



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICO-CIRÚRGICAS

**DETERMINAÇÃO DOS VALORES DE DIMENSÃO FRACTAL E LACUNARIDADE
DE IMAGENS MICROSCÓPICAS DE TERMINAÇÕES NERVOSAS LIVRES EM
LIGAMENTOS DE JOELHO E COTOVELO**

JOSÉ IRAN OLIVEIRA DAS CHAGAS JÚNIOR

FORTALEZA
2024

JOSÉ IRAN OLIVEIRA DAS CHAGAS JÚNIOR

**DETERMINAÇÃO DOS VALORES DE DIMENSÃO FRACTAL E LACUNARIDADE
DE IMAGENS MICROSCÓPICAS DE TERMINAÇÕES NERVOSAS LIVRES EM
LIGAMENTOS DE JOELHO E COTOVELO PRODUZIDAS POR
IMUNOFLUORESCÊNCIA**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Ciências Médico-Cirúrgicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Área de concentração: Metabolismo, Fisiologia e Biologia celular no Estresse.

Orientador: Prof. Dr^a Maria Luzete Costa Cavalcante.

Coorientador: Prof. Dr. Márcio Wilker Soares Campelo.

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C424u Chagas Júnior, José Iran Oliveira das.

Uso da dimensão fractal e lacunaridade na avaliação da organização de imagens de terminações nervosas livres em ligamentos de joelho e cotovelo / José Iran Oliveira das Chagas Júnior. – 2024.

57 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2024.

Orientação: Prof. Dr. Maria Luzete Costa Cavalcante.

Coorientação: Prof. Dr. Marcio Wilker Soares Campelo.

1. Fractais. 2. Terminações nervosas. 3. Ligamentos. 4. Imagem óptica. 5. Imunofluorescência. I. Título.

JOSÉ IRAN OLIVEIRA DAS CHAGAS JÚNIOR

DETERMINAÇÃO DOS VALORES DE DIMENSÃO FRACTAL E LACUNARIDADE
DE IMAGENS MICROSCÓPICAS DE TERMINAÇÕES NERVOSAS LIVRES EM
LIGAMENTOS DE JOELHO E COTOVELO PRODUZIDAS POR
IMUNOFLOURESCÊNCIA

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Ciências Médico-Cirúrgicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Área de concentração: Metabolismo, Fisiologia e Biologia celular no Estresse.

Orientador: Prof. Dr^a Maria Luzete Costa Cavalcante.

Coorientador: Prof. Dr. Márcio Wilker Soares Campelo.

Aprovada em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^a. Maria Luzete Costa Cavalcante
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr^a. Conceição Aparecida Dornelas
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Carmelo Silveira Carneiro Leão Filho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Diego Ariel de Lima
Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA)

Prof. Dr^a. Lana Lacerda de Lima
Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, que sempre foi o guia da minha vida e do meu destino. Aos meus Pais Iran e Ana Marta, por todo esforço, dedicação e investimento na minha vida e na realização dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

À coordenação do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Médico-Cirúrgicas da Universidade Federal do Ceará, em nome da Professora Doutora Maria Luzete Costa Cavalcante, minha orientadora, pela orientação constante, dedicação irrestrita, doação pessoal e atenção dedicada a este projeto.

Ao Professor Doutor Márcio Wilker Soares Campelo, coorientador, pela sua contribuição nesta pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação que muito contribuíram com suas aulas.

Aos funcionários da Pós-Graduação, os quais sempre estiveram de prontidão para ajudar-me, sobretudo a Sra. Maria Luciene Vieira Oliveira, a Sra. Magda Fontenele de Sousa e o Sr. Marcelo Igor Barbosa da Paixão.

Ao Dr. Ricardo de Oliveira Lima, do Hospital Geral César Cals, que me apresentou o programa de pós-graduação e apoiou-me no processo seletivo.

À Prof^a Dra. Raquel Sampaio Florêncio, da Universidade Estadual do Ceará, que me auxiliou na estatística desse estudo.

Ao Prof. Antônio Brazil Viana Júnior, da Universidade Federal do Ceará, que também contribuiu com a estatística.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Por fim, não posso deixar de agradecer aos meus amigos Camila Mendes e Luís Henrique que sempre incentivaram-me para que eu pudesse chegar até aqui, nesse momento muito importante da minha vida e aos meus colegas de trabalho da Policlínica Dr. José Eloy e do Centro Universitário Terra Nordeste.

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível”

São Francisco de Assis.

RESUMO

DETERMINAÇÃO DOS VALORES DE DIMENSÃO FRACTAL E LACUNARIDADE DE IMAGENS MICROSCÓPICAS DE TERMINAÇÕES NERVOSAS LIVRES EM LIGAMENTOS DE JOELHO E COTOVELO PRODUZIDAS POR IMUNOFLUORESCÊNCIA. JOSÉ IRAN OLIVEIRA DAS CHAGAS JÚNIOR. TESE (DOCTORADO). Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Médico-Cirúrgicas, Universidade Federal do Ceará. Orientadora: Prof^a. Dr^a Maria Luzete Costa Cavalcante. Coorientador: Prof. Dr. Márcio Wilker Soares Campelo.

A dimensão fractal (DF) é uma área matemática que estuda objetos que apresentam padrões repetidos em várias escalas, conhecidos como fractais. Já a lacunaridade (LAC) permite identificar a quantidade, complexidade e a organização espacial de uma partícula e ajuda a caracterizar sua organização e sua densidade. Esta pesquisa tem como objetivo avaliar a organização de imagens de terminações nervosas livres em ligamentos de joelho e cotovelo através da dimensão fractal e lacunaridade. Trata-se de um estudo descritivo, desenvolvido na Universidade Federal do Ceará, onde foram analisadas imagens digitais de secções histológicas por imunofluorescência, provenientes de peças cadavéricas de joelho e cotovelo coletadas em um estudo prévio por Alencar Neto, 2022; Lima, 2019; Costa, 2024. O estudo atendeu às normas da resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. A amostra foi composta de 3 grupos: A - ligamento meniscotibial do joelho (LMT), B - ligamento anterolateral do joelho (LAL) e C - ligamento colateral lateral do cotovelo (LCL). Dentre esses 3 grupos estudados, os grupos A (LMT) e C (LCL), tiveram a dimensão fractal maior, o que sugere um nível de desorganização maior, inverso ao encontrado no grupo B, que apresentou dimensão fractal menor o que sugere um nível de organização maior. Na LAC, entre grupos estudados, o grupo B (LAL) obteve uma lacunaridade maior, o que sugere uma densidade menor. A análise da correlação da DF com a LAC o grupo A (LMT) apresentou uma correlação positiva moderada; o grupo B (LAL) apresentou uma correlação negativa moderada, e o grupo C (LCL) uma correlação positiva fraca. Avanços em tecnologias, como microscopia avançada e técnicas de imagem associadas à análise fractal e lacunaridade, estão expandindo nosso entendimento sobre terminações nervosas. Estas ferramentas têm potencial para aplicações em neurociência clínica e regeneração nervosa, oferecendo possibilidade de tratamentos e condutas inovadoras. Ainda, faltam estudos que empreguem esta técnica, fato este que motivou a realização deste trabalho.

Palavras-Chave: 1. Fractais. 2. Terminações Nervosas. 3. Ligamentos. 4. Imagem óptica. 5. Imunofluorescência.

ABSTRACT

USE OF FRACTAL DIMENSION AND LACUNARITY IN THE EVALUATION OF THE ORGANIZATION OF IMAGES OF FREE NERVE ENDINGS IN KNEE AND ELBOW LIGAMENTS. JOSÉ IRAN OLIVEIRA DAS CHAGAS JUNIOR. THESIS (DOCTORATE). Stricto Sensu Postgraduate Program in Medical-Surgical Sciences, Federal University of Ceará. Advisor: Prof. Dr. Maria Luzete Costa Cavalcante. Co-advisor: Prof. Dr. Márcio Wilker Soares Campelo.

Fractal dimension (DF) is a mathematical area that studies objects that present repeated patterns at various scales, known as fractals. Lacunarity (LAC) allows identifying the quantity, complexity, and spatial organization of a particle and helps to characterize its organization and density. This research aims to evaluate the organization of images of free nerve endings in knee and elbow ligaments through the fractal dimension and lacunarity. This is a descriptive study, developed at the Federal University of Ceará, where digital images of histological sections by immunofluorescence were analyzed, from cadaveric knee and elbow pieces collected in a previous study by Alencar Neto, 2022; Lima, 2019; Costa, 2024. The study met the standards of resolution 466/2012 of the National Health Council. The sample was composed of 3 groups: A - meniscotibial ligament of the knee (LMT), B - anterolateral ligament of the knee (ALL), and C - lateral collateral ligament of the elbow (LCL). Among the three groups studied, groups A (LMT) and C (LCL) had the largest fractal dimension, which suggests a higher level of disorganization, the opposite of what was found in group B, which had a smaller fractal dimension, suggesting a higher level of organization. In LAC, among the groups studied, group B (LAL) had a larger lacunarity, which suggests a lower density. The analysis of the correlation of DF with LAC showed that group A (LMT) presented a moderate positive correlation; group B (LAL) presented a moderate negative correlation, and group C (LCL) a weak positive correlation. Advances in technologies, such as advanced microscopy and imaging techniques associated with fractal analysis and lacunarity, are expanding our understanding of nerve endings. These tools have potential for applications in clinical neuroscience and nerve regeneration, offering the possibility of innovative treatments and approaches. However, there is a lack of studies that employ this technique, which is what motivated this work.

Keywords: 1. Fractals. 2. Nerve endings. 3. Ligaments. 4. Optical imaging. 5. Immunofluorescence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Importação das imagens em formato TIF.....	26
Figura 02 – Conversão das imagens coloridas em imagens de 8 bits.....	26
Figura 03 – Binarização da imagem.....	27
Figura 04 – Plugin “ <i>fractalac</i> ” de obtenção da análise fractal e lacunaridade.....	27
Figura 05 – Processo de mensuração da DF e LAC.....	28
Figura 06 – Mensuração da DF utilizando a ferramenta “ <i>Fractal box counting</i> ” (contagem de caixas, onde o tamanho do box aumenta progressivamente (box= 2, 3, 4, 8, 16, 32, 64) até cobrir as imagens selecionadas e o programa calcula a DF (automaticamente).....	28
Figura 7 – Comparação da DF entre grupos.....	33
Figura 8 – Comparação da LAC entre grupos.....	35
Figura 9 – Correlação da DF com a LAC por grupo.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 01.	Dimensão fractal (DF) do grupo A - LMT do joelho.....	30
Tabela 02.	Dimensão fractal (DF) do grupo B - LAL do joelho.....	31
Tabela 03.	Dimensão fractal (DF) do grupo C - LCL do cotovelo.....	31
Tabela 04.	Lacunaridade (LAC) do grupo A - LMT do joelho.....	31
Tabela 05.	Lacunaridade (LAC) do grupo B - LAL do joelho.....	32
Tabela 06.	Lacunaridade (LAC) do grupo C - LCL do cotovelo.....	32
Tabela 07.	DF entre grupos.....	33
Tabela 08.	LAC entre grupos.....	34
Tabela 09.	Correlação da DF com a Lacunaridade por grupo.....	35
Tabela 10.	Descritivas da DF e LAC dos grupos A, B, C.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA - ANÁLISE DE VARIÂNCIA
CNS - CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE
CEP – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
DF - DIMENSÃO FRACTAL
H0 - HIPÓTESE NULA
H1 - HIPÓTESE ALTERNATIVA
HUWC HOSPITAL UNIVERSITÁRIO WALTER CANTÍDIO
IF - IMUNOFLUORESCÊNCIA
IFD - IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA
IFI - IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA
IJF - INSTITUTO DR. JOSÉ FROTA
LABCEX - LABORATÓRIO DE CIRURGIA EXPERIMENTAL
LAC - LACUNARIDADE
LAL - LIGAMENTO ANTEROLATERAL
LCL - LIGAMENTO COLATERAL LATERAL
LMT - LIGAMENTO MENISCOTIBIAL
PGP - PGP PROTEIN GENE PRODUCT
PNE - PACIENTES COM NECESSIDADES ESPECIAIS.
RSB - RESEARCH SERVICES BRANCH
UV - LUZ ULTRAVIOLETA

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4 RESULTADOS.....	29
5 DISCUSSÃO.....	37
6 CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS.....	43
ANEXOS.....	50

1 INTRODUÇÃO

1.1 Análise fractal.

1.1.1 O que é a análise fractal

A análise fractal é uma área da matemática que estuda objetos que apresentam padrões repetidos em várias escalas, conhecidos como fractais. Esses objetos são caracterizados por sua complexidade infinita e autossimilaridade. A geometria fractal tem diversas aplicações em campos científicos, desde a física e biologia até a geologia e medicina, devido ao seu poder de descrever formas naturais complexas que não se adequam à geometria euclidiana tradicional (Mandelbrot, 1982).

Os métodos de análise quantitativa baseados na Geometria Fractal, descritos por Benoit Mandelbrot, nos anos 1970, têm suplementado os métodos quantitativos padrão, baseados na Geometria Euclidiana, descrita há mais de 2400 anos por Euclides de Alexandria (Rosario, 2023).

A dimensão fractal permite a descrição e a mensuração da semelhança de um determinado objeto com ele mesmo. Isso significa que, ao ampliar uma parte de uma forma fractal, pode-se encontrar uma estrutura semelhante à forma inteira. Essa propriedade é essencial para descrever muitos fenômenos naturais que não seguem formas regulares ou simétricas. Quanto mais elevados os valores da Dimensão Fractal (DF), maior será a complexidade da estrutura analisada. A grande vantagem desse método é fornecer uma medida única para quantificar uma estrutura complexa (Backes; Bruno, 2005).

Na biologia e medicina, a análise fractal é usada para estudar estruturas biológicas complexas, como os padrões de ramificação dos vasos sanguíneos, a arquitetura do tecido cerebral e a organização dos pulmões. Esse tipo de análise pode fornecer insights sobre a saúde e a função dessas estruturas, além de auxiliar no diagnóstico de doenças (Mandelbrot, 1982; Cross, 1997).

A DF, tem mostrado-se um método bastante útil também em outras áreas, como por exemplo o estudo de Timbó (2008), que diagnosticou células tumorais através de dimensões fractais, utilizando um algoritmo para diferenciação

quantitativa e estatística de uma amostra de células afetadas por uma determinada patologia e uma amostra de células saudáveis.

Uma revisão sistemática sobre a DF em imagens cerebrais, identificaram diversas publicações, envolvendo classes de neuropatologias, sendo elas: degenerativas, neoplásicas, psiquiátricas, infecciosas, funcionais, congênitas e vasculares. Os autores ressaltam que a medida da DF em imagens cerebrais pode aumentar ou diminuir em comparação com os valores normais quando se avalia e diferencia tumores cerebrais ou quando se diagnostica doenças neurológicas e psiquiátricas (De Moraes Filho; Cassia-Moura, 2015).

Há contribuição também no campo da Cardiologia, onde Moreira et al. (2011) avalia a dimensão fractal para quantificar o grau de rejeição celular miocárdica pós-transplante cardíaco. O mesmo evidenciou que os valores mais altos foram diretamente correlacionados com os graus de rejeição maiores. Isso pode ajudar na tomada de decisão sobre casos suspeitos e na intensificação da medicação imunossupressora.

Kido et al. (1995), examinaram a dimensão fractal de anormalidades intersticiais pulmonares baseadas em radiografias de tórax usando o método Box-counting. Foram examinadas cem regiões de interesse de radiografias de quarenta pacientes com anormalidades intersticiais pulmonares e cem pacientes com pulmões normais. Os casos de doença intersticial tiveram dimensões fractais significativamente maiores do que os pulmões normais ($1,67 \pm 0,10$ versus $1,44 \pm 0,12$, respectivamente; $P < 0,001$).

Outro estudo realizou a avaliação do padrão vascular normal e anormal na retina humana usando a análise fractal quantitativa baseada em regiões da retina, onde obteve como achado que a DF foi mais significativa na região macular normal do que na região macular com retinopatia diabética ($p = 0,008$ e $p = 0,019$, respectivamente), (Avakian et al., 2009).

Corrêa (2021), estruturou uma sequência metodológica para estruturar um protocolo de verificação da DF através de exames de imagem em pacientes com paralisia cerebral, tendo como finalidade complementar a situação bucal. Conclui-se que a DF é uma ferramenta útil para tal situação e que pode beneficiar tanto pacientes com paralisia cerebral quanto outros tipos de Pacientes com Necessidades Especiais (PNEs), sendo auxiliar ao diagnóstico.

A DF também foi utilizada para caracterizar células tricoleucêmicas comparadas aos linfócitos normais e detectou que a DF dos linfócitos normais variaram de 1.0322 a 1.1378 (mediana de 1.1189 ± 0.1056), enquanto para as células tricoleucêmicas variaram de 1.1011 a 1.2766 (mediana de 1.1675 ± 0.1755), havendo uma grande diferença entre os grupos dos linfócitos normais e o grupo das células tricoleucêmicas, e os autores afirmam que o método é de grande relevância, servindo como técnica auxiliar ou complementar ao diagnóstico (Rocha et. al., 2022).

1.1.2 Perspectivas futuras e potenciais aplicações clínicas

Para quantificar a fractalidade em imagens de ligamentos, são utilizadas técnicas avançadas de processamento de imagem e algoritmos computacionais. Avanços em software e hardware têm melhorado a precisão e a aplicabilidade dessas análises em contextos biológicos (Katz, 1988).

A análise fractal tem o potencial de tornar-se um biomarcador valioso no diagnóstico e prognóstico de doenças ligamentares. Desenvolvimentos emergentes nesta área prometem melhorar a precisão dos diagnósticos e oferecer novas estratégias para a pesquisa com ligamentos (West, 2010).

Ao aplicar a análise fractal em ligamentos, é necessário considerar aspectos críticos, como a escolha dos parâmetros adequados e a interpretação dos dados. Existem limitações técnicas e ambiguidades na interpretação de dados fractais, que exigem cautela e experiência (Falconer, 2003).

1.1.3 Geometria fractal e os ligamentos

A análise fractal também pode revelar padrões e irregularidades na estrutura dos ligamentos. Técnicas de análise fractal são usadas para investigar a organização das fibras colágenas e a complexidade estrutural dos ligamentos, oferecendo insights sobre suas propriedades mecânicas e funcionais (Cross, 1997).

Pode auxiliar no diagnóstico precoce de alterações nos ligamentos, sendo útil na avaliação de lesões ligamentares e na personalização do tratamento. O uso de fractais para prever a integridade dos ligamentos e planejar intervenções terapêuticas está em crescimento e apresenta perspectivas promissoras (Goldberger et al., 2002).

Estudos específicos demonstraram o uso da análise fractal para investigar ligamentos em diferentes condições e populações, mostrando como esse método pode oferecer informações valiosas sobre a saúde articular e estratégias de reabilitação (Lieberman, 2011).

1.2 Lacunaridade

1.2.1 Lacunaridade em ligamentos

Nos ligamentos, a lacunaridade permite identificar a quantidade, complexidade e organização espacial das fibras colágenas e de outros componentes, ajudando a caracterizar a microestrutura, revelando como as fibras colágenas estão organizadas, a densidade de fibras e a presença de áreas mais densas ou menos densas dentro do tecido ligamentar (Rieger, 1996).

A lacunaridade dos ligamentos deve ser calculada a partir de imagens microscópicas, utilizando técnicas de processamento de imagens com análise computacional. Esse método envolve a quantificação da distribuição espacial das fibras colágenas e outras estruturas fibrosas, oferecendo uma visão detalhada da estrutura ligamentar (Stanley; Miyashita, 2003).

O aprofundamento do entendimento da lacunaridade nos ligamentos deve levar ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e a melhores diagnósticos na área. Por fim, essa abordagem pode ajudar na avaliação da eficácia de intervenções terapêuticas e na monitorização da recuperação de lesões ligamentares (Komi, 2003).

1.3 Terminações Nervosas

As terminações nervosas estão localizadas em diversas partes do corpo, incluindo áreas subcutâneas, tecidos conjuntivos, órgãos viscerais, músculos esqueléticos e lisos. Sua distribuição é específica para cada região do corpo, adaptando-se às necessidades funcionais de cada área (Guyton; Hall, 2011).

São classificadas em dois grupos principais: terminações motoras e receptores sensoriais.

Terminações motoras incluem as junções neuromusculares, responsáveis pela inervação dos músculos esqueléticos, e terminações em músculos lisos e cardíacos, que regulam a contração involuntária (Bear et al., 2016).

Receptores sensoriais incluem receptores sinestésicos (toque, pressão, dor e temperatura), visuais, auditivos, gustativos e olfativos, que são responsáveis por detectar estímulos do ambiente e transmiti-los ao sistema nervoso central para processamento (Purves et al., 2012).

Podemos classificar os receptores sensoriais em:

- Termorreceptores: respondem a variações de temperatura, permitindo a percepção de calor e frio. Esses receptores são fundamentais para a regulação da temperatura (Guyton; Hall, 2011).
- Nociceptores: detectam estímulos potencialmente prejudiciais, como dor, protegendo o organismo de danos (Julius; Basbaum, 2001).
- Quimiorreceptores: responsáveis pela detecção de substâncias químicas, como no paladar e olfato, desempenhando papéis cruciais na alimentação e na detecção de perigos ambientais (Buck; Axel, 1991).
- Fotorreceptores: são os receptores sensoriais responsáveis pela visão. Eles são compostos por células que captam a luz que chega à retina e enviam um impulso nervoso para o cérebro, permitindo o reconhecimento de imagens (Neto; Orrith, 2017).
- Mecanorreceptores: detectam estímulos mecânicos, como toque, pressão e vibração. São essenciais para a percepção tátil e proprioceptiva (Johnson, 2001).

Freeman e Wyke (1967), em um estudo do tecido periarticular do joelho de gatos, realizaram a seguinte classificação das terminações nervosas:

- Tipo 1: possuem morfologia globulares ou corpúsculo ovóide, localização nas cápsulas fibrosas, diâmetro das fibras entre 5-8 μm (pouco mielinizadas), função principal de mecanorreceptor (baixo limiar, adaptação lenta) e são conhecidos como Ruffini, terminação de Golgi-Mazzoni ou Meissner;
- Tipo 2: possuem morfologia cilíndricas ou corpúsculos cônicos, localização nas cápsulas fibrosas, diâmetro das fibras entre 8-12 μm (intermediariamente mielinizadas), função principal de mecanorreceptor (baixo 35 limiar, adaptação rápida) e são conhecidos como Paccini, corpos de Golgi-Mazzoni ou Meissner;

- Tipo 3: possuem morfologia fusiformes, localização nos ligamentos e tendões, diâmetro das fibras entre 13-17 μm (muito mielinizadas), função principal de mecanorreceptor (alto limiar, adaptação muito lenta) e são conhecidos como terminações de Golgi e corpúsculo de Golgi-Mazzoni;

- Tipo 4: possuem morfologia de terminações nervosas livres não mielinizadas, localização variadas, diâmetro das fibras menores que dois micrômetros (não mielinizadas), função principal de receptores álgicos e são conhecidos como terminações nervosas livres.

As terminações nervosas integram informações sensoriais que contribuem para a consciência e resposta motora, sendo essenciais para o equilíbrio e a coordenação motora. Esse processamento permite a interação eficaz com o ambiente (Purves et al., 2012).

A transdução converte estímulos físicos ou químicos em sinais elétricos chamados de sinais nervosos, que são transmitidos como potenciais de ação ao longo de fibras nervosas. Essa condução rápida e precisa é essencial para a comunicação eficaz no sistema nervoso (Kandel et al., 2013).

Os receptores sensoriais exibem adaptação rápida ou lenta, ajustando sua sensibilidade a estímulos contínuos. A modulação da sensibilidade é feita por meio de mecanismos neurais centrais e periféricos, permitindo a adaptação a diferentes condições ambientais (Costanzo, 2014).

Lesões nervosas periféricas podem comprometer a função sensorial e motora, levando a distúrbios como neuropatias e síndromes dolorosas. Essas condições impactam significativamente a qualidade de vida (Dyck; Thomas, 2005).

As terminações nervosas livres são pequenas ramificações de algumas fibras mielinizadas ou amielinizadas finas que não estão encapsuladas. Elas estão presentes em quase todos os tecidos do corpo, incluindo a pele. As transduções mecanoelétrica, quimioelétrica e termoeelétrica são suas principais funções. São adaptadas de maneira lenta e transmitem informações como propriocepção, dor, sensibilidade à temperatura e tato grosseiro (Reece, 2006).

Esse tipo de terminação nervosa é o mais comum. Elas estão localizadas perto de vasos sanguíneos, entre as camadas epiteliais da pele, na córnea, no trato digestivo e nos tecidos conjuntivos. Também são encontradas nas articulações, entre as camadas fibrosa e sinovial, e dentro da própria camada fibrosa. Podem ser mielinizadas ou não mielinizadas, mas as células de Schwann geralmente as

embainham parcialmente. As terminações ramificadas das fibras constituem as terminações nervosas livres, que são ligeiramente espessadas (Costa, 2024).

1.4 Ligamentos

1.4.1 Definição e função dos ligamentos

Os ligamentos são faixas de tecido conjuntivo fibroso que conectam ossos nas articulações, fornecendo estabilidade e limitando movimentos excessivos. Eles são essenciais para a integridade estrutural e a função das articulações (Moore; Dalley; Agur, 2018).

São fundamentais para estabilizar a articulação e atuam como restritores passivos que previnem deslocamentos excessivos. Eles trabalham em conjunto com os músculos e tendões para manter o alinhamento correto dos ossos durante o movimento (Solomonow, 2006).

1.4.2 Estrutura dos ligamentos

Tais estruturas são compostas principalmente por fibras de colágeno, que conferem resistência à tração, e elastina, que proporciona elasticidade. A matriz extracelular também contém fibroblastos, responsáveis pela manutenção e reparo do tecido. Essa estrutura confere aos ligamentos a capacidade de suportar cargas e movimentos sem lesões (Kjaer, 2004).

Eles podem ser divididos em:

- Ligamentos intrínsecos: localizados dentro da cápsula articular, ajudam a estabilizar a articulação internamente, como os ligamentos colaterais do joelho (Moore; Dalley; Agur, 2018).
- Ligamentos extrínsecos: situados fora da cápsula articular, como os ligamentos cruzados anterior e posterior do joelho, são cruciais para controlar o movimento articular e resistir a forças externas (Griffin et al., 2006).

1.4.3 Lesões ligamentares e as tecnologias emergentes no tratamento

Lesões ligamentares, como entorses e rupturas, são comuns em atividades físico-esportivas, resultando em dor e instabilidade articular. O aquecimento e o alongamento adequados são importantes na prevenção de lesões, pois preparam os tecidos para o estresse físico (Woods et al., 2007). A terapia regenerativa tem avançado com o uso de células-tronco e engenharia de tecidos. Esses métodos estão sendo explorados para melhorar o tratamento de lesões ligamentares, acelerando a cicatrização e melhorando os resultados funcionais (Murphy; Atala, 2014).

Pesquisas recentes têm concentrado-se na regeneração de ligamentos usando biomateriais e engenharia de tecidos. *Scaffolds* biocompatíveis têm mostrado potencial para promover a regeneração tecidual e a recuperação funcional após lesões.

1.4.4 Biomecânica dos ligamentos

Os ligamentos desempenham um papel crítico na estabilidade articular e no suporte biomecânico, respondendo às forças de tração e compressão durante o movimento e atividades físicas (Dyck; Thomas et al., 1995). As propriedades mecânicas dos ligamentos, como elasticidade e resistência à tração, são essenciais para sua função, permitindo que suportem cargas sem lesionar-se (Petrie et al., 1997). Os ligamentos adaptam-se ao estresse mecânico através de processos de remodelação, sendo que a atividade física regular pode fortalecê-los, enquanto a inatividade pode enfraquecê-los (Kjaer, 2004).

1.4.5 Regulação neurovascular dos ligamentos

Os ligamentos são inervados e vascularizados, com nervos sensoriais desempenhando um papel crucial na detecção de tensão e na regulação da função articular (Benjamin et al., 2002). Além de contribuir para a estabilidade, eles auxiliam na propriocepção e na coordenação neuromuscular, ajudando na percepção do posicionamento articular (Provins, 1958). Após lesões, os ligamentos passam por reações inflamatórias e reparadoras que podem impactar a função articular. Lesões

crônicas podem levar à instabilidade e disfunção (Woods et al., 2007). Fisiologicamente, os ligamentos variam entre diferentes articulações, como joelho, ombro e tornozelo. A função dessas estruturas pode ser influenciada por fatores como idade, sexo e nível de atividade física (Thompson et al., 2015).

1.5 Imunofluorescência

A imunofluorescência é uma técnica importante utilizada em biologia celular e molecular para detectar a presença e localização de proteínas específicas em amostras biológicas, como células, tecidos ou outros materiais biológicos. Ela baseia-se na capacidade dos anticorpos (também chamados de imunoglobulinas) de ligarem-se especificamente a esses antígenos (Naoum, 2012).

A técnica utiliza anticorpos específicos que foram previamente conjugados a fluoróforos, moléculas que emitem luz fluorescente quando excitadas por uma determinada faixa de comprimento de onda de luz, geralmente luz ultravioleta (UV) ou luz azul.

Quando um anticorpo marcado por fluorescência liga-se ao antígeno de interesse em uma amostra biológica, a fluorescência emitida pode ser detectada e visualizada com o uso de um microscópio de fluorescência (Da Silva; Cutolo; Langoni, 2002).

Quando as moléculas são expostas a uma fonte de luz, os anticorpos são marcados por moléculas que se excitam. A cor emitida pode ser amarela ou esverdeada, no caso do uso de acetato de fluoresceína, ou vermelha, quando se usa rodamina. A técnica pode ser classificada como direta ou indireta (Milani et al., 2023).

Muitos antígenos virais podem ser encontrados por meio da imunofluorescência direta (IF). Um conjugado específico é adicionado às células infectadas por vírus, fixadas em um microscópio na IF direta (IFD). Se o anticorpo for específico para o antígeno, a formação do complexo pode ser visualizada com um microscópio de fluorescência. Não há formação de imunocomplexos ou fluorescência se o conjugado não for específico para o antígeno.

A imunofluorescência indireta (IFI) é usada para detectar anticorpos ou antígenos. O exame é conduzido em duas fases. Na primeira fase, anticorpos não marcados são adicionados às células infectadas, fixadas em uma lâmina de

microscópio. Após a incubação, as lâminas são lavadas para remover anticorpos não ligados (Aoki et al., 2010).

Segundo Alves (2018), para realizar a imunofluorescência, é necessário seguir os seguintes passos básicos:

3. Incubação com anticorpos primários: Anticorpos primários, específicos para o antígeno de interesse, são adicionados à amostra e incubados, permitindo que se liguem aos antígenos presentes.

4. Lavagem: A amostra é lavada para remover anticorpos não ligados e outros reagentes.

5. Incubação com anticorpos secundários: Anticorpos secundários, conjugados a fluoróforos, são adicionados à amostra e incubados. Esses anticorpos secundários reconhecem os anticorpos primários, amplificando o sinal fluorescente.

6. Lavagem final: A amostra é novamente lavada para remover anticorpos secundários não ligados e outros reagentes.

7. Montagem e análise: A amostra é montada em um meio adequado para microscopia e, então, analisada usando um microscópio de fluorescência. A presença e a localização dos antígenos de interesse são determinadas pela observação da fluorescência emitida.

A imunofluorescência tem sido amplamente utilizada em pesquisa biomédica e diagnóstico clínico para estudar a distribuição de proteínas, células e outras estruturas biológicas em amostras complexas, fornecendo insights valiosos sobre a função celular, a fisiopatologia de doenças e a eficácia de tratamentos (Moreira, 2002).

A imunofluorescência é uma técnica bastante utilizada para a visualização de proteínas e antígenos, estudo de expressão gênica, identificação de biomarcadores, estudos de interação proteína-proteína, análise de estruturas subcelulares, estudo de doenças, além de pesquisas em biologia do desenvolvimento, toxicologia e farmacologia (Barbosa, 2010).

Apesar de ser uma técnica amplamente utilizada, apresenta alguns desafios e limitações que precisam ser considerados ao interpretar os resultados, como a especificidade dos anticorpos. A escolha de anticorpos altamente seletivos é fundamental para garantir resultados confiáveis na imunofluorescência. Contudo, nem todos os anticorpos são igualmente específicos, o que pode levar à detecção

cruzada de proteínas não-alvo ou à falta de detecção da proteína de interesse (Luciano et al., 2009).

Esta técnica apresenta como limitação o seu alto custo e o fato de exigir do leitor uma habilidade técnica específica para realizar a leitura das imagens microscópicas, pois não apresentam uma padronização (Porth; Branco; De Freitas Milarch, 2024).

Vale destacar também que alguns tipos de amostras biológicas, como colágeno e elastina em tecidos humanos, podem exibir autofluorescência natural, que interfere na detecção específica do sinal fluorescente emitido pelos anticorpos. Isso pode interferir na interpretação dos resultados e exigir métodos adicionais de controle e correção (Laurino et al., 2009; Georgakoudi et al., 2002).

As perspectivas futuras para a técnica de imunofluorescência na pesquisa biológica estão voltadas para o aprimoramento da sensibilidade, especificidade, resolução espacial e aplicação em novos contextos, como o uso de técnicas de seleção de anticorpos recombinantes e engenharia de anticorpos para melhorar a afinidade e a especificidade de ligação aos antígenos de interesse (Reischak; Ravazzolo; Moojen, 2002).

Um grande avanço será a capacidade de detectar múltiplas proteínas simultaneamente em uma amostra (multiplexação) e de realizar análises detalhadas entre diferentes marcadores subcelulares. A imunofluorescência será cada vez mais aplicada em estudos complexos, como organoides, culturas tridimensionais e modelos de tecidos humanos in vitro. Isso permitirá um melhor entendimento da biologia em contextos mais fisiológicos e uma modelagem mais precisa de doenças e respostas a tratamentos (Braga et al., 1998).

Outra possibilidade é a integração da imunofluorescência com tecnologias como a proteômica e a genômica, permitindo uma análise integrada de múltiplos níveis de informação biológica. Isso permitirá uma compreensão mais abrangente de redes de sinalização celular e mecanismos patológicos (Cunha et al., 2019).

No campo da análise fractal, vários estudos vêm sendo realizados com imagens provenientes de imunofluorescência, como o estudo de Dantas (2023), que avaliou a aplicabilidade da técnica de imunofluorescência com o uso do anticorpo PGP 9.5 (PGP Protein Gene Product) e varredura a laser confocal no estudo da inervação da faringe em humanos.

A imunofluorescência continuará a evoluir para aplicações clínicas, como o diagnóstico de doenças, monitoramento de terapias e caracterização de biomarcadores preditivos. O desenvolvimento de ensaios rápidos e sensíveis baseados em imunofluorescência terá um impacto significativo na medicina personalizada e na saúde pública. Essas perspectivas demonstram como a imunofluorescência está tornando-se uma ferramenta essencial na pesquisa biológica e clínica, proporcionando novas oportunidades para explorar e compreender os processos biológicos em um nível celular e molecular detalhado (Ertekin et al., 2023).

Avanços em tecnologias, como microscopia avançada e técnicas de imagem associadas à análise fractal e lacunaridade, estão expandindo nosso entendimento sobre terminações nervosas. Essas ferramentas têm potencial para aplicações na neurociência clínica e regeneração nervosa, oferecendo possibilidades de tratamentos e condutas inovadoras (de Holanda; de Vasconcelos; de Souza Santos, 2023).

Todavia, faltam estudos que empreguem essas técnicas para a determinação precisa de estruturas neurais presentes em ligamentos, o que motivou a realização deste trabalho. Diante do exposto, a realização de um estudo com maior precisão para avaliar a organização das imagens de terminações nervosas livres em ligamentos de joelho e cotovelo, por meio da dimensão fractal e lacunaridade, tem potencial para impactar tanto a pesquisa básica quanto a aplicação clínica, contribuindo para uma melhor compreensão da função das terminações nervosas livres e para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

1.6 Relevância e Justificativa

Alguns estudos realizados nos últimos anos, como o de Rocha (2022), demonstraram que a variabilidade morfológica e quantitativa das estruturas neurais sensoriais são específicas para cada órgão. Portanto, são necessários estudos individualizados para diferentes áreas do organismo humano. Destaca-se ainda que existem poucos estudos na literatura sobre a inervação sensorial das estruturas do joelho e cotovelo, e que não há estudos que utilizem a dimensão fractal (DF) e a

lacunaridade (LAC) para analisar imagens de terminações nervosas em meio a imunofluorescência, o que torna ainda mais relevante a presente tese.

Nesse sentido, este estudo, que investiga terminações nervosas em ligamentos utilizando dimensão fractal (DF) e lacunaridade (LAC), é fundamental. Respostas sensoriais anormais têm sido encontradas em algumas doenças que afetam essas estruturas, como corroborado pelo estudo de Moraes (2008), no qual foi avaliada a histomorfometria dos mecanorreceptores e das terminações nervosas livres no quadril artrósico, uma doença crônico-degenerativa caracterizada pelo desgaste progressivo da cartilagem articular. Essa condição, com elevada morbimortalidade, gera grande impacto na saúde pública.

Destaca-se ainda que os estudos sobre a inervação são essenciais para compreender melhor essas estruturas. Eles colaboram significativamente para o conhecimento de sua fisiopatologia, influenciando o manejo da doença, o desenvolvimento de técnicas cirúrgicas e a escolha da conduta terapêutica adequada para cada indivíduo.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Determinar os valores de dimensão fractal e lacunaridade de imagens microscópicas de terminações nervosas livres em ligamentos de joelho e cotovelo produzidas por imunofluorescência.

2.2 Específicos

- Analisar qualitativamente as imagens produzidas por imunofluorescência;
- Comparar os valores de Dimensão Fractal (DF) e Lacunaridade (LAC) entre diferentes imagens dentro de um mesmo grupo experimental;
- Comparar os valores de DF e LAC entre diferentes grupos experimentais;
- Avaliar a correlação entre os valores de DF e LAC nas imagens analisadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição do estudo

Trata-se de um estudo descritivo, desenvolvido pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas da Universidade Federal do Ceará, onde foram analisadas qualitativamente imagens digitais de secções histológicas por imunofluorescência, obtidas a partir de amostras teciduais provenientes de peças cadavéricas de joelho e cotovelo de cadáveres adultos, coletadas previamente em outros estudos por outros autores: Alencar Neto, 2022; Lima, 2019; Costa, 2024.

3.2 Aspectos éticos

O estudo foi conduzido conforme a resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) e, aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) dos respectivos locais de coleta.

3.3 População e amostra

GRUPO A – 11 imagens de ligamentos menisco tibiais de joelho (LMT), provenientes de 20 cadáveres adultos (fresco). Coleta realizada por Alencar Neto, 2022, sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Dr. José Frota – IJF, com o parecer CAAE 31316620.8.0000.5047 (ANEXO A). Foram excluídos da amostra, ligamentos que apresentassem sinais de lesão traumática e degenerativa em qualquer compartimento do joelho que dificultem a dissecação do ligamento meniscotibial e participantes esqueleticamente imaturos.

GRUPO B – 16 imagens de ligamentos anterolaterais de joelho (LAL), provenientes de 20 cadáveres adultos (congelado). Coleta realizada Lima, 2019, sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário Christus, conforme parecer CAAE 78798617.50000.5049 (ANEXO B). Os critérios de exclusão foram sinais de trauma e/ou lesão degenerativa que pudessem dificultar a dissecação do LAL do joelho, doença inflamatória, infecção prévia ou cirurgia prévia.

GRUPO C - 11 imagens de ligamentos colaterais lateral do cotovelo (LCL), provenientes de 10 cadáveres adultos (fresco). Coleta realizada Costa, 2024 sob aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), com o parecer CAAE 11713219.1.0000.5054 (ANEXO C). Os critérios de exclusão foram qualquer doença degenerativa ou trauma no cotovelo.

3.4 Coleta da amostra

GRUPO A – Realizada por Alencar Neto (2022), onde inicialmente foi escolhido o joelho de forma aleatória, atendendo aos critérios de inclusão e exclusão. Para coleta dos LMT mediais, foi realizada um método de dissecação próprio por uma incisão posteromedial ao joelho em formato de “L” com início da parte posterior do epicôndilo medial do fêmur em direção à borda posteromedial da tibial. Foram identificados os tendões do músculo sartório, semitendíneo e grácil (pata de ganso) os quais serão rebatidos distalmente. Foi realizada uma incisão 41 transversa ao LCM superficial, onde foi identificada a cápsula articular e os LMT medias - ponto onde é realizada a artrotomia submeniscal para visualização da redução de uma fratura articular (Chang et al., 2012; Kandemir; Maclean, 2014; Luo et al., 2010; Zhang et al., 2020). Caso fosse preciso coleta dos LMT laterais, seria realizada uma incisão em “L” de início 2 cm acima da cabeça da fíbula cruzando o tubérculo de Gerdy (TG) em direção à margem lateral da crista tibial. O trato iliotibial seria seccionado longitudinalmente e destacado anteriormente e posteriormente do TG. Seria identificada a cápsula articular e os LMT laterais (Barco et al., 2016; Solomon et al., 2013; Zhang et al., 2020). A seguir, foi realizada a medição dos ligamentos: medidas de pesos, em uma balança analítica eletrônica e medidas de comprimentos. Cada fragmento após isolado, ou foi preparado para secção criostática ou foi estocado a -70° graus em 20% de sacarose para secção em outro momento.

GRUPO B – Realizada por Lima (2019), todos os cadáveres foram dissecados 30 dias após a morte, de acordo com a lei vigente no local onde o estudo foi realizado). Todos foram mantidos congelados até o momento da dissecação. A técnica de dissecação utilizada foi semelhante à descrita por de Lima et al. (2019b). Em seguida foi realizada a secção criostática e os cortes de 10 µm foram utilizados para preparação das lâminas coradas com hematoxilina de Harris (Laborclin®, Pinhais,

PR) e com eosina amarelada (Inlab®, Diadema, SP) de cada espécime deste estudo, para análise histológica e avaliação da integridade dos tecidos e localização de potenciais estruturas de interesse, servindo assim de referência ao estudo de imunofluorescência.

GRUPO C – Realizada por Costa (2024), através do cotovelo levemente fletido, foi realizado acesso de Kocher, com incisão sobre a pele de cerca de 10 cm, centrada no epicôndilo lateral e com trajeto oblíquo. A fáscia comum dos extensores foi incisada e aberta seguindo a linha gordurosa oblíqua. A seguir, foi realizada dissecação romba entre os músculos ancôneo e extensor ulnar do carpo, até a superfície lateral da ulna. Após identificação da crista do supinador, o LCL foi cuidadosamente isolado de distal para proximal até a sua origem no epicôndilo lateral do úmero. Com dissecação rente ao osso, cada ligamento foi descascado da sua inserção e origem, sendo marcado com 1 ponto de sutura simples em sua porção distal e 2 pontos de sutura simples em sua porção proximal, sendo medido com paquímetro digital e pesado em balança de precisão após a coleta. A medição do comprimento foi realizada do epicôndilo lateral até o ponto mais saliente da crista do supinador. A seguir, o LCL foi estocado a -70° graus em 20% de sacarose para secção em outro momento.

3.5 Imunofluorescência

Conforme os estudos realizados por Alencar Neto (2022); Lima (2019) e Costa, (2024), o processo de preparação das lâminas, descrito foi realizado pelo método de imunofluorescência com anticorpo primário PGP 9.5 e anticorpo secundário Alexa Fluor 488, conforme o descrito por Jew et al. (2003), também aplicado no estudo realizado por Dantas (2023).

3.6 Preparo das lâminas para análise por microscopia confocal

As secções preparadas com imunofluorescência foram examinadas com microscópio confocal a laser equipado com epifluorescência (Zeiss® LSM 710). As secções foram vistas primeiro com epifluorescência, usando um filtro de excitação (492-630nm) para emissão de feixe (520-525) Duolexis – flúor 488. Cada secção 48

foi examinada no aumento de 10 vezes para orientação dos tecidos e mapeamento das estruturas. Quando identificadas, foram utilizadas objetivas de 20 vezes e de 40 vezes para ver detalhes (Alencar Neto, 2022; Lima, 2019; Costa, 2024).

3.7 Análise das imagens

A DF e LAC foram calculadas através dos métodos *box-counting* e *gliding-box* utilizando-se o programa analisador de imagens gratuito *ImageJ* (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) junto com o plugin *FracLac*. O *ImageJ* trata-se de um software processador de imagens em formato java, criado por por Wayne Rasband, pesquisador do *Research Services Branch* (RSB) dos Estados Unidos da América.

Para analisar as imagens, foi necessário a realização de um preparo, através da binarização da imagem, transformando-a em uma imagem composta de pixels pretos com intensidade zero, com um fundo branco de intensidade 255. A sequência do processo está ilustrada mais adiante.

Os dados obtidos foram automaticamente organizados em planilhas eletrônicas pelo *ImageJ*, mantidos no tamanho original sendo pré-processadas e analisadas seguindo os seguintes passos:

1. Importação das imagens no formato TIF.
2. Transformação das imagens coloridas em imagens de 8 bits;
3. Redenrização das imagens: Binarização da imagem;
4. Mensuração da DF, utilizando a ferramenta "*Fractal box-counting*" (contagem de caixas), onde o tamanho do box aumenta progressivamente (box= 2, 3, 4, 8, 16, 32, 64) até cobrir as imagens selecionadas e o programa calcula a DF automaticamente);
5. Mensuração da LAC utilizando o método *gliding box* do plugin *FracLac*, similar ao método de contagem de caixas, onde o tamanho do box aumenta progressivamente e desliza a partir de um canto até preencher totalmente a imagem selecionada;
6. Avaliação e interpretação dos resultados da Análise Fractal por métodos estatísticos no software *GraphPad Prism®* versão 10.2.3 para Windows®.

A seguir temos a representação dos passos do processo:

Figura 01 -- Importação das imagens em formato TIF.

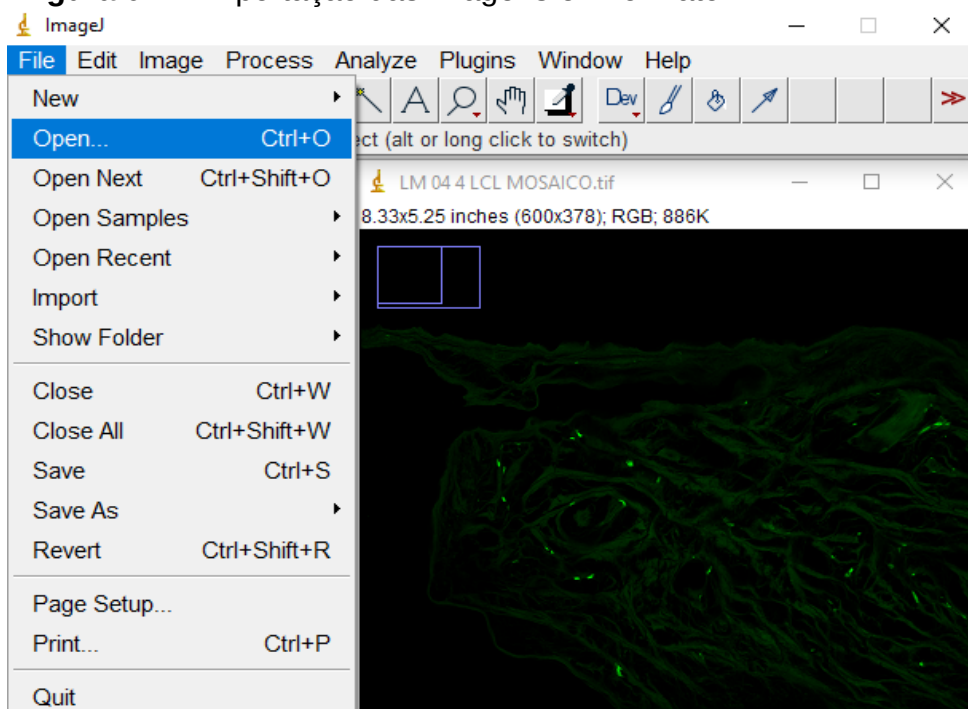


Figura 02 – Conversão das imagens coloridas em imagens de 8 bits.

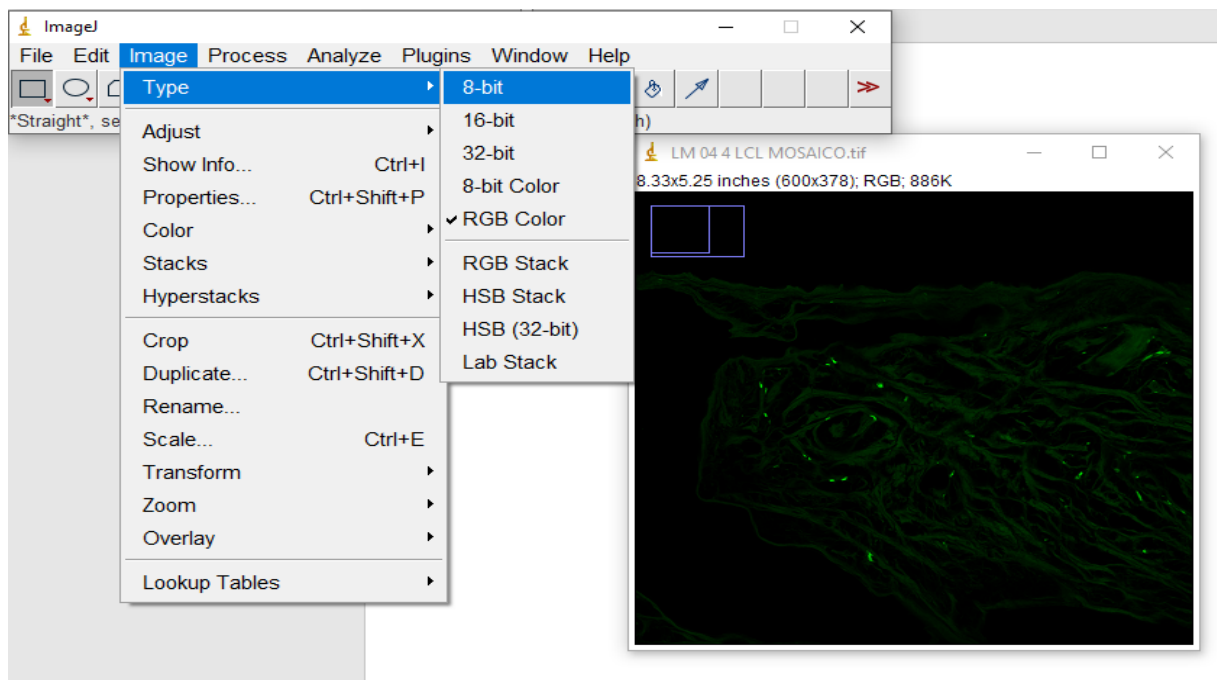


Figura 03 – Binarização e renderização da imagem.

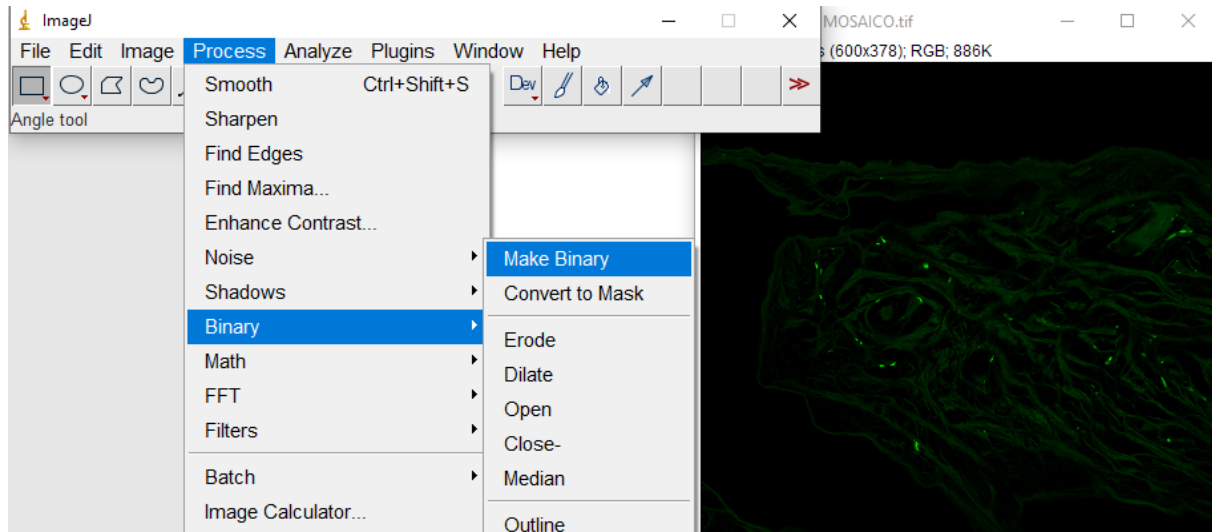


Figura 04 – Plugin “fractalac” de obtenção da análise fractal e lacunaridade.

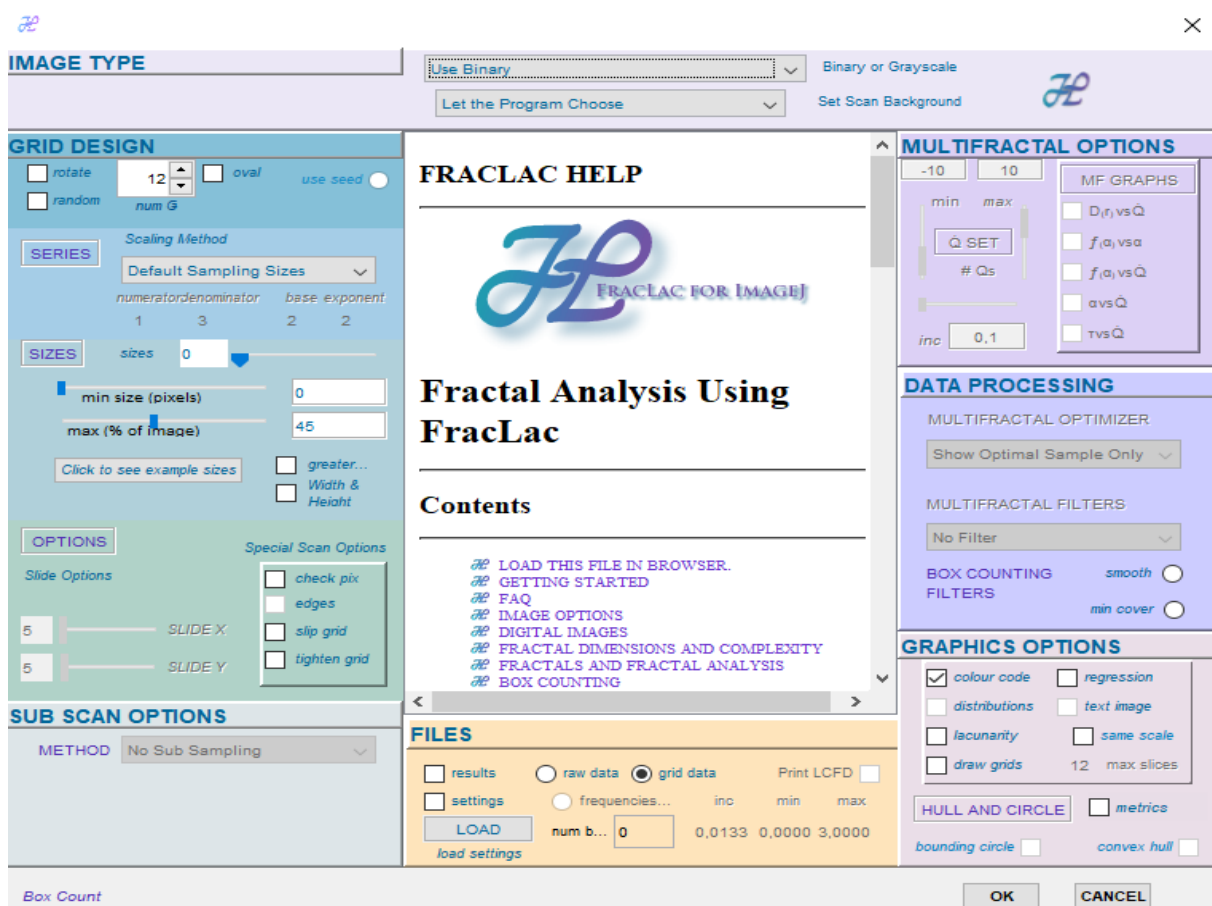


Figura 05 – Processo de mensuração da DF e LAC;

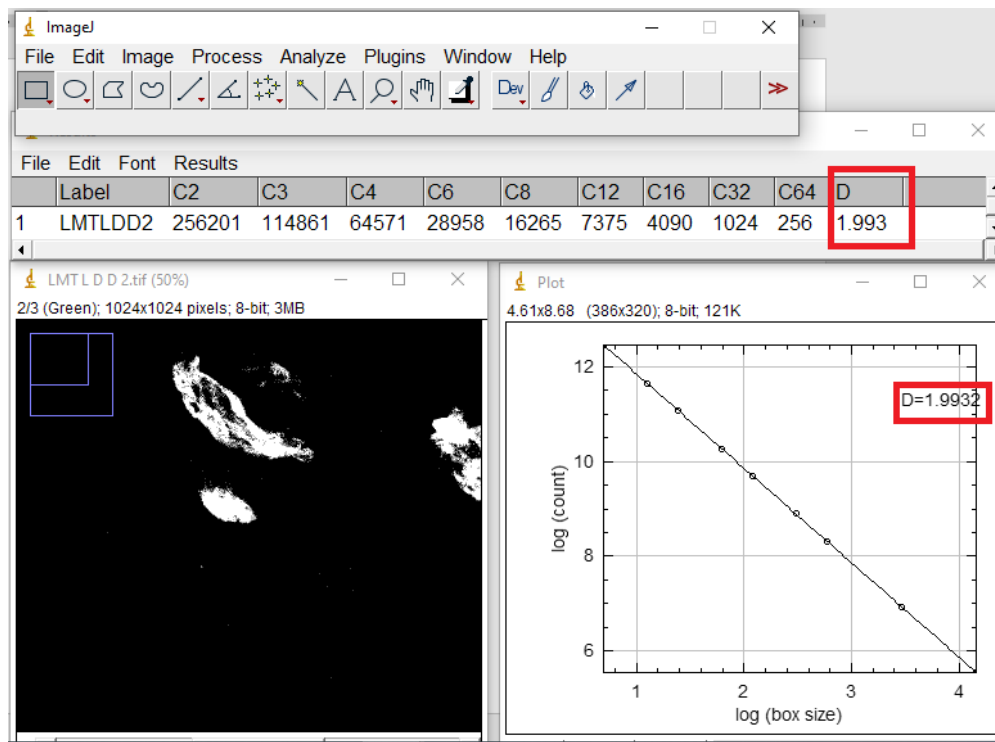
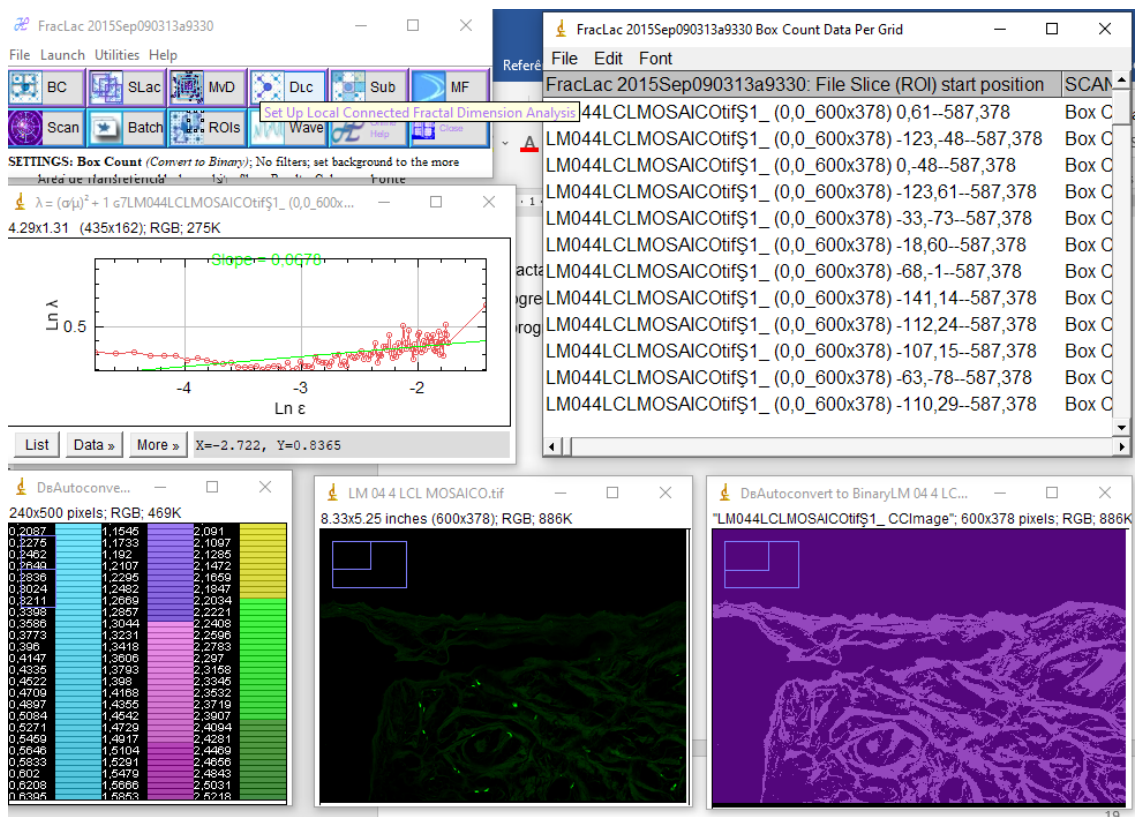


Figura 06 – Mensuração da DF utilizando a ferramenta “*Fractal box-counting*” (contagem de caixas, onde o tamanho do box aumenta progressivamente (box= 2, 3, 4, 8, 16, 32, 64) até cobrir as imagens selecionadas e o programa calcula a DF automaticamente);



3.8 Estatísticas

Inicialmente os grupos foram nomeados da seguinte forma: Grupo A: ligamento menisco tibial do joelho (LMT); Grupo B: ligamento anterolateral do joelho (LAL) e Grupo C: ligamento colateral lateral do cotovelo. Em seguida foi realizado o teste de normalidade pelo Teste de Shapiro-Wilk que tem como objetivo avaliar se uma distribuição dos dados aproxima-se de uma distribuição normal.

Desenvolvido em 1965 por Samuel S. Shapiro e Martin B. Wilk, o teste de Shapiro-Wilk é reconhecido por ser eficaz, principalmente para amostras de tamanhos pequenos a moderados. A estatística W é usada para comparar os dados observados com os previstos para uma distribuição normal. Valores W baixos indicam um desvio considerável da normalidade. Para dizer que uma distribuição é normal, o valor p precisa ser maior do que 0,05 (Miot, 2017).

Foi usado o software *GraphPad Prism*® versão 10.2.3 para Windows® (*GraphPad Software*, San Diego, California, USA, Abril/2023) para a realização dos procedimentos estatísticos. Para todas as análises, foi considerado estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

Inicialmente foi realizado o Teste de comparações múltiplas de Dunn, usando nível de significância $\alpha = (0,05)$, onde os cruzamentos A-B (LMT vs. LAL) e B-C (LAL vs. LCL), foram significantes, pois apresentaram valores de p menores que α . Logo o cruzamento dos grupos A-C (LMT vs. LCL), não foram significantes, pois apresentaram valor de p maior que α .

Também foi usado o software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS, v29), para tabular e analisar as variáveis quantitativas, o qual forneceu medidas de tendências centrais, valores percentil e dispersão.

Para realização da correlação entre a DF e LAC foi usado o programa R, versão 4.4.1.

4 RESULTADOS

A seguir são apresentados os resultados da análise das imagens digitais processadas por imunofluorescência. Primeiramente, são mostrados dados referentes à quantificação automatizada da DF e LAC nas estruturas Joelho e

Cotovelo, inicialmente por comparação intragrupo e em seguida apresentamos a comparação da DF e LC entre os grupos.

Obtivamos como resultado os seguintes valores: grupo A ($p < 0.0001$); grupo B ($p = 0.3993$); grupo C ($p = 0.2193$). Por tratar-se de uma amostra não paramétrica, para o cálculo da DF, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis. Já para a LC obtivemos valor $p = (0.0040)$, responderam positivamente ao teste de normalidade e homogeneidade das variâncias, sendo considerados, portanto, dados paramétricos, onde foi usado o teste paramétrico de análise de variância (ANOVA).

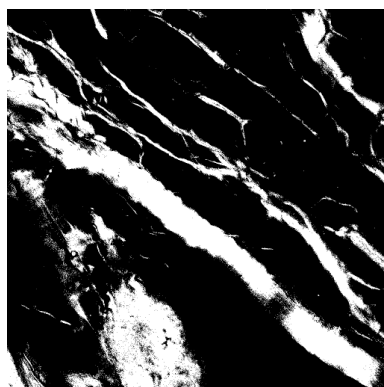
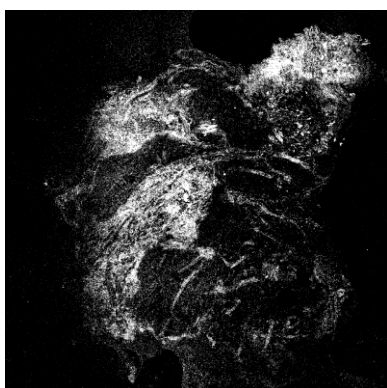
Dimensão Fractal – comparação intragrupo.

Na análise estatística, o grupo A, apresentou 11 imagens válidas, com uma média de (1,988), oscilando entre (1,945) e (1,999) na análise fractal e mediana (1,992), com desvio padrão de (0,015). Vide tabela 01.

Tabela 01. Dimensão fractal (DF) do grupo A (LMT) - 11 imagens.

(N)	imagens válidas	11
	invalidadas	0
Média		1,988
Erro padrão da média		0,004
Mediana		1,992
Desvio padrão		0,015
Mínima		1,945
Máxima		1,999

Figuras 07, 08 e 09. Representação histológica da DF do grupo A (LMT) – Mediana, mínima e máxima.

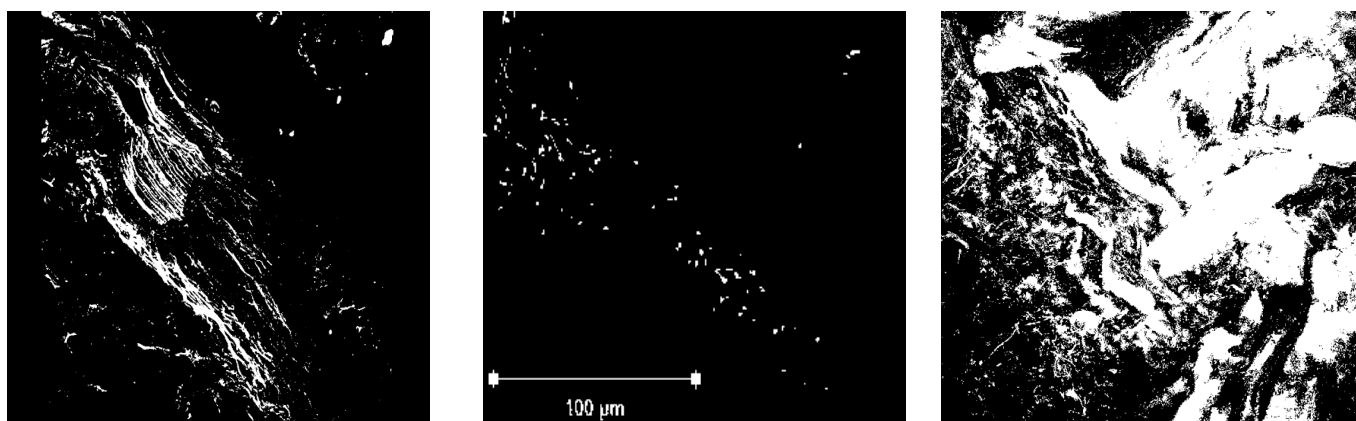


Na análise estatística, o grupo B, apresentou 16 imagens válidas, com uma média de (1,548), oscilando entre (1,108) e (1,798) e mediana (1,571), com desvio padrão de (0,207). Vide tabela 02.

Tabela 02. Dimensão fractal (DF) do grupo B (LAL) - 16 imagens.

(N)	imagens válidas	16
	invalidadas	0
Média		1,548
Erro Padrão da Média		0,051
Mediana		1,571
Desvio Padrão		0,207
Mínimo		1,108
Máximo		1,798

Figura 10, 11 e 12. Apresentação histológica da DF do grupo B (LAL)) – Mediana, mínima e máxima.



Na análise estatística, o grupo C, apresentou 12 imagens válidas, com uma média de (1,956), oscilando entre (1,928) e (1,984) na análise fractal e mediana (1,958), com desvio padrão de (0,018). Vide tabela 03.

Tabela 03. Dimensão fractal (DF) do grupo C (LCL) - 12 imagens.

(N)	imagens válidas	12
	invalidadas	0
Média		1,956
Erro padrão da média		0,005
Mediana		1,958
Desvio padrão		0,018
Mínima		1,928
Máxima		1,984

Figura 13, 14 e 15. Apresentação histológica da DF do grupo C (LCL) – Mediana, mínima e máxima.



Lacunaridade das estruturas – comparação intragrupo.

Na análise estatística, o grupo A, apresentou 11 imagens válidas, com uma média de (1,100), oscilando entre (0,418) e (2,491) e mediana (0,936), com desvio padrão de (0,589). Vide tabela 04.

Tabela 04. Lacunaridade (LAC) do grupo A (LMT) - 11 imagens.

(N)	imagens válidas	11
	invalidadas	0
Média		1.100
Erro Padrão da Média		0.177
Mediana		0.936
Desvio Padrão		0.589
Mínimo		0.418
Máximo		2.491

Na análise estatística, o grupo B, apresentou 16 imagens válidas, com uma média de (1,318), oscilando entre (0,583) e (2,192) e mediana (1,145), com desvio padrão de (0,512). Vide tabela 05.

Tabela 05. Lacunaridade (LAC) do grupo B (LAL) - 16 imagens.

(N)	imagens válidas	16
	invalidadas	0
Média		1.318
Erro Padrão da Média		0.128
Mediana		1.145
Desvio Padrão		0.512
Mínimo		0.583
Máximo		2.192

Na análise estatística, o grupo C, apresentou 12 imagens válidas, com uma média de (0,480), oscilando entre (0,244) e (0,935) na lacunaridade e mediana (0,363), com desvio padrão de (0,230). Vide tabela 06.

Tabela 06. Lacunaridade (LAC) do grupo C (LCL) - 12 imagens.

(N)	imagens válidas	12
	invalidadas	0
Média		0,480
Erro padrão da média		0,066
Mediana		0,363
Desvio padrão		0,230
Mínima		0,244
Máxima		0,935

Dimensão Fractal – comparação entre grupos.

Ao cruzamento dos grupos A x B (LMT vs. LAL), o valor de p foi ($<0,0001$), com uma diferença de classificação média de (24,77), sendo A (33,27) e B (8,500), o que sugere que A tem uma quantificação de terminações nervosas maior.

No cruzamento dos grupos A x C (LMT vs. LCL), o valor de p foi (0,1011), com uma diferença de classificação média de (10,11), sendo A (33,27) e C (23,17), o que revela que a diferença entre as amostras não é significativa, pois pela regra o valor de p é maior do que o valor de alfa.

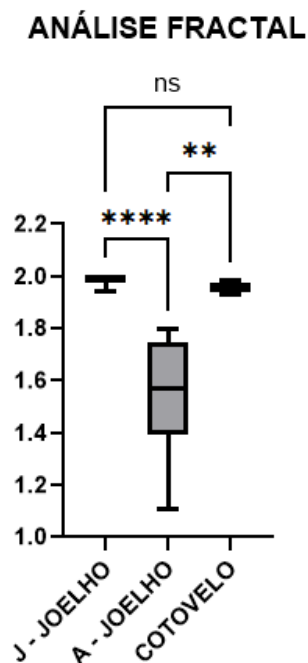
Nos grupos B x C (LAL vs. LCL), o valor de p foi (0,0023), com uma diferença de classificação média de (-14,67), sendo B (8,500) e C (23,17), o que sugere que a estrutura B tem uma quantificação de terminações nervosas maior.

Entre os 3 grupos estudados, A e C, tiveram a dimensão fractal maior, o que sugere um nível de desorganização maior. Vide figura tabela 07 e figura 07.

Tabela 07. DF entre grupos.

Nível de significância (Alpha).	0,05					
Teste de comparações múltiplas de Dunn.	Diferença de classificação média.	Significativo?	Resumo	Valor p ajustado		
LMT vs. LAL	24,77	Sim	****	<0,0001	A-B	
LMT vs. LCL	10,11	Não	ns	0,1011	A-C	
LAL vs. LCL	-14,67	Sim	**	0,0023	B-C	
Detalhes do teste	Classificação média 1	Classificação média 2	Diferença de classificação média.	n1	n2	Z
LMT vs. LAL	33,27	8,500	24,77	11	16	5,548
LMT vs. LCL	33,27	23,17	10,11	11	12	2,124
LAL vs. LCL	8,500	23,17	-14,67	16	12	3,369

Figura 7 – Comparação da DF entre grupos.



Lacunaridade – comparação entre grupos.

Inicialmente foi realizado o Teste de comparações múltiplas de Šídák, usando nível de significância $\alpha = (0,05)$, onde os cruzamentos A-C (LMT vs. LCL) e B-C (LAL vs. LCL) foram significantes, pois apresentaram valores de p menores que α . Logo o cruzamento dos grupos A-B (LMT vs. LAL) não apresentou significância, pois o valor de p foi maior que α .

No cruzamento dos grupos A x B (LMT vs. LAL), o valor de p foi (0, 570), com uma diferença média de (-0,218), sendo A (1,100) e B (0,480), o que revela que a diferença entre as amostras não é significativa, pois pela regra o valor de p é maior do que o valor de alfa.

No cruzamento dos grupos A x C (LMT vs. LCL), o valor de p foi (0,009), com uma diferença de classificação média de (0,619), sendo A (1,100) e C (0,480), o que sugere que a estrutura A - Joelho tem uma quantificação de terminações nervosas maior.

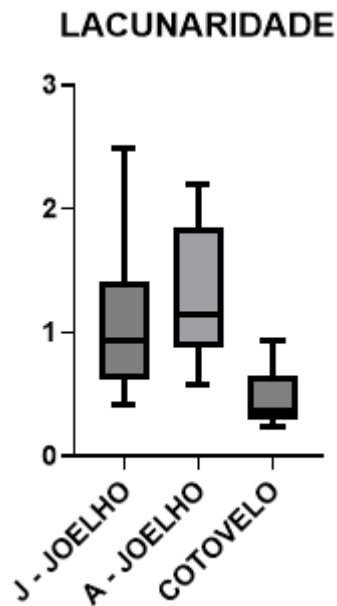
Nos grupos B x C (LAL vs. LCL), o valor de p foi (0,0001), com uma diferença de classificação média de (0,837), sendo B (1,318) e C (0,480), o que sugere que a estrutura A - tem uma quantificação de terminações nervosas maior.

Podemos concluir dessa forma, que entre os 3 grupos estudados, A (LMT) e B (LAL) tiveram uma lacunaridade maior, o que sugere uma densidade menor, inverso ao encontrado no grupo C, que apresentou lacunaridade menor sugerindo uma densidade maior. Vide tabela 08 e figura 08.

Tabela 08. LAC entre grupos.

Nível de significância (Alpha).	0,05							
Teste de comparações múltiplas de Šídák	Diferença média	IC de 95,00% de diferença	Abaixo do limite?	Resumo	Valor P ajustado			
LMT vs. LAL	-0,218	-0,680 a 0,244	Não	ns	0,570	A-B		
LMT vs. LCL	0,619	0,127 a 1,112	Sim	**	0,009	A-C		
LAL vs. LCL	0,837	0,387 a 1,288	Sim	***	0,0001	B-C		
Detalhes do teste	Média 1	Média 2	Diferença média	Erro padrão de diferença	n1	n2	t	DF
LMT vs. LAL	1,100	1,318	-0,218	0,184	11	16	1,181	36
LMT vs. LCL	1,100	0,480	0,619	0,196	11	12	3,150	36
LAL vs. LCL	1,318	0,480	0,837	0,180	16	12	4,654	36

Figura 8 – Comparação da LAC entre grupos



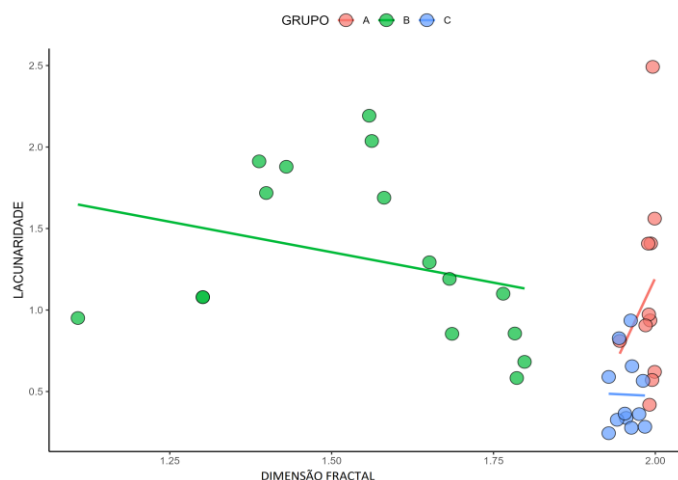
Para análise da correlação da DF com a LAC, adotou-se o valor de “p”, com significância de 5%. Conforme Bussab; Morettin (2017), a correlação mostra a força que mantém duas variáveis unidas, ou seja, se elas estão linearmente relacionadas. Pode ser positiva (se aumentarmos uma variável a outra aumenta) ou negativa (se aumentarmos uma variável a outra diminuirá). Conforme Cohen (1992), é possível ainda definir a correlação em fraca, moderada e forte, de acordo com o valor de “r”.

Conforme a tabela 09 e figura 09, descrita abaixo, o grupo A (LMT) apresentou uma correlação positiva moderada; o grupo B (LAL) apresentou uma correlação negativa moderada, e o grupo C (LCL) uma correlação positiva fraca.

Tabela 09. Correlação da DF com a LAC por grupo.

Grupo	Parâmetro 1	Parâmetro 2	<i>rho</i>	<i>p</i>
A - LMT	DF	LAC	0.23	0.492
B - LAL	DF	LAC	-0.45	0.083
C - LCL	DF	LAC	0.02	0.948

Figura 09. Correlação da DF com a LAC por grupo.



Descritivas da DF e LAC dos grupos A, B, C.

A Dimensão fractal total, considerando as 39 lâminas, apresentou valor mediano elevado. Na comparação entre os grupos, A (LMT) e C (LCL) apresentaram uma desorganização, ao inverso do encontrado no grupo B (LAL), que apresentou dimensão fractal menor, fato esse que sugere um nível de organização maior.

No que diz respeito à lacunaridade total, esta apresentou valor mediano reduzido. Na análise de cada grupo, A (LMT) e C (LCL), tiveram uma lacunaridade menor, o que sugere uma densidade maior, inverso ao encontrado no grupo B (LAL), que apresentou lacunaridade maior sugerindo uma densidade maior. Vide tabela 10.

Tabela 10. Descritivas da DF e LAC dos grupos A, B, C.

Variáveis	N	Grupo			
		Total ²	A, N = 11 ²	B, N = 16 ²	C, N = 12 ²
DIMENSÃO FRACTAL	39	1.80 ± 0.25 (1.94)	1.99 ± 0.02 (1.99)	1.55 ± 0.21 (1.57)	1.96 ± 0.02 (1.96)
LACUNARIDADE	39	1.00 ± 0.58 (0.91)	1.10 ± 0.59 (0.94)	1.32 ± 0.51 (1.15)	0.48 ± 0.23 (0.36)

² Média ± Desvio Padrão (Mediana)

6 DISCUSSÃO

O principal atrativo da geometria fractal é sua capacidade de descrever as formas irregulares, rugosas, complexas e fragmentadas dos objetos naturais ou artificiais que a geometria tradicional ou Euclideana falhou em analisar. O fenômeno é expresso através de leis de escala estatisticamente estabelecidas no domínio espacial ou temporal, sendo caracterizado pelas leis de potência encontradas no mundo físico real (Mossulin; De Medeiros, 2023). Isso justifica a minha escolha pela análise fractal nesse estudo, tendo em vista que as imagens aqui analisadas são irregulares, e foram analisadas pelo software *imageJ*, pelo método *box-counting* que consiste em divisões infinitas de um objeto, gerando partes semelhantes a ele mesmo.

Através da aplicação desse método no presente estudo podemos observar que os fractais são tipicamente de escala, autossimilares e têm uma quantidade infinita de detalhes e vem sendo bastante usado em pesquisas envolvendo estruturas nervosas por imunofluorescência.

A utilização da dimensão fractal permite a mensuração e descrição da semelhança entre um objeto analisado e ele mesmo. Isso permite que você compare as partes da estrutura com a estrutura como um todo. De certa forma, valores altos de DF indicam uma maior complexidade da estrutura analisada (Antoniazzi, 2007).

Entretanto, faz-se necessário que o pesquisador reconheça padrões característicos da imagem analisada, como também, identificar as relações entre os padrões detectados e os diagnósticos prováveis.

Felipe, Olioti e Traina, 2005, afirmam que o uso da dimensão fractal requer habilidade e experiência técnica do leitor da imagem. Considerando todas essas peculiaridades, a dimensão fractal tem sido bastante usada para quantificar estruturas biológicas complexas como as terminações nervosas pela técnica de imunofluorescência, como por exemplo no estudo Pinheiro Júnior et al. (2002), que teve como objetivo quantificar mecanorreceptores de terminações nervosas através da imunofluorescência e evidenciou mecanorreceptores do tipo Meissner e Pacini de alta densidade, que ajudaram na compreensão da fisiologia de estabilidade do ombro.

A Universidade Federal do Ceará apresenta uma linha de pesquisa com diversos estudos envolvendo terminações nervosas livres, como exemplo a realizada

por Lima (2019), que estudou as terminações nervosas e mecanorreceptores do ligamento anterolateral do joelho, em todas as amostras analisadas foram identificados mecanorreceptores do tipo I (Ruffini-like) e do tipo IV (terminações nervosas livres), fibras paralelas e formato enovelado.

Também destacamos o estudo de Costa (2024) afirmou que a intenção era descrever a forma e a distribuição dos mecanorreceptores e terminações nervosas livres do Ligamento Colateral Lateral do Cotovelo (LCL). Em todas as amostras analisadas foram detectados mecanorreceptores do tipo I (Ruffini-like) e do tipo IV (terminações nervosas livres), variando desde fibras paralelas até fibras em formato enovelado. Foram encontradas ainda terminações nervosas não classificadas, com formatos diversos e irregulares. Portanto, concluiu-se que o LCL mostra estrutura nervosa periférica de mecanorreceptores tipo I e IV.

Neste estudo, a DF foi maior no grupo dos ligamentos meniscotibiais do joelho, corroborando com a pesquisa de Alencar Neto (2022), que identificou mecanorreceptores do tipo I (Ruffini-like) e do tipo IV (terminações nervosas livres), variando desde fibras paralelas até fibras em formato enovelado. Foram encontradas ainda, terminações nervosas não classificadas, com formatos diversos e irregulares.

A correlação entre a propriocepção e a presença dos mecanorreceptores nos tecidos articulares do joelho têm sido estudadas em animais e homens. Desde os trabalhos de Schultz et al, sabe-se da existência de mecanorreceptores nos ligamentos cruzados do joelho humano, havendo também referências em relação à cápsula articular, ligamento colateral medial e meniscos, porém não há consenso quanto ao número e aos tipos de mecanorreceptores encontrados nos ligamentos cruzados anterior e posterior.

Em outro estudo de Sampaio (2001), que objetivou detectar a presença de mecanorreceptores e comprovar que esse tecido tem função e suas implicações diagnósticas, mostrou-se que o tecido nervoso, geralmente próximo aos vasos, variou de simples filetes nervosos a corpúsculos sensoriais especializados. Feixes nervosos foram constantes no tecido de interconexão. Em menor quantidade, foram detectadas terminações sensoriais encapsuladas, mecanorreceptores, em especial corpúsculos de Pacini.

Em relação ao uso da imunofluorescência em estudos associados à microscopia confocal, para evidenciar terminações nervosas, diversos estudos vêm sendo realizados na Universidade Federal do Ceará, como mostra a tabela 11.

Tabela 11. Estudos envolvendo imunofluorescência realizados na Universidade Federal do Ceará.

PINHEIRO JÚNIOR (2015)	Análise dos mecanorreceptores e terminações nervosas livres da banda anterior do ligamento glenoumeral inferior com imunofluorescência e microscopia confocal.
PEIXOTO (2017)	Histomorfometria das terminações nervosas das conchas nasais inferiores de humanos por imunofluorescência e microscopia confocal a laser.
LIMA (2019)	Estudo das terminações nervosas e mecanorreceptores do ligamento anterolateral do joelho.
LIMA (2021)	Análise dos mecanorreceptores e terminações nervosas livres do ligamento transversal do carpo.
ALENCAR NETO (2022)	Análise dos mecanorreceptores e terminações nervosas livres do ligamento meniscotibial medial do joelho com imunofluorescência e microscopia confocal.
ABREU 2024	Mecanorreceptores e terminações nervosas livres nas polias anelares dos tendões flexores da mão: um estudo por imunofluorescência e microscopia confocal a laser.
COSTA 2024	Análise dos mecanorreceptores e terminações nervosas livres do ligamento colateral lateral do cotovelo com imunofluorescência e microscopia confocal.

No estudo realizado por Pinheiro Júnior (2015) a imunofluorescência aparece como técnica padrão-ouro para identificação de estruturas nervosas, quando comparada por exemplo à técnica usando ouro, que possui baixa especificidade para estruturas nervosas. Já a técnica envolvendo a prata requer uma experiência maior do examinador para evidenciar estruturas nervosas.

Apesar da imunofluorescência ser um método de predileção na atualidade, por prever uma especificidade significativa e sensibilidade por terminações nervosas, há possibilidade de um desfecho não favorável, a coloração de estruturas vasculares.

O desenvolvimento da técnica de imunofluorescência alavancou os estudos envolvendo mecanorreceptores. Embora cada uma delas tenha suas próprias características técnicas, muitos não são tão específicos para marcadores neurais (Lima, 2019).

Peixoto (2017) afirma que alteração da diluição do anticorpo primário PGP 9,5 de 1:400 para 1:200, mostrou-se mais adequada para evidenciação da estrutura nervosa proposta no seu estudo (conchas nasais inferiores). Acrescenta ainda que, houve um melhor realce do plano de fundo e não houve comprometimento do estudo

morfológico das terminações nervosas, porém comprometeu o cálculo da densidade ao processar as imagens em softwares computacionais.

De acordo com Barros Filho; Da Silva Júnior e De Brito (2023), lacunaridade diz respeito a distribuição de vazios em um padrão espacial e nesse sentido permite ainda avaliar a densidade e dispersão partículas.

Dessa forma ao analisar lacunaridade de imagens de terminações nervosas livres de ligamentos, esse estudo permitiu compreender a concentração e a distribuição dessas terminações em um determinado espaço. Porém a escassez de valores de referência de DF e LAC na literatura não permitiram a realização de comparações de resultados.

Analisando as medianas de lacunaridade, dos grupos A, B e C, observou-se que o grupo B (LAL) do joelho, apresentou maior lacunaridade, refletindo em uma menor densidade. Diante desse resultado, levantou-se a hipótese de que a amostra desse grupo poderia ter sofrido influência da técnica de formolização. Fontoura (2020), refere que o formol pode influenciar na qualidade da amostra, e consequentemente nos valores de DF e LAC, através do seu efeito destrutivo em tecidos, podendo inclusive dificultar a imunofluorescência, requerendo o uso de artifício para tornar livre o epítipo do antígeno gerador da resposta imune.

A densidade óssea tem sido avaliada em diversos estudos em imaginologia com a finalidade de avaliar o padrão da qualidade de imagens. Como no estudo de Faria (2021), que avaliou a qualidade óssea trabecular, por meio da DF e LAC, identificando a textura e volume ósseo da região posterior da mandíbula de homens e mulheres, através de 21 exames de tomografia, compostos de 10 cortes axiais. A DF apresentou valor médio de 0,87 e a LAC em torno de 0,17, não ocorrendo diferença entre os lados direito e esquerdo da mandíbula, nem entre homens e mulheres. Baseado nesses resultados, foi evidenciado que esse método torna-se útil para criar um padrão de lacunaridade adequado na análise da qualidade óssea mandibular).

Ainda avaliando mandíbula Barcelos (2023), avaliou a dimensão fractal (DF) e lacunaridade do osso mandibular através de radiografia panorâmica digital, tendo como amostra 34 pacientes submetidos à radioterapia para tratamento de câncer de cabeça e pescoço, comparando 17 pacientes que desenvolveram osteorradioneecrose com outros 17 pacientes que não desenvolveram. Os valores

médios de DF e LAC não foram significativamente diferentes entre os grupos, e o ponto de corte encontrado para DF foi $\leq 1,1736$ e $> 0,4155$ para lacunaridade.

Assim como também Cavalcante (2024) que realizou uma revisão sistemática sobre a análise do osso mandibular através de imagem em radiografias panorâmicas, usando dimensão fractal e estudos observacionais com endocrinopatias relacionadas às paratireóides. Isso demonstra que a lacunaridade, também utilizada neste estudo para análise de imagens, foi adequada para análise de imagens em ligamentos. Em tempo questiono se em estudos futuros poderíamos usar tal método para criar padrões de qualidade em ligamentos de joelho e cotovelo?

A avaliação da densidade de colágeno em ligamentos, por meio de imagens, usando *imageJ*, tem sido investigada, demonstrando padrões de organização dessas fibras. Rocha (2022), avaliou quantitativamente por meio de um programa analisador de imagens, a dimensão Fractal e lacunaridade e o padrão de deposição do colágeno global (Col-G) e dos tipos I (Col-1) e tipo III (Col-3) em pele de camundongos submetidos a queimaduras, e evidenciou diferentes valores de LAC em virtude dos diferentes padrões de organização das fibras colágenas (Col-G, Col-1 e Col-3), sendo maior o Col-1 e Col-3 durante a fase proliferativa da lesão. Santos (2024), analisou qualitativamente a estrutura de colágeno do Ligamento Meniscotibial Medial do Joelho, corado com *picrosirius red* para avaliar os tipos de colágenos usando imagens no software *imageJ*. Ressalto que o ligamento menisco medial analisado neste estudo, corresponde a imagens também submetidas ao método *box-counting*, da DF e LAC.

Zaia e Maponi (2022) utilizando a DF e LAC para avaliar o perfil de DNA mitocondrial, caracterizaram o fenótipo senescente como envelhecimento normal ou envelhecimento patológico através da organização e arquitetura das imagens. No presente estudo todas as imagens foram avaliadas pela DF e LAC observando a organização e disposição das terminações nervosas livres presentes nos ligamentos, para definir um padrão de similaridade entre os três grupos avaliados. Em revisão sistemática, também foi descrito que a DF e LAC tem contribuído em diversas áreas e destaca a Engenharia de tecidos, pois através destes métodos foi possível mensurar a morfologia da micróglia, contribuindo desta forma para o desenvolvimento de tecidos projetados em laboratório e modelos 3D em neurociência (Karperien; Jelinek, 2015).

Podemos apontar como possível limitação deste estudo a quantidade de joelhos examinados e consequentemente a quantidade de imagens. A legislação local em vigor no Brasil restringe o acesso a cadáveres congelados em grande quantidade, resultando em apenas 20 amostras de falecidos, porém levando em conta estudos semelhantes da literatura, acreditamos que a amostra utilizada foi suficiente para validar as conclusões.

A junção da microscopia avançada à técnicas de imagem associadas à análise fractal e lacunaridade, expandiram nosso conhecimento sobre terminações nervosas livres. Diante desse entendimento, o foco para pesquisas futuras será também estudar as terminações nervosas não classificadas, proposta por Rein et al. (2015), como um “tipo V” à classificação, complementando com estudos de imunofluorescência.

Um outro passo relevante a ser aplicado será a padronização de valores de referência para DF e LAC em ligamentos de joelho e cotovelo, o que subsidiará informações relevantes para o manejo das lesões, propedêutica do tratamento cirúrgico, oferecendo dessa forma possibilidades para tratamentos e condutas inovadoras, fatos este que despertaram o interesse em estender este estudo em uma pesquisa pós-doutoral.

7 CONCLUSÃO

A dimensão fractal (DF) é uma ferramenta validada e eficaz na quantificação de estruturas complexas, superando as limitações da geometria tradicional.

Grupos A (LMT) e C (LCL) apresentaram maior dimensão fractal, indicando maior desorganização estrutural. O grupo B (LAL) apresentou menor dimensão fractal, sugerindo maior organização.

O grupo B (LAL) demonstrou maior lacunaridade, indicando menor densidade de estruturas, enquanto o grupo C apresentou menor lacunaridade, sugerindo maior densidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, S. A. R. **Mecanorreceptores e terminações nervosas livres nas polias anelares dos tendões flexores da mão: um estudo por imunofluorescência e microscopia confocal a laser.** 2024. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médico-Cirúrgicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2024.

ALENCAR NETO, J. B. **Análise dos mecanorreceptores e terminações nervosas livres do ligamento meniscotibial medial do joelho com imunofluorescência e microscopia confocal.** 2022. 87 f. Tese (Doutorado em Ciências Médico-Cirúrgicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022.

ALVES, N. D. B. S. **Análise crítica da técnica de imunofluorescência direta no diagnóstico laboratorial da raiva do Instituto Pasteur de São Paulo.** 2020. 45p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização Profissional em Vigilância Laboratorial da Raiva do Instituto Pasteur de São Paulo). 2020.

ANTONIAZZI, R. L. **Aplicação do método box counting para a estimativa da dimensão fractal de figuras planas digitalizadas.** 2007. 52 f. Trabalho de Conclusão de Curso. (Curso de Especialização em Geomática) - Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2007.

AOKI, V. et al. Imunofluorescência direta e indireta. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, p. 490-500, 2010.

AVAKIAN, A. et al. Fractal analysis of region-based vascular change in the normal and non-proliferative diabetic retina. **Current eye research**, v. 24, n. 4, p. 274-280, 2002.

BACKES, A. R.; BRUNO, O. M. **Técnicas de estimativa de dimensão fractal aplicadas em imagens digitais.** São Carlos: ICMC-USP. Disponível em: https://repositorio.usp.br/directbitstream/19b01f14-d3ef-4983-8e53-e8443ff87021/relatorio_247.pdf.

BARBOSA, R. N. P. et al. Novas evidências sobre o valor diagnóstico da reação de imunofluorescência indireta e reação intradérmica de hipersensibilidade tardia na infecção humana por *Leishmania (L.) infantum* chagasi na Amazônia, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 1, 2010.

BARCELOS, N. S. **Análise fractal do osso mandibular e a ocorrência de osteorradioneecrose: um estudo transversal com grupo controle.** 2023. 64f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Fortaleza, 2023.

BARROS FILHO, M. N. M.; DA SILVA JÚNIOR, J. B. M.; DE BRITO, J. F. Lacunaridade urbana: uma análise comparativa entre cidades brasileiras de médio porte. **Cuadernos de Educación y Desarrollo**, v. 15, n. 4, p. 3131-3147, 2023.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neuroscience: Exploring the Brain**. 4th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2016.

BENJAMIN, M.; KUMAI, T.; RALPHS, J. R. et al. The skeletal attachment of tendons—tendon "entheses". *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, v. 133, n. 4, p. 931-945, 2002.

BRAGA, M. D. et al. Control of canine visceral leishmaniasis: comparison of results from a rapid elimination program of serum-reactive dogs using an immunoenzyme assay and slower elimination of serum-reactive dogs using filter paper elution indirect immunofluorescence. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 31, n. 5, p. 419-424, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução nº 466, de 2012**. Conselho Nacional de Saúde. Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

BUCK, L.; AXEL, R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, v. 65, n. 1, p. 175-187, 1991.

BUSSAB, W. O.; MORETTIN, P. A. **Estatística básica**. 9. ed. São Paulo: Saraiva, 2017.

CAVALCANTE, D. S. **Análise do osso mandibular através de atributos de imagem em radiografias panorâmicas: revisão sistemática sobre dimensão fractal e estudos observacionais com endocrinopatias relacionadas às paratireóides**. 2024. 109 f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2024.

COHEN, J. Statistical power analysis. *Current directions in psychological science*, v. 1, n. 3, p. 98-101, 1992.

CORRÊA, A. L. C. **Protocolo de Análise da Dimensão Fractal em pacientes com Paralisia Cerebral**. 2007. 91 f. Trabalho de Conclusão de Curso. (Curso de Graduação em Odontologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2021.

COSTA, R. P. P. **Análise dos mecanorreceptores e terminações nervosas livres do ligamento colateral lateral do cotovelo com imunofluorescência e microscopia confocal**. 2024. 87 f. Tese (Doutorado em Ciências Médico-Cirúrgicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2024.

COSTANZO, L. S. **Physiology**. 5th ed. Philadelphia: Saunders, 2014.

CROSS, S. S. Fractals in pathology. *Journal of Pathology*, v. 182, n. 1, p. 1-8, 1997.

CUNHA, C. et al. Mapeamento biomolecular do receptor GPR120: uma abordagem multiorgânica. *Revista dos Trabalhos de Iniciação Científica da UNICAMP*, n. 27, p. 1-1, 2019.

DA SILVA, A. V.; CUTOLO, A. A.; LANGONI, H. Comparação da reação de imunofluorescência indireta e do método de aglutinação direta na detecção de anticorpos anti-Toxoplasma em soros de ovinos, caprinos, caninos e felinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 1, p. 7-11, 2002.

DANTAS, G. L. **Histomorfometria da inervação proprioceptiva faríngea na apneia obstrutiva do sono: estudo caso-controle**. 2023. 153 f. Tese (Doutorado em Ciências Médico-Cirúrgicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2023.

DE HOLANDA CAVALCANTI, V. H.; DE VASCONCELOS, D. S.; DE SOUZA SANTOS, D. Relação entre comprimento e dimensão fractal em sequências genéticas virais. **Jornada de Iniciação Científica e Extensão**, v. 18, n. 1, 2023.

DE MORAES FILHO, A. O.; CASSIA-MOURA, R. Dimensão fractal de imagens cerebrais: uma revisão. **Proceeding Series of the Brazilian Society of Computational and Applied Mathematics**, v. 3, n. 1, 2015.

DYCK, P. J.; THOMAS, P. K. **Peripheral Neuropathy**. 4th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005.

ERTEKIN, S. S. et al. Doença sistêmica na vasculite leucocitoclástica: foco nos achados de imunofluorescência direta. **Anais Brasileiros de Dermatologia (Portuguese)**, v. 98, n. 1, p. 59-67, 2023.

FALCONER, K. J. **Fractal Geometry: Mathematical Foundations and Applications**. 2nd ed. Chichester: Wiley, 2003.

FARIA, G. C. et al. Dimensão fractal e lacunaridade como parâmetros de avaliação da qualidade óssea na mandíbula de indivíduos saudáveis: análise por meio da tomografia computadorizada de feixe cônico. **HU Revista**, v. 47, p. 1-7, 2021.

FELIPE, J. C.; OLIOTI, J. B.; TRAINA, A. J. M. **Discriminação de aspectos malignos em massas tumorais de mamografias usando características de forma das imagens**. 2005, Anais. Porto Alegre: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2005.

FONTOURA, E. L. L. et al. Conservação de peças anatômicas: vantagens e desvantagens de diferentes métodos. **Revista Uningá**, v. 57, n. 2, p. 34-46, 2020.

FREEMAN, M. A. R.; WYKE, Barry. Articular reflexes at the ankle joint: An electromyographic study of normal and abnormal influences of ankle? joint mechanoreceptors upon reflex activity in the leg muscles. **British Journal of Surgery**, v. 54, n. 12, p. 990-1001, 1967.

FREEMAN, M. A. R.; WYKE, B. The innervation of the ankle joint. An anatomical and histological study in the cat. **Cells Tissues Organs**, v 68, n.3, p.321-333, 1967.

GARDNER, H. **Art through the Ages**. 12. ed. Belmont: Wadsworth, 2005.

GEORGAKOUDI, Irene et al. NAD (P) H and collagen as in vivo quantitative fluorescent biomarkers of epithelial precancerous changes. **Cancer research**, v. 62, n. 3, p. 682-687, 2002.

GOLDBERGER, A. L.; et al. Fractal dynamics in physiology: Alterations with disease and aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 1, p. 2466-2472, 2002.

GRIFFIN, L. Y. et al. Understanding and preventing noncontact ACL injuries. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 34, n. 9, p. 1512-1532, 2006.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Textbook of Medical Physiology**. 12th ed. Philadelphia: Saunders, 2011.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Textbook of Medical Physiology**. 13. ed. Philadelphia: Elsevier, 2020.

JOHNSON, K. O. The roles and functions of cutaneous mechanoreceptors. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 11, n. 4, p. 455-461, 2001.

JEW, J. et al. Fluorescence immunohistochemistry and confocal scanning laser microscopy A protocol for studies of joint innervation. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 74, n. 6, p. 689-696, 2003.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-210, 2001.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. *Principles of Neural Science*. 5th ed. **New York**: McGraw-Hill, 2013.

KARPERIEN, A. L.; JELINEK, H. F. Fractal, multifractal, and lacunarity analysis of microglia in tissue engineering. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 3, p. 51, 2015.

KATZ, M. J. Fractals and the analysis of waveforms. **Computers in Biology and Medicine**, v. 18, n. 3, p. 145-156, 1988.

KIDO, Shoji et al. Fractal analysis of interstitial lung abnormalities in chest radiography. **Radiographics**, v. 15, n. 6, p. 1457-1464, 1995.

KJAER, M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 2, p. 649-698, 2004.

KOMI, P. V. *Strength and Power in Sport*. 2nd ed. **Oxford**: Blackwell Science, 2003.

LAURINO, C. C. F. C. et al. Experiência da adoção do I e II Consensos Brasileiros de Fator Antinuclear por Imunofluorescência Indireta em Células HEP-2 em um hospital universitário. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 49, p. 110-114, 2009.

LIEBERMAN, D. E. ***The Evolution of the Human Head***. Cambridge: Harvard University Press, 2011.

LIMA, D. A. **Estudo das terminações nervosas e mecanorreceptores do ligamento anterolateral do joelho**. 2019. 87 f. Tese (Doutorado em Ciências Médico-Cirúrgicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

LIMA, L. L. D. **Análise dos mecanorreceptores e terminações nervosas livres do ligamento transversal do carpo**. 2021. 102 f. Tese (Doutorado em Ciências Médico-Cirúrgicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.

LUCIANO, R. M. et al. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 3, p. 181-187, 2009.

LUO, C. F. et al. Three-column fixation for complex tibial plateau fractures. **Journal of Orthopaedic Trauma**, v.24, n.11, p.683-692, 2010.

MANDELBROT, B. B. ***The Fractal Geometry of Nature***. New York: W.H. Freeman and Company, 1982.

MILANI, E. R. et al. **Atividades de inverno: noções básicas de Imunofluorescência e Microscopia Confocal**. In: Congresso dos Profissionais das Universidades Estaduais de São Paulo. 2023. p. e023006-e023006.

MIOT, H. A. Avaliação da normalidade dos dados em estudos clínicos e experimentais. **Jornal vascular brasileiro**, v. 16, n. 2, p. 88-91, 2017.

MOORE, K. L.; DALLEY, A. F.; AGUR, A. M. R. ***Clinically Oriented Anatomy***. 8. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2018.

MORAES, M. R. B. **Histomorfometria dos mecanorreceptores e terminações nervosas livres no quadril artrósico: estudo comparativo com quadril normal de cadáver**. 2008. 103 f. Tese (Doutorado em Cirurgia) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2008.

MOREIRA, M. A. B. et al. Aplicação da técnica de imunofluorescência direta para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em aspirado de linfonodo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, p. 103-106, 2002.

MORENO, C. T. et al. Mecanorreceptores dos ligamentos cruzados do joelho. **Rev Bras Ortop**, v. 40, n. 9, p. 534-42, 2005.

MOREIRA, R. D. et al. Dimensão fractal na quantificação do grau de rejeição celular miocárdica pós-transplante cardíaco. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 26, p. 155-163, 2011.

MOSSULIN, A. V. L.; DE MEDEIROS, L. F. O ensino de Geometria Fractal na Educação Básica: uma revisão sistemática de literatura. REMAT: **Revista Eletrônica da Matemática**, v. 9, n. 2, p. e2004-e2004, 2023.

MURPHY, S. V.; ATALA, A. 3D bioprinting of tissues and organs. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 8, p. 773-785, 2014.

NAOUM, P. F. **Métodos de avaliação laboratorial**. Academia de ciência e tecnologia. Disponível em <http://www.ciencianews.com.br/aulavirt/metodos.pdf>. Acesso em, v. 4, 2012.

NETO, A.; ORRITH, L. Histologia do Sistema Nervoso: Diversidade Celular e Suas Localizações. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**. Ed, v. 8, p. 74-93, 2017.

PEIXOTO, M. E. B. **Histomorfometria das terminações nervosas das conchas nasais inferiores de humanos por imunofluorescência e microscopia confocal a laser**. 2016. 64 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

PETRIE, J. S. et al. Mechanical properties of collagen fibers in tendons and ligaments. **Journal of Applied Physiology**, v. 82, n. 4, p. 1006-1013, 1997.

PINHEIRO JÚNIOR, J. A. **Análise dos mecanorreceptores e terminações nervosas livres da banda anterior do ligamento glenoumeral inferior com imunofluorescência e microscopia confocal**. 2015. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médico-cirúrgicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

PORTH, M. L. B. A.; BRANCO, J. M.; DE FREITAS MILARCH, C. Diagnóstico laboratorial de criptosporidiose em laboratórios de análises clínicas de pequeno a médio porte. **Revista Científica Sophia**, v. 16, n. 1, 2024.

PROVINS, K. A. The proprioceptive system. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 51, n. 5, p. 293-304, 1958.

PURVES, D.; et al. **Neuroscience**. 5th ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2012.

REECE, W. O. **Fisiologia dos Animais Domésticos de Dukes**. 12^a ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2006. 926p.

REIN, S. et al. Immunohistochemical mapping of sensory nerve endings in the human triangular fibrocartilage complex. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 473, n. 10, p. 3245-3253, 2015.

REISCHAK, D.; RAVAZZOLO, A. P.; MOOJEN, V. Imunofluorescência utilizando isolados brasileiros no diagnóstico sorológico de infecção por lentivírus em caprinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, p. 7-12, 2002.

RIEGER, H. *Fractals in Biology and Medicine*. Boston: Birkhäuser, 1996.

ROCHA, J. L. C. **Quantificação da organização e arquitetura do colágeno em queimaduras cutâneas por meio da dimensão fractal, lacunaridade e transformada rápida de Fourier**. 2022. 157 f. Tese (Doutorado em Ciências Médico-Cirúrgicas)- Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022.

ROCHA, S. F. **Caracterização das células tricoleucêmicas por dimensão fractal**. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

ROSARIO, A. S. D. H. **Construções de fractais usando o Geogebra**. 2023. 47 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Matemática) – Faculdade de Matemática. Campus Universitário de Bragança, Universidade Federal do Pará, Bragança-PA, 2023.

SAMPAIO, T. C. F. V. S. et al. Estudo morfo-histológico da interconexão dos ligamentos cruzados no joelho humano. **Rev. bras. ortop**, 2001, 394-400.

SANTOS, A. P. D. **Estudo anatômico do ligamento meniscotibial medial do joelho: análise histológica da estrutura de colágeno e vascularização**. 2024. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médico-Cirúrgicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2024

SOLOMONOW, M. Sensory-motor control of ligaments and associated neuromuscular disorders. **Journal of Electromyography and Kinesiology**, v. 16, n. 6, p. 549-567, 2006.

STANLEY, H. E.; MIYASHITA, S. *Fractals in Science*. Springer, 2003.

THOMPSON, J. et al. Biomechanics of Ligaments and Tendons. **Journal of Biomechanics**, v. 48, n. 12, p. 2605-2612, 2015.

TIMBÓ, C. D. S. **Diagnóstico de células tumorais por meio de dimensões fractais**. 2004. 135 f. Dissertação (Mestrado em radioproteção e dosimetria) - Instituto de Radioproteção e Dosimetria - Comissão Nacional de Energia Nuclear, Rio de Janeiro, 2004.

TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. **Principles of Anatomy and Physiology**. 15. ed. Hoboken: Wiley, 2017.

VOGLER, E. A. Protein adsorption in three dimensions. **Biomaterials**, v. 27, n. 33, p. 5738-5748, 2006.

WEST, B. J. *Where Medicine Went Wrong: Rediscovering the Path to Complexity*. Singapore: World Scientific Publishing, 2010.

WOODS, K. et al. The efficacy of warming up in preventing injury in sports: an update. **British Journal of Sports Medicine**, v. 41, n. 5, p. 345-348, 2007.

ZAIA, A.; MAPONI, P. Mitochondrial DNA profiling by fractal lacunarity to characterize the senescent phenotype as normal aging or pathological aging. *Fractal and Fractional*, v. 6, n. 4, p. 219, 2022.

ANEXOS

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP IJF.

INSTITUTO DR. JOSÉ FROTA - IJF/ PREFEITURA DE FORTALEZA 								
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP								
DADOS DA EMENDA Título da Pesquisa: Análise dos mecanorreceptores e terminações nervosas livres dos ligamentos meniscolibais do joelho com imunofluorescência e microscopia confocal Pesquisador: Jonathan Brito de Alencar Neto Área Temática: Versão: 4 CAAE: 31316620.8.0000.5047 Instituição Proponente: Instituto Dr. José Frota - IJF/ Prefeitura de Fortaleza Patrocinador Principal: Financiamento Próprio								
DADOS DO PARECER Número do Parecer: 4.205.877 Apresentação do Projeto: Os ligamentos meniscolibais, também conhecido como ligamentos coronários, são uma banda fibrosa que conecta perifericamente os meniscos à tibia. Atualmente, as lesões em rampa do menisco foram associadas à lesão concomitante dos ligamentos meniscolibais, sendo causas de instabilidade em joelhos LCA-deficientes. O estudo dessa estrutura é fundamental para definirmos suas principais características e entendermos melhor seu funcionamento, para que possamos tratá-lo de forma adequada nos casos de ruptura do mesmo. 12 ligamentos meniscolibais de joelho, obtidos durante o artroscopia submeniscal em acesso posteromedial à fratura do platô medial, serão cuidadosamente dissecados para avaliação da morfologia dos mecanorreceptores e terminações nervosas livres, buscando compreender a interação do sistema proprioceptivo e mecânico do joelho. Para imunohistoquímica será utilizado um marcador tipo PGP9.5 (protein gene product) como anticorpo primário e Alexa Fluor 488 como anticorpo secundário, seguido de análise das lâminas por microscopia confocal de varredura a laser. Critério de Inclusão: Serão incluídos no estudo 20 ligamentos meniscolibais do joelho (10 LMT mediais e 10 LMT laterais), provenientes de 10 doadores de órgãos tecidos efetivados pela Comissão Intra-Hospitalar de Doação de Órgãos e Tecidos para Transplante (CIH-DOTT) após confirmação de morte encefálica, todos adultos, sempre preferindo por sexo ou idade e após assinatura do TCLE.								
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="border: none;">Endereço: Rua São João do Rio Branco, nº 1816</td> <td style="border: none; text-align: right;">CEP: 60.025-061</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">Bairro: Centro</td> <td style="border: none; text-align: right;">Município: FORTALEZA</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">UF: CE</td> <td style="border: none; text-align: right;">Telefone: (85) 3255-5093</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">Fax: (85) 3255-5093</td> <td style="border: none; text-align: right;">E-mail: cep@ijf.ufma.br</td> </tr> </table>	Endereço: Rua São João do Rio Branco, nº 1816	CEP: 60.025-061	Bairro: Centro	Município: FORTALEZA	UF: CE	Telefone: (85) 3255-5093	Fax: (85) 3255-5093	E-mail: cep@ijf.ufma.br
Endereço: Rua São João do Rio Branco, nº 1816	CEP: 60.025-061							
Bairro: Centro	Município: FORTALEZA							
UF: CE	Telefone: (85) 3255-5093							
Fax: (85) 3255-5093	E-mail: cep@ijf.ufma.br							

ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP UNICHRISTUS.

CENTRO UNIVERSITÁRIO CHRISTUS - UNICHRISTUS 												
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP												
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA Título da Pesquisa: Análise dos mecanorreceptores e terminações nervosas livres do ligamento anterolateral (LAL) do joelho com imunofluorescência e microscopia confocal Pesquisador: DIEGO ARIEL DE LIMA Área Temática: Versão: 1 CAAE: 78798617.5.0000.5049 Instituição Proponente: Instituto para o Desenvolvimento da Educação Ltda-IPADE/Faculdade Patrocinador Principal: Financiamento Próprio												
DADOS DO PARECER Número do Parecer: 2.375.766 Apresentação do Projeto: 1. RESUMO: O Ligamento anterolateral é um ligamento recentemente descrito na literatura médica, tendo uma suposta ação na estabilidade rotacional do joelho. O estudo dessa estrutura recém descoberta é fundamental para definirmos suas principais características e entendermos melhor seu funcionamento, para que possamos tratá-lo de forma adequada nos casos de ruptura do mesmo. Seis ligamentos anterolaterais do joelho, obtidos de cadáveres não reclamados na Polícia Forense do Ceará, serão cuidadosamente dissecados para avaliação da morfologia dos mecanorreceptores e terminações nervosas livres, buscando compreender a interação do sistema proprioceptivo e mecânico do joelho. Para imunohistoquímica será utilizado um marcador tipo PGP 9.5 (protein gene product) como anticorpo primário e Alexa Fluor 488 como anticorpo secundário, seguido de análise das lâminas por microscopia confocal de varredura a laser. 2. INTRODUÇÃO Atualmente, tem-se dado muita atenção ao Ligamento Anterolateral do joelho (LAL)¹. O mesmo é uma estrutura ligamentar recentemente descrita na literatura médica². Em 1879, Segond descreveu um padrão de fratura-avulsão na tíbia proximal anterolateral como resultado de uma rotação interna forçada do joelho³. Posteriormente, tal fratura foi tida como sinal patognomônico da lesão do Ligamento Cruzado Anterior (LCA). Todavia, até 2013 não se sabia qual era a relação causal entre a "fratura de Segond" e o LCA⁴; 5.												
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 33%;">Endereço: Rua João Antônio Gurgel, 133</td> <td style="width: 33%;"></td> <td style="width: 33%;">CEP: 60.130-099</td> </tr> <tr> <td>Bairro: xxx</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>UF: CE</td> <td>Município: PORTALEZA</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefone: (85)2285-6999</td> <td>Fax: (85)3395-6998</td> <td>E-mail: fc@unicristus.com.br</td> </tr> </table>	Endereço: Rua João Antônio Gurgel, 133		CEP: 60.130-099	Bairro: xxx			UF: CE	Município: PORTALEZA		Telefone: (85)2285-6999	Fax: (85)3395-6998	E-mail: fc@unicristus.com.br
Endereço: Rua João Antônio Gurgel, 133		CEP: 60.130-099										
Bairro: xxx												
UF: CE	Município: PORTALEZA											
Telefone: (85)2285-6999	Fax: (85)3395-6998	E-mail: fc@unicristus.com.br										

ANEXO C – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP UFC.

UFC - UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ / 								
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP								
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA Título da Pesquisa: HISTOMORFOMETRIA DOS MECANORRECEPTORES E TERMINAÇÕES NERVOSAS LIVRES NO COMPLEXO LIGAMENTAR LATERAL DO COTOVELO Pesquisador: RAFAEL PATROCÍNIO DE PAULA COSTA Área Temática: Versão: 2 CAAE: 11713219.1.0000.5054 Instituição Proponente: Departamento de Cirurgia Patrocinador Principal: Financiamento Próprio								
DADOS DO PARECER Número do Parecer: 3.644.777 Apresentação do Projeto: Serão avaliados os receptores neurais de 8 ligamentos colaterais laterais dos cotovelos de 4 cadáveres, de morte não natural, adultos e não congelados, sendo a escolha realizada de forma aleatória, advindos da Perícia Forense do Estado do Ceará (PEFOCE), mediante aprovação prévia do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará. Os espécimes com afecções degenerativas ou traumáticas no cotovelo, apresentadas durante a inspeção ou durante a dissecação, serão excluídos. Coleta de Material: com o cotovelo pronado e fletido em 90°, é realizada uma incisão na região lateral segundo a técnica descrita por Kocher, com acesso cutâneo de cerca de 10cm, centrada sobre epicôndilo lateral, iniciando e terminando pósterio-lateralmente. A fâscia entre os músculos anconeus e extensor ulnar do carpo é então identificada e dividida de forma romba, proximal e distalmente, expondo o complexo ligamentar lateral. Os ligamentos são então desinseridos de suas inserções ósseas no úmero, rádio e ulna de forma cuidadosa, tomando cuidado para não danificá-los. As peças são identificadas com um fio de nylon à esquerda, colocadas em frascos com solução fisiológica e transportadas ao laboratório de cirurgia experimental. No laboratório de cirurgia experimental da UFC, cada ligamento será seccionado de acordo								
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="border: none;">Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000</td> <td style="border: none; text-align: right;">CEP: 60.430-275</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">Bairro: Rodolfo Teófilo</td> <td style="border: none;"></td> </tr> <tr> <td style="border: none;">UF: CE Município: FORTALEZA</td> <td style="border: none;"></td> </tr> <tr> <td style="border: none;">Telefone: (85)3366-8344</td> <td style="border: none; text-align: right;">E-mail: comape@ufc.br</td> </tr> </table>	Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000	CEP: 60.430-275	Bairro: Rodolfo Teófilo		UF: CE Município: FORTALEZA		Telefone: (85)3366-8344	E-mail: comape@ufc.br
Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000	CEP: 60.430-275							
Bairro: Rodolfo Teófilo								
UF: CE Município: FORTALEZA								
Telefone: (85)3366-8344	E-mail: comape@ufc.br							