	44759	18422	50774	74883	99009	67887	19302	54669	25266	93462	24634	84761	42907	95158	27146	37012	43361	01373		
93250	48308	20282	92711	74402	51335	64031	41740	06880	69373	73674	97914	77989	47280	71804	74587	70563	77813	30242	60398	25493	56247	68087	64847	13134	25129	55536	19838	21479	48265	01674	47274	56350	37512			
10620	03381	09798	89487	33602	47073	92357	38870	73784	35662	88923	90790	45674	11901	30322	80254	99018	17019	17892	68133	28278	38448	11342	82928	84361	13134	25129	55536	19838	21479	48265	01674	47274	56350	37512		
32668	72831	55156	90166	91599	09471	79945	42380	86605	97738	08206	54199	41327	01720	21745	71318	07978	53440	26128	10545	44834	89816	52509	85192	32114	83770	90076	76266	02131	93202	25355	93041	84434	21318	33874		
83452	28803	63272	65480	98760	14379	82534	76335	21208	42302	63835	39490	57482	32921	33795	41355	30432	48364	18128	23329	74767	91288	23329	74767	91288	23329	74767	91288	23329	74767	91288	23329	74767	91288	23329	74767	
09527	26095	79373	09119	79765	99918	01628	47335	17893	53176	74101	87573	01556	89183	64830	16770	35724	82103	61658	22966	33176	16078	98145	22652	76918	41000	46029	58928	10341	39703	85224	37858	61657	04814			
38452	92994	85019	57720	30551	03383	34265	65728	89776	04006	06089	84076	12445	47416	33620	59151																					