MARIANE CRISTINA DONATO SIMÕES

Avaliação morfofuncional e ultraestrutural do desenvolvimento da articulação do quadril em fetos humanos

São Paulo

2018

MARIANE CRISTINA DONATO SIMÕES

Avaliação morfofuncional e ultraestrutural do desenvolvimento da articulação do quadril em fetos humanos

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

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2018

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

VERSÃO CORRIGIDA

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3693
FMVZ

Simões, Mariane Cristina Donato
Avaliação morfofuncional e ultraestrutural do desenvolvimento da articulação do quadril em fetos humanos / Mariane Cristina Donato Simões. – 2018.
77 f. : il.

Mestrado (Dissertação) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2018.

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. Feto. 2. Articulação do quadril. 3. Cartilagem. 4. Fibras colágenas. 5. Condrócitos. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Maria Aparecida Laet, CRB 5673-8, da FMVZ/USP.

São Paulo, 6th August 2017

CERTIFIED

We certify that the Research "Morphological and ultrastructural evaluation of the development of hip articulation in human fetuses", protocol number CEUAx 2241030816, under the responsibility Edson Aparecido Liberti, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day August 03, 2017.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "Avaliação morfofuncional e ultraestrutural do desenvolvimento da articulação coxofemoral em fetos humanos ", protocolado sob o CEUAx nº 2241030816, sob a responsabilidade de Edson Aparecido Liberti, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 03 de agosto de 2017.

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

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

ICB USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 17 de novembro de 2016.

PARECER 1320/CEPSH
CAAE nº 61888916.2.0000.5467
Protocolo CEPSH-ICB nº 1360/16

A Comissão de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, nesta data, **APROVOU** o projeto intitulado: "**Avaliação morfofuncional e ultraestrutural do desenvolvimento da articulação coxofemoral em fetos humanos**", dos pesquisadores Prof. Dr. **Edson Aparecido Liberti** e aluna **Mariane Cristina Donato Simões**.

Cabe aos pesquisadores elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final) de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: www.icb.usp.br, como também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste projeto.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **17/11/2017**, bem como anexado uma cópia à Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Prof. Dr. **PAOLO MARINHO DE ANDRADE ZANOOTTO**
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SIMÕES, Mariane Cristina Donato

Título: Avaliação morfofuncional e ultraestrutural do desenvolvimento da articulação do quadril em fetos humanos

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

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof.Dr._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof.Dr._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof.Dr._____

Instituição:_____Julgamento:_____

DEDICATÓRIA

A Deus,

meu Pai do céu, que me deu o dom da vida e está comigo abençoando e iluminando meus passos diariamente, mantendo-me firme em minha fé. A ti deposito a minha vida e meu futuro. Obrigada pela saúde e pela família maravilhosa que eu tenho;

Ao meu pai querido (em memória),

Walter Bruno Donato, que tanto amo e sinto saudades... carne da minha carne, que está comigo nos pensamentos e em meu coração. Agradeço pelos ensinamentos de vida e sabedoria ímpar dos quais tive o privilégio de receber sendo sua filha. Tenho a certeza de que onde estiver, está orgulhoso de mim e me apoiando. Obrigada por me fazer ser forte e acreditar em Jesus Cristo. Sinto muito a sua falta.

À minha mãe e amiga,

Roseli Aparecida Lacativa Donato que é minha fortaleza, meu porto seguro e hoje meu pai e mãe. Obrigada por tudo o que faz por mim, por ser tão iluminada, por me aconselhar nas dificuldades, na minha carreira e na minha vida, por me apoiar nos estudos e principalmente por ser meu exemplo de fé e amor. Sem você nada disso seria possível.

Ao meu querido esposo,

Rafael Taborda Simões que escolhi para estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida, que é meu amigo, companheiro de todas as horas, uma pessoa em quem confio e deposito meu amor. Quem realmente conhece, sabe a pessoa maravilhosa que você é. Agradeço por me aconselhar nas decisões e principalmente me dar forças quando eu já estou cansada. Obrigada por superar meus maus momentos, e por me ajudar a ser uma pessoa melhor. Eu não sei o que seria de mim sem o seu amor. Amo você.

AGRADECIMENTOS

À minha irmã, que quer o melhor para minha vida e me orienta por eu ser mais nova. Amo você mais do que pode imaginar.

Ao meu professor, orientador e mestre, Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti, o grande "Anatomossauro", a quem foi dado o dom de ensinar com tamanha excelência e, desta forma, envolver seus alunos ao fascínio que é a Anatomia. Obrigada por me acolher e confiar sem me conhecer direito. Obrigada pela paciência, pelos ensinamentos, pela dedicação nesses dois anos de estudo, por entender que também exerço minha profissão ao mesmo tempo que estudo pois quero ser uma profissional mais capacitada. Agradeço a amizade e consideração e por ser tão especial, iluminado, um professor exemplo e de referência em minha vida. Saiba que você está no meu coração, meu querido mestre.

Ao Dr. Henrique Antônio Berwanger de Amorim Cabrita, amigo e médico do Instituto Vita, que aceitou o convite de participar do meu estudo de mestrado e me auxiliar com sua sabedoria, competência e experiência clínica incríveis. Obrigada por ser minha inspiração com meus pacientes e no trabalho do dia a dia.

Ao professor Dr. Rafael Gabaret Agopian que disponibilizou momentos de sua vida atarefada a me ensinar e ajudar em uma parte importante da minha dissertação. Pessoa muito especial que sempre responde as minhas dúvidas, mesmo por telefone e sempre se coloca à disposição. Ofereço este trabalho a você.

Agradeço o apoio de toda a minha família para que eu sempre siga em frente com meus estudos;

Aos médicos do Instituto Vita que me apoiaram desde o início e me ajudaram de alguma forma ao longo da minha dissertação em qualquer situação: Dr. Guilherme Meyer, Dr. Breno Schor, Dr. Mauro Dinato que se colocou à disposição no que eu precisasse nos estudos e ao Dr. Gabriel Pastore que foi essencial na minha carreira, pois com nossas conversas foi o responsável por eu estar hoje no mestrado.

Ao professor Dr. Henri Friedhofer, meu paciente e amigo que me auxiliou corrigindo a escrita desse trabalho, me ensinou sobre a vida, sobre dar aulas, como se portar e me ensinou com suas atitudes sobre excelência e profissionalismo. Obrigada pelo carinho.

A todos os amigos do Vita que me ajudaram de alguma forma na minha dissertação, até mesmo com palavras de incentivo, em especial à Renata Ciol, à Fávia Nakatake, amiga muito especial sempre se fazendo presente e me acompanhando desde o início.

Aos amigos do laboratório de pesquisa "VEM QUE É MOLE" que ganhei nesse caminho e me ajudaram. Em especial ao Luciano Leonel e à minha mais nova amiga, Regiane Freire Nogueira de Lima, que conheci estudando e esteve presente em todas as estapas desse mestrado me ajudando, ouvindo, aconselhando e dando forças. Saiba que levo você para minha vida. Obrigada pela parceria, alegrias e dificuldades que passamos juntos, vocês são demais!

Aos funcionários da FMVZ e em especial do ICB. Aos técnicos que ajudaram para que eu realizasse os experimentos no meu trabalho: Boleta, Soninha, Martinha; Rosana Prisco que me ajudou carinhosamente com a parte da estatística; Malu, grande Malu...um anjo na minha vida, a mãezona que me acolheu em sua sala e sempre me ajudou em tudo. Não tenho palavras por tanta consideração e carinho. A todos que estavam envolvidos para que tudo desse certo, meus mais sinceros agradecimentos.

Ao reservatório de anatomia do ICB que forneceu os espécimes para esse trabalho.

Ao programa de pós graduação, secretaria, biblioteca e aos professores que me auxiliaram no meu trabalho com a qualificação, Prof. Dr. José Roberto Kfouri e Profa. Dra. Rose Eli Grassi.

Aos meus pacientes, que tiveram paciência com a minha agenda, foram tantas desmarcações, remarcações, me viam cansada ou preocupada…que este trabalho me capacite para eu poder tratá-los trazendo conforto com mais conhecimento e competência.

“Combati o bom combate, terminei a minha carreira, guardei a fé.”

(Timóteo 4:7)

"I am the captain of my fate… I am the master of my soul”.

(William Ernest Henley)

RESUMO

SIMÕES, M.C.D. **Avaliação morfofuncional e ultraestrutural do desenvolvimento da articulação do quadril em fetos humanos.** [Morphofunctional and ultrastructural evaluation of hip joint development in human fetuses]. 2018. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

O desenvolvimento da articulação do quadril tem sido de intenso interesse devido à escassa informação acerca dos aspectos morfológicos e ultraestruturais em fetos humanos de diferentes faixas etárias. Pretende-se avaliar os aspectos morfofuncionais e ultraestruturais do desenvolvimento da cartilagem articular da epífise da cabeça do fêmur. Foram utilizados 20 fetos humanos de idades compreendidas entre 16 a 31 semanas de vida intra uterina (VIU), fixados em solução de formol a 10% e conservados em glicerina. Os fetos foram divididos em 4 grupos (n=5): grupo 1 (G1): 16-19 semanas VIU; grupo 2 (G2): 20-23 semanas VIU; grupo 3 (G3): 24-27 semanas VIU e grupo 4 (G4): 28-31 semanas VIU. Os espécimes foram divididos em uma metade *anterior* e outra, *posterior* através de um corte frontal em sua parte média. Os antímeros direitos foram processados através da microscopia de luz para análise quantitativa a fim de determinar a área, a densidade dos condrócitos e de matriz extracelular (MEC), e o volume e para análise qualitativa a fim de determinar a distribuição e organização das fibras colágenas na MEC através da coloração da Safranina-O e do Picro-sirius. Os antímeros esquerdos foram submetidos à microscopia eletrônica de varredura. Foram encontradas diferenças significantes entre os grupos com o aumento da área e do volume de condrócitos com a avanço das idades de forma gradativa. Quanto maior a faixa etária, menor o número de condrócitos, e maior a densidade percentual de matriz extracelular. Através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), na superfície da epífise, a organização e orientação das fibras de colágeno mudaram nos diferentes grupos, de uma orientação irregular no grupo de fetos mais jovens, para uma organização pantográfica no grupo de fetos mais desenvolvidos. Conhecer a organização e o desenvolvimento normal cartilagíneo da cabeça do fêmur contribui com conhecimentos morfológicos para entender melhor a maturação do colágeno nos locais de reparo dos tecidos e embasar aspectos relacionados a doenças e malformações da articulação.

Palavras-chave: Feto. Articulação do quadril. Cartilagem. Fibras colágenas. Condrócitos.

ABSTRACT

SIMÕES, M.C.D. **Morphofunctional and ultrastructural evaluation of hip joint development in human fetuses**. [Avaliação morfofuncional e ultraestrutural do desenvolvimento da articulação do quadril em fetos humanos]. 2018. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

The development of the hip joint has been of intense interest due to the scarce information about the morphological and ultrastructural aspects in human fetuses of different age groups. It is intended to evaluate the morphofunctional and ultrastructural aspects of the development of the articular cartilage of the epiphysis of the femoral head. Twenty human fetuses aged between 16 and 31 weeks of intrauterine life (IUL), fixed in 10% formalin solution and preserved in glycerin, were used. Fetuses were divided into 4 groups (n = 5): group 1 (G1): 16-19 weeks VIU; group 2 (G2): 20-23 weeks VIU; group 3 (G3): 24-27 weeks VIU and group 4 (G4): 28-31 weeks VIU. The specimens were divided into an anterior half and a posterior one through a frontal cut in the middle part. The right antimers were processed by light microscopy for quantitative analysis to determine the area, chondrocyte density and extracellular matrix (ECM), and volume and for qualitative analysis in order to determine the distribution and organization of collagen fibers in MEC through the staining of Safranin-O and Picrosirius. The left antimers were submitted to scanning electron microscopy. Significant differences were found between groups with increasing area and volume of chondrocytes with advancing age gradually. The higher the age group, the lower the number of chondrocytes, and the higher the percentage density of extracellular matrix. Through scanning electron microscopy (SEM), on the surface of the epiphysis, the organization and orientation of the collagen fibers changed in the different groups, from an irregular orientation in the group of younger fetuses, to a pantographic organization in the group of more developed fetuses. Knowing the normal organization and development of the cartilaginous head of the femur contributes with morphological knowledge to better understand the maturation of collagen in the tissue repair sites and to support aspects related to diseases and malformations of the joint.

Key words: Fetus. Hip joint. Cartilage. Collagen fibers. Chondrocytes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Modelo em arcadas de Benninghoff	25
Figura 2	Compasso antropométrico	29
Figura 3	Representação do corte frontal nos quadris	29
Figura 4	Cortes histológicos da cabeça do fêmur de feto humano	30
Figura 5	Metodologia utilizada para estudo morfométrico	32
Figura 6	Representação dos campos da cartilagem do fêmur	33
Figura 7	Obtenção das áreas dos condrócitos	34
Figura 8	Representação do campo contendo o sistema teste para determinação da densidade de condrócitos e MEC	35
Figura 9	Os três sistemas testes utilizados no método do Nucleator	36
Figura 10	Representação dos 3 sistemas testes e a transparência sobrepostos à fotomicrografia analisada no método do nucleator	38
Figura 11	Tabela utilizada no método do nucleator	39
Figura 12	Representação do tipo de fibras colágenas da cabeça do fêmur nos diferentes grupos de G1 a G4	49
Figura 13	Representação da matriz extracelular nos grupos de G1 a G4	50
Figura 14	Esquemas ilustrando a disposição das fibras colágenas da MEC da cabeça do fêmur nos grupos G1, G2/G3 e G4	51
Figura 15	Eletronmicrografias de varredura da cartilagem da cabeça do fêmur de feto de G1	52
Figura 16	Eletromicrografia de varredura da superfície articular e da parte média da cartilagem nos grupos representativos G1, G2 e G3	53
Figura 17	Eletromicrografia de varredura nos grupos representativos G1, G2, G3 e G4	54
Figura 18	Eletromicrografia de varredura da parte cartilagínea G1, G2, G3 e G4	55

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Medidas do comprimento fetal (centímetros) nos grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5)	42
Gráfico 2	Medidas do peso fetal (gramas) nos grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5)	43
Gráfico 3	Distribuição de frequência para a área dos condrócitos dos grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5)	44
Gráfico 4	Representação gráfica das médias das áreas (μm^2) dos condrócitos nos grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5)	45
Gráfico 5	Densidade dos condrócitos e de matriz extracelular (MEC) para os grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5)	46
Gráfico 6	Comparação no volume dos condrócitos entre os grupos G1, G2, G3 e G4	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Grupos G1, G2, G3 e G4 de acordo com a faixa etária	31
Tabela 2	Médias das áreas (μm^2) dos condrócitos nos grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5)	45
Tabela 3	Densidade de condrócitos e de matriz extracelular (MEC) nos grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5)	46
Tabela 4	Médias dos volumes dos condrócitos da epífise proximal do fêmur, nos grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5)	47

LISTA DE LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AQ	Articulação do quadril
COS	Centro de ossificação secundário
DP	Desvio Padrão
G1	Grupo de fetos com idades de 16 a 19 semanas de VIU
G2	Grupo de fetos com idades de 20 a 23 semanas de VIU
G3	Grupo de fetos com idades de 24 a 27 semanas de VIU
G4	Grupo de fetos com idades de 28 a 31 semanas de VIU
GAG	Glicosaminoglicanas
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
PS	Picro-sirius
TM	Tricomo de Masson
USP	Universidade de São Paulo
VIU	Vida intrauterina
$\overline{V}_N$	Volume médio

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	20
2	**REVISÃO DA LITERATURA**	22
2.1	DESENVOLVIMENTO DA AQ E OSSIFICAÇÃO ENDOCONDRAL	22
2.2	A CARTILAGEM ARTICULAR DA CABEÇA DO FÊMUR	24
3	**OBJETIVOS**	27
3.1	OBJETIVO GERAL	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4	**MATERIAL E MÉTODO**	28
4.1	FORMAÇÃO DOS GRUPOS	28
4.2	PREPARAÇÃO DO MATERIAL PARA HISTOLOGIA	30
4.3	ANÁLISE QUALITATIVA	31
4.4	ANÁLISE QUANTITATIVA	31
4.4.1	MORFOMETRIA	31
4.4.1.1	ÁREA	32
4.4.1.2	DENSIDADE DE CONDRÓCITOS	34
4.5	ESTEREOLOGIA – MÉTODO DO NUCLEATOR	35
4.6	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	40
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5	**RESULTADOS**	42
5.1	**Análise Quantitativa**	42
5.1.1	Área dos condrócitos	43
5.1.2	Densidade de condrócitos e da Matriz Extracelular (MEC)	46
5.1.3	Volume dos condrócitos (método do Nucleator).	47
5.2	**Análise Qualitativa**	48
5.2.1	Tipificação das fibras colágenas	48
5.2.2	Avaliação da matriz extracelular (MEC)	50
5.2.3	Arquitetura tridimensional da MEC	51
5.2.4	Aspectos ultraestruturais sob microscopia eletrônica de varredura (MEV)	52

6	**DISCUSSÃO**	56
7	**CONCLUSÕES**	61
	REFERÊNCIAS	62
	ANEXOS	69
	APÊNDICES	72

1 INTRODUÇÃO

A articulação do quadril (AQ) tem sido estudada há décadas, e esse intenso interesse pode ser visto sob o foco da complexidade desta articulação e de sua importância clínica (WALKER, J. M.; GOLDSMITH, 1981).

Classificada como esferóidea, movimentos da AQ em torno dos eixos sagital, longitudinal e transversal, permitem que se realize flexão, extensão, abdução, adução, circundução e rotação, envolvidos nos mecanismos de sustentação e de defesa. Embora com uma ampla gama de movimentos a AQ é considerada, dentre todas as articulações do corpo humano, a mais estável estruturalmente, e a mais difícil de luxar (BRUNNSTROM S.; LEHMKUHL L. DON; SMITH L. K., 1987; DRAKE, R. L.; VOGL, A. W.; MITCHELL, 2010)).

Embora existam trabalhos sobre o desenvolvimento da AQ, tanto em animais (JEFFREY; ASPDEN, 2006; CLUZEL, 2012; CLUZEL et al., 2013) como no homem (GARDNER; GRAY, 1950; FELTS, 1954; DELAERE; DHEM, 1999; LEE; EBERSON, 2006; BARÓTI et al., 2013), a maioria dos que avaliam a sua estrutura precoce em humanos descreve características isoladas, decorrentes de amostras de pequeno tamanho (WALKER, J. M.; GOLDSMITH, 1981). Com isso, na bibliografia à qual se teve acesso, são escassas as informações acerca dos aspectos morfológicos e ultraestruturais da AQ em fetos humanos de diferentes faixas etárias.

Tais características são passíveis de serem abordadas até o presente momento, uma vez que, Walker e Goldsmith (1981), e Fukazawa, Hatta, Uchio et al. (2009), ao avaliarem anomalias congênitas em joelhos, concluiram que o estudo morfológico do desenvolvimento normal dos componentes articulares, além de necessário para uma melhor compreensão das alterações em sua estrutura, podem servir de base teórica para as estratégias de intervenções terapêuticas e cirúrgicas (CLUZEL et al., 2013). Ainda, como descrito por McCarthy (1993) e Tecklenburg et al. (2006), planos adequados para o tratamento de defeitos congênitos requerem um preciso conhecimento das etapas do desenvolvimento normal.

Sabendo-se que o desenvolvimento normal da cabeça do fêmur depende da relação concêntrica, e da estimulação interativa dinâmica entre a sua forma e a do acetábulo, (LI et al., 2013), autores como Jadin, Wong, Bae et al. (2005) destacam a importância de padrões morfométricos na caracterização da densidade e organização dos condrócitos durante o

crescimento e a maturação da cartilagem, uma vez que esses parâmetros constituem um passo significativo para a compreensão da dinâmica de crescimento em nível tecidual (JADIN et al., 2005).

Desta forma, devido ao interesse crescente na compreensão da formação dos componentes articulares (WALKER, J. M.; GOLDSMITH, 1981) e às poucas informações relativas ao desenvolvimento sequencial normal da AQ em fetos humanos, pretende-se, no presente estudo analisar os aspectos morfofuncionais do desenvolvimento da cartilagem articular da cabeça do fêmur.

Entende-se que, através da metodologia proposta, os dados referentes a esse componente cartilagíneo, possam ser utilizados para o entendimento de doenças e malformações, bem como embasar possíveis intervenções terapêuticas e cirúrgicas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DESENVOLVIMENTO DA AQ E OSSIFICAÇÃO ENDOCONDRAL

O esqueleto pélvico é formado pela ossificação endocondral. No entanto, não se sabe como a cartilagem normal é formada antes da ossificação ocorrer (OKUMURA et al., 2017).

O desenvolvimento de todos os elementos da pelve e da AQ se diferenciam de um único grupo de células mesenquimais no mesoderma lateral em membros. Os brotos dos membros, a nível dos segmentos sacrais craniais, desenvolvem-se por volta da 4ª semana (GARDNER; 0'RAHILLY, 1968), com início do processo de condrificação na 5ª semana (STREETER, 1951;(BHOSALE; RICHARDSON, 2008). A cartilagem surge do mesênquima, e, nesse estágio, as células mesenquimais diferenciam-se em condrócitos que proliferam, começam a agregar-se para formar uma massa de células arredondadas intimamente apostas formando um blastema, e dentro de algumas semanas, eles se tornam tecido de pré-cartilagem e cartilagem. O tecido mesenquimatoso que envolve o blastema dá origem à membrana chamada pericôndrio (LEE; EBERSON, 2006; BHOSALE; RICHARDSON, 2008).

Os primeiros osteoblastos diferenciam-se do mesênquima precursor no pericôndrio e produzem um colar ósseo, que se tornará o futuro osso cortical. Vasos sanguíneos invadem através do colar de osso na cartilagem hipertrófica, trazendo osteoblastos progenitores do pericôndrio, que estabelece a matriz óssea para formar o centro de ossificação primário (COP). A matriz de cartilagem é degradada iniciando o crescimento ósseo linear continuo pela ossificação endocondral mediada pela placa de crescimento, enquanto os osteoblastos no pericôndrio formam o osso cortical na circunferência externa (YANG et al., 2016).

A ossificação endocondral é um processo de diferenciação cartilagínea responsável pelo crescimento longitudinal dos ossos longos que ocorre na lâmina epifisial (estrutura cartilaginosa localizada entre a epífise e a diáfise) e experimenta mudanças em sua morfologia envolvendo maturação de condrócitos e mineralização da matriz além de modificações na expressão de tipos de colágenos que pode estar relacionado ao seu ambiente mecânico (CASTRO-ABRIL; GUTIÉRREZ; GARZÓN-ALVARADO, 2016).

Os condrócitos existentes na lâmina epifisial são continuamente substituídos por osso como resultado de eventos sequenciais incluindo proliferação celular e síntese de MEC

contendo fibras colágenas do tipo II (SANDBERG; VUORIO, 1987; ZUSCIK et al., 2008). A lâmina epifisial apresenta uma organização histológica em três zonas: *repouso, proliferação e hipertrofia.* Cada zona distingue estágios morfológicos e bioquímicos durante a diferenciação dos condrócitos. Na *zona de repouso*, os condrócitos estão em um estado quiescente e apresentam uma MEC rica. Na *zona proliferativa*, os condrócitos se dividem por mitose e assumem um fenótipo achatado, e se organizam em colunas depositando matriz cartilagínea contendo fibras colágenas do tipo II (ZUSCIK et al., 2008). Por último, na *zona hipertrófica*, os condrócitos são responsáveis pela invasão vascular, uma complexa rede de canais de cartilagem que 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 centro de ossificação secundário (COS) localizados nas epífises, param a divisão, ocorre a diferenciação celular, degeneram e sofrem apoptose. (CASTRO-ABRIL; GUTIÉRREZ; GARZÓN-ALVARADO, 2016).

Durante o desenvolvimento de ossos longos em humanos os canais de cartilagem surgem durante a 12ª semana de VIU e facilitam o desenvolvimento dos centros de ossificação secundários (COS). Com o início da formação desses centros, 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 (HALL, 2005). A MEC torna-se calcificada e nos espaços recém-formados por lacunas cartilagíneas, 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 para substituir a cartilagem por osso (GARTNER; HIATT, 2014; YANG LIU et al., 2014).

Após a morte e degradação dos condrócitos, sua matriz cartilagínea residual serve como um suporte para posterior deposição mineral e formação óssea (ZUSCIK et al., 2008; GARTNER; HIATT, 2014).

O crescimento do indivíduo termina com o fechamento de placas de crescimento ósseo e sua mineralização completa (sinostose), a fina camada de cartilagem hialina especializada que persiste no final das epífises é a cartilagem articular (CLUZEL, 2012).

2.2 A CARTILAGEM ARTICULAR DA CABEÇA DO FÊMUR

Descrita pelos autores clássicos como Testut (1905); Poirier, Charpi e Cúneo (1908), e Tandler (1928), a cabeça esférica do fêmur, arredondada e lisa, representa dois terços de uma esfera coberta por cartilagem articular. Juntamente com o encaixe profundo fornecido pelo acetábulo da pelve, ela participa da articulação do quadril (AQ), o tipo mais perfeito de articulação esferóide, com superfícies muito coaptadas.

De acordo com Hunziker (1988) e Goldring (2012), a cartilagem articular da cabeça do fêmur, do tipo hialina, representa parte da epífise embrionária que não é reposta por osso durante a ossificação endocondral. Estruturalmente, a cartilagem articular, aneural e avascular, é constituída por aproximadamente 95% de matriz extracelular (MEC), e 5% de condrócitos.

Os condrócitos são responsáveis por manter a matriz extracelular cartilagínea, isto é, síntese, manutenção e modificação gradual da MEC (LOESER, 2000; BHOSALE; RICHARDSON, 2008). A cartilagem madura alimenta e elimina seus resíduos por difusão através da matriz para o líquido sinovial. Dependendo da localização dos condrócitos na cartilagem, podem assumir várias formas, alongadas ou esféricas. Cada condrócito está localizado em uma lacuna, uma cavidade da matriz cartilagínea. Algumas lacunas contêm apenas um condrócito, outros contêm dois, quatro, às vezes seis, formando um grupo isogênico (CLUZEL, 2012).

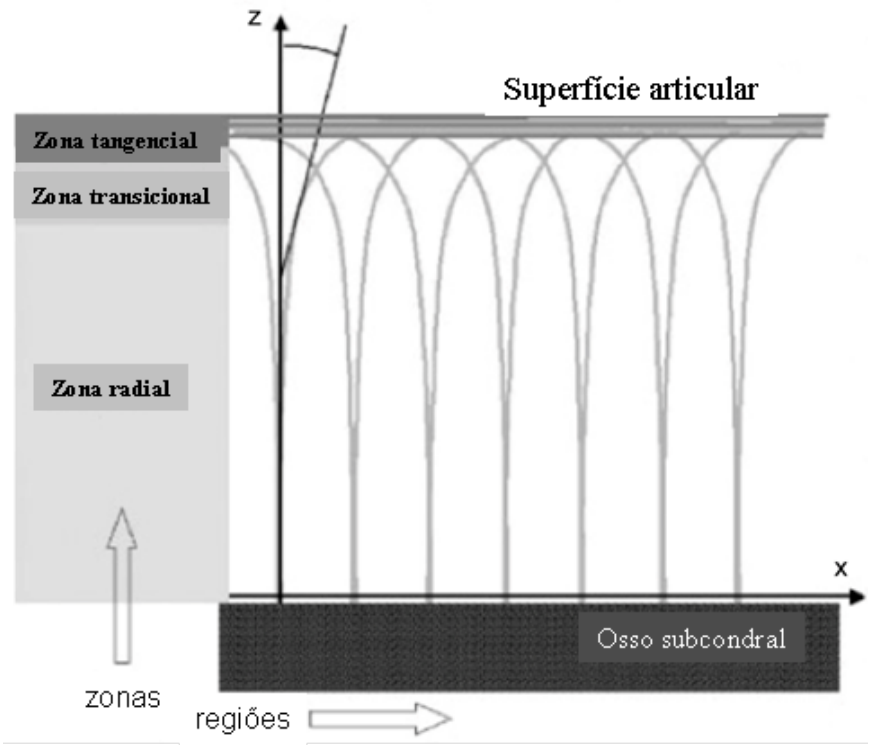
A matriz extracelular na cartilagem é sólida e firme, mas um tanto maleável, contribuindo assim para sua elasticidade (GAO et al., 2014). Altamente especializada composta por água, oxigênio, íons, moléculas de colágenos e agregados de proteoglicanas contendo glicosaminoglicanas (GAG) e glicoproteínas. 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).

O quadro da matriz é 50% de colágeno: o colágeno tipo II é maioria (quase 90% de colágeno), mas também são encontrados os colágenos de tipos VI, IX, X, XI, XII, XIV, todos sintetizados por condrócitos. Estas fibras de colágeno são organizadas em uma rede entrelaçada à qual ligam proteoglicanos (são formados a partir da associação de glicosaminoglicano e uma proteína de ligação que ancora as fibras de colágeno), que representam 35% do peso seco da cartilagem (TODHUNTER, 1996; EURELL e SICKLE, 1998).

A família dos colágenos é composta por mais de vinte tipos geneticamente diferentes e, em especial, citam-se: o colágeno tipo I, sendo amplamente distribuído no organismo e que proporciona resistência à força, tensão e estiramento; o colágeno tipo II, que apresenta estriações transversais e encontra-se arranjado em uma rede tridimensional de finas fibrilas e proporciona resistência à pressão intermitente; e o colágeno tipo III, formando fibras reticulares, arranjadas como uma rede frouxa de finas fibras, propiciando 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 (CLUZEL, 2012).

Da superfície articular ao osso subcondral, a cartilagem articular madura pode ser subdividida em quatro zonas com base na orientação das fibras de colágeno e dos condrócitos na Figura 1 (GRUNDER, 2006).

Figura 1– Modelo em arcadas de Benninghoff



Fonte: (GRUNDER, 2006).
Legenda: Orientação geral das fibras de colagéno do tipo II na MEC da cartilagem articular, com o modelo nas arcadas de Benninghoff.

A cartilagem articular apresenta densidade celular e organização que variam com sua profundidade a partir da superfície articular. A variação associada às propriedades (composições, estruturas e funções) da matriz extracelular na cartilagem articular levou à descrição de zona superficial ou tangencial (0–10% de profundidade da superfície articular), média ou transicional (10–40%) e zona profunda ou radial (40–100%) e zona calcificada segundo Hunziker, (1992).

Na zona superficial, a densidade celular é relativamente alta, e as células estão dispostas em aglomerados paralelos à superfície. Em contraste, na zona profunda, as células estão presentes em uma densidade mais baixa e são organizados em colunas (ZUSCIK et al., 2008; OKUMURA et al., 2017). Os condrócitos na *zona superficial ou tangencial* produzem exclusivamente lubricina que contribui para uma camada limite de lubrificantes incluindo o ácido hialurônico que oferece à cartilagem uma superfície lisa com um coeficiente de fricção muito baixo, que permite eficiência de deslizamento durante o movimento articular (GREENE et al. 2011) e apresenta capacidade de adaptar-se às forças de tensão, compressão e cisalhamento (CLUZEL, 2012). Na *zona média ou transicional*, a densidade celular é menor, com células predominantemente esferoidais, abundantes na matriz extracelular. As fibras colágenas de grande diâmetro são dispostas aleatoriamente e a concentração de agregado de proteoglicano é maior. A *zona profunda ou radial* é a área mais espessa da cartilagem, contendo os maiores condrócitos dispostos perpendicularmente à superfície articular e apresentam a forma esferoidal. Esta zona contém o maior diâmetro de condrócitos e fibrilas de colágeno e maior concentração de proteoglicanos. No entanto, a densidade celular é mais baixa. A *zona de cartilagem calcificada* é a interface entre a cartilagem articular não calcificada (mineralizada em todas as áreas superficial, média e profunda) e o osso subcondral, determina uma atividade metabólica muito baixa por apresentar um pequeno volume de células incorporadas em uma matriz calcificada. A cartilagem é mineralizada com hidroxiapatita, proporcionando ancoragem às fibras da zona radial. Os condrócitos expressam um fenótipo hipertrófico que são únicas em sintetizar o colágeno do tipo X responsável por proporcionar uma grande integridade estrutural, resistência e fornecer um amortecedor de choque juntamente com o osso subcondral (HAN et al., 2011; CLUZEL, 2012; RYAN; BISSET; NEWSHAM-WEST, 2015).

3 OBJETIVOS

Contribuir com conhecimentos morfológicos evolutivos da AQ, a fim de embasar aspectos relacionados a doenças e malformações da articulação, e possíveis tratamentos de lesões da cartilagem articular.

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os aspectos morfofuncionais do desenvolvimento da cartilagem articular da cabeça do fêmur, em fetos humanos de 16 a 31 semanas de VIU.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Com o uso de técnicas de microscopias de luz e eletrônica de varredura, e de morfometria e estereologia, avaliar:

- Qualitativamente, a distribuição e organização das fibras colágenas na matriz extracelular (MEC);
- Quantitativamente, a área, densidade e volume dos condrócitos e da MEC.

Os resultados expressos na presente pesquisa permitem inferir que a organização de colágeno na cartilagem se estabelece muito cedo no estágio fetal, e evolui durante o desenvolvimento para constituir a estrutura adulta conhecida.

4 MATERIAL E MÉTODO

O estudo foi desenvolvido 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).

A presente pesquisa obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo de acordo com Parecer número1320/CEPSH-ICBUSP e do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (Protocolo 1360/16).

4.1 FORMAÇÃO DOS GRUPOS

Foram utilizados 39 fetos conservados em glicerina pelo método de Giacomini (RODRIGUES, 2005), pertencentes ao Biorrepositório do acervo didático do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB III - USP) (Apêndice A), conforme autorização para utilização de amostras do biorrepositório no Anexo A.

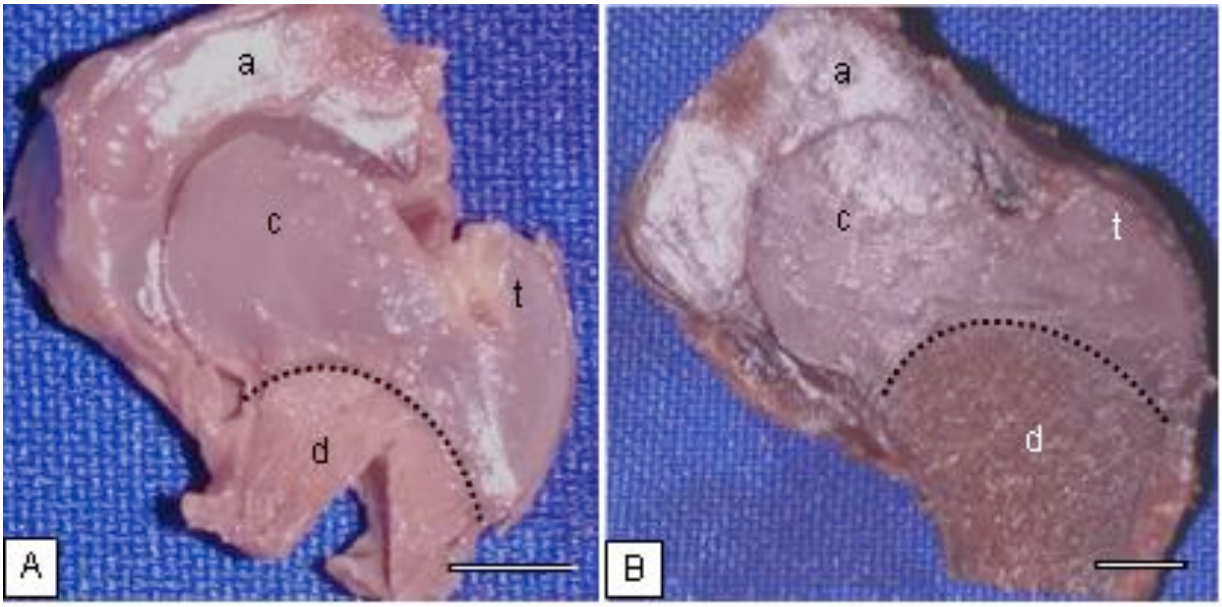
O peso dos espécimes (em gramas) foi obtido em balança digital semi-analítica, e o comprimento (em centímetros), determinado pela distância vértex/cóccix com o uso de um compasso antropométrico (Figura 2). A obtenção desses parâmetros permitiu determinar a faixa etária dos espécimes entre 16 e 31 semanas de vida intrauterina (VIU), de acordo com o estabelecido por Streeter (1920) (Anexo B).

Após a dissecção das articulações direitas e esquerdas do quadril (AQ) de todos os espécimes obteve-se um bloco contendo a região do acetábulo, a cabeça e a parte proximal da diáfise do fêmur, que foi dividido em uma metade **anterior** e outra, **posterior** através de um corte frontal em sua parte média (Figura 3). Os antímeros direitos foram processados para a microscopia de luz, e os esquerdos, para microscopia eletrônica de varredura.

Figura 2 – Compasso antropométrico

Fonte: (SIMÕES, M.C.D., 2018).
Legenda: Compasso antropométrico paraa obtenção da medida vértex-cóccix dos fetos dos diferentes grupos.

Figura 3 – Representação do corte frontal nos quadris

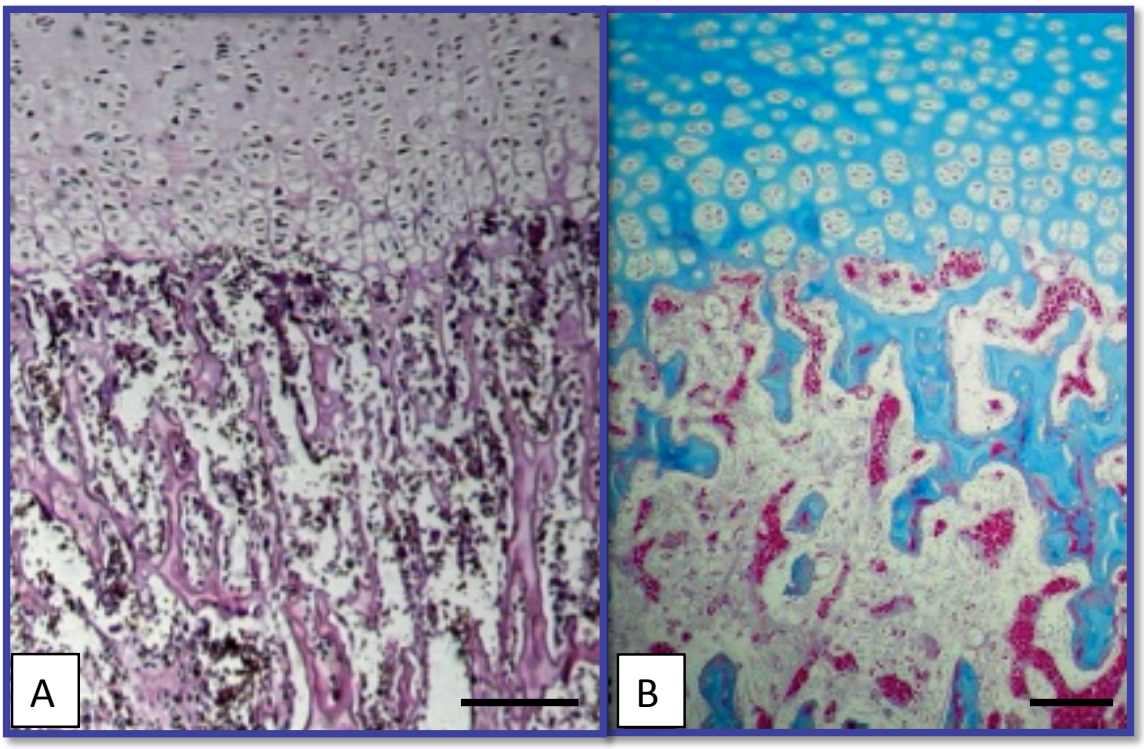


Fonte: (SIMÕES, M.C.D., 2017).
Legenda: Corte frontal da ***AQ*** de fetos de G1 (**A**) e G3 (**B**), evidenciando o acetábulo (a), cabeça do fêmur (c), trocanter maior (t) e a parte proximal da diáfise do fêmur (d). A linha tracejada corresponde à região da lâmina epifisial (barra de calibração: 0,5cm).

4.2 PREPARAÇÃO DO MATERIAL PARA HISTOLOGIA

As metades anteriores e posteriores do **antímero direito** 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. Cortes seriados de 5µm (micrômetros) de espessura foram inicialmente corados pelo Tricromo de Masson (TM) (ROMEIS, 1968), que permitiu retirar da amostra, os espécimes que apresentavam condrodisplasia, conforme ilustra a Figura 4.

Figura 4 - Cortes histológicos da cabeça do fêmur de feto humano



Fonte: (A - SIMÕES, M.C.D., 2017; B - Coelho, 2013).
Legenda: (A) **Fotomicrografia de cortes histológicos da região da lâmina epifisial da cabeça do fêmur de feto G1**- aspecto normal; (B) **Condrodisplasia** em **epífise/metáfise de fêmur de bezerro** do Rio Grande do Sul (COELHO et al., 2013) (TM; 100X/ barra de calibração: 0,5cm).

Desta forma, do grupo inicial, foram separados 20 fetos, que foram divididos em quatro grupos (n=5), de acordo com a faixa etária (Tabela 1).

Tabela 1 - Grupos G1, G2, G3 e G4 de acordo com a faixa etária

GRUPO	IDADE GESTACIONAL (VIU)	NÚMERO DE FETOS
G1	16 a 19 semanas	5
G2	20 a 23 semanas	5
G3	24 a 27 semanas	5
G4	28 a 31semanas	5

Fonte: (SIMÕES, M.C.D., 2018).

4.3 ANÁLISE QUALITATIVA

Para avaliação qualitativa da matriz cartilagínea empregou-se o método da Safranina-O (LUNA, 1968), e a tipificação das fibras colágenas foi obtida através do método do Picro-sirius analisado sob luz polarizada, conforme preconizado por Junqueira, Bignolas e Bretani (1979).

4.4 ANÁLISE QUANTITATIVA

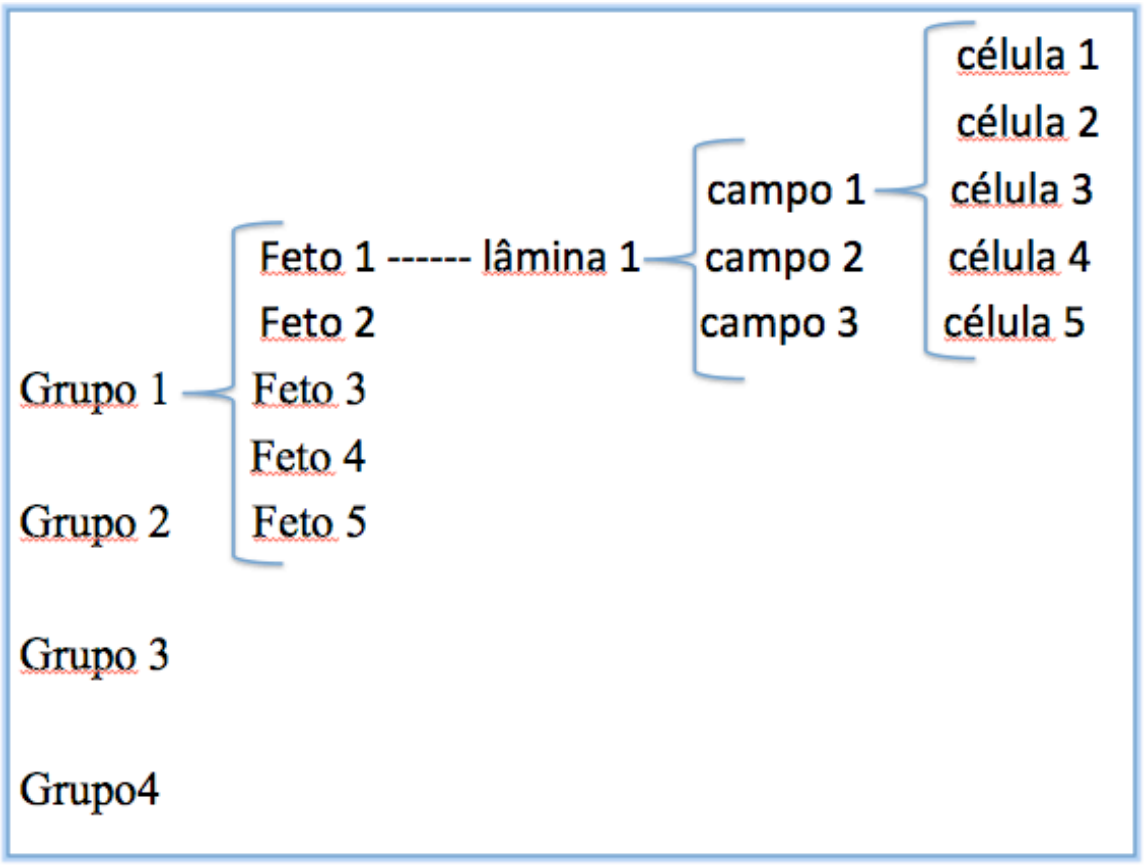
4.4.1 MORFOMETRIA

Utilizando-se os cortes corados pelo método de Masson, os parâmetros morfométricos relativos à **área** e **densidade** dos condrócitos e da matriz extracelular (MEC) foram obtidos com o uso de 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 Clinica e à Cirurgia - LAFACC - ICB/USP.

4.4.1.1 ÁREA

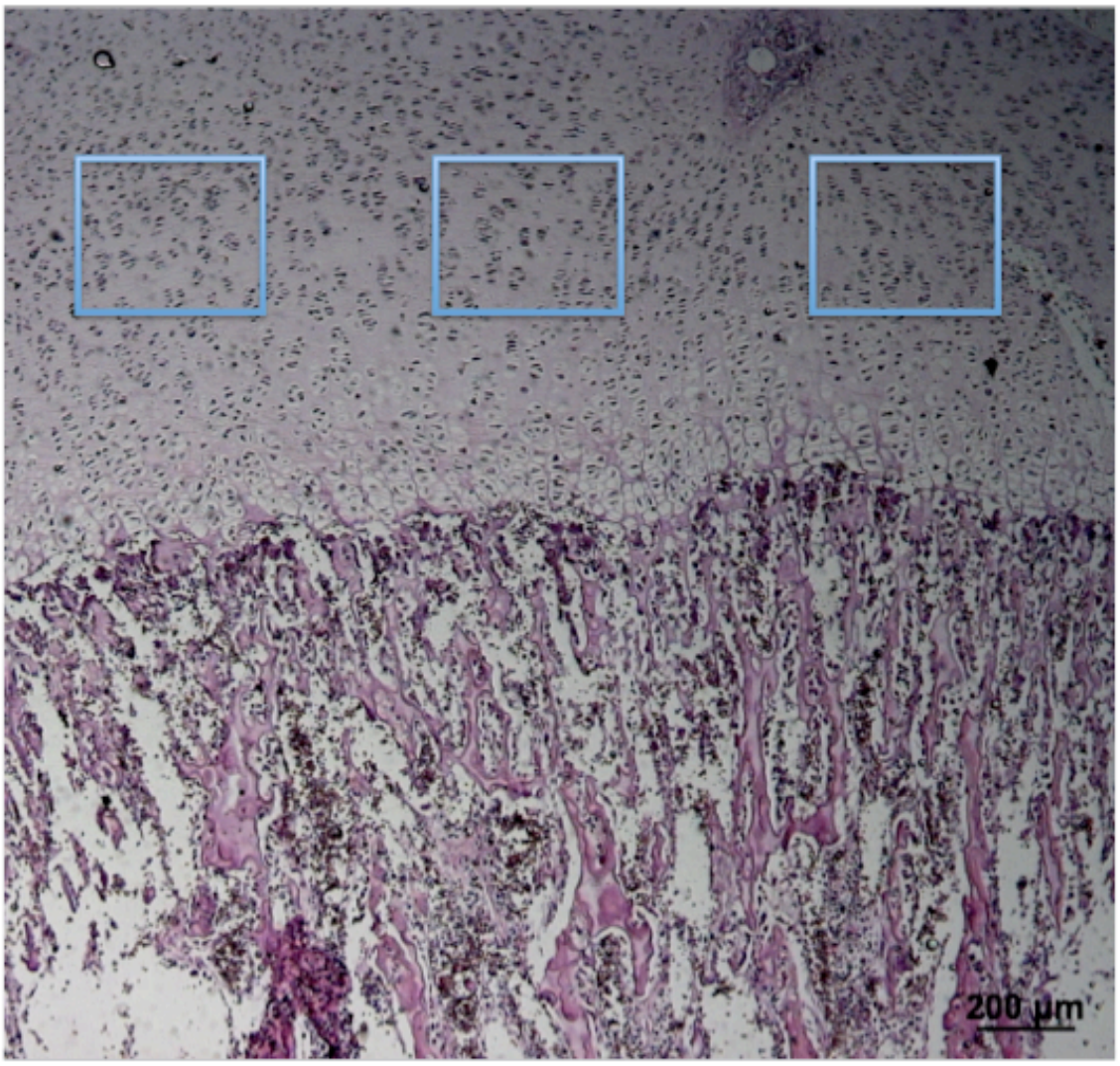
Para a obtenção desses parâmetros, em um corte de cada feto por grupo foram selecionados aleatoriamente, com objetiva de 40x, três campos da parte média da epífise proximal do fêmur, nos quais foram escolhidos cinco condrócitos/campo (Figuras 5 e 6).

Figura 5 – Metodologia utilizada para estudo morfométrico



Fonte: (SIMÕES, M.C.D., 2017).
Legenda: Sequência de lâminas, cortes e condrócitos por feto de cada grupo, para a determinação da área e densidade de condrócitos.

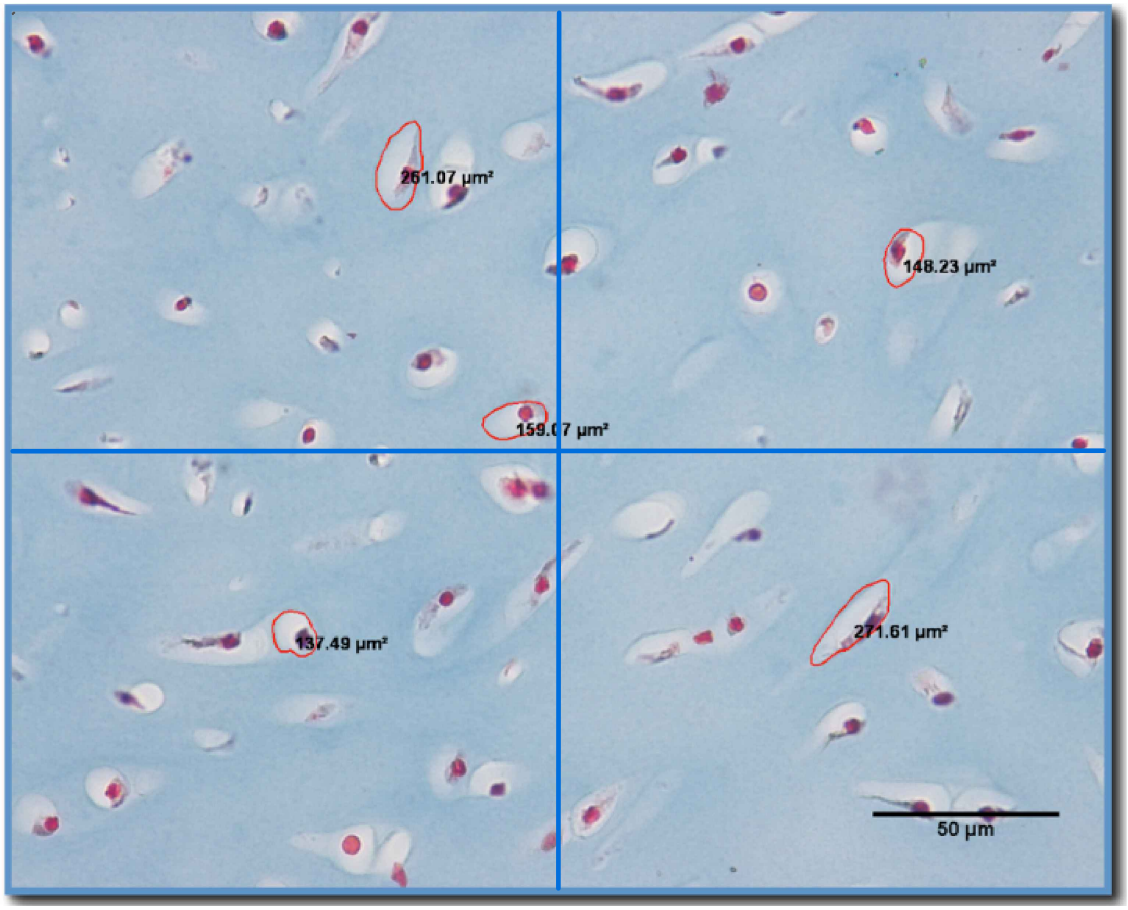
Figura 6 - Representação dos campos da cartilagem do fêmur



Fonte: (SIMÕES, M.C.D., 2017).
Legenda: Fotomicrografia de parte da cabeça do fêmur, onde se observam os três campos representados por uma área quadrangular, contendo os condrócitos que tiveram a área determinada (TM, 40X).

Os cinco condrócitos que tiveram a **área** determinada, foram selecionados sobrepondo-se à imagem do campo uma transparência com uma linha horizontal e outra vertical interseccionadas, que delimitaram quatro espaços com áreas equivalentes. Desta forma, foi medido um condrócito para cada espaço, e um próximo à intersecção das linhas, conforme ilustra a Figura 7.

Figura 7 – Obtenção das áreas dos condrócitos

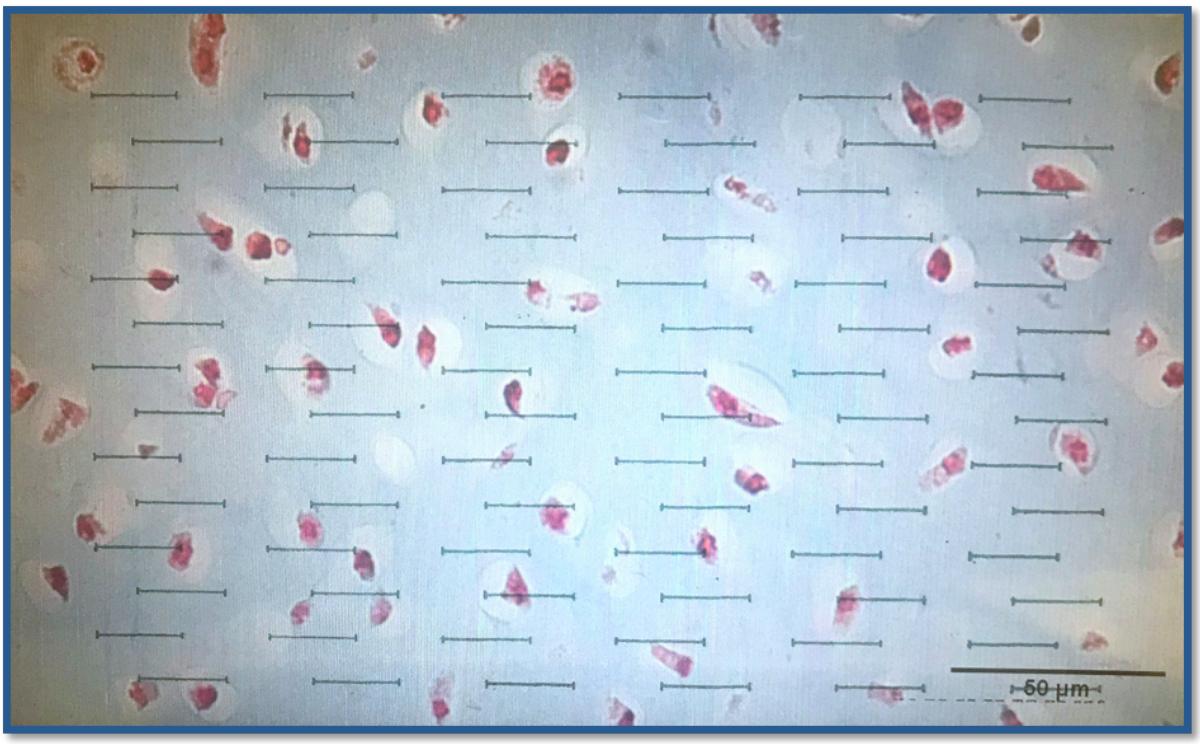


Fonte: (SIMÕES, M.C.D., 2017).
Legenda:Fotomicrografia das áreas dos condrócitos nos quatro espaços e próximo à intersecção das linhas horizontal e vertical, traçadas em papel transparente sobreposto à imagem de um campo de G4 (TM).

4.4.1.2 DENSIDADE DE CONDRÓCITOS

A **densidade** de condrócitos foi determinada nos três campos de cada lâmina, com o auxílio de um sistema teste com *84 linhas eqüidistantes* sobreposto à imagem, conforme ilustra a Figura 8. Desta forma, foram contadas as linhas que incidiram sobre essas estruturas que, transformados em porcentagem de condrócitos e de MEC, foram comparados estatisticamente entre os diferentes grupos (MANDARIM-DE-LACERDA, 1995).

Figura 8 - Representação do campo contendo o sistema teste para determinação da densidade de condrócitos e MEC



Fonte: (SIMÕES, M.C.D., 2017).
Legenda: Representação do sistema teste de 84 linhas eqüidistantes sobreposto à imagem e utilizado na determinação da porcentagem de condrócitos e de MEC (TM, 40X).

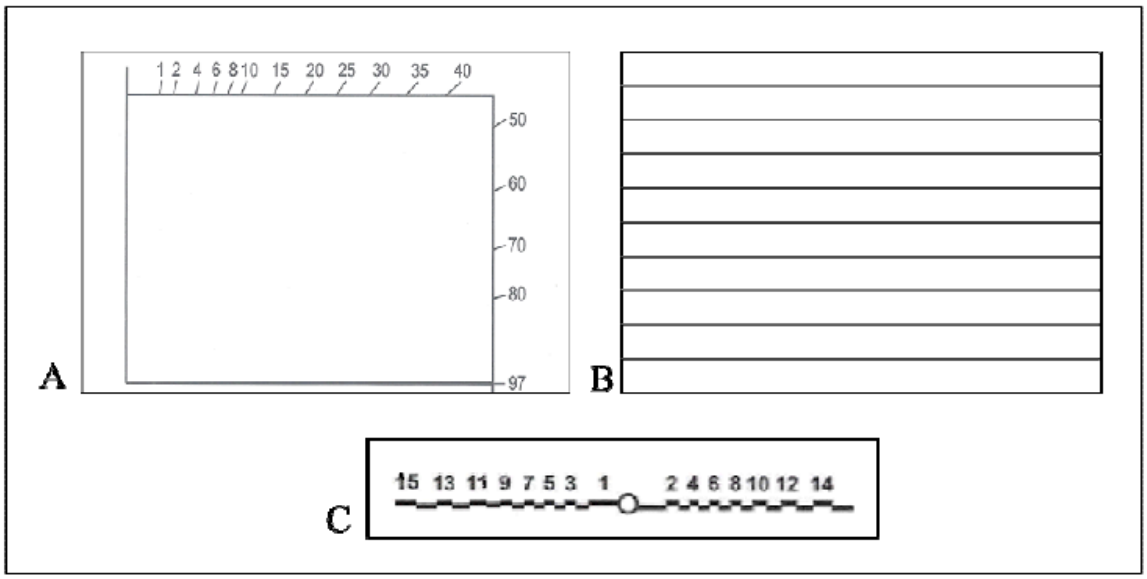
4.5 ESTEREOLOGIA – MÉTODO DO NUCLEATOR

O método nucleator permite estimar, de forma imparcial, o volume de células de formatos variados, e é numericamente remetido a uma reconstrução em formato tridimensional (3D) para estimativa do seu volume (μm^3) (GUNDERSEN et al., 1988). Nas lâminas analisadas, foi utilizada a mesma transparência com uma linha horizontal e outra vertical interseccionadas, para determinação de três condrócitos por espaço e três condrócitos próximos da intersecção das linhas perfazendo um total de 15 condrócitos/ campo de forma que cada célula tenha a mesma probabilidade de ser selecionada, independentemente da sua forma, orientação, ou tamanho, uma vez que foram escolhidas aleatoriamente.

No método do nucleator são utilizados três sistemas testes em conjunto. O 1º sistema teste (Figura 9) (A) determina a angulação a ser adotada para os demais sistemas teste do método seguindo a tabela de números randômicos, o 2º sistema teste (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 (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) que, na realidade, representam classes de medida[1]. Vale mencionar que as réguas podem ter tamanhos variados, adaptados às necessidades da pesquisa. Neste trabalho utilizou-se uma relação entre tamanho condrócitos e tamanho de régua de forma que os dados não estivessem limitados somente à classe 1 e tivessem uma distribuição mais uniforme.

Figura 9 - Os três sistemas testes utilizados no método do Nucleator



Fonte: (SIMÕES, M.C.D., 2018).
Legenda: Os 3 sistemas testes utilizados para o método do Nucleator. (A) determina a angulação a ser seguida; (B) linhas que seguem a angulação determinada e são sobrepostas a A. E (C) que determina os domínios da célula.

O aumento escolhido para análise de todas as lâminas foi de 40x.

Para realização do método, utilizou-se sobre a imagem, a transparência da linha horizontal interseccionada pela vertical em sua parte média, mencionada anteriormente. Após essa definição, foi utilizada para escolha aleatória de números, a *Tabela de números randômicos* (Anexo C), os quais são necessários para utilizar o 1º sistema teste do nucleator (A), seguido do 2º e 3º sistema teste (B) que determina a angulação a ser adotada nos sistemas teste do método.

(1) 2nd ISS Brazilian Stereology Course, 2007.

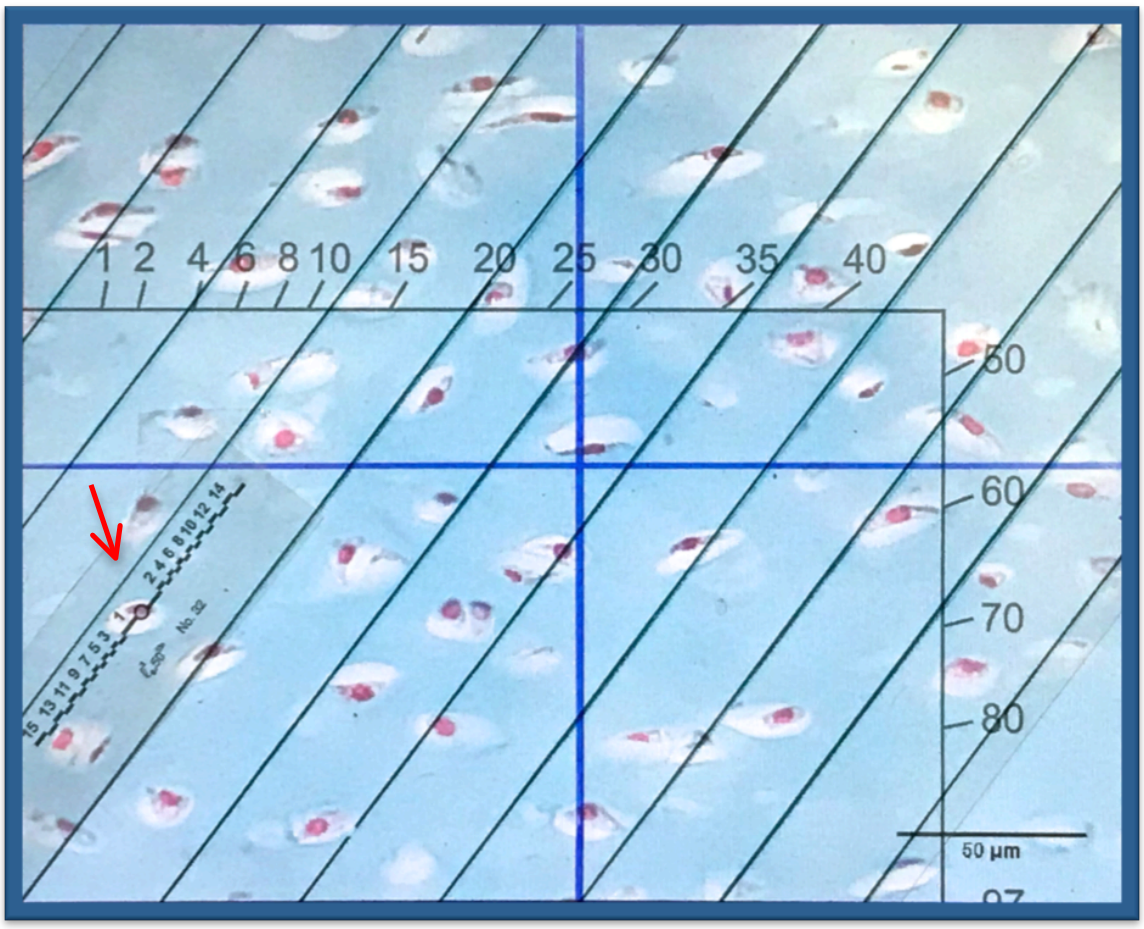
Dessa forma, o primeiro sistema teste foi colocado sobreposto à primeira transparência e após a angulação definida, o 2º sistema teste foi colocado sobrepondo-se à segunda transparência, seguindo a angulação determinada pela Tabela de números randômicos. Em seguida, o 3º sistema teste foi sobreposto aos demais, obedecendo-se a angulação inicial. 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.

Sendo 3 campos de cada feto nas lâminas coradas pelo TM, foram medidos o volume de 45 condrócitos por feto; 225 condrócitos por grupo, resultando em um total de 900 volumes de condrócitos (μm^3).

De modos sistemáticos e uniformemente alocados, estes sistemas testes foram sobrepostos sobre cada uma das imagens utilizadas. Este procedimento é ilustrado na Figura 10.

Em seguida, utilizou-se o quadro (Figura 11) 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 representa 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 10 - Representação dos 3 sistemas testes e a transparência sobrepostos à fotomicrografia analisada no método do nucleator



Fonte: (SIMÕES, M.C.D., 2018).
Legenda: Representação dos 3 sistemas testes e a transparência sobrepostos à fotomicrografia analisada pelo método do nucleator. Seta: demonstração do posicionamento do 3º sistema teste. Angulação de 20º (TM, 40X).

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

$$\overline{V_N} = \frac{4\pi}{3} \cdot \frac{\sum H}{\sum G} = _____ \ \mu m^3$$

Na fórmula acima, *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 11– Tabela utilizada no método do nucleator

G1, F1, C1-C2-C3								
Grupo 1	Feto 1	Campo1	Campo 2	Campo3				
A	B	C	D	E	F	G		H
Class	Upper limit			Class middle	Class	Obs (check marks)	# OBS Digital	E . G
	physical length mm	length ³ mm³	tissue length³ µm³	length³ µm³				
1	5,1	134	487	243	1	55		13365
2	6,8	310	1130	809	2	17		13753
3	8,2	544	1982	1556	3	10		15560
4	9,5	853	3107	2544	4	5		12720
5	10,8	1262	4595	3851	5	1		3851
6	12,2	1803	6563	5579	6			0
7	13,6	2517	9166	7865	7	2		15730
8	15,1	3462	12608	10887	8			0
9	16,8	4712	17159	14883	9			0
10	18,5	6365	23177	20168	10			0
11	20,4	8551	31136	27156	11			0
12	22,5	11441	41660	36398	12			0
13	24,8	15263	55577	48618	13			0
14	27,3	20317	73980	64778	14			0
15	30,0	27000	98316	86148	15			0
						90		74979
					L³n =	833,1	µm³	
					Vn =	3487,912	µm³	

Fonte: (SIMÕES, M.C.D., 2018).
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 quadril.

Desta forma, obteve-se os volumes médios dos condrócitos da epífise proximal do fêmur para os grupos G1, G2, G3 e G4.

4.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A estrutura tridimensional através da MEV foi analisada nas metades anteriores e posteriores do **antímero esquerdo** da AQ de um espécime de cada grupo, previamente submetidos a micro-dissecções com o uso de material oftalmológico sob lupa cirúrgica 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).

Inicialmente, os espécimes lavados em água corrente por um período de 24 horas, foram fixados por 8 horas a 4ºC 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), após esse processo, foram lavados em água destilada a 4ºC por 12 horas, pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio (OsO4) a 1% por 2 horas a 4ºC, e por último, 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 crítico[2], utilizando dióxido de carbono (CO2) líquido, as amostras foram montadas em bases metálicas apropriadas e metalizadas com íons de ouro[3] para análise no microscópio.

(2) BAL-TEC CPD 030 - OerlikonBalzers; Schalksmühle, Alemanha. Departamento de Anatomia, ICB/USP.
(3) BALZERS SCD 040 - OerlikonBalzers; Schalksmühle, Alemanha. Departamento de Anatomia, ICB/USP.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico Statgraphics Centurion XVI. Os dados obtidos relativos a área de condrócitos, densidade de condrócitos e de MEC e volume de condrócitos estão expressos por média ± desvio padrão. A área dos condrócitos foram analisadas descritivamente por distribuição de frequência em cada idade gestacional (G1, G2, G3 e G4). Empregou-se a análise de variância ANOVA com um fator para comparar o comprimento fetal (cm), peso fetal (g), área dos condrócitos (μm^2), densidade de condrócitos e MEC (%) e volume dos condrócitos (μm^3) entre as idades gestacionais (G1, G2, G3 e G4); seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey (ZAR J., 1984). A homogeneidade de variâncias foi verificada e quando necessário empregou-se transformação logarítmica. O nível de significância adotado foi de 5%.

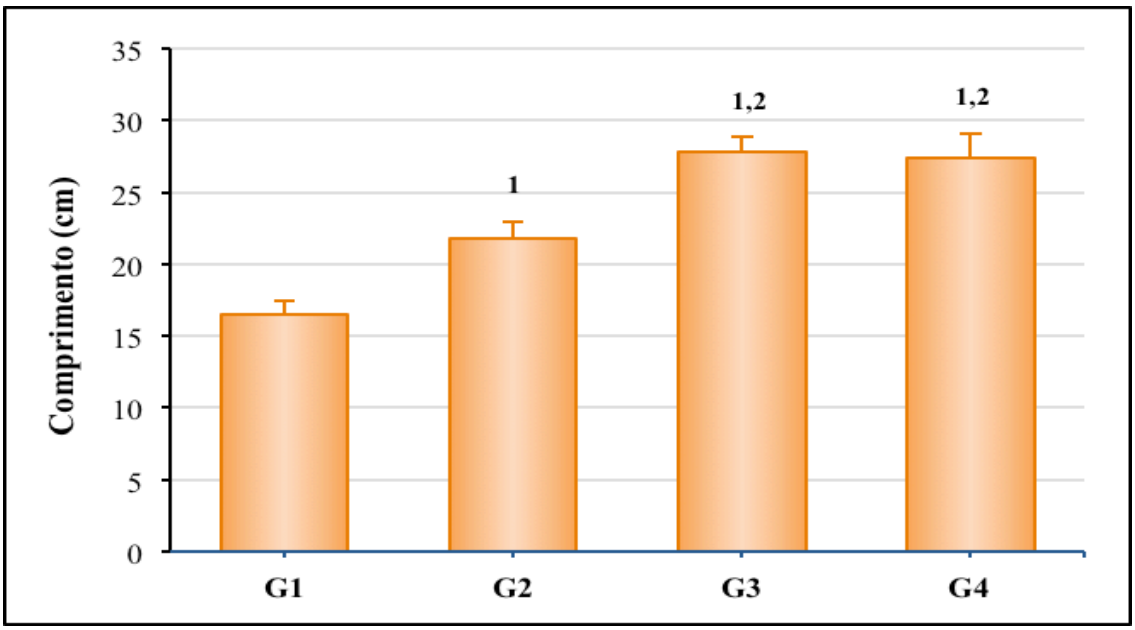
Os dados obtidos para os grupos G1, G2, G3 e G4 da análise qualitativa e quantitativa foram analisados estatisticamente e assim, calculadas as médias (com desvio padrão) da área dos condrócitos, densidade dos condrócitos e da MEC e volume dos condrócitos da epífise proximal do fêmur. Além disso, para a área dos condrócitos foram calculadas as distribuições de freqüência como intuito de fazer inferências sobre o comportamento deste parâmetro ao longo do crescimento.

5 RESULTADOS

Os dados obtidos relativos aos grupos experimentais aqui abordados serão descritos sob os aspectos quantitativos e qualitativos.

5.1 Análise Quantitativa

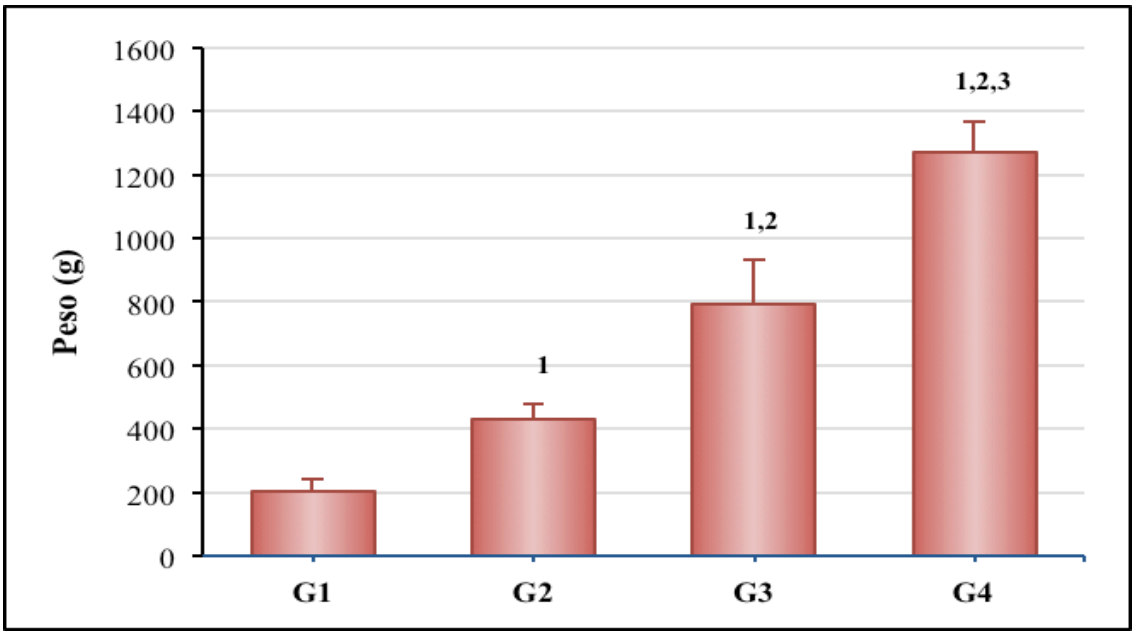
Gráfico 1- Medidas do comprimento fetal (centímetros) nos grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5)



Fonte: (SIMÕES, M.C.D., 2018).
Legenda: Medidas do comprimento fetal (centímetros) nos grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5) (Tukey, [1] ≠G1; [2] ≠G2, p<0,05).

Estatisticamente, ocorreu diferença significante desse parâmetro entre os grupos. Os grupos G3 e G4 apresentam diferença significante em relação a G1 e G2, sendo que G2 é diferente de G1 e G3 não difere em comprimento de G4.

Gráfico 2 - Medidas do peso fetal (gramas) nos grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5)



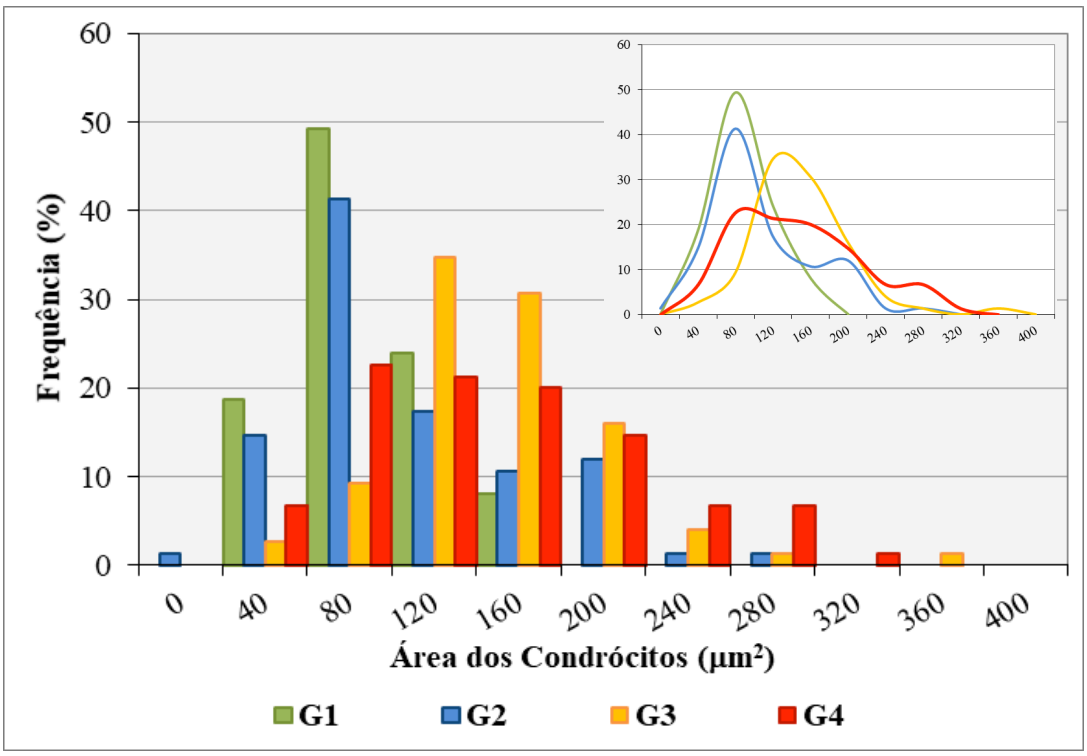
Fonte: (SIMÕES, M.C.D., 2018).
Legenda: Medidas do peso fetal (gramas) nos grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5) (Tukey, [1] ≠G1; [2] ≠G2; [3] ≠G3, p<0,05).

Verificou-se que ocorreu diferença significante do peso entre os grupos. O grupo G4 apresenta diferença significante em relação a G1, G2 e G3; G3 apresenta diferença em relação a G1 e G2 e G2 apresenta diferença significante em relação a G1. Pode-se analisar que conforme o aumento das idades, os fetos apresentam ganho de peso.

5.1.1 Área dos condrócitos

A figura 14 apresenta a distribuição de freqüência para a área dos condrócitos da epífise proximal do fêmur, entre os grupos G1, G2, G3 e G4.

Gráfico 3 - Distribuição de frequência para a área dos condrócitos dos grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5)



Fonte:: (SIMÕES, M.C.D., 2018).
Legenda: Distribuição de frequência para a área dos condrócitos (μm^2) no fêmur, nos grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5), gráficos de barra e linha (envoltória).

Ao se analisar essa distribuição verificou-se que a área dos condrócitos de G1 estão distribuídas de 40μm^2 a 160μm^2 com maior concentração (49%) na faixa de 80μm^2.

No grupo G2, 42% dos condrócitos tiveram sua área na faixa de 80μm^2, sendo que, G3 exibiu áreas de condrócitos concentradas na faixa de 120 μm^2 (35%) e 160 μm^2 (31%).

O grupo G4 foi o que apresentou maior variabilidade desse parâmetro, ou seja, a área de 22% dos condrócitos esteve concentrada na faixa de 80μm^2, 21% na faixa de 120μm^2 e 20% na faixa de 160μm^2.

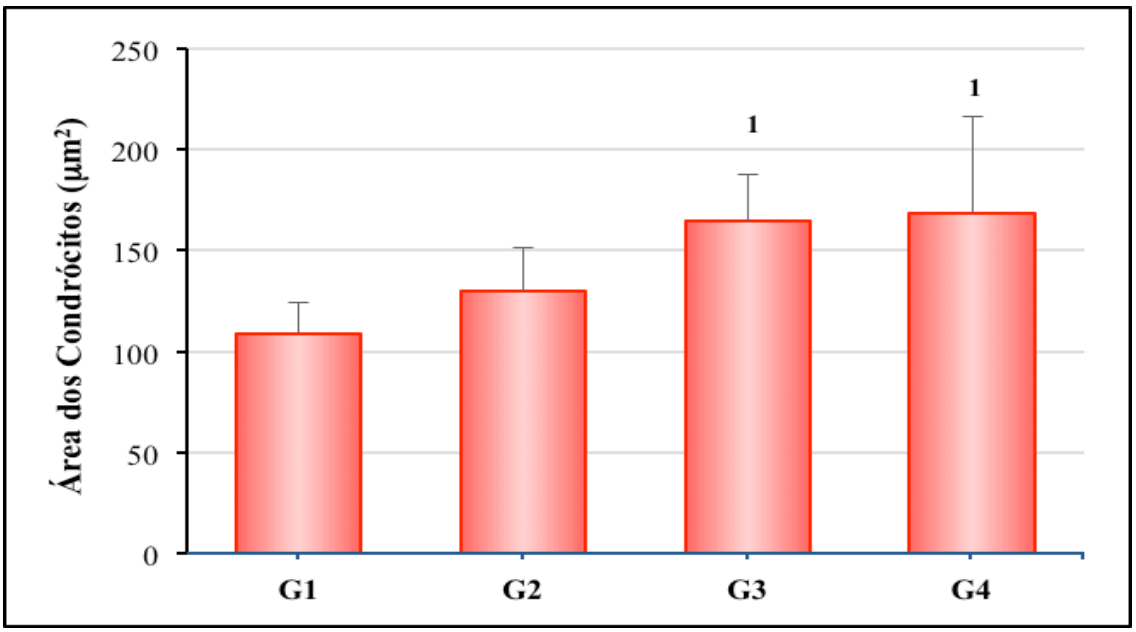
Na Tabela 2 e Figura 15, estão expressas as médias da área dos condrócitos da epífise proximal do fêmur, referentes aos grupos G1, G2, G3 e G4.

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

Grupo	Área dos condrócitos (μm^2)
G1	107,6 ± 14,4
G2	126,6 ± 21,7
G3	168,9 ± 15,9
G4	168,6 ± 48,1

Fonte: (SIMÕES, M.C.D., 2018).
Legenda: Média (±DP) das áreas dos condrócitos (μm^2) nos grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5). (ANOVA um fator, p=0,006/ p<0,05).

Gráfico 4 - Representação gráfica das médias das áreas (μm^2) dos condrócitos nos grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5)



Fonte: (SIMÕES, M.C.D., 2018).
Legenda: Média (±DP) das áreas dos condrócitos (μm^2) nos grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5) (Tukey, [1] ≠ G1, p<0,05).

Estatisticamente, ocorreu diferença significante desse parâmetro entre os grupos. Assim, quanto maior a faixa etária dos fetos, maior a área dos condrócitos (G1 < G2 < G3 < G4), sendo que os dois últimos, não diferiram entre si (p<0,05).

5.1.2 Densidade de condrócitos e da Matriz Extracelular (MEC)

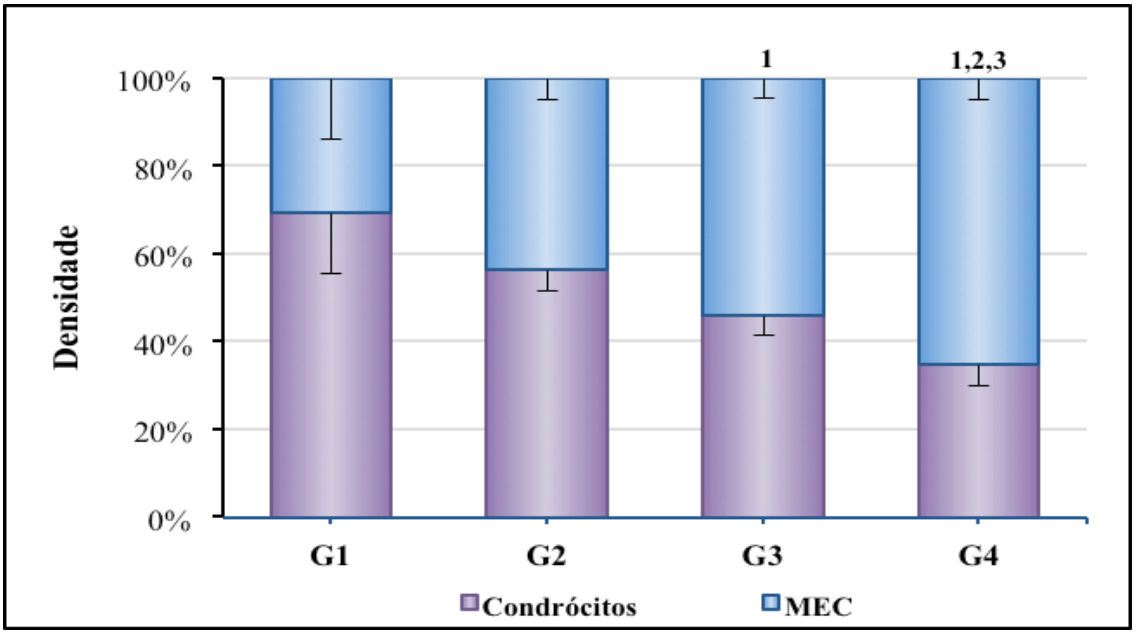
Na Tabela 3 e na Figura 16 são apresentadas as médias (± DP) da densidade percentual de condrócitos e de MEC, nos diferentes grupos.

Tabela 3 – Densidade de condrócitos e de matriz extracelular (MEC) nos grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5)

Grupo	Densidade dos condrócitos (%)	Densidade de MEC (%)
G1	0,694 ± 0,139	0,306 ± 0,139
G2	0,564 ± 0,048	0,436 ± 0,048
G3	0,462 ± 0,044	0,538 ± 0,044
G4	0,348 ± 0,047	0,652 ± 0,047

Fonte: (SIMÕES, M.C.D., 2018).
Legenda: Média (± DP) da densidade percentual dos condrócitos e de matriz extracelular para os grupos G1, G2, G3 e G4. (ANOVA um fator, p<0,001/ p<0,05).

Gráfico 5 - Densidade dos condrócitos e de matriz extracelular (MEC) para os grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5)



Fonte: (SIMÕES, M.C.D., 2018).
Legenda: Média (± DP) da densidade percentual dos condrócitos e de matriz extracelular para os grupos G1, G2, G3 e G4 (condrócitos : Tukey, $^{1} \neq$ G1; $^{2} \neq$ G2; $^{3} \neq$ G3, $p < 0,05$; MEC : $^{1} \neq$ G1; $^{2} \neq$ G2; $^{3} \neq$ G3, $p < 0,05$).

Em linhas gerais, verificou-se que, relativamente à densidade de condrócitos, há uma

diminuição do grupo G1 ao grupo G4, este, diferente significativamente em relação aos demais grupos.

Contrariamente, o que ocorre com a densidade MEC, é uma elevação de sua densidade com o aumento da faixa etária, ou seja, de G1 a G4.

5.1.3 Volume dos condrócitos (método do Nucleator)

Os dados relativos aos grupos G1, G2, G3 e G4 obtidos por essa metodologia são apresentados na Tabela 4 e Figura 17.

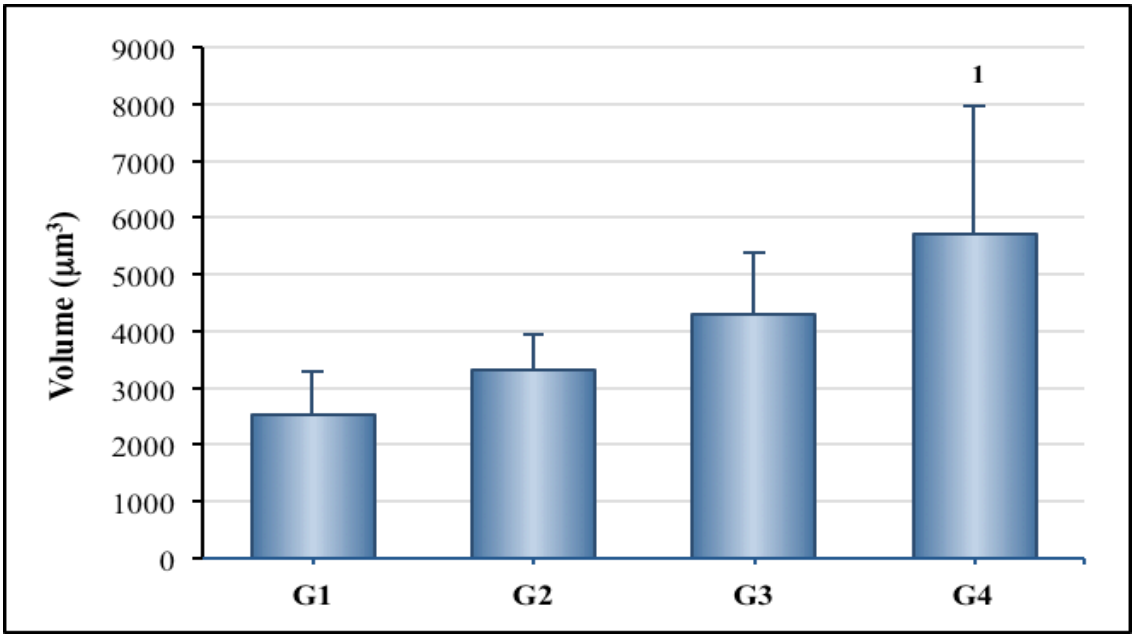
Tabela 4 - Médias dos volumes dos condrócitos da epífise proximal do fêmur, nos grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5)

Grupo	Média do Volume dos condrócitos(μm^3)
G1	2536,5 ± 759,0
G2	3307,0 ± 648,2
G3	4305,5 ± 1074,9
G4	5716,8 ± 2263,8

Fonte: (SIMÕES, M.C.D., 2017).
Legenda: Médias (± DP) dos volumes (μm^3) dos condrócitos nos grupos G1, G2, G3 e G4. (ANOVA um fator, p=0,009/ p<0,05).

O gráfico da Figura 17 a seguir, apresenta as variações de volume dos condrócitos.

Gráfico 6 - Comparação no volume dos condrócitos entre os grupos G1, G2, G3 e G4



Fonte: (SIMÕES, M.C.D., 2018).
Legenda: Média (±DP) dos volumes dos condrócitos (μm^3) nos grupos G1, G2, G3 e G4 (n=5) (Tukey, $^1 \neq$ G1, $p < 0,05$).

Inicialmente, observou-se que a média do volume dos condrócitos aumenta com o avançar da idade. Tomando-se como base o grupo G1 (menor faixa etária), os aumentos de volume médio verificados foram de 30,37 % para G2; 41,08 % para G3, e de 55,63% para G4.

Ao se avaliar estatisticamente, foi detectada diferença significante de volume dos condrócitos entre os grupos, onde G1 < G2 < G3 < G4, ou seja, quanto maior a faixa etária dos fetos, maior o volume dos condrócitos.

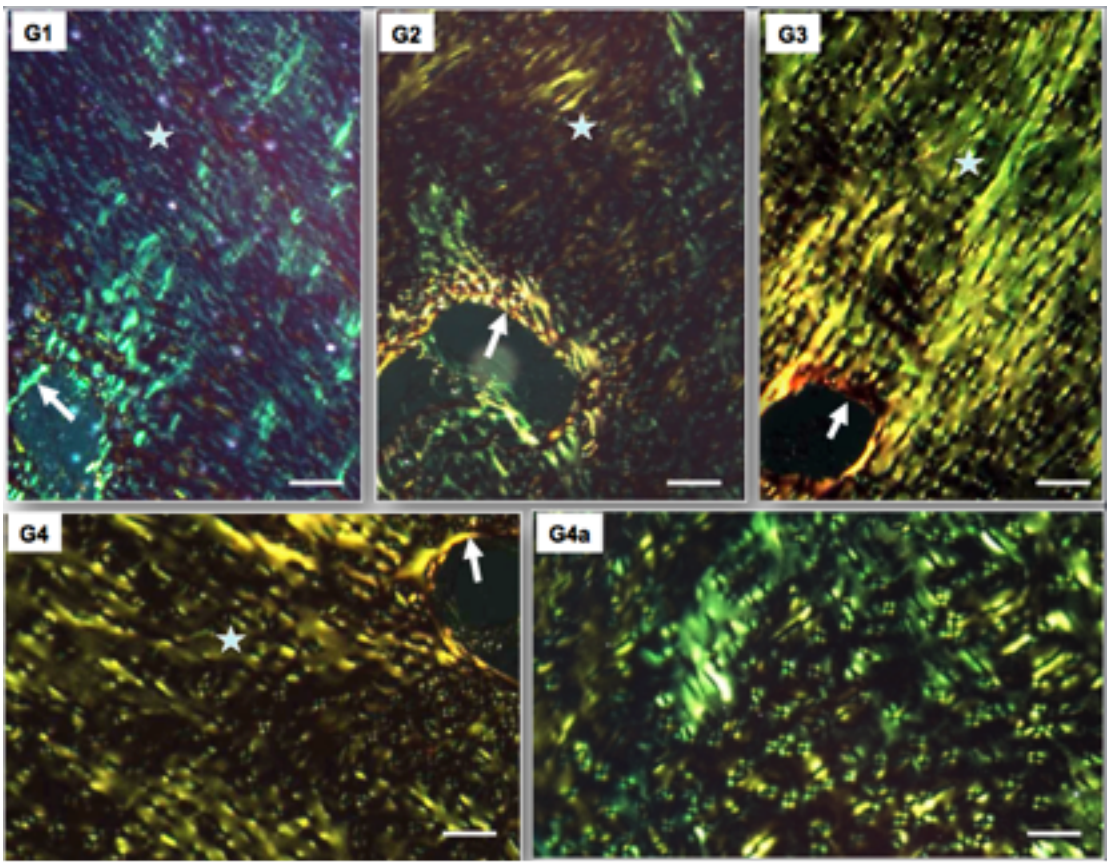
5.2 Análise Qualitativa

5.2.1 Tipificação das fibras colágenas

Utilizando-se a 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.

Dessa forma, na camada superficial da epífise do fêmur, em G1 o predomínio foi de fibras do tipo II, azuladas e delgadas orientadas em malha espessa e irregular; já em G2 verificou-se que as fibras do tipo I e III, amarelo-esverdeadas de espessura intermediária em G2 e G3, organizadas de forma compacta. Os fetos de G4 caracterizaram-se por exibir uma grande quantidade de fibras do tipo III (esverdeadas) onde se observa a organização dessas fibrilas em rede pantográfica G4a (Figura 12).

Figura 12 - Representação do tipo de fibras colágenas da cabeça do fêmur nos diferentes grupos de G1 a G4

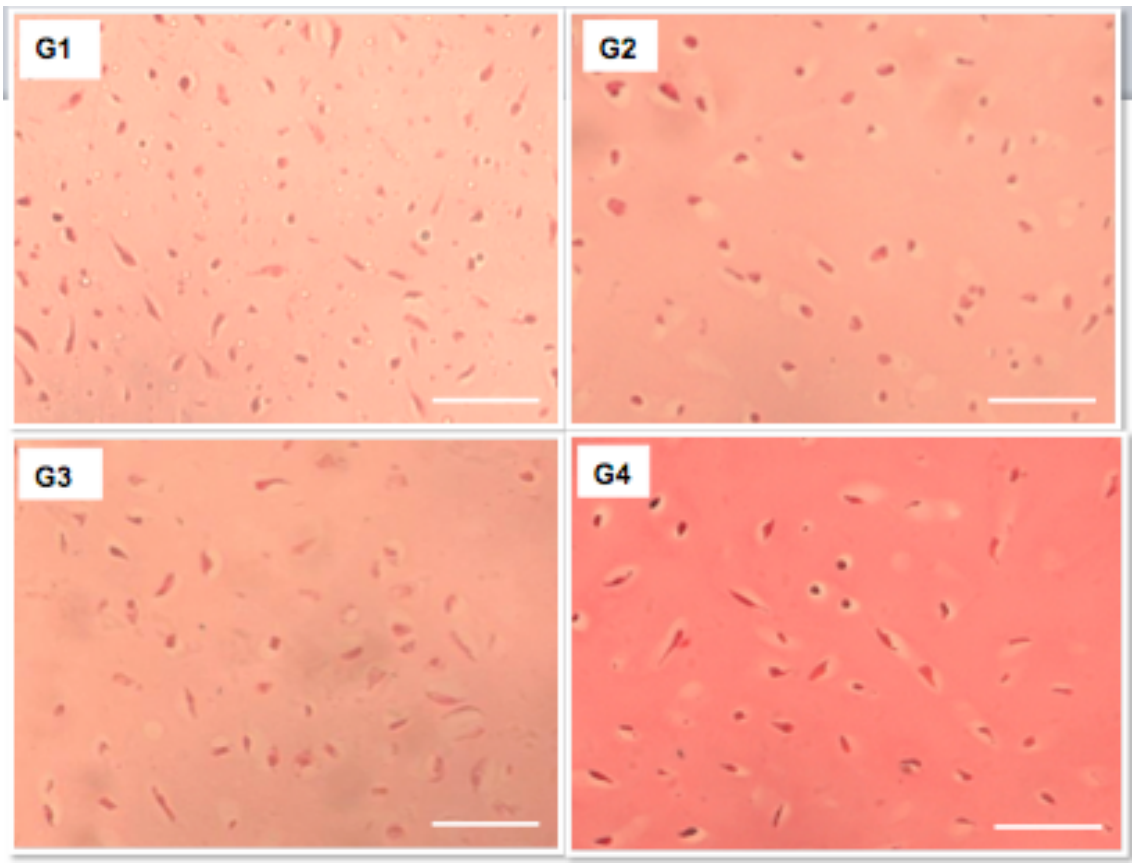


Fonte: (SIMÕES, M.C.D., 2018).
Legenda: Fotomicrografias destacando-se o padrão de coloração e de organização dos tipos de fibras colágenas nos diferentes grupos. Notar a distribuição das fibras do tipo II (*) azuladas e delgadas em G1; amarelo-esverdeadas(*) e de espessura intermediária em G2 e G3, e predominantemente esverdeadas (*) em G4, onde se observa em determinados trechos, a organização em malha pantográfica (G4a). As setas indicam as fibras colágenas constituintes das paredes dos vasos: do tipo III em G1, e do tipo I nos demais grupos. (Picro-sirius sob luz polarizada. Barra de calibração: 20 µm).

5.2.2 Avaliação da matriz extracelular (MEC)

Na Figura 13, observa-se a MEC da cabeça do fêmur dos grupos G1, G2, G3 e G4 evidenciada pelo método da Safranina-O.

Figura 13 – Representação da matriz extracelular nos grupos de G1 a G4



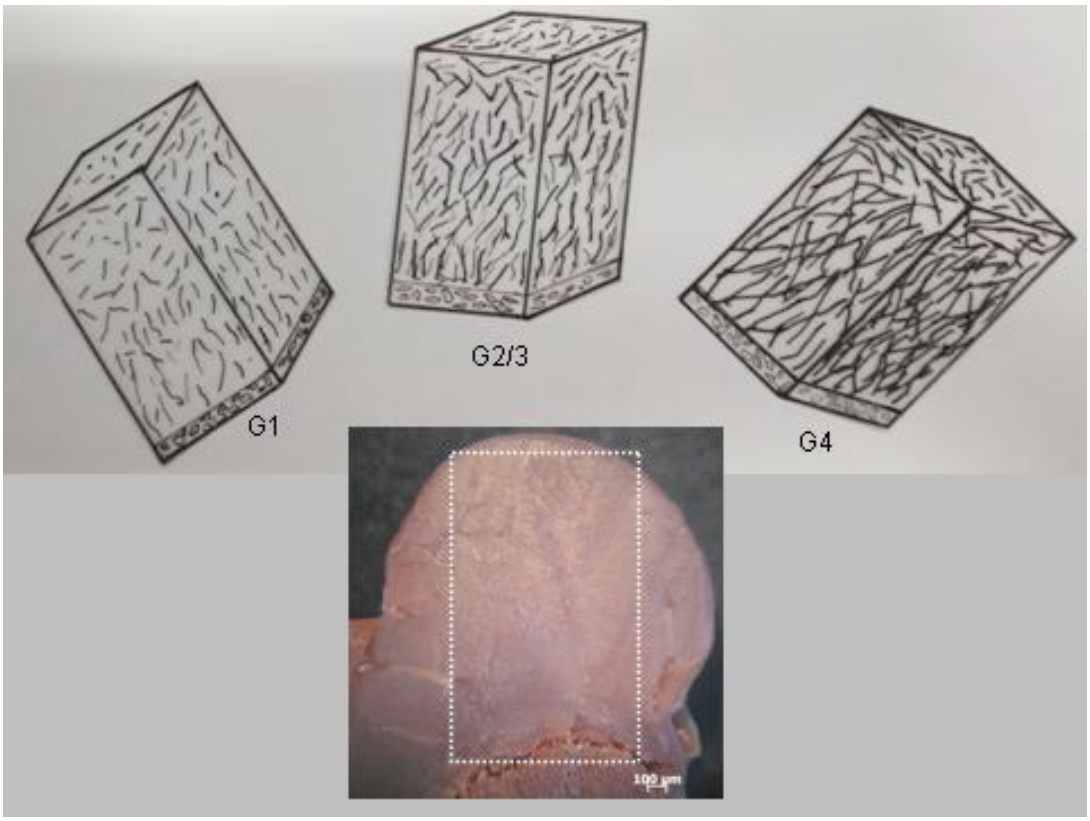
Fonte: (SIMÕES, M.C.D., 2018).
Legenda: Fotomicrografias evidenciando a matriz extracelular (MEC) nos diferentes grupos. Notar as diferentes densidades entre os grupos, destacadas pela tonalidade das colorações: mais clara em G1; intermediária em G2 e G3, e mais intensa em G4. (Safranina-O. Barra de calibração: 50 µm).

Ao se analisar a coloração da MEC por esse método, notou-se uma evolução no padrão de intensidade, isto é, a mesma variou de menos intensa em G1, para mais intensa em G4. Relativamente a G2 e G3, não foram observadas diferenças entre os grupos, que apresentaram um padrão de intensidade maior que G1, e menor que G4.

5.2.3 Arquitetura tridimensional da MEC

Com os dados obtidos nos ítens 5.2.1e 5.2.2 é possível inferir sobre a disposição espacial das fibras colágenas na MEC da cabeça do fêmur.

Figura 14 - Esquemas ilustrando a disposição das fibras colágenas da MEC da cabeça do fêmur nos grupos G1, G2/G3 e G4



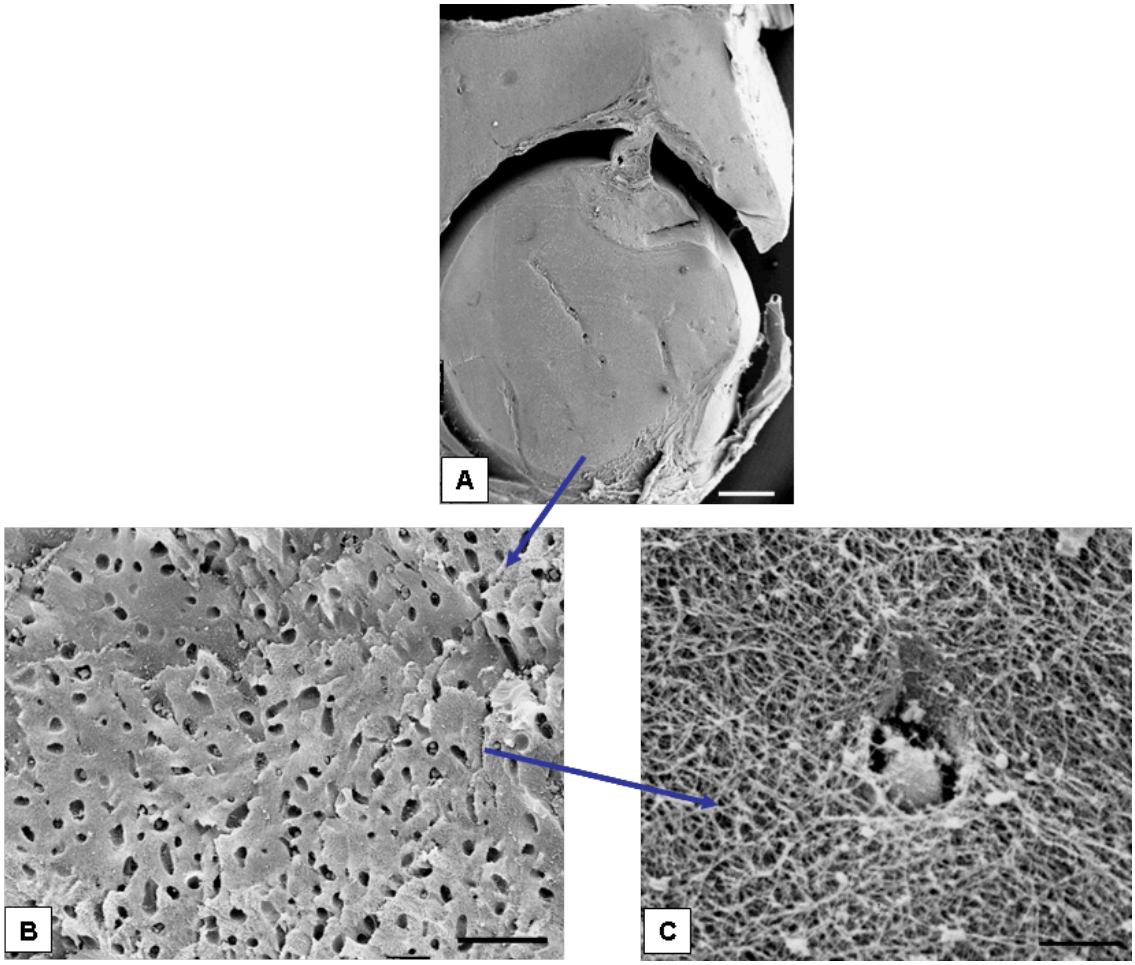
Fonte: (SIMÕES, M.C.D., 2018).

Desta forma, mesmo no grupo mais jovem (G1), nota-se que há uma certa estratificação em direção à superfície, onde, desde essa fase precoce, as fibras mais profundas estão arranjadas no sentido longitudinal, e as mais superficiais, no sentido oblíquo. Isto se evidencia em G2 e G3, e assume característica final em G4, onde as fibras superficiais, inicialmente dispostas de maneira obliqua, assumem trajeto transversal ao longo eixo da cabeça do fêmur, ou seja, paralelo à superfície articular (Figura 14).

5.2.4 Aspectos ultraestruturais sob microscopia eletrônica de varredura (MEV)

No geral, verificam-se os condrócitos inseridos em loci distribuídos na matriz extracelular da cartilagem (MEC); esta, formada por fibras que, após circundarem e delimitarem os loci dispõem-se em rede de malha pantográfica (Figura 15).

Figura 15 - Eletronmicrografias de varredura da cartilagem da cabeça do fêmur de feto de G1



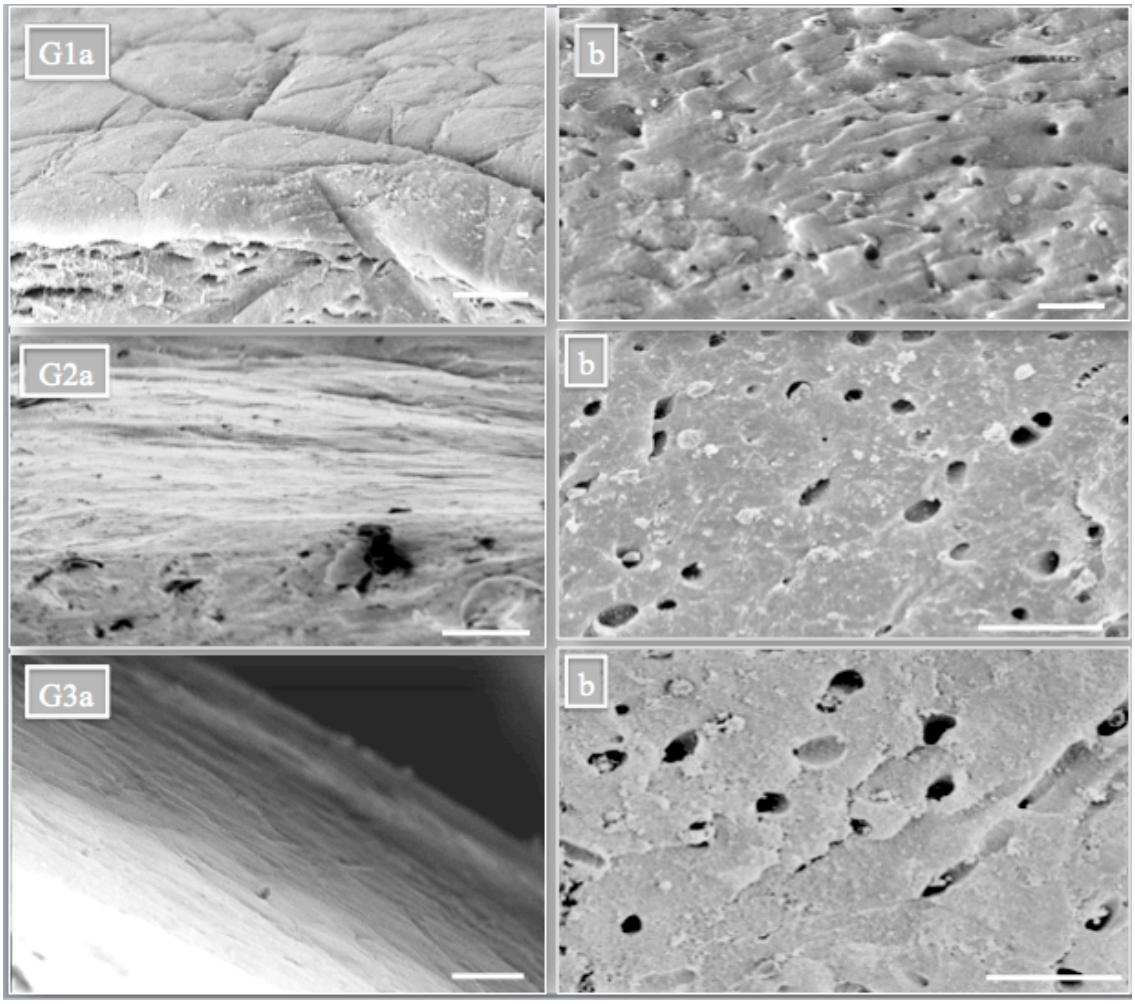
Fonte: (SIMÕES, M.C.D., 2018).
Legenda: Eletronmicrografias de varredura da cartilagem da cabeça do fêmur de feto de G1. A- A cabeça do fêmur cartilagínea, inserida no acetábulo (notar o ligamento da cabeça do fêmur). B- Detalhe dos loci de condrócitos distribuídos na matriz extracelular da cartilagem (MEC); C- Condrócito em seu locus circundado por fibrilas colágenas da MEC, dispostas em rede pantográfica. (Barra de calibração: A- 1mm; B, C - 30 μm).

Quanto ao aspecto tridimensional da superfície articular, G1 destacou-se por apresentar uma superfície irregular, com sulcos rasos e profundos, conferindo-lhe um aspecto

enrugado. Já em G3 e G4 essa superfície era praticamente lisa, com saliências alongadas e discretas em toda a sua extensão. Os espécimes de G2 exibiram um aspecto intermediário, ou seja, saliências espessas e alongadas, separadas por depressões relativamente profundas.

Na parte média da cartilagem, os condrócitos estavam mais densamente arranjados em G1 e G2. Já G3 e G4, que por apresentar mais MEC, caracterizaram-se pela distribuição mais dispersa dos condrócitos (Figura 16).

Figura 16 - Eletromicrografia de varredura da superfície articular e da parte média da cartilagem nos grupos representativos G1, G2 e G3.

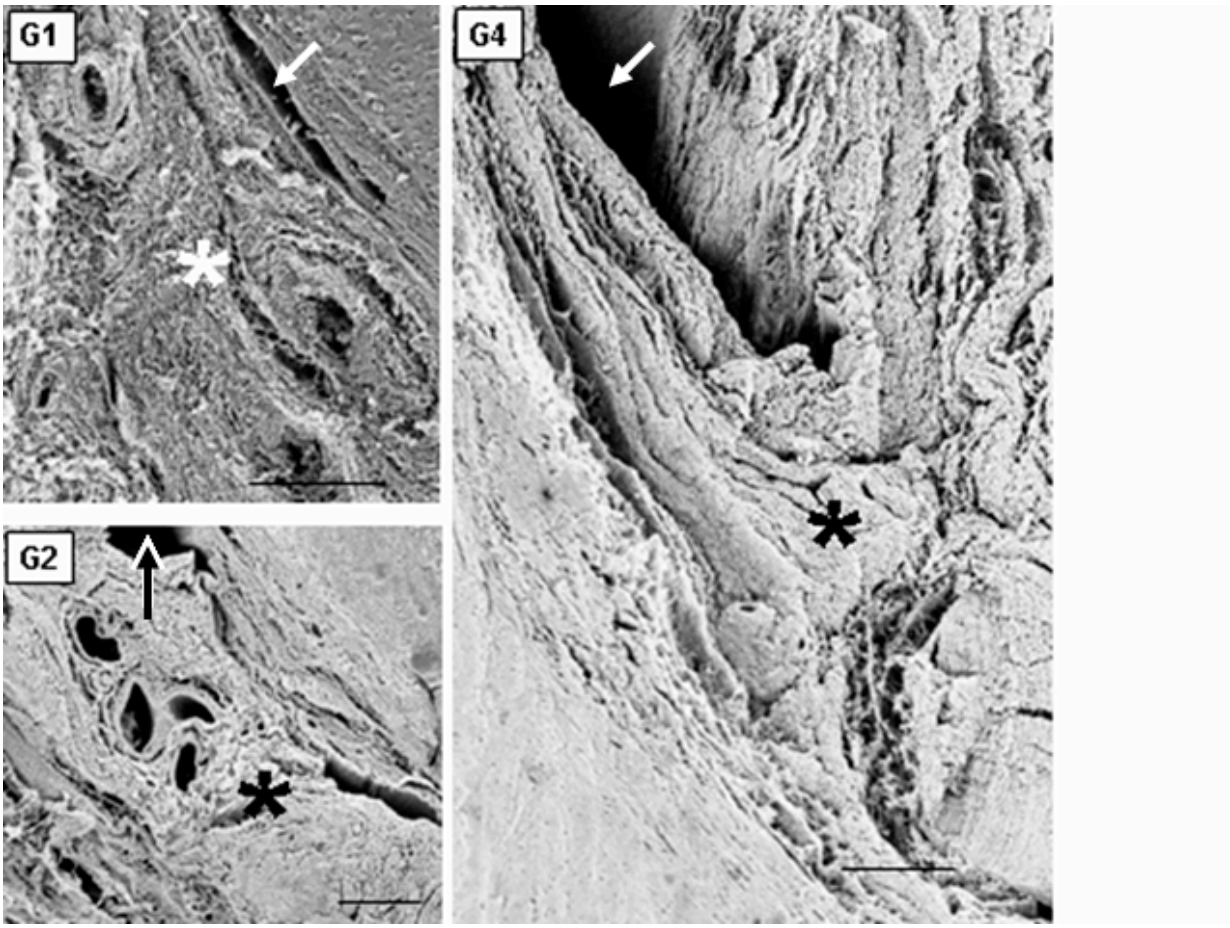


Fonte: (SIMÕES, M.C.D., 2018).
Legenda: Eletromicrografias de varredura da superfície articular e da parte média da cartilagem. Detalhe dos loci de condrócitos distribuídos na matriz extracelular nos grupos representativos G1, G2 e G3. (Barra de calibração: 30 µm).

Ao se avaliar a região de inserção da cápsula articular próximo ao colo do fêmur, verificou-se em G1 e G2, uma estrutura capsular relativamente delgada, densamente irrigada.

Nos espécimes de G3 e G4, foram evidentes o espessamento capsular, e a diminuição na irrigação da região (Figura 17).

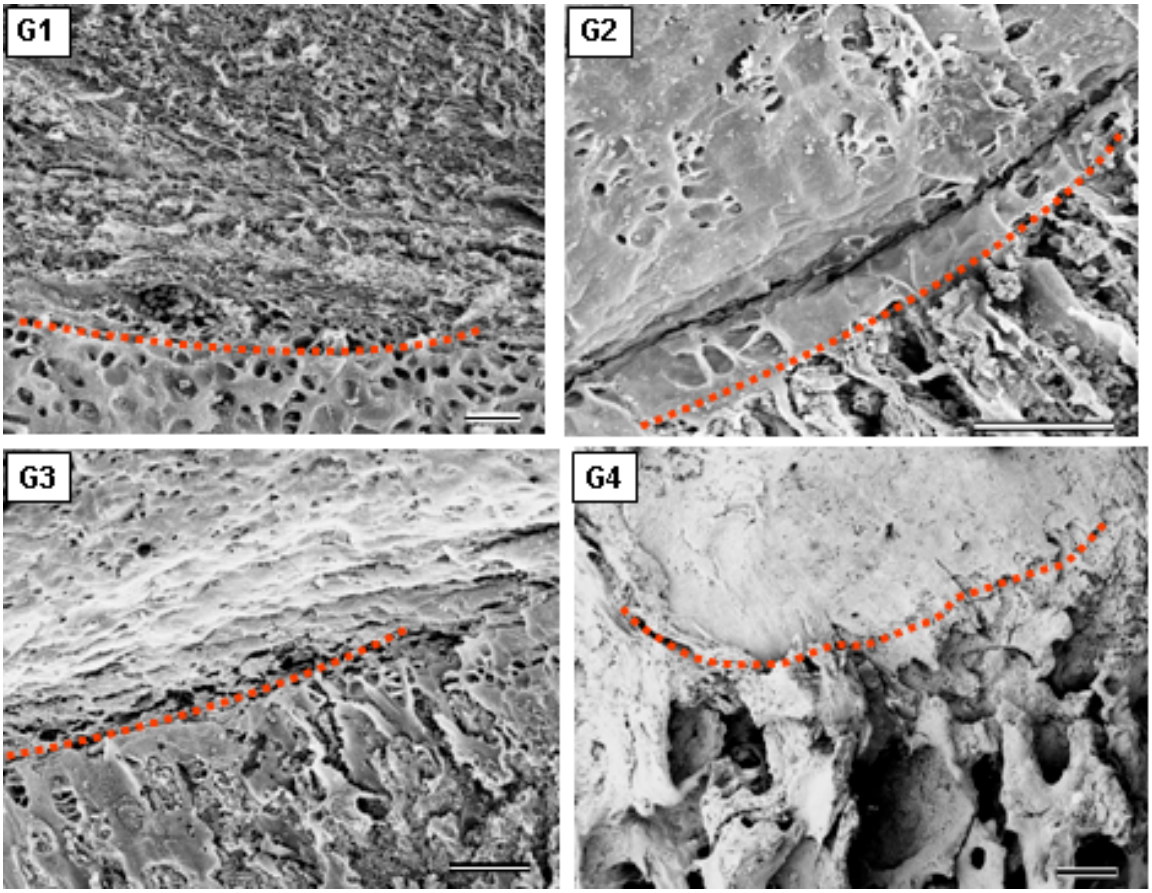
Figura 17 - Eletromicrografia de varredura nos grupos representativos G1, G2, G3 e G4



Fonte: (SIMÕES, M.C.D., 2018).
Legenda: Região de inserção da cápsula articular próximo ao colo do fêmur. Notar em G1 e G2 a densidade de vasos, e o espessamento da cápsula em G4. A seta indica a cavidade articular. (barras de calibração: 30 µm).

Na Figura 18 é possível observar a evolução, tanto da parte cartilagínea da cabeça do fêmur, como da região metafisária.

Figura 18 - Eletromicrografia de varredura da parte cartilagínea G1, G2, G3 e G4



Fonte: (SIMÕES, M.C.D., 2018).
Legenda:A linha tracejada indica a transição entre a cabeça do fêmur (acima), e a região metafisária (abaixo). (Barra de calibração: 30 µm)

Assim, enquanto em G1 tem-se uma cabeça do fêmur particularmente fibrosa e a região metafisária em processo inicial de calcificação, a densidade cartilagínea aumenta gradativamente, com os loci de condrócitos bem evidenciados, e a região metafisária assume um aspecto de tecido ósseo característico, com espaços medulares e organizados em colunas.

6 DISCUSSÃO

Tem sido descrito que a influência do estresse normal e patológico afetam a cartilagem, e consequentemente, a diferenciação de condrócitos. Entender como a aplicação sutil do estresse mecânico normal leva ao desenvolvimento adequado de membros e cartilagens é importante para prever terapias que facilitem as abordagens de engenharia de tecidos (ZUSCIK et al., 2008).

Em seus estudos sobre a maturação da cartilagem e diferenciação de condrócitos, Chen et al. (1995) descreveram que o desenvolvimento dessas células pode ser dividido em três estágios, os quais se relacionam com as diferentes zonas constituintes da cartilagem: proliferação, maturação e hipertrofia, ordenadas da mais superficial para a mais profunda. No estágio inicial de diferenciação, correspondente à zona de proliferação, os condrócitos se organizam densamente, enquanto que no segundo estágio, equivalente à zona de maturação da cartilagem, eles se apresentam mais distantes uns dos outros. Jadin et al. (2005) relatam que o amadurecimento do tecido cartilagíneo durante o desenvolvimento fetal, particularmente na região das epífises, está relacionado com as alterações na organização do tecido cartilagíneo, o que torna os condrócitos mais esparsos. Na presente pesquisa, verificou-se que nos dois estágios iniciais (G1 e G2), os condrócitos estavam mais densamente arranjados, diferentemente dos dois últimos grupos (G3 e G4) que, com maior densidade de MEC, caracterizaram-se pela distribuição mais dispersa dos condrócitos.

O comportamento biomecânico da cartilagem hialina está relacionado à rede de fibras colágenas do tipo II, e componentes presentes na matriz extracelular hidratada que reconfiguram a rede de colágeno e proteínas associadas (HAN et al., 2011). A resistência da cartilagem articular ao alongamento (até 5% do comprimento inicial) e forças de cisalhamento é em grande parte devido à organização dessas fibras, e às ligações covalentes de hidroxipiridina presentes entre duas moléculas adjacentes.

A força de compressão exercida na cartilagem faz com que o comportamento biomecânico responda de forma que, ao se acomodar, a mesma logo retorna à posição inicial, ou seja, ela é capaz de resistir a forças de compressão graças às propriedades visco-elásticas (Poole et al., 2001). Some-se a isto, a presença de proteoglicanos, que são fortemente ligados a uma matriz hidratada com uma turgidez inerente, que resiste deformação por forças de compressão (CLUZEL, 2012).

A coloração com Picro-sirius analisada sob luz polarizada permitiu diferenciar cada

grupo (G1, G2, G3 G4) de acordo com a organização, orientação e os tipos predominantes de fibras colágenas. Segundo Treilleux et al. (1992), Todhunter (1996), Eurell e Sickle (1998), o colágeno do tipo II é encontrado em sua maioria em quase 90%, na matriz extracelular, o que foi aqui comprovado, desde os fetos de G1, onde ocorreu o predomínio de fibras do tipo II, orientadas em malha espessa e irregular. Esses autores relataram que na 22ª semana de desenvolvimento fetal também foram encontradas, proporcionalmente, fibras colágenas dos tipos I e III, o que corrobora com os achados da presente pesquisa no mesmo período de gestação (G2). Já o grupo G4 caracterizou-se por exibir grande densidade de fibras do tipo III.

A rede colágena altamente organizada da matriz cartilagínea confere propriedades mecânicas de resistência à tração e sua estrutura estratificada descrita por Benninghoff (1925) é criada pela orientação predominante das fibras colágenas. (MUEHLEMAN et al., 2004) demonstraram, através de raios-X, a estrutura das arcadas descritas por Benninghoff, orientadas verticalmente, e consideraram como sendo a organização estrutural dos feixes de fibras colágenas na cartilagem articular. Essas observações foram confirmadas por Cluzel et al. (2012), que descreveram a existência de uma rede colágena tridimensional, semelhante a colunas de direção vertical. Para Hyttinen et al. (2009), a arquitetura dessa rede é alterada pela carga articular durante o crescimento e maturação.

A arquitetura espacial da rede de fibras colágenas é modulada pela idade, espécie animal, frequência e modo de carga, formando uma malha entrelaçada que comprime e retorna à posição inicial, principalmente na zona superficial da cartilagem ((HYTTINEN et al., 2009). Porém, a organização estrutural dessas fibras não sofre inferência de forças de compressão e peso exercidas sobre a cartilagem, uma vez que nos fetos do presente estudo, verificou-se uma arquitetura de fibras colágenas precocemente organizadas. De fato, pois segundo (CLUZEL, 2012), a estratificação precoce da rede de colágeno está presente antes do nascimento e, portanto, antes de sofrer carga na articulação. No entanto, esta organização ainda não está totalmente madura quando comparada à organização da rede de colágeno na idade adulta.

(KLIKA et al., 2016) relatam que perto da interface com o osso, a matriz de colágeno é orientada predominantemente perpendicular ao osso quando a região média, com orientação da fibrila girando ao longo da cartilagem, até que as estas estejam paralelas à superfície da articulação formando a clássica arcada de Benninghoff e, assim, é possível inferir sobre a disposição espacial das fibras colágenas na MEC da cabeça do fêmur pois no grupo mais jovem (G1), há uma certa estratificação em direção à superfície, onde, desde essa fase

precoce, as fibras mais profundas estão arranjadas no sentido longitudinal, e as mais superficiais, no sentido oblíquo. Isto se evidencia em G2 e G3, e assume característica final em G4, onde as fibras superficiais, inicialmente dispostas de maneira obliqua, assumem trajeto transversal ao longo eixo da cabeça do fêmur, ou seja, paralelo à superfície articular.

Nieminen et al. (2001) e Xia et al. (2003) relatam o que também foi observado neste estudo que a direção preferencial das fibras de colágeno é paralela ou tangencial à superfície articular, e não possui uma direção preferencial na área transicional, apresentando um alinhamento perpendicular ou radial ao osso subcondral para criar a "estrutura de Benninghoff".

O desenvolvimento e maturação da superfície articular estão sob controle de sinais biomecânicos e moleculares, a contração dos músculos esqueléticos e forças exercidas pelos ligamentos são necessários para o desenvolvimento normal de uma articulação e foi demonstrado que essas contrações aparecem muito cedo durante o desenvolvimento no útero, e que sua freqüência aumenta com o tempo para representar 80% da atividade fetal (MURRAY E DRACHMAN, 1969). Alterações na pressão hidrostática e forças de cisalhamento na cartilagem alteram a expressão do gene dos condrócitos, a formação da matriz e o crescimento local. No entanto, (CLUZEL et al., 2013) relatam que a força dos músculos, é necessária para que outros fatores intervenham para garantir um desenvolvimento relativamente homogêneo da cartilagem articular, na aparência e na musculatura. Em relação à espessura, sinais moleculares também são importantes na aquisição da morfologia da articulação, e com as forças biomecânicas agindo em paralelo para moldar a articulação e contribuir para a estratificação normal da cartilagem durante seu crescimento.

O estudo estereológico para volume dos condrócitos, utilizando o nucleator, auxilia na interpretação para correlacionar o crescimento do tamanho dos condrócitos nas diferentes faixas etárias (HUNZIKER, 2002). Observou-se que a média do volume dos condrócitos aumenta com o avançar da idade, ou seja, quanto maior a faixa etária dos fetos, maior o volume dos condrócitos. Desta forma, a análise estatística permitiu detectar uma diferença significante entre os grupos.

Para Nemec et al. (2013) os ossos longos de fetos humanos, em especial suas epífises, estão sujeitos a várias alterações. Assim, de acordo com os dados desses autores, os fetos de G4 são os que atingem um “pico” de desenvolvimento, caracterizado pelo grande aumento de volume dos condrócitos (verificado na passagem de G3 para G4), o primeiro passo para a diferenciação dessas células, segundo (ZUSCIK et al., 2008). Neste período de vida fetal, como descrito por Goldring (2012), 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.

Em estudos de microscopia de luz por autores como Lecocq et al. (2008), a espessura da cartilagem articular mostra uma diferença significativa entre os cinco locais estudados da epífise distal do fêmur em certos estágios de desenvolvimento. Essas diferenças refletem variações na maturação entre locais de uma mesma articulação. Segundo Julkunen et al., (2010), Lecocq et al. (2008) e Grunder (2006) as diferenças nas zonas entre os locais são de fato uma adaptação da rede de colágeno às necessidades locais na articulação.

Observações segundo autores como Van Turnhout et al. (2008) nos levam a concluir que a camada mais superficial do modelo Beninghoff se desenvolve no estágio fetal, e é um dos primeiros sinais de amadurecimento da cartilagem articular. De fato, nesse estágio, o restante da epífise ainda é completamente cartilaginoso e aparece como uma rede homogênea com uma malha razoavelmente solta. Com uso da microscopia eletrônica de varredura, quereflete a ultraestrutura da organização das fibras de colágeno observou-se na superfície da epífise, que a organização e orientação das fibras de colágeno mudaram nos diferentes grupos, de uma orientação irregular no grupo de fetos mais jovens mostrando os condrócitos inseridos em loci distribuídos na MEC da cartilagem, para uma organização disposta em rede de malha pantográfica no grupo de fetos mais desenvolvidos. Por fim, 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.

A superfície cartilagínea mostra-se ondulada em uma análise espacial da rede de colágeno e por causa da sua organização na camada superficial sua microestrutura é heterogênea, com variações entre articulações, entre as superfícies de apoio, o adulto e o jovem. A organização é mais uniforme entre os adultos (TODHUNTER et al., 1996).

Quanto ao aspecto ultraestrutural da superfície articular, o grupo mais novo (G1) apresentou uma superfície irregular, com sulcos rasos e profundos, dando-lhe um aspecto enrugado; os espécimes de G2 exibiram um aspecto intermediário, ou seja, saliências espessas e alongadas, separadas por depressões relativamente profundas. Na parte média da cartilagem de G1 e G2, os condrócitos estavam mais densamente arranjado verificando-se uma estrutura capsular relativamente delgada, densamente irrigada; e no G3 e G4 essa superfície era praticamente lisa, com saliências alongadas e discretas em toda a sua extensão, e por apresentar mais MEC, caracterizaram-se pela distribuição mais dispersa dos condrócitos com

evidência de espessamento capsular e diminuição na irrigação da região.

A cartilagem calcificada representa uma zona intermediária entre a cartilagem não calcificada e o osso subcondral. Esta zona, ancorada ao osso subcondral por fibras colágenas espessas orientadas perpendicularmente à superfície articular, desempenha um papel fundamental na resistência (CLUZEL, 2012). Pode-se analisar uma evolução tanto da parte cartilagínea da cabeça do fêmur, como da região metafisária uma vez que em G1 a cabeça do fêmur é fibrosa e a região metafisária encontra-se em processo inicial de calcificação, a densidade cartilagínea da cabeça do fêmur aumenta gradativamente com os loci de condrócitos bem evidenciados, e a região metafisária assume um aspecto de tecido ósseo característico, com colunas e espaços medulares. Esses achados corroboram com o estudo de Van Turnhout et al. (2008) ao relatarem que foi encontrada a estrutura de Benninghoff com as três zonas nos achados da orientação de colágeno em equinos de mais de 10 mêses de vida. Sendo que na zona profunda, as fibras de colágeno eram predominantemente perpendicular ao osso subcondral, na zona superficial, eles estavam alinhados paralelamente à superfície articular e na zona de transição, encontraram um baixo atraso que indica a estrutura do colágeno anisotrópico, e que padrões descrevem uma arcada como a estrutura paralela à superfície articular ao longo de toda a profundidade da cartilagem.

Os resultados expressos na presente pesquisa permitem inferir que a organização de colágeno na cartilagem se estabelece muito cedo no estágio fetal, e evolui durante o desenvolvimento para constituir a estrutura adulta conhecida.

7 CONCLUSÃO

Face à metodologia proposta, e aos resultados obtidos, é lícito concluir-se que:

. De acordo com a idade, houve um aumento gradativo da área e do volume dos condrócitos;

. Concomitantemente a uma diminuição percentual de condrócitos, ocorreu um aumento percentual da densidade de matriz extracelular;

. O padrão de intensidade da coloração MEC evoluiu de menos intensa em G1 para mais intensa em G4 com o avançar da idade, não havendo diferenças entre os grupos de G2 e G3;

. O predomínio aparente das fibras colágenas do tipo II em G1, o equilíbrio entre as fibras dos tipos I e III em G2 e G3, e o predomínio das fibras do tipo III em G4 sugerem, para este grupo, um processo de evolução e remodelação cartilagínea;

. A organização pantográfica das malhas colágenas, desde a profundidade até a superfície cartilagínea, permite admitir que a arquitetura em arcadas começa a se estabelecer desde a fase mais precoce (G1);

. A superfície articular, irregular em G1 e praticamente lisa em G3 e G4, refletem a menor quantidade de MEC subjacente no grupo mais jovem;

. A estrutura capsular na região de inserção da cápsula articular próximo ao colo do fêmur é relativamente delgada e densamente irrigada em G1 e G2, espessa e menos irrigada em G3 e G4.

REFERÊNCIAS

BARÓTI, B.; PAP, Z.; PÁNTI, Z.; BURUIAN, M. M.; PÁVAI, Z. Morphometric and ultrasonographic study of the human fetal hip joint during intrauterine development. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 54, n. 4, p. 977–981, 2013.

BENNINGHOF, A. Spaltlinen am Knochen, eine Mrthode 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.

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.

BRUNNSTROM S.; LEHMKUHL L. DON; SMITH L. K. **Brunnstrom Cinesiologia Clínica**. Quarta edi ed. [s.l: s.n.].1987.

CASTRO-ABRIL, H. A.; GUTIÉRREZ, M. L.; GARZÓN-ALVARADO, D. A. Proximal femoral growth plate mechanical behavior: Comparison between different developmental stages. **Computers in Biology and Medicine**, v. 76, p. 192–201, 2016.

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.

CLARK, J. M. Variation of collagen fiber alignment in a joint surface: a scanning electron microscope study of the tibial plateau in dog, rabbit, and man. **J Orthop Res** 9, 246–257. 1991.

CLUZEL, C. **Développement du cartilage articulaire équin du fœtus à l ' adulte : imagerie par résonance magnétique et microscopie en lumière polarisée.** 2012. Université de Montréal, 2012.

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. 33–38, ago. 2013.

COELHO, A. C. B.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; SOARES, M. P.; QUEVEDO, P. de S.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L. Condrodisplasia em bovinos no Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 10, p. 1195–1200, 2013.

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

DELAERE, O. A. ; DHEM, A. Prenatal development of the human pelvis and acetabulum.pdf. **Acta orthopaedica**, v. 65, n. 3, p. 255–260, 1999.

DRAKE, R. L.; VOGL, A. W.; MITCHELL, A. W. M. **Gray's Anatomia para estudantes**. 2a edição ed. [s.l: s.n.]. 2010.

EURELL. J. A.; VAN SICKLE, D.C. **Connective and supportive tissues.** In: Textbook of veterinary histology (H.D. Dellmann, J.A. Eurell, eds), pp 32-61. 1998

FELTS, W. The prenatal development of the human femur. **Am J Anat**, p. 1–44, 1954.

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.

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.

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.

GREENE, G.W.; BANQUY, X.; LEE, D.W.; LOWREY, D. D.; YU, J. and ISRAELACHVILI, J.N. Adaptive mechanically controlled lubrication mechanism found in articular joints. **Proc Natl Acad Sci**. U S A 108: 5255–5259. 2011.

GRUNDER, W. MRI assessment of cartilage ultrastructure. **NMR Biomed**. 19: 855-876. 2006.

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

GUNDERSEN, H. J. G.; BENDTSEN, T. F.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N.; MØLLER, A.; NIELSEN, K.; NYENGAARD, J. R.; PAKKENBERG, B.; SØRENSEN, F. B.; VESTERBY, A.; WEST, M. J. **Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis**. APMIS, v. 96, n. 1-6, p. 379–394, 1988.

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

HAN, L.; FRANK, E. H.; GREENE, J. J.; LEE, H. Y.; HUNG, H. H. K.; GRODZINSKY, A. J.; ORTIZ, C. Time-dependent nanomechanics of cartilage. **Biophysical Journal**, v. 100, n. 7, p. 1846–1854, 2011.

HAN et al., 2011; CLUZEL, 2012; RYAN; BISSET; NEWSHAM-WEST, 2015. Should We Care About Tendon Structure? The Disconnect Between Structure and Symptoms in Tendinopathy. ***Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy***, v. 45, p. 823-825, DOI:10.2519/jospt.2015.0112.

HYTTINEM, M. M. ; AROKOSKI, J. P.; PARKKINEN, J. J., LAMMI, M. J.; LAPVETELAINEN, T.; MAURANEN, K.; KIRALY, K.; TAMMI, M. I.; HELMINEN, H. J. Age matters: collagen birefringence of superficial articular cartilage is increased in young guinea-pigs but decreased in older animals after identical physiological type of joint loading. **Osteoarthritis Cartilage** 9: 694-701. 2001.

HYTTINEN, M.M; HOLOPAINEN, J.; WEEREN, P. R.; FIRTH E. C.; HELMINEN, H. J. ; BRAMA, P. A. J. Changes in collagen fibril network organization and proteoglycan distribution in equine articular cartilage during maturation and growth. **J. Anat.** 215: 584-591. 2009.

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.; 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.

JEFFREY, J. E.; ASPDEN, R. M. The biophysical effects of a single impact load on human and bovine articular cartilage. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine**, v. 220, n. 6, p. 677–686, 2006.

JULLKUNEN, P.; IIVARINEN, J. BRAMA, P. A.; AROKOSKI, J.; JURVELIN, J. S.; HELMINEN, H. J. Maturation of collagen fibril network structure in tibial and femoral cartilage of rabbits. **Osteoarthritis Cartilage** 18: 406-415. 2010.

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

KAAB, M. J.; GWYNN, I. A. P.; NOTZLI, H. P. Collagen fibre arrangement in the tibial plateau articular cartilage of man and other mammalian species. **J Anat** 193, 23–34. 1998.

KAPANDJI, I. A. **Fisiologia Articular, volume 2 : esquemas comentados de mecânica humana.** Guanabara ed. Rio de Janeiro: Maloine, 2000.

KLIKA, V.; GAFFNEY, E. A.; CHEN, Y. C.; BROWN, C. P. An overview of multiphase cartilage mechanical modelling and its role in understanding function and pathology. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 62, p. 139–157, 2016.

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.

LECOQ, M.; GIRARD, C. A.; FOGARTY, U.; BEAUCHAMP, G.; RICHARD, H.; LAVERTY, S. Cartilage matrix changes in the developing epiphysis: early events on the pathway to equine osteochondrosis? **Equine Vet**. J. 40: 442-454. 2008.

LEE, M. C.; EBERSON, C. P. Growth and Development of the Child's Hip. **Orthopedic Clinics of North America**, v. 37, n. 2, p. 119–132, 2006.

LI, L. Y.; ZHANG, L. J.; JIA, J. Y.; ZHAO, Q.; WANG, E. bo; LI, Q. W. Does dynamic immobilization reduce chondrocyte apoptosis and disturbance to the femoral head perfusion? **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 6, n. 2, p. 212–223, 2013.

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.

LU, X. L. .; MOW, V. C. Biomechanics of articular cartilage and determination of material properties. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 40, n. 2, p. 193–199, 2008.

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

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. ; **Métodos quantitativos em morfologia**. Rio de Janeiro: EdUERJ. 1955.

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.; AGUR, A. M. R. **Anatomia Orientada para a Clínica**. 6a edição ed. Rio de Janeiro: ABDR, 2011. Vi, 131 p.: il.
MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia básica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 248-251.

MUEHLEMAN, C.; MAJUMDAR, S.; ISSEVER, A. S.; ARFELLI, F.; MENK, R. H.; RIGON, L.; HEITNER, G.; REIME, B.; METGE, J.; WAGNER, A.; KUETTNER, K. E.; MOLLENHAUER, J. X-ray detection of structural orientation in human articular cartilage. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 12, n. 2, p. 97–105, 2004.

MURRAY, P. D.; DRACHMAN, D. B.The role of movement in the development of joints and related structures: the head and neck in the chick embryo. **J. Embryol**. Exp. Morphol. 22: 349-371. 1969.

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.

NIEMINEN, M. T.; RIEPPO, J.; TOYRAS, J.; HAKUMAKI, J. M.; SILVENNOINEN J.; HYTTINEN, N. M.; HELMINEN, H. J.; JURVELIN, J. S. T2 relaxation reveals spatial collagen architecture in articular cartilage: a comparative quantitative MRI and polarized light microscopic study. **Magn. Reson. Med.** 46: 487-493. 2001.

OKUMURA, M.; ISHIKAWA, A.; AOYAMA, T.; YAMADA, S.; UWABE, C.; IMAI, H.; MATSUDA, T.; YONEYAMA, A.; TAKEDA, T.; TAKAKUWA, T. Cartilage Formation in the Pelvic Skeleton during the Embryonic and Early-Fetal Period. **PloS one**, v. 12, n. 4, p. e0173852, 2017.

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

POIRIER, P.; CHARPY, A.; CÚNEO, B. **Abrégé d'Anatomie**. Saint-Germain, Paris. 1908.

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

RODRIGUES, H. **Técnicas anatômicas**. Vitória : [s.n]. 3. ed. 2005. P. 229.

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.

RYAN, M.; BISSET, L.; NEWSHAM-WEST, R. Should We Care About Tendon Structure?

The Disconnect Between Structure and Symptoms in Tendinopathy. **Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy**, v. 45, n. 11, p. 823–825, 2015. Disponível em: <http://www.jospt.org/doi/10.2519/jospt.2015.0112>.

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.

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

TANDLER, J. **Tratado de Anatomia Sistêmica**. Barcelona. Salvat Editores, S. A. 1928

TESTUT L.; LATARJET A. **Tratado de Anatomia Humana**. Paris. 8 Edição. 1905.

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.

TODHUNTER, R. J. Anatomy and physiology of synovial joints. **In: Joint disease in the horse** (C.W. McIlwraith, G.W. Trotter, eds), W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp 1-28. (1996).

TREILLEUX, I.; MALLEIN-GERIN, F.; GUELLEC, D.; HERBAGE, D. Localization of the expression of type I II III collagen, and aggregan 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.

VAN TURNHOUT, M. C.; HAAZELAGER, M. B.; GIJSEN, M. A.; SCHIPPER, H.; KRANENBARG, S.; VAN LEEUWEN, J. L. Quantitative description of collagen structure in the articular cartilage of the young and adult equine distal metacarpus. **Anim. Biol**. 58: 353-370. 2008.

WALKER, J. M. Histological study of the fetal development of the human acetabulum and labrum: Significance in congenital hip disease. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 54, n. 4, p. 255–263, 1981.

WALKER, J. M.; GOLDSMITH, C. H. Morphometric study of the fetal development of the human hip joint: Significance for congenital hip disease. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 54, n. 6, p. 411–437, 1981.

WILLIAMS, P. L.; WARWICK, R.; DYSON, M.; BANNISTER, L. H. **Gray's Anatomia**.

37a edição ed. [s.l: s.n.]

XIA, Y.; MOODY, J. B.; ALHADLAQ, H. et al. Imaging the physical and morphological properties of a multi-zone young articular cartilage at microscopic resolution. **J Magn Reson Imaging** 17, 365–374. 2003.

YANG, L.; TSANG, K. Y.; TANG, H. C.; CHAN, D.; CHEAH, K. S. E. Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v. 114, n. 33, p. 13, 2016.

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.

ZAR JERROLD, Z. H. Bi**ostatistical Analysis**. 2nd ed. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey, 1984.

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 – AUTORIZAÇÃO PARA UTILIZAÇÃO DE AMOSTRAS DO BIORREPOSITÓRIO.

MINUTA

MODELO DE AUTORIZAÇÃO PARA USO DE MATERIAL DE BIOREPOSITÓRIO DE ORIGEM HUMANA

De acordo a Resolução nº 411/11, artigo 1º, item 15, venho informar que disponho de uma coleção de amostras de 80 fetos humanos Cadastrada sob o nº..... e sob minha responsabilidade, que autorizo sejam utilizadas na Dissertação de Mestrado da aluna **Mariane Cristina Donato Simões** intitulada *Avaliação morfofuncional e ultraestrutural do desenvolvimento da articulação coxofemoral em fetos humanos*, sob minha orientação.

Por outro lado ressalto que o uso destas amostras é relevante para o estudo do desenvolvimento das diferentes estruturas componentes do corpo humano.

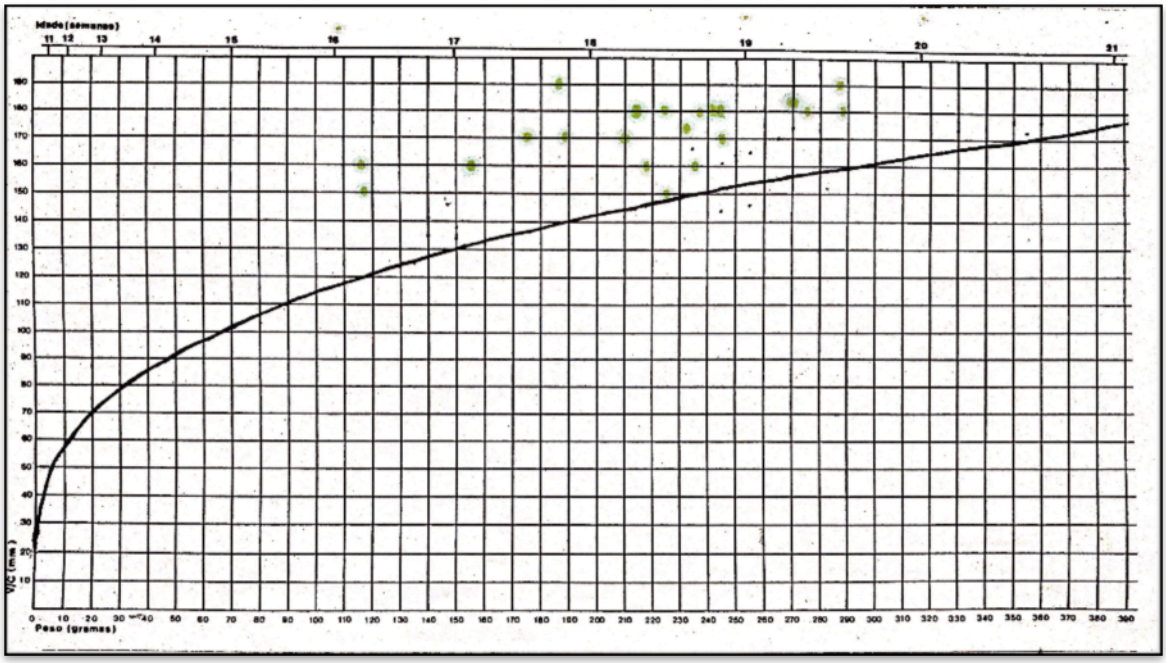
São Paulo, 15/09/2016

Prof. Dr. Edson Ap. Liberti
(Responsável pela coleção)
Departamento de Anatomia ICB/USP

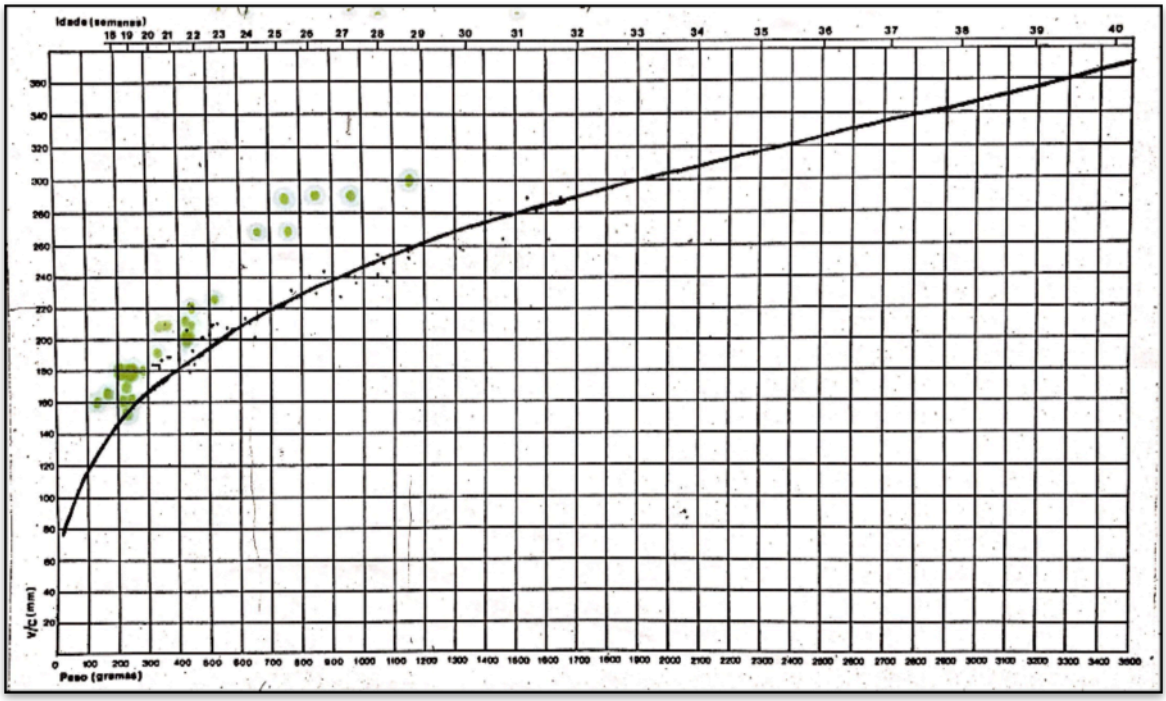
ANEXO B – GRÁFICO E CURVA ELABORADOS POR STREETER (1920)

Gráfico e curva onde se observa a idade de parte do material utilizado no presente trabalho, que apresentou idade compreendida entre 16 e 31 semanas.

. Gráfico de faixa etária dos espécimes entre 11ª a 21ª semana de VIU.



. Gráfico de faixa etária dos espécimes entre 18ª a 40ª semana de VIU.



ANEXO C – TABELA DE NÚMEROS RANDÔMICOS

ISS STEREOLOGY COURSE

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

1: Take the first unused digit in the first (unnumbered) blocks- and cross it out! (= 9)

2: 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'

| | | |

APÊNDICES

APÊNDICE A – DIVISÃO DO GRUPO DE ESTUDO

	FETO (Nº)	PESO (gramas)	COMPRIMENTO (cm)	Idade (semanas)
1	906	244	18	18 e meia
2	809	240	18	18 e meia
3	858	217	16	18 e meia
4	786	188	17	17 e meia
5	841	235	16	18 e meia
6	771	224	17	18 e meia
7	805	221	15,5	18 e meia
8	849	289	18	19 e meia
9	903	401	21	21 e meia
10	797	155	16	17
11	812	214	18	18 e meia
12	84	270	18,5	19
13	785	507	23,5	22 e meia
14	838	423	20,5	21 e meia
15	814	225	18	19
16	806	210	17	18 e meia
17	802	383	21	20 e meia
18	779	381	21	20 e meia
19	793	177	17	16 e meia
20	792	286	19	19 e meia
21	783	1175	30	28 e meia
22	784	981	29,5	27 e meia
23	799	231	17,5	18 e meia
24	807	275	18	19 e meia
25	774	335	21	20 e meia

26	790	239	18	19 e meia
27	776	117	15	16 e meia
28	846	175	17	17 e meia
29	787	343	19	20 e meia
30	857	184	19	17 e meia
31	856	779	27	25 e meia
32	848	876	27,5	26 e meia
33	778	435	22	21 e meia
34	770	646	27	24 e meia
35	839	112	16	16 e meia
36	1	1420	30	33
37	2	1263	27/28	30
38	3	1305	28	31
39	4	1204	26	29

APÊNDICE B – TABELAS UTILIZADAS PARA OS DADOS ESTATÍSTICOS

1) ÁREA DOS CONDRÓCITOS

	G1	G2	G3	G4
F1	115,225714	124,8526667	150,440667	99,460667
F2	124,364	96,33533333	170,96	160,26
F3	96,693333	116,976	156,737333	154,308
F4	89,1866667	149,1846667	190,57	217,494
F5	112,582	145,566	175,989333	211,286
Média	107,6103427	126,5829333	168,9394666	168,5617334

2) NÚMERO DE CONDRÓCITOS POR CAMPO

	G1	G2	G3	G4
F1	217	159	124	96
F2	196	131	102	84
F3	137	150	107	99
F4	184	140	126	91
F5	140	131	123	69
Média	174,8	142,2	116,4	87,8

3) DENSIDADE DE CONDRÓCITOS (%)

Densidade Condrócitos (%)	G1	G2	G3	G4
F1	0,861	0,631	0,492	0,381
F2	0,778	0,520	0,405	0,333
F3	0,544	0,595	0,425	0,393
F4	0,730	0,556	0,500	0,361
F5	0,556	0,520	0,488	0,274
Média	0,694	0,564	0,462	0,348

4) DENSIDADE DE MEC (%)

Densidade MEC (%)	G1	G2	G3	G4
F1	0,139	0,369	0,508	0,619
F2	0,222	0,480	0,595	0,667
F3	0,456	0,405	0,575	0,607
F4	0,270	0,444	0,500	0,639
F5	0,444	0,480	0,512	0,726
Média	0,306	0,436	0,538	0,652

3) MÉDIAS E DESVIO PADRÃO DA ÁREA, DENSIDADE E VOLUME

Área

Grupo	*Average (Média)*	*Standard deviation (Desvio Padrão)*
G1	107,649	14,4
G2	126,583	21,7
G3	168,939	15,9
G4	168,562	48,1

Densidade

Grupo	*Average (Média)*	*Standard deviation (Desvio Padrão)*	*Average (Média)*	*Standard deviation (Desvio Padrão)*
G1	0,6938	0,13945	0,3062	0,13945
G2	0,5644	0,0484386	0,4356	0,0484386
G3	0,462	0,0436978	0,538	0,0436978
G4	0,3484	0,0473899	0,6516	0,0473899

Volume

Grupo	*Average (Média)*	*Standard deviation (Desvio Padrão)*
G1	2536,48	759,028
G2	3307,04	648,167
G3	4305,54	1074,94
G4	5716,81	2263,82

4) MEDIDAS DOS VOLUMES DOS GRUPOS

GRUPO	FETO	Nº do Campo	Nº do Sorteio	VOLUME DOS CODRÓCITOS
Grupo 1	F1	1	96	Vn= 3487,912 µm³
		2	23	
		3	85	
	F2	1	78	Vn=2837,071 µm³
		2	64	
		3	86	
	F3	1	26	Vn= 1542,88 µm³
		2	71	
		3	87	
	F4	1	41	Vn= 2027,603 µm³
		2	86	
		3	15	
	F5	1	42	Vn= 2786,924 µm³
		2	8	
		3	43	
Grupo 2	F1	1	88	Vn= 2662,767 µm³
		2	46	
		3	3	
	F2	1	40	Vn= 2964,625 µm³
		2	49	
		3	19	
	F3	1	54	Vn= 3823,171 µm³
		2	40	
		3	84	
	F4	1	6	Vn= 2921,409 µm³
		2	66	
		3	98	
	F5	1	47	Vn= 4163,221 µm³
		2	11	
		3	28	
Grupo 3	F1	1	26	Vn= 3873,178 µm³
		2	82	
		3	6	
	F2	1	62	Vn= 3884,808 µm³
		2	99	
		3	50	
	F3	1	96	Vn= 2965,649 µm³
		2	29	
		3	21	
	F4	1	97	Vn= 5231,566 µm³
		2	57	

		3	25	
	F5	1	73	Vn= 5572,5 µm³
		2	18	
		3	74	
	F1	1	61	Vn= 4211,833 µm³
		2	15	
		3	87	
Grupo 4	F2	1	37	Vn= 2764,572 µm³
		2	57	
		3	91	
	F3	1	47	Vn= 6024,66 µm³
		2	20	
		3	53	
	F4	1	70	Vn= 8430,039 µm³
		2	61	
		3	26	
	F5	1	92	Vn= 7152,967 µm³
		2	48	
		3	9	