



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS  
MÉDICO-CIRÚRGICAS**

**DIOGO ARAÚJO DE FARIAS JÚNIOR**

**ESTUDO HISTOMORFOLÓGICO DOS MECANORRECEPTORES E  
TERMINAÇÕES NERVOSAS LIVRES DO LIGAMENTO COLATERAL  
ULNAR DA METACARPO FALANGEANA DO POLEGAR HUMANO**

**FORTALEZA**

**2018**

DIOGO ARAÚJO DE FARIAS JÚNIOR

ESTUDO HISTOMORFOLÓGICO DOS MECANORRECEPTORES E  
TERMINAÇÕES NERVOSAS LIVRES DO LIGAMENTO COLATERAL ULNAR  
DA METACARPO FALANGEANA DO POLEGAR HUMANO

Dissertação apresentada à banca  
examinadora do Programa de Pós-  
Graduação *Stricto Sensu* em Ciências  
Médico-Cirúrgicas do Departamento de  
Cirurgia da Universidade Federal do  
Ceará para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora:  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Luzete Costa Cavalcante

FORTALEZA  
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

- 
- P72a      Faias Júnior Júnior, Diogo Araújo  
            Estudo Histomorfológico dos Mecanorreceptores e Terminações Nervosas Livres do Ligamento Colateral Ulnar da Metacarpofalangeana do Polegar Humano/ Diogo Araújo de Farias Júnior. – 2018.  
            60f.: il. color.
- Dissertação– Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Cirurgia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas, Mestrado em Cirurgia, Fortaleza, 2018.  
            Área de Concentração: Cirurgia.  
            Orientação: Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Luzete Costa Cavalcante.
1. Mecanorreceptores. 2. Terminações Nervosas. 3. Ligamentos. I. Título.

---

CDD 617.58

DIOGO ARAÚJO DE FARIAS JÚNIOR

ESTUDO HISTOMORFOLÓGICO DOS MECANORRECEPTORES E  
TERMINAÇÕES NERVOSAS LIVRES DO LIGAMENTO COLATERAL ULNAR  
DA METACARPO FALANGEANA DO POLEGAR HUMANO

Dissertação apresentada à  
banca examinadora do Programa de  
Pós-Graduação *Stricto Sensu* em  
Ciências Médico-Cirúrgicas do  
Departamento de Cirurgia da  
Universidade Federal do Ceará para  
obtenção do grau de Mestre

Aprovada em:

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Doutora Maria Luzete Costa Cavalcante  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Doutor José Alberto Dias Leite  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Doutor Miguel Ricardo Barbosa Moraes  
Examinador externo

*À Deus, pelo dom da vida.*

*Aos meus pais, por todo esforço e dedicação durante minha vida.*

*À minha esposa, Michelle, pela parceria e estímulo em todos os momentos.*

*Aos meus filhos, Rafael, Mariana, Filipe e Manuela, pela renovação no desejo de continuar aprendendo e ensinando.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Doutor José Alberto Dias Leite, pelo contínuo estímulo durante toda minha vida profissional.

À Professora Doutora Maria Luzete Costa Cavalcante, por contribuir com seus ensinamentos e sua dedicação na orientação da tese.

Ao Professor Titular Lusmar Veras Rodrigues, Coordenador do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

Aos Professores do programa de Pós-Graduação, por contribuírem com seus ensinamentos.

A Sr<sup>a</sup>. Maria Luciene Vieira Oliveira e a Sr<sup>a</sup>. Magda Fontenele de Sousa, secretarias do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, pela amizade e apoio em todas as etapas.

Ao Professor Titular Manoel Odorico de Moraes Filho, diretor do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará, por permitir a utilização do microscópio confocal.

À Professora Doutora Margarida Maria de Lima Pompeu, por permitir a utilização do criostato na preparação das lâminas e pelos ensinamentos durante a leitura das lâminas em HE e Masson..

Ao Professor Doutor Danilo Damasceno Rocha, chefe da microscopia confocal do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará, por auxiliar na obtenção das imagens.

Dr. Eduardo Guedes Fernandes, por sua contribuição em todas as etapas do desenvolvimento da tese.

Acadêmico Daniel de Castro Silva pela grande contribuição e dedicação ao desenvolvimento do trabalho.

“O tempo vai passar! No final, o que fará  
a diferença é como foi aproveitado.”  
(Diogo Araújo de Farias)

## RESUMO

As lesões do ligamento colateral ulnar do polegar (LCUP) estão entre as lesões mais comuns na mão, representando cerca de 86% de todas as lesões ligamentares do polegar. Quando não tratadas, podem ser motivo de dor, limitação funcional e osteoartrite na metacarpofalangeana do polegar. Foram retirados cinco ligamentos colaterais ulnar do polegar, provenientes de cadáveres, congelados, não identificados, com idade aparente entre 50 e 70 anos. Ligamentos com sinais degenerativos foram retirados da amostragem. Foi estudado a porção principal do ligamento colateral ulnar do polegar utilizando as colorações HE, Masson, imunofluorescência com PGP 9,5 e Alexa Fluor 488. As colorações em HE e Masson mostraram-se eficientes para o estudo da composição estrutural do LCUP. A imunofluorescência com PGP 9.5 e Alexa Fluor 488 aliada a microscopia confocal a laser, foi fundamental na visualização do tecido nervoso. Foram identificadas terminações nervosas livres, terminações nervosas multifilamentadas, Ruffin-Like e estruturas ovaladas e arredondadas não classificáveis), além de tecido vascular nas porções proximal, média e distal do LCUP. Tecido conectivo com fibras bem organizadas paralelas foram bem delimitadas em meio as terminações nervosas. Concluímos que a presença de terminações nervosas no ligamento colateral ulnar do polegar sugere fortemente sua participação na estabilização e propriocepção desta articulação. Estudos futuros incluindo LCUP degenerados poderão contribuir para o melhor entendimento das alterações sofridas na estrutura histológica e anátomo-funcional, secundárias aos processos degenerativos, correlacionando com os dados obtidos nesse estudo.

**Palavras-Chave:** Terminações nervosas livres. Mecanorreceptores. Ligamento colateral ulnar do polegar. Imunofluorescência.

## ABSTRACT

Thumb ulnar collateral ligaments (LCUP) are among the most common lesions on the hand, accounting for about 86% of all thumb ligament lesions. When untreated, they can be cause for pain, functional limitation and osteoarthritis in the metacarpophalangeal of the thumb. Five ulnar collateral ligaments from the thumb were removed from frozen, unidentified corpses, with an apparent age between 50 and 70 years. Ligaments with degenerative signs were removed from the sample. The main portion of the ulnar collateral ligament of the thumb was studied using HE stains, Masson, immunofluorescence with PGP 9.5 and Alexa Fluor 488. The stains in HE and Masson were efficient for the study of the structural composition of the LCUP. Immunofluorescence with PGP 9.5 and Alexa Fluor 488 allied to laser confocal microscopy was fundamental in visualizing nerve tissue. Free nerve endings, multifilamentated nerve endings, Ruffin-Like and non-classifiable oval and rounded structures), as well as vascular tissue in the proximal, middle and distal portions of the LCUP were identified. Connective tissue with well organized parallel fibers were well delimited between the nerve endings. We conclude that the presence of nerve endings in the ulnar collateral ligament of the thumb strongly suggests its participation in the stabilization and proprioception of this joint. Future studies including degenerate LCUP may contribute to a better understanding of alterations in histological and anatomic-functional structure, secondary to degenerative processes, correlating with the data obtained in this study.

**Keywords:** Free nerve endings. Mechanoreceptors. Ulnar collateral ligament of the thumb. Immunofluorescence.

## LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: detalhe da incisão e remoção das peças contendo o LCUP. A direita um aumento mostrando as inserções do LCUP: proximal (1º MTC), distal (FP) a placa volar e a cápsula dorsal.	21
Figura 2: Foto de uma das peças analisadas e nervo mediano de controle	22
Figura 3: Foto da mensuração das medidas e peso das amostras	23
Figura 4: classificação de Freeman e Wyke - 1967	27
Figura 5: Lâminas de HE - padrão celular do grupo I	29
Figura 6: A-condrócitos com núcleos arredondados e enfileirados, fibroblastos (porção superior) com núcleos alongados e fibras de colágeno com arranjo paralelo. B-Detalhe de uma calcificação (ao centro) rodeada de fibroblastos com seus núcleos alongados.	29
Figura 7: Detalhe de prováveis estruturas vâsculo nervosas encontradas no grupo I	30
Figura 8: coloração de Masson mostrando fibras de colágeno e provável tecido nervoso.	30
Figura 9: lâminas coradas por imunofluorescência (PGP 9.5, confocal,100X) mostrando fibras de colágeno dispostas em feixes paralelos e estruturas finas e alongadas entre as fibras de colageno, semelhante em tamanh e forma, a terminações nervosas livres	31
Figura 10: imunofluorescência comPGP 9.5 e microscopia confocal a laser (C-100X) e coloração pela técnica de HE (D-100X) da região proximal e volar do LCUP evidenciando o predomínio de fibras de colágeno dispostas em feixes longitudinais.	31
Figura 11: cortes da porção medial do LCUP corados em HE mostrando feixes de colágeno paralelos (A), prováveis estruturas vâsculo-nervosas (A e B), células com núcleos alongados e semelhantes a fibroblastos.	32

Figura 12: detalhe de uma possível estrutura vásculo-nervosa (400X) encontrada na porção medial do LCUP – Grupo II.	.....	32
Figura 13: terminações nervosas livres entre os feixes de colágeno (200X).	.....	33
Figura 14: formação nervosa entre os feixes de colágeno (200X). Terminações nervosas livres multifilamentadas	.....	33
Figura 15: lâmina de HE (100X) mostrando o padrão tecidual distal do LCUP (Grupo III) com fibras de colágeno agrupadas em feixes paralelos, prováveis estruturas vásculo-nervosas e vasos sanguíneos	.....	34
Figura 16: detalhe de uma possível estrutura vásculo-nervosa (400X) encontrada na porção distal do LCUP – Grupo III.	.....	35
Figura 17: lâmina corada pela técnica de tricônio de Masson mostrando possível estrutura nervosa circulada em amarelo no meio dos feixes de fibra de colágeno. Aumento 50X.	.....	35
Figura 18: Rufinni like e terminações nervosas livres (100X).	.....	36
Figura 19: Rufinni like e terminações nervosas livres (100X).	.....	36
Figura 20: detalhe de uma terminação nervosa livre entre os feixes de colágeno. (200X). À direita fibra nervosa multifilamentada.	.....	37
Figura 21: detalhe de estruturas ovaladas não classificáveis e terminações nervosas livres (200x).	.....	37
Figura 22: vaso sanguíneo com sua luz e estrutura nervosa não classificável. Aumento de 400X	.....	38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: parâmetros morfométricos das amostras .....	28
Tabela 2: análise histomorfológica das terminações nervosas do ligamento collateral ulnar do polegar .....	39
Tabela 3: identificação das amostras e análise estatística .....	40

## LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

a	anos
CMC	articulação cárpica metacárpica
cm	centímetros
DAPI	<i>49,69-diamidino-2-phenylindole</i>
DP	desvio padrão
EUA	Estados Unidos da América
et al.	e outros
h	Horas
HE	hematoxilina-eosina
LCA	ligamento colateral acessório
LCP	ligamento colateral principal
LCUP	ligamento colateral ulnar do polegar
mm	milímetros
min	minutos
MTCF	metacarpofalangeana
MTCFP	metacarpofalangeana do polegar
MCL	microscopia confocal de varredura à laser
nm	nanômetros
OCT	<i>optimum cutting temperature</i>
p.	página
PA	porção acessória
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PP	porção principal
PGP	<i>protein gene product</i>
TSF	tampão fosfato-salino
TX	triton
UFC	Universidade Federal do Ceará
µm	micrômetros

## LISTAS DE SÍMBOLOS

%	percentagem
°	grau (s)
±	mais ou menos
°C	grau (s) Celsius
≥	maior ou igual
≤	menor ou igual

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Objetivo geral.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2 Objetivo específico.....</b>	<b>19</b>
<b>3 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Coleta de material.....</b>	<b>20</b>
<b>3.2 Preparação dos tecidos.....</b>	<b>22</b>
<b>3.3 Preparação das peças para corte.....</b>	<b>23</b>
<b>3.4 Corte.....</b>	<b>23</b>
<b>3.5 Coloração dos tecidos pela técnica HE e Masson.....</b>	<b>24</b>
<b>3.6 Coloração dos tecidos pela imunofluorescência.....</b>	<b>25</b>
<b>3.7 Microscópio Confocal à Laser (MCL).....</b>	<b>27</b>
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
<b>4.1 Medida e pesagem das peças.....</b>	<b>28</b>
<b>4.2 Análise tecidual.....</b>	<b>28</b>
4.2.1 Grupo I – parte proximal do ligamento colateral ulnar do polegar	28
4.2.2 Grupo II – parte central do ligamento colateral ulnar do polegar	32
4.2.3 Grupo III – parte distal do ligamento colateral ulnar do polegar	34
<b>4.3 Análise histomorfológica.....</b>	<b>39</b>
<b>4.4 Análise estatística.....</b>	<b>40</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>45</b>

**REFERÊNCIAS**

**ANEXOS**

## 1. Introdução:

O polegar teve um papel importante na evolução humana. Encontra-se em posição de oponência aos demais dedos e essa posição permite a formação dos movimentos de pinça, dando à mão, uma grande versatilidade funcional. Marzke et al., 1998, sugeriram que o flexor pollicis longus e extensor pollicis brevis podem ter evoluído para permitir que a articulação metacarpofalangeana se mantenha em extensão enquanto a falange distal do polegar é fletida. (Rui Diogo, Brian G Richmond e Bernard Wood, 2012) relataram que essa posição favoreceu à fabricação de ferramentas de pedra bem como a capacidade de cozinhar, facilitando a absorção dos nutrientes e contribuindo para o desenvolvimento do cérebro (AIELLO, 1995). A metacarpofalangeana (MTCF) do polegar permite movimentos de flexão, extensão, rotação, adução e abdução (TUBIANA, 1996; PARDINI, 2008) e para que os movimentos de pinça sejam realizados com eficiência, há necessidade de estabilização da MTCF do polegar, especialmente em seu lado ulnar. O ligamento colateral ulnar do polegar é um importante estabilizador da MTCF do polegar especialmente quando essa articulação é submetida a um estresse em valgo (MCKEON, 2013). Ao flexionar o polegar acontece um desvio radial e pronação, tensionando o ligamento colateral ulnar proporcionando estabilidade da MTCF, permitindo, ao polegar, exercer a função de oponência com melhor eficiência (PATEL *et al*, 2010). Os componentes responsáveis pela estabilidade da MTCF do polegar são divididos em estáticos (ligamento colateral ulnar, cápsula articular e a placa volar) e dinâmicos ( ossos sesamóides, localizados nas inserções tendinosas do flexor curto e do adutor do polegar ( KATHLEN *et al*, 2013), e o músculo adutor do polegar). O ligamento colateral ulnar da MTCF do polegar é formado por duas partes: o ligamento colateral principal (LCP) e um ligamento colateral acessório (LCA). O LCP tem sua origem proximal na porção dorsal da cabeça do primeiro metacarpo, inserindo-se na porção volar da falange proximal. O LCA tem sua origem no primeiro metacarpo, mais volar em relação ao LCP, inserindo-se na placa volar da MTCF do polegar (TUBIANA, 1996).

Os ligamentos são formados principalmente de colágeno, organizados em feixes paralelos com células de núcleos grandes e elípticos (fibroblastos). O arranjo dos feixes de colágeno dentro de um determinado ligamento depende dos movimentos realizados pela articulação (STACEY, 2007). As fibras de colágeno são calcificadas nas inserções ósseas. Geralmente os ligamentos se inserem nos ossos em ângulo agudo causando uma força de cisalhamento, aumentando a tensão normal do ligamento (STACEY, 2007).

As lesões do ligamento colateral ulnar do polegar estão entre as lesões mais comuns na mão, chegando a 50/100.000 em algumas populações, sendo 10 vezes mais frequentes que as lesões do ligamento colateral radial da mesma articulação (DANIEL *et al*, 2015). Em uma revisão ( MAHAJAN E RHEMREV, 2013), afirma que as lesões do ligamento colateral ulnar, representam cerca de 86% de todas as lesões na base do polegar e que a incidência estimada nos EUA é de aproximadamente 200.000 pacientes por ano (MAHAJAN; RHEMREV, 2013). Traumas ou esforços contínuos podem degenerar e/ou romper o ligamento colateral ulnar do polegar podendo ser estáveis (rupturas incompletas), ou instáveis, (ruptura completa), sendo a lesão de Stener a forma mais grave de todas, pois há interposição da aponeurose do adutor do polegar, impedindo a cicatrização ligamentar, sendo necessário o reparo primário ou reconstrução cirúrgica, pois quando tratados de maneira conservadora apresentam uma alta taxa de falha de 34%, sendo causa de instabilidade crônica, limitação funcional e dor (CHEN, 2000).

Acreditamos que os mecanorreceptores têm um papel importante na propriocepção e proteção da MTCFP, pois a integridade do ligamento colateral ulnar do polegar é essencial para estabilização da MTCFP durante os movimentos de pinça e que, nas lesões não tratadas, haveria perda da propriocepção, aumentando a sobrecarga na MTCFP, predispondo a osteoartrite precoce, dor e por fim, comprometendo definitivamente a função de pinça do polegar (LEE; HAGERT, 2012).

A propriocepção está relacionada com sinais aferentes da articulação, músculos e ligamentos, que determinam a posição e detectam movimentos, protegendo as articulações contra mobilizações excessivas. O sistema de propriocepção compreende os mecanorreceptores, terminações nervosas livres ( MORAES, 2008). Os mecanorreceptores são terminações nervosas ou células especializadas, cuja função é converter diferentes formas de energia em

alterações do potencial de membrana, onde as fibras nervosas aferentes transformam os potenciais geradores iniciais em potenciais de ação que serão transmitidos ao longo destas fibras até o sistema nervoso central (CHUSID, 1972).

Um dos primeiros estudos das terminações nervosas foi feito em gatos e publicado em 1967 por Freeman & Wyke descrevendo-os em forma, dimensões e atividade eletrofisiológica. No homem, os mecanorreceptores são identificados no ligamento cruzado anterior do joelho (HALATA, 1989); no ligamento coracoacromial do ombro (MORISAWA, 1988); na bolsa subacromial (VANGNESS, 1995); no ligamento palmar do punho (MASHOOF *et al*, 2001); ligamento do cotovelo (PETRIE,S *et al*, 1997); no ligamento cruzado posterior do joelho (DEL VALLE *et al*, 1998); no seio do tarso (AKIYAMA *at el*, 1999); no processo articular superior e inferior vertebral (HASEGAWA *at el*, 1999); na cápsula articular das metacarpo falangianas (CHEN, 2000); no retináculo dos tendões flexores (MASHOOF *et al*, 2001); no ligamento glenoumenal inferior (EJNISMAN *at el*, 2002); na articulação sacroilíaca (VILENSKY *at el*, 2002); na articulação do punho (JEW *at el*, 2003) e na fibrocartilagem triangular do punho (CAVALCANTE; RODRIGRES; MATTAR, 2004). Estes estudos contribuem para o reconhecimento dos mecanorreceptores e terminações nervosas em sua forma e densidade. Observam-se variações na morfologia relacionada à idade, às regiões estudadas, especialmente nas enfermidades (CAUNA; MARAN, 1959; CAVALCANTE; RODRIGUES; MATTAR, 2004; EINISMAN *at el*, 2002)

Vários métodos de coloração podem ser empregados na identificação das terminações nervosas. Todavia, muitas limitações são inerentes aos métodos utilizados. O cloreto de ouro é uma técnica muito usada pelos pesquisadores, entretanto, além de corar o tecido nervoso, cora estruturas como vasos, fibroblastos e tecido adiposo, dificultando a identificação precisa das estruturas neurais. Outros autores também observaram que o cloreto de ouro permite identificar os mecanorreceptores, mas a impregnação de vasos dificulta a diferenciação nervosa (AMIR; LOWE; FINSTERBUSH, 1995; ASSIMAKOPOULOS *at el*, 1992; DE AVILA *et al*, 1989; HOSOKAWA *et al*, 1999; MICHELSON; HUTCHINS, 1995; PETRIE *et al*, 1998; VANGNESS *et al*, 1995; ZIMNY; ONGE; SCHUTTE, 1985). A coloração pela prata é de difícil manuseio e requer extensiva experiência para obter uma boa preparação tecidual. É portanto, particularmente indicada para o estudo de nervos motores e sensitivos

e necessita do controle do nível de acidez para não impregnar nos tecidos (KENNEDY; ALEXANDER; HAYES, 1982; KIM; AZUMA, 1995; OHMORI; AZUMA, 1998; SCHULTZ *et al*, 1984). No método de Golgi-Kopsch, a impregnação de tecido nervoso à microscopia óptica convencional não permite a visão clara da região superior do neurônio, quando comparado à microscopia confocal, que permite obter imagens tridimensionais com os dendritos emergindo do corpo neuronal (FREIRE; BOYDE, 1990). Algumas técnicas imunohistoquímicas (proteína S-100) necessitam de formalização prévia, não são suficientemente específicas como marcadores neurais e possibilitam a impregnação inespecífica de outros tecidos ( DEL VALLE *et al*, 1998; EJNISMAN *et al*, 2002; MASHOOF *et al*, 2001).

Muitas são as controvérsias geradas entre os pesquisadores acerca da morfologia das terminações nervosas (HALATA; HAUS, 1989; HASEGAWA *et al*, 1999; MORISAWA, 1998) e as imperfeições das técnicas de colorações tradicionais, para identificação dos mecanorreceptores e terminações nervosas livres, são superadas pela imunofluorescência associada a microscopia confocal a laser, que inclusive permite o estudo tridimensional destas terminações. Embora o custo ainda não permita universalizar este método. Anticorpos marcadores específicos (PGP 9,5) de finas terminações nervosas, associados à microscopia confocal a laser, permitem o estudo mais detalhado das estruturas nervosas, visualizando com segurança, acima de qualquer outro método existente, contribuindo, para uma verdade científica, evitando controvérsias (JEW *et al*, 2003; BRODIN *et al*, 1988; CHEN *et al*, 2000; vilensky *et al*, 2002).

Nas publicações atuais não encontramos estudos sobre a presença de mecanorreceptores ou presença de terminações nervosas livres no ligamento colateral ulnar do polegar, sendo essa, uma região anatômica pouco estudada, especialmente em relação à sua inervação proprioceptiva e seu papel na fisiopatologia da dor nas lesões degenerativas e instabilidades crônicas pós traumáticas como na lesão de Stener e o polegar de Gamekeeper. As informações obtidas nesse estudo podem contribuir para uma melhor compreensão no funcionamento biomecânico e histológico desta estrutura.

## **2. OBJETIVOS:**

### **2.1 Geral:**

Avaliar a morfologia e localização das terminações nervosas na porção principal do ligamento colateral ulnar do polegar.

### **2.2 Específicos:**

Descrever as características histomorfológicas das terminações nervosas da porção principal do ligamento colateral do polegar usando as colorações HE, Tricromio de Masson, avaliando com microscopia óptica convencional, e imunofluorescência com PGP 9,5 com uso da microscopia confocal de varredura a laser no estudo no ligamento colateral do polegar de humanos.

### 3. CASUÍSTICA E MÉTODOS:

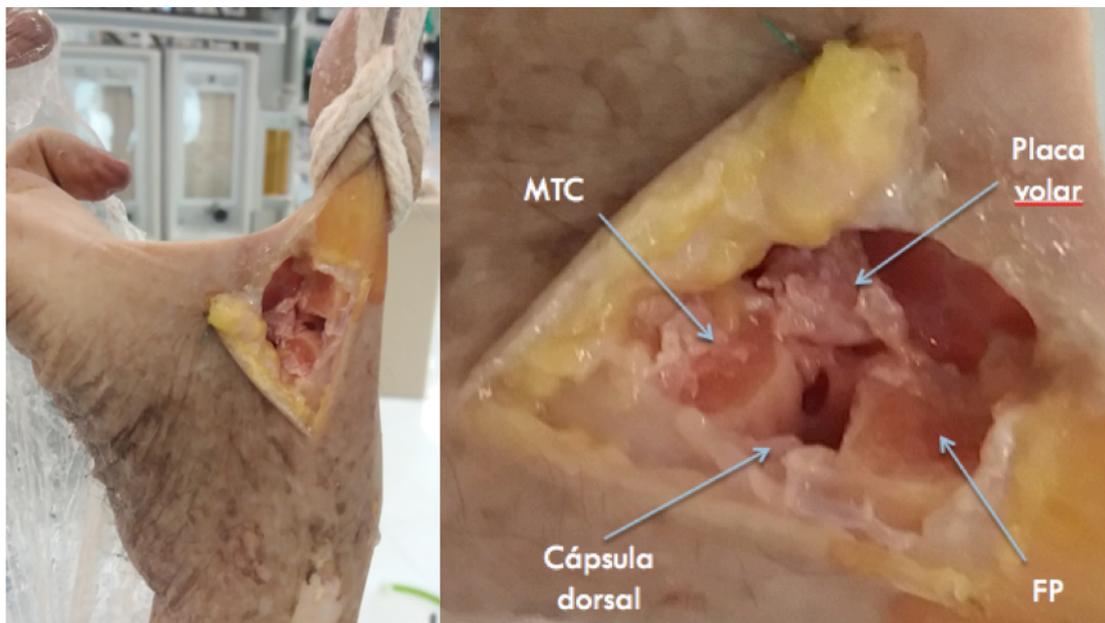
A pesquisa foi desenvolvida através do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará - UFC, com a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade, conforme parecer número 2.630.288 (anexo A).

O estudo foi realizado com cinco peças anatômicas contendo o ligamento colateral ulnar da metacarpofalangeana do polegar, provenientes de cadáveres congelados, não reclamados, todos adultos, com idade aproximada entre 50 e 70 anos. Foram retiradas sete peças, porém duas apresentavam sinais degenerativos no LCUP e foram excluídas, restando cinco peças para a realização do estudo. Os cadáveres foram descongelados à temperatura ambiente antes da retirada das peças. Dos cinco cadáveres selecionados para o estudo, dois eram do sexo feminino, sendo uma parda e a outra negra. Os três do sexo masculino, eram dois pardos e um da cor branca. Foram retiradas três peças do lado direito e duas peças do lado esquerdo.

#### 3.1 Coleta de Material

A remoção das peças foi feita através de uma incisão em “U” ou em “L” com base de aproximadamente 4 cm e laterais de aproximadamente 3 cm extendendo-se até o dorso da articulação metacarpo falangeana do polegar. Após a incisão, realizamos uma dissecação da pele, junto do tecido celular subcutâneo, elevando e suturando o conjunto dorsalmente com fio de sutura, permitindo uma ampla visualização da cápsula articular e da inserção do músculo adutor do polegar. A cápsula articular era cuidadosamente dissecada, após a tenotomia do adutor do polegar, expondo o LUCP com sua duas porções: porção principal (PP) e porção acessória (PA), ressecado-o com suas respectivas inserções proximais (1º metacarpo) e distais (falange proximal do polegar – dorsalmente e parte da placa volar - figura 1).

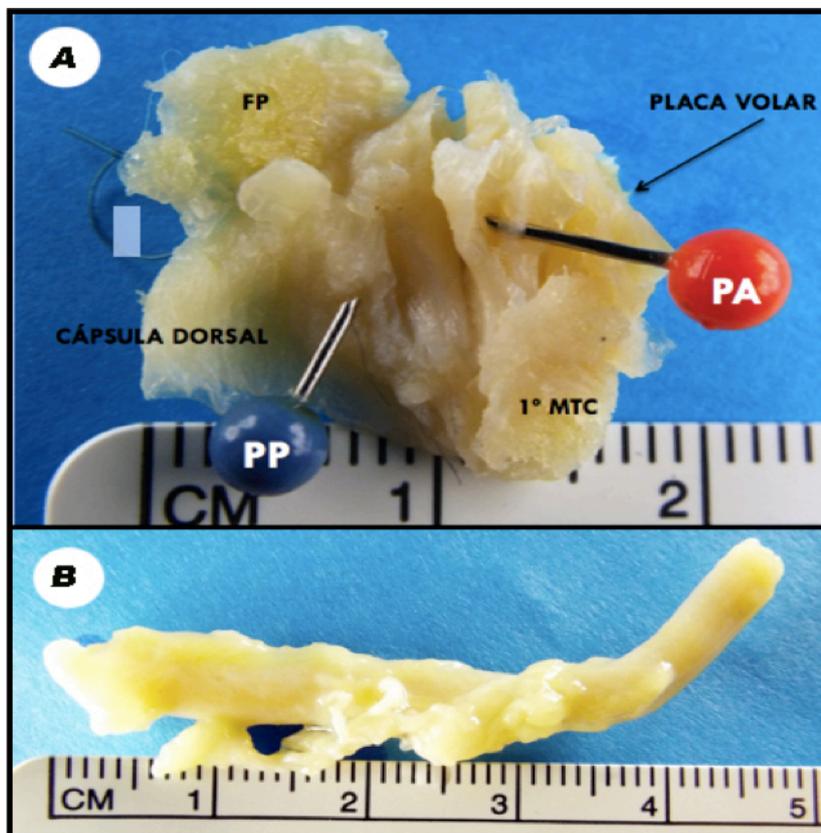
figura 1 : detalhe da incisão e remoção das peças contendo o LCUP. A direita um aumento mostrando as inserções do LCUP: proximal (1º MTC), distal (FP) a placa volar e a cápsula dorsal.



Fonte: autor

Após a remoção da peça, era feita uma marcação dorsal e distal com um fio de sutura para orientação espacial da peça anatômica (figura 2A). Após a remoção, as peças eram identificadas com lateralidade, idade aparente, cor, sexo e data da coleta e em seguida imersas em um frasco de vidro contendo solução de paraformaldeído 4% em 0,1 M de tampão fosfato, pH 7.4 e em seguida acondicionadas a uma temperatura de 4°C. Através de uma incisão volar e mediana no punho de aproximadamente 6 cm, retiramos um fragmento de cerca de 5 cm do nervo mediano que foi usado como referência na coloração das peças (figura 2B).

figura 2: A: ligamento collateral ulnar do polegar com suas porções principal (PP) e acessória (PA) e suas inserções proximais no primeiro metacarpo (1ºMTC) e distais (falange proximal –FP e placa volar). Dorsalmente ver-se uma porção da cápsula dorsal da metacarpofalangeana. Nota-se a marcação com fio de sutura (dorsal e distal). B: Segmento de nervo mediano usado como referência de tecido nervoso na coloração.



Fonte: autor

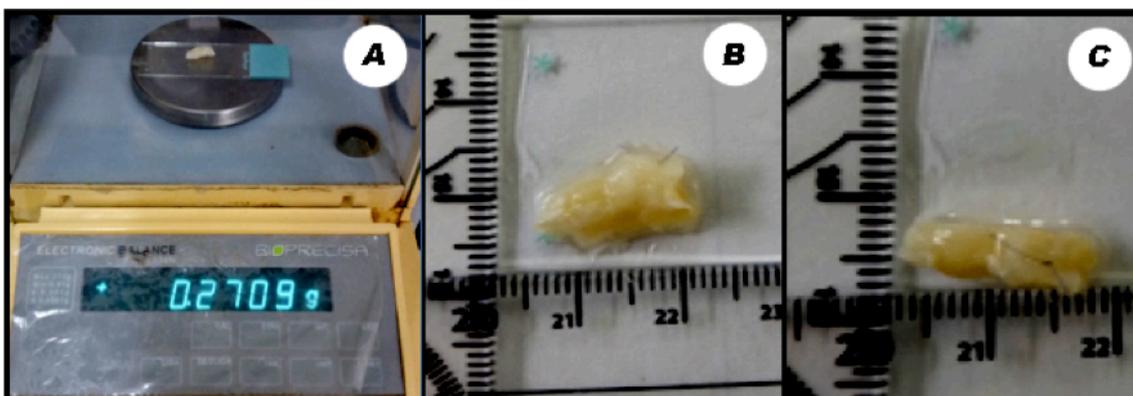
### 3.2 Preparação dos tecidos

As peças permaneceram imersas para fixação em solução de paraformaldeído 4% em 0,1 M de tampão fosfato, pH 7.4, a 4°C por 24 a 48 horas. Removido do fixador, o tecido era lavado por várias vezes em sacarose 20% tampão fosfato-salino (TSF pH7.4) e em seguida emergido em sacarose 20% TFS por cerca de 24 a 48 horas até o tecido afundar. Esse passo visa crio-protoger o tecido que em seguida foi levado ao freezer para congelar a -70°C.

### 3.3 Preparação das peças para o corte

As peças foram retiradas do freezer, descongeladas em temperatura ambiente e submetidas a uma nova dissecação anatômica sob magnificação (lupa cirúrgica) no intuito de retirar o excesso das estruturas que não seriam incluídas no estudo (cápsula dorsal, placa volar e injeções ósseas) e separar a porção principal do LCUP, por ser o principal estabilizador da MTCF do polegar. Terminada a dissecação, as peças foram medidas, pesadas em uma balança de precisão, fotografadas com a leitura da pesagem e régua de referência (figura 3).

figura 3: A-pesagem da peça na balança de precisão; B-medida do comprimento e altura da peça; C-medida da espessura da peça.



Fonte: autor

### 3.4 Corte:

Inicialmente colocamos OCT (Tissue-Teck), preenchendo toda a superfície da base metálica, que foi levada ao criostato para congelamento, colocando-se uma lâmina limpa sobre a peça para retificação da superfície após o congelamento. Com a base congelada, a peça foi posicionada com a porção distal voltada para o lado direito e a porção dorsal voltada para ranhura superior da base, cobrimos totalmente a peça com OCT (Tissue-Teck) e levamos novamente ao criostato para congelar e finalmente cortar. Os cortes foram feitos com uma espessura de 10 micrômetros. Obtivemos 40 (quarenta) lâminas cada uma contendo dois cortes, sendo 25 (vinte e cinco) lâminas destinadas à imunohistoquímica (cortes de 10 $\mu$ m), 05 (cinco) lâminas contendo

o nervo mediano para controle de imunofluorescência, 10 (dez) lâminas para coloração em HE (cortes de 10µm) e a 05 (cinco) lâminas para a coloração com a técnica de tricômio de Masson (cortes de 6µm). Todas as lâminas foram previamente identificadas. Após o corte e fixação das peças, as lâminas obtidas eram colocadas em uma caixa umidificada para transporte.

### **3.5 Coloração dos tecidos pela técnica de HE e Tricromo de Masson**

O processo de coloração HE tem duração de 2h e 10 min ininterruptos e consta das seguintes etapas:

- Três etapas de desparafinização sendo a primeira na estufa a 45°C com duração de 40 min, a segunda com Xilol I com duração de 10 min e a terceira com Xilol II com duração de 10 min.
- Três etapas de hidratação usando Álcool Etílico a 100% por 5 min, Álcool Etílico a 80% por 5 min e Álcool Etílico 70% por 5 min.
- Lavagem água por 7 min
- Coloração com Hematoxilina por 3 min
- Lavagem em água corrente por 3 min
- Coloração com Eosina por 7 min
- Lavagem em água corrente por 2 min
- Quatro etapas de desidratação, cada uma com duração de 5 min, respectivamente com Álcool Etílico a 70%, Álcool Etílico 80%, Álcool Etílico a 100% I e Álcool Etílico a 100% II
- Duas etapas de fixação do corante e conservação do material com Xilol I, por 5 min e com Xilol II por 10 min.

O processo de coloração pela técnica de Tricromo de Masson usa solução de Bouin, Hematoxilina férrica de Weigert, Solução de escarlata de Biebrich, solução ácida fosfotungstic-fosfomolibdica, solução de azul de anilina e solução de água-ácido seguindo as etapas:

- Desparafinar e hidratar
- Lavar em água corrente por 5 minutos
- Mordentar em solução de Bouin por 1 hora na estufa a 60 graus ou preferencialmente deixar por uma noite em temperatura ambiente

- Lavar em água corrente até desaparecer o amarelo deixado pela solução de Bouin
- Passar em água destilada
- Corar pela solução de Hematoxilina Férrica de Weigert (A e B) por 10 minutos
- Lavar em água corrente por 10 minutos
- Passar em água destilada
- Corar pela solução de Escarlata de Biebrich por 5 minutos
- Passar por água destilada
- Diferenciar pela solução de Ácido Fosfotúngstico-Fosfomolibdico durante 10 a 15 minutos
- Passar por água destilada
- Corar pela solução de Azul de Anilina durante 5 a 10 minutos
- Lavar em água destilada
- Passar pela solução de Ácido Acético Glacial 1% por 3 a 5 minutos
- Passar por água destilada
- Desidratar, diafanizar e montar em resina.

### **3.6 Coloração dos tecidos pela imunofluorescência**

As lâminas contendo o ligamento colateral ulnar da metacarpofalangeana do polegar, foram submetidos à análise histológica para evidenciar as terminações nervosas, segundo o método de imunohistoquímica PGP 9.5 anticorpos (monoclonal e policlonal) a uma diluição de 1/100 e 1/500, respectivamente. Este método consta das seguintes etapas:

- As secções foram cercadas com PAP PEN, formando uma barreira para a solução que guarda os tecidos seccionados e guardado em uma caixa úmida minimizando a evaporação;
- As secções foram lavadas 4 vezes por 15 min com 0,1M (PBS), frio, contendo 3% de Triton, seguido de incubação por 2 horas na temperatura ambiente, com solução de bloqueio contendo 4% de soro normal e albumina do soro bovino;

- Os tecidos foram lavados por 15min, 4 vezes com 0,1M (PBS) e incubado com anticorpo primário por 18 – 20 h a 4° graus;
- O anticorpo primário usado foi a anti-proteína PGP 9.5, diluído em 1:400 em solução consistindo de 0,5 % TX-100 em 0,1 M (PBS);
- Depois de encubado a 4° o tecido continuou por 2hs na temperatura ambiente. Depois lavado 4 vezes por 15min em 0,1M (PBS), em seguida incubado no escuro por 12 h na temperatura ambiente com o segundo anticorpo marcado fluorescente (Alexa Flúor 488 - IgG) diluído em 1:200 com os diluentes do anticorpo primário;
- Em seguida, as lâminas foram protegidas da luz e feita uma serie de lavagens, 4 vezes por 10min em 0,1M (PBS) frio, 1 vez por 20min com 0,05M PSB frio, com água destilada e estocado a -70° para visão microscópica confocal a laser.

### **3.7 Microscópio Confocal à Laser (MCL)**

As lâminas preparadas com imunofluorescência foram examinadas com microscópio confocal a laser equipado com epifluorescência (MCL- 510) usando Krypton/laser e montado no microscópio Axiovert 100M. As secções foram observadas inicialmente com epifluorescência, usando-se um filtro de excitação (490-494 nm) para emissão de feixe (520-525nm) Dualexis – fluor 488. Cada secção foi examinada no aumento de 10 x para orientação dos tecidos e mapeamento das estruturas. Quando identificadas, usamos objetivas de 20x e 40x para visualizar os detalhes. No microscópio foi inserido um software para a projeção da imagem (KONTRON KS400). Depois destas projeções, elas foram salvas, configuradas, analisadas as imagens e comparadas às secções entre as diferenças dos fragmentos das regiões do LCU. Evidenciamos largura, comprimento dos mecanorreceptores, terminações nervosas livres e características morfológicas. Todas as imagens foram estudadas por MCL. Após a identificação dos mecanorreceptores e terminações nervosas livres, bem como em sua localização no ligamento colateral ulnar da metacarpofalangeana do polegar, estas foram classificadas, segundo a classificação de Freeman e Wike, 1967 (figura 4) e agrupados em três grupos:

Grupo I – parte proximal do ligamento colateral ulnar (1º metacarpo)

Grupo II – parte central do ligamento colateral ulnar

Grupo III – parte distal do ligamento colateral ulnar (falange proximal)

Figura 4: classificação de Freeman e Wyke - 1967

Kind	Morphology	Diameter ( $\mu\text{m}$ )	Functional characteristic	Eponyms
I	Globular or ovoid	5-8 (myelinated)	Mechanoreceptor; slow-adapting, low threshold.	Ruffini's, Golgi-Mazzoni's endings, Meissner's corpuscle.
II	Cylindrical or tapered	8-12 (myelinated)	Mechanoreceptor, low threshold, fast-adapting.	Krause's, Vater, Vater-Pacine's corpuscles
III	Spindle-like	13-17 (myelinated)	Mechanoreceptor, high threshold, very slow-adapting.	Golgi's endings, Golgi-Mazzoni's corpuscle
IV	a) non-myelinated plexus	2-5 (myelinated)	Pain receptor	-
	Non-myelinated free endings	< 2 (non-myelinated)	Pain receptor	-

Fonte: FREEMAN, M. A. R.; WYKE, B. The innervation of the knee joint. An anatomical and histological study in the cat. J Anat, 1967

## 4. RESULTADOS:

### 4.1- Medida e pesagem das peças:

Todas as peças foram pesadas em balança de precisão obtendo-se um peso médio de 0,1907g ( $\pm 3,160$ ) e dimensionadas quanto a sua altura (média: 6,62mm / $\pm 1,149$ ), comprimento (média: 13,24mm/ $\pm 0,439$ ) e largura (média: 4,36mm/ $\pm 0,693$ ) - tabela 1.

tabela 1: parâmetros morfométricos das amostras

LCU	P1	P2	P3	P4	P5	Média	Desvio Padrão
<b>COMPRIMENTO</b>	11,2 mm	11 mm	18 mm	15 mm	11mm	13,24 mm	$\pm 3,160$
<b>ALTURA</b>	7,1 mm	5 mm	8 mm	6 mm	7 mm	6,62 mm	$\pm 1,149$
<b>LARGURA</b>	4,2 mm	3,8 mm	4,3 mm	4,5 mm	5 mm	4,36 mm	$\pm 0,439$
<b>PESO</b>	0,1122 g	0,1730 g	0,2709 g	0,1082 g	0,2157 g	0,1907 g	$\pm 0,693$

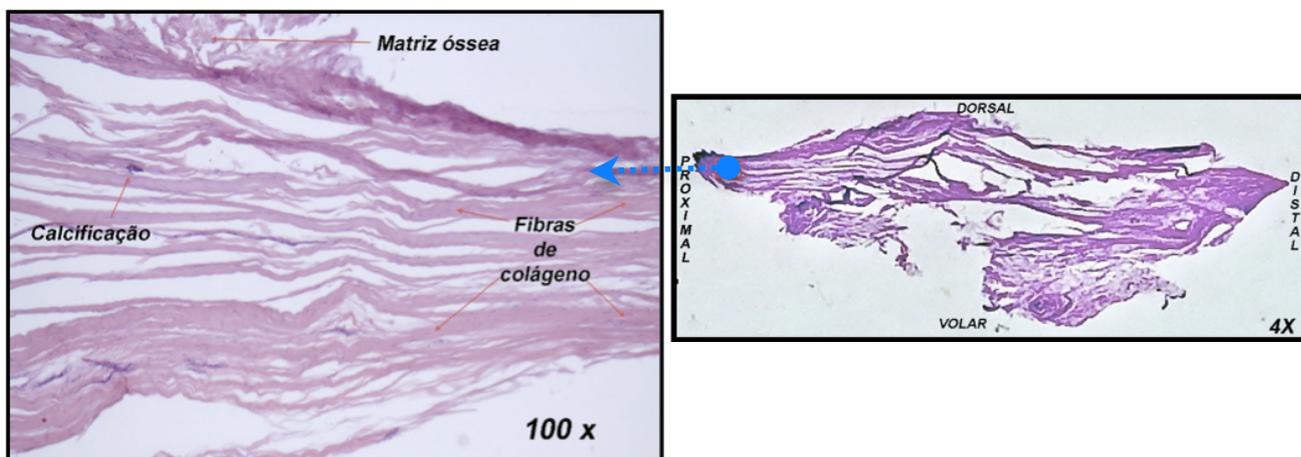
Fonte: autor

### 4.2 Análise tecidual

#### 4.2.1 Grupo I – parte proximal do ligamento colateral ulnar do polegar:

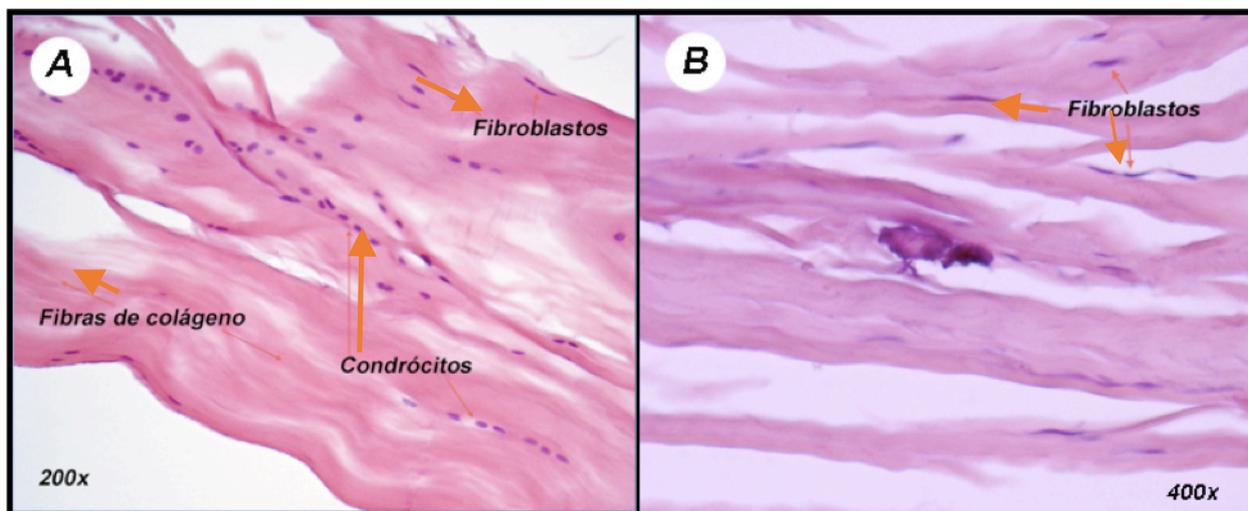
Nas lâminas de HE e Masson observadas em aumento de 100X, 200X e 400X, visualizamos um predomínio de fibras de colágeno dispostas em feixes paralelos, apresentando em seu interior, células com núcleos alongados semelhantes a fibroblastos. Entre os feixes de colágeno, encontramos algumas células com núcleos arredondados e enfileiradas, semelhantes a condrócitos, além de pontos de calcificação e matriz óssea, provavelmente relacionada à zona de inserção proximal do LCUP no 1º metacarpiano (Figura 5 e 6).

figura 5: ampliação da porção proximal e dorsal do LCUP mostrando as fibras de colágeno arranjadas em feixes paralelos. Presença pequeno ponto de calcificação entre as fibras de colégeno e na porção superior (dorsal) nota-se a presença de matriz óssea, característico de zona de inserção óssea e prováveis estruturas vasculo nervosas na porção volar. A direita temos uma visão panorâmica do corte aumentado aproximadamente 4x, destacando a área que foi ampliada 100X (à esquerda).



Fonte: autor

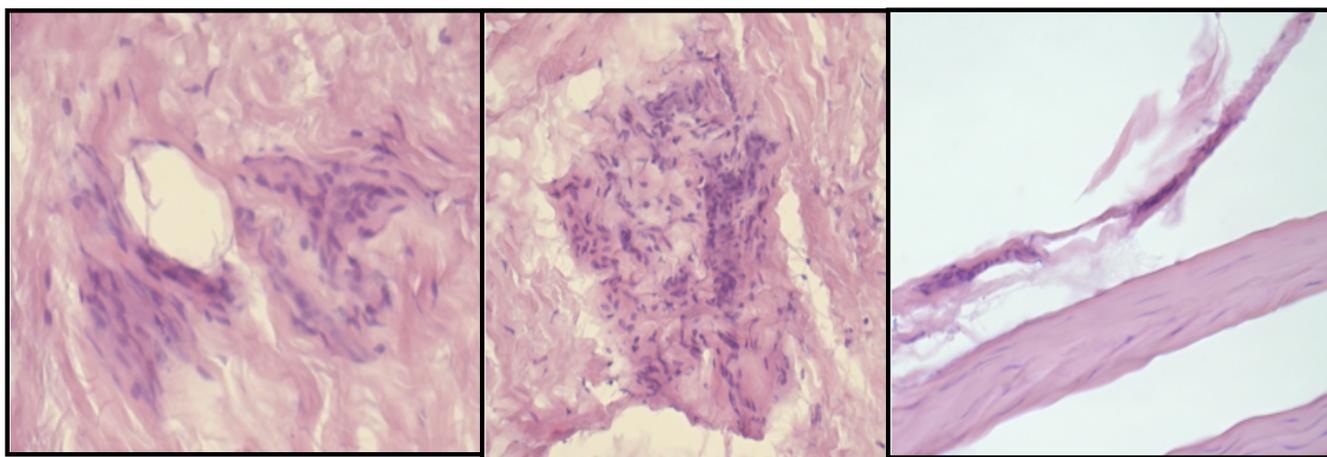
figura 6: A-condrócitos com núcleos arredondados e enfileirados, fibroblastos (porção superior) com núcleos alongados e fibras de colágeno com arranjo paralelo. B-Detalhe de uma calcificação (ao centro) rodeada de fibroblastos com seus núcleos alongados.



Fonte: autor

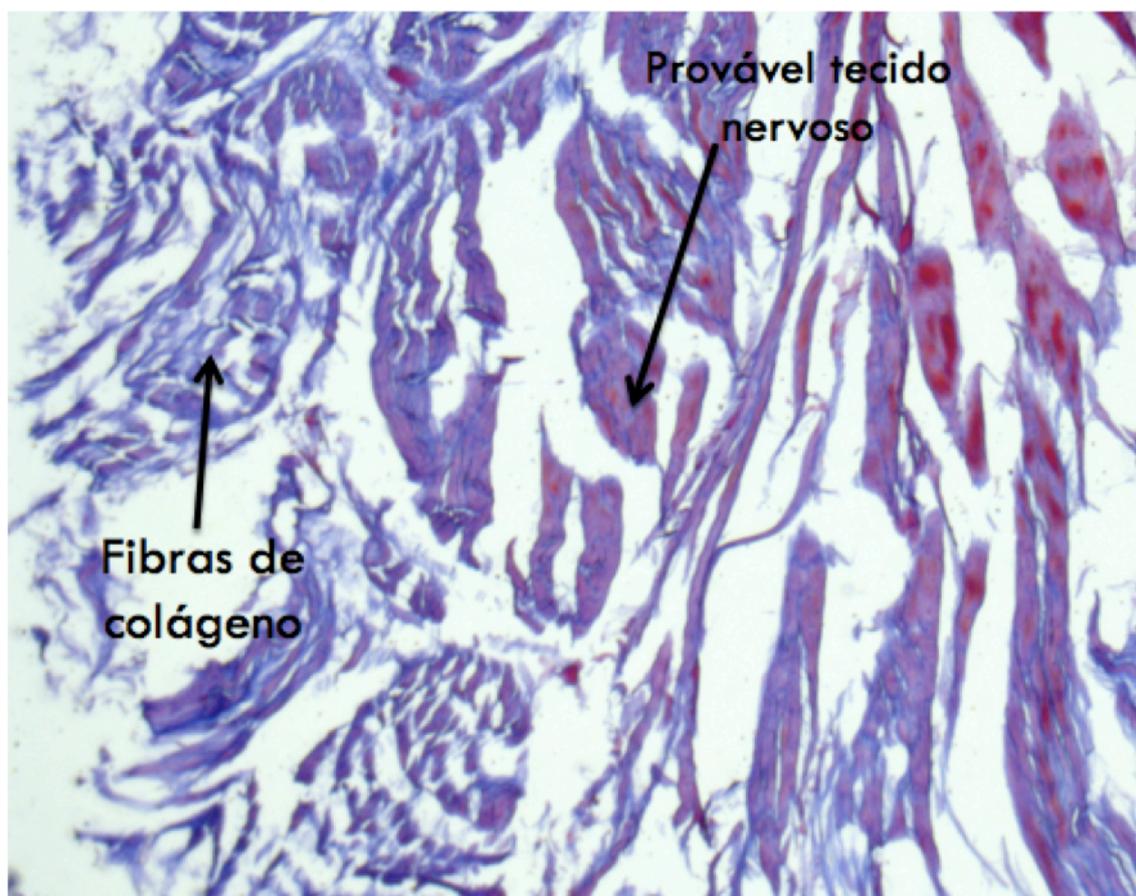
Encontramos ainda possíveis estruturas nervosas afiladas paralelas às fibras de colágeno, algumas de formas arredondadas e outras de forma não definidas na coloração HE (figura 6) e na coloração por Masson (figura 7).

figura 7: Detalhe de prováveis estruturas vâsculo nervosas encontradas no grupo I



Fonte: autor

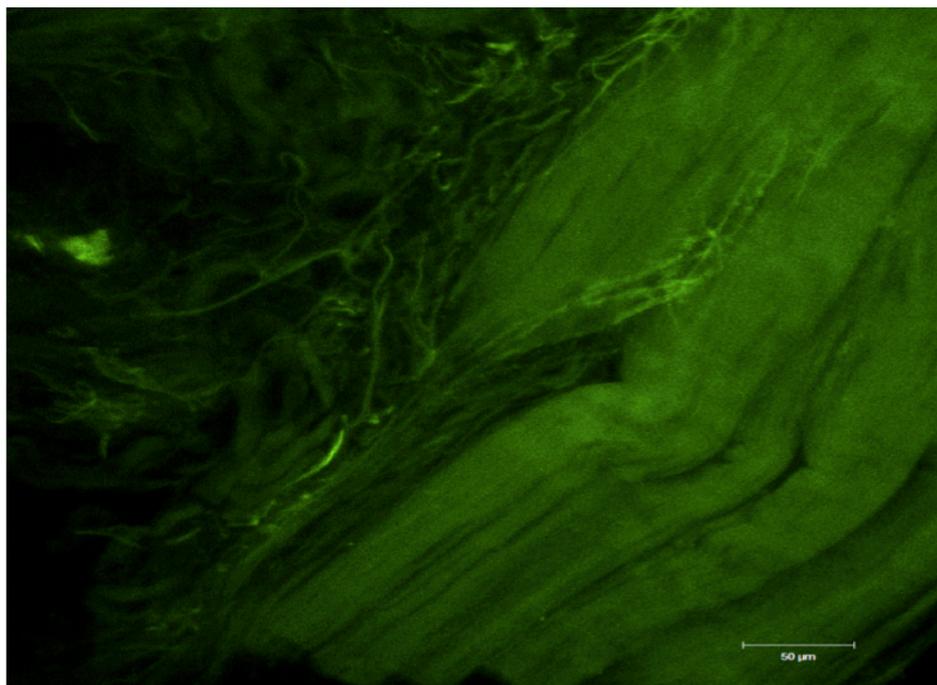
figura 8: coloração de Masson mostrando fibras de colágeno e provável tecido nervoso.



Fonte: autor

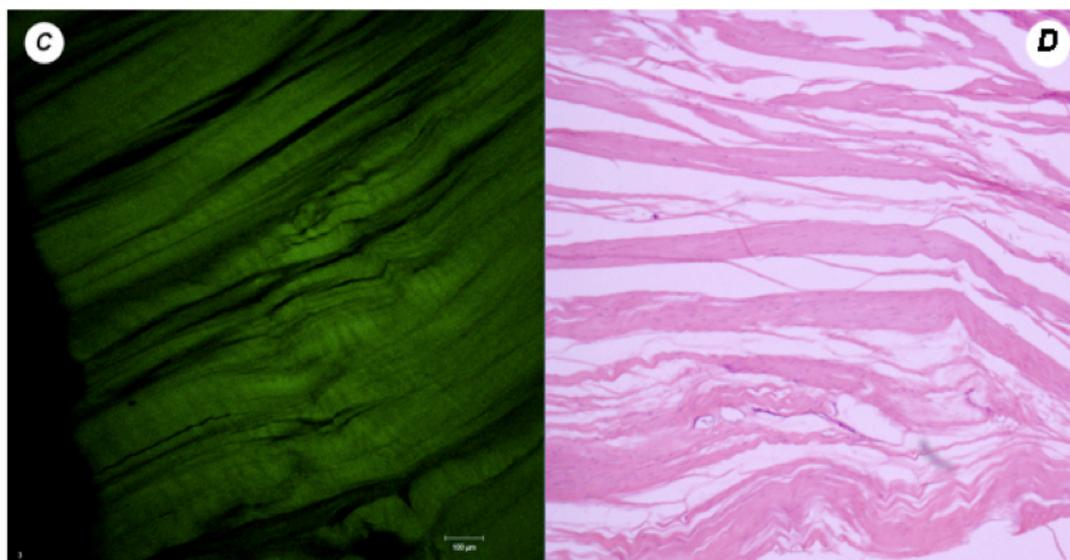
Na análise das lâminas coradas com anticorpo primário PGP 9.5, evidenciamos estruturas nervosas semelhante a terminações nervosas livres em meio as fibras de colágeno dispostas em feixes paralelos (figura 9) de tamanho entre 1,19 e 4,76  $\mu\text{m}$ . Achados semelhantes aos encontrados na coloração em HE (figura 10).

figura 9: lâminas coradas por imunofluorescência (PGP 9.5, confocal,100X) mostrando fibras de colágeno dispostas em feixes paralelos e estruturas finas e alongadas entre as fibras de colágeno, semelhante em tamanho e forma, a terminações nervosas livres



Fonte: autor

figura 10: imunofluorescência com PGP 9.5 e microscopia confocal a laser (C-100X) e coloração pela técnica de HE (D-100X) da região proximal e volar do LCUP evidenciando o predomínio de fibras de colágeno dispostas em feixes longitudinais.

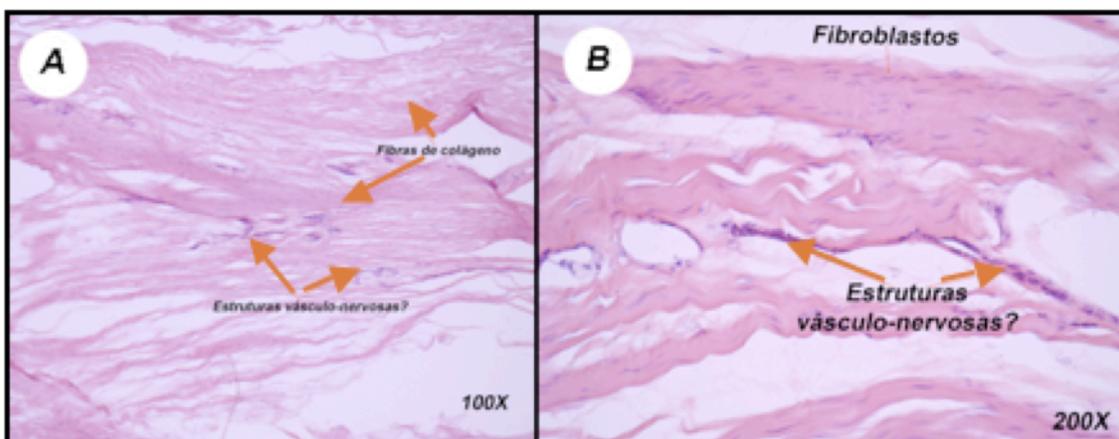


Fonte: autor

#### 4.2.2 Grupo II – parte central do ligamento colateral ulnar do polegar

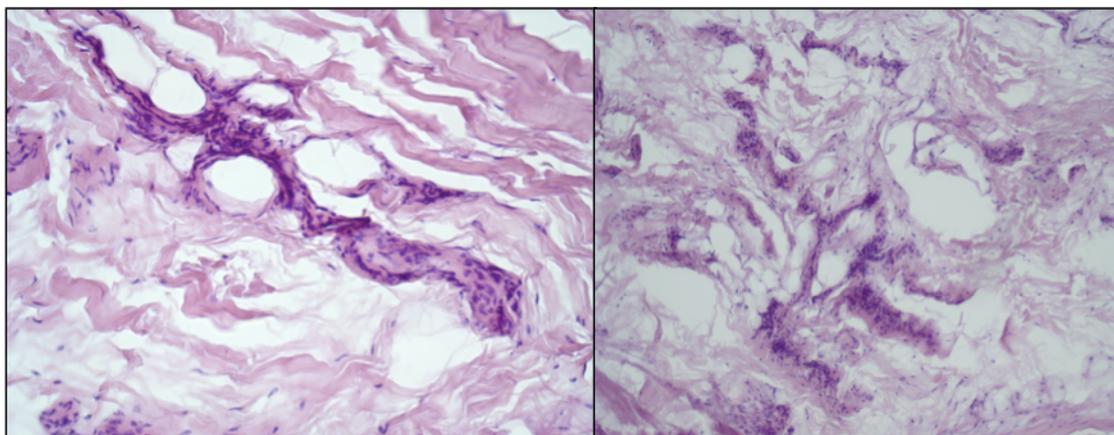
Nas lâminas com coloração HE e Masson evidenciou-se um predomínio de fibras de colágeno dispostas longitudinalmente, apresentando em seu interior, células com núcleos alongados semelhantes a fibroblastos, semelhante à região proximal. Nessa região encontramos outras estruturas que acreditamos ser vasos sanguíneos e/ou tecido nervoso (figuras 11 e 12), porém a não foi possível diferenciá-las devido às limitações próprias do método HE.

figura 11: cortes da porção medial do LCUP corados em HE mostrando feixes de colágeno paralelos (A), prováveis estruturas vâsculo-nervosas (A e B), células com núcleos alongados e semelhantes a fibroblastos.



Fonte: autor

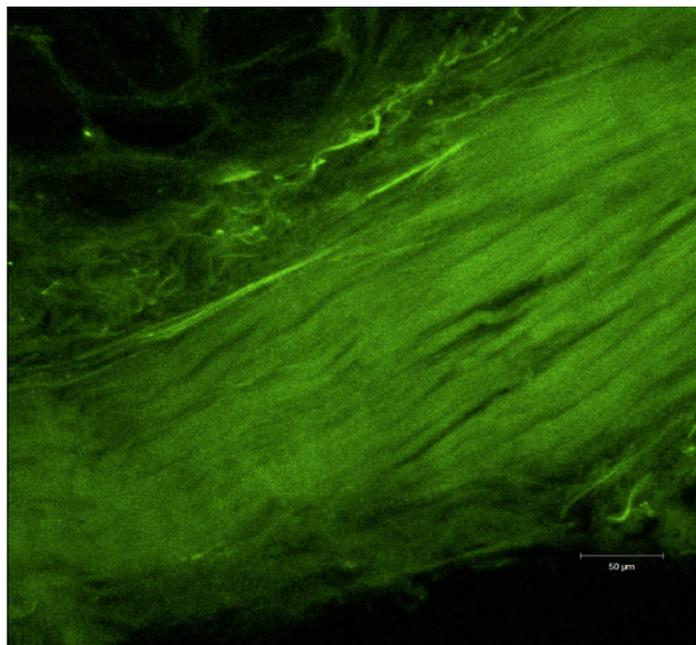
figura 12: detalhe de uma possível estrutura vâsculo-nervosa (400X) encontrada na porção medial do LCUP – Grupo II.



Fonte: autor

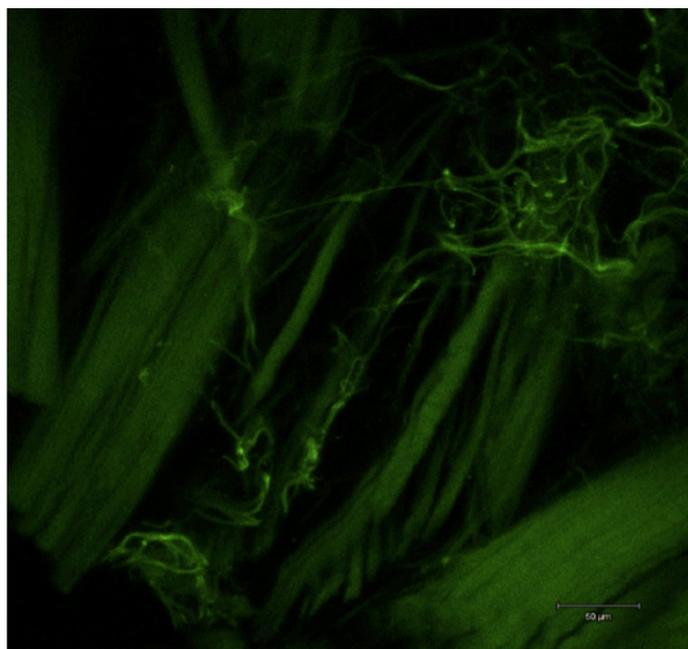
As lâminas coradas pelo método de imunoflorêncência com PGP 9.5 e visualizadas com microscopia confocal a laser, evidenciaram terminações nervosas livres filiformes (figura 13) e terminações nervosas multifilamentadas (figura 14) em meio as fibras de colágeno (1,19 a 4,76  $\mu\text{m}$ ).

figura 13: terminações nervosas livres entre os feixes de colágeno (200X).



Fonte: autor

figura 14: formação nervosa entre os feixes de colágeno (200X). Terminações nervosas livres multifilamentadas

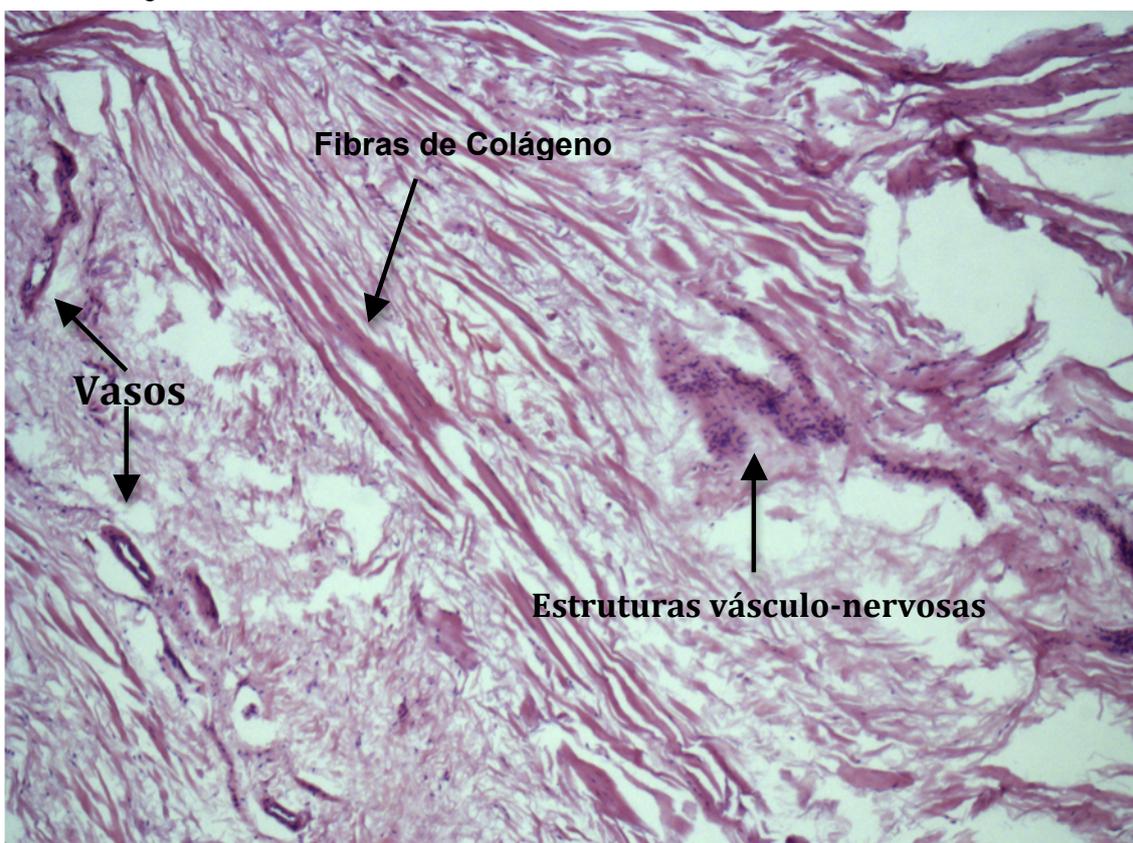


Fonte: autor

#### 4.2.3 Grupo III – parte distal do ligamento colateral ulnar (falange proximal)

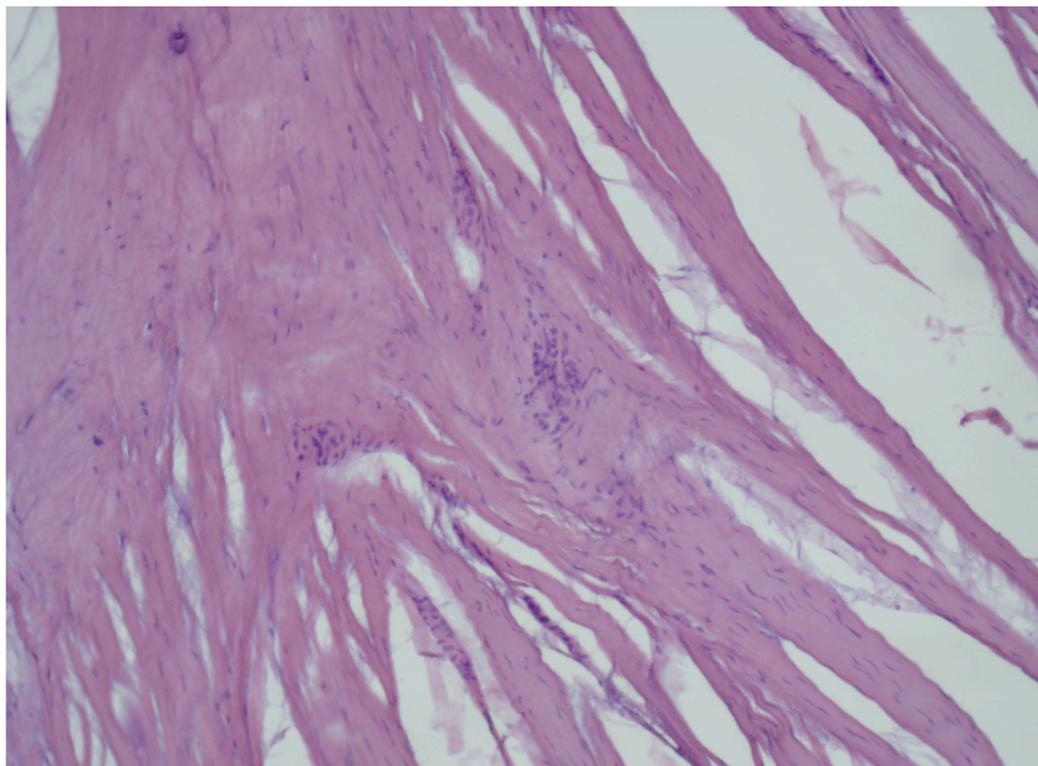
Neste grupo encontramos a maior quantidade de estruturas. Analisando as lâminas de HE e Masson identificamos padrões celulares semelhantes aos encontrados no grupo 1 e grupo 2, percebemos uma maior repetição de possíveis estruturas vasculares e nervosas, especialmente na porção dorsal, nos deixando a impressão de que nesta região, estão em maior numero. (figuras 15, 16 e 17).

figura 15: lâmina de HE (100X) mostrando o padrão tecidual distal do LCUP (Grupo III) com fibras de colágeno agrupadas em feixes paralelos, prováveis estruturas vásculo-nervosas e vasos sanguíneos.



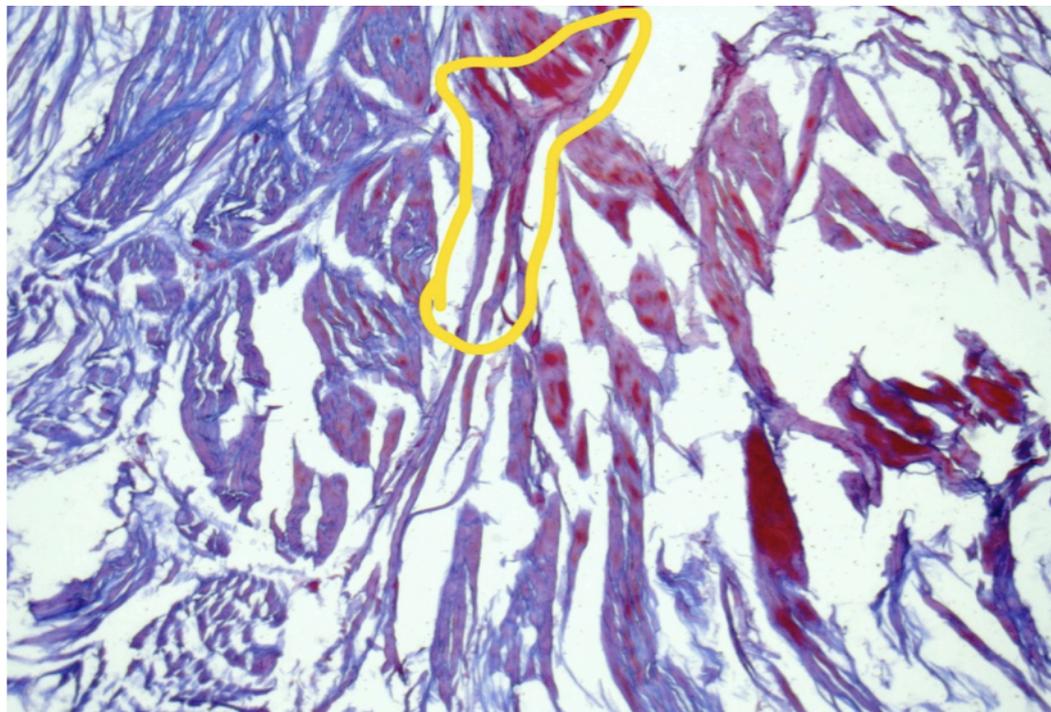
Fonte: autor

figura 16: detalhe de uma possível estrutura vásculo-nervosa (400X) encontrada na porção distal do LCUP – Grupo III.



Fonte: autor

figura 17: lâmina corada pela técnica de tricômio de Masson mostrando possível estrutura nervosa circulado em amarelo no meio dos feixes de fibra de colágeno. Aumento 50X.



Fonte: autor

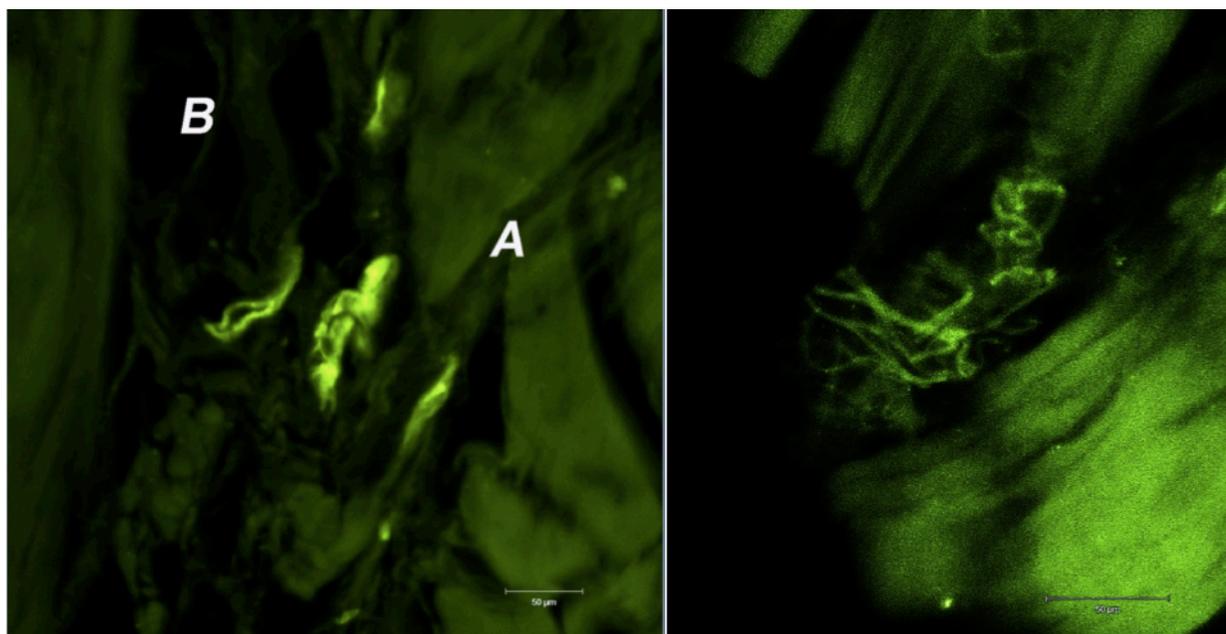
A análise das lâminas de imunofluorescência, com PGP 9.5, mostraram, estruturas nervosas diversas com padrão arboriforme tipo Ruffine-like, em meio às fibras de colágeno (figuras 18), detalhadas com aumento de 200X e 400X (figura 19).

figura 18: Rufinni like e terminações nervosas livres (100X).



Fonte: autor

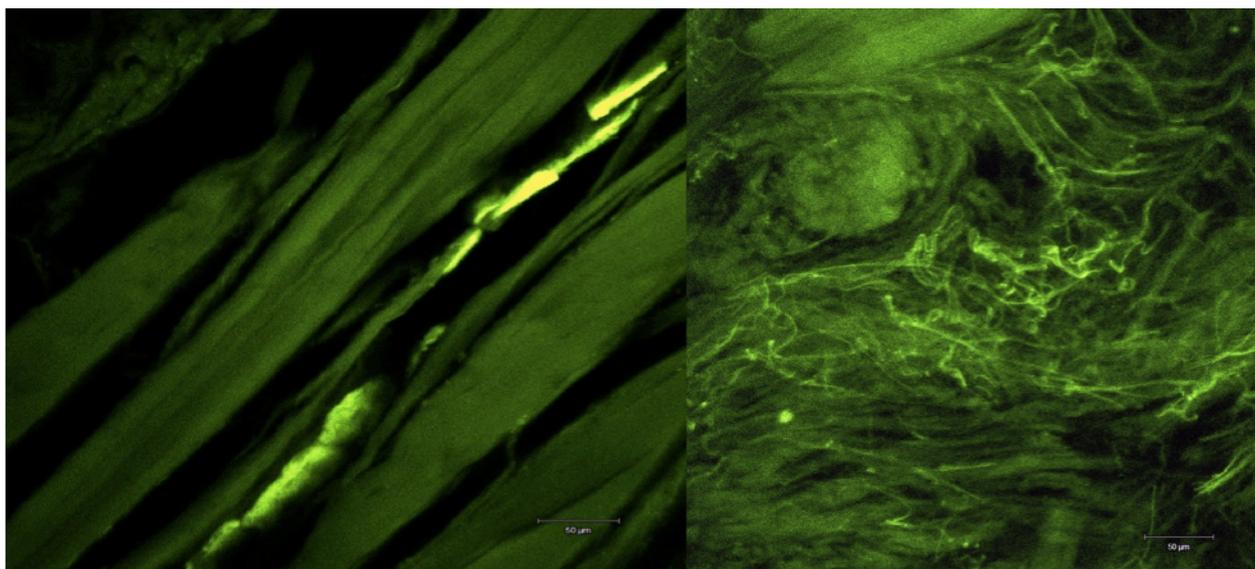
figura 19: Detalhe em aumento de 200X de algumas estruturas da figura 11 - Rufinni Like (A) rodeado de terminações nervosas livres (B). A direita detalhe de um Rufinni-Like aumento 400X.



Fonte: autor

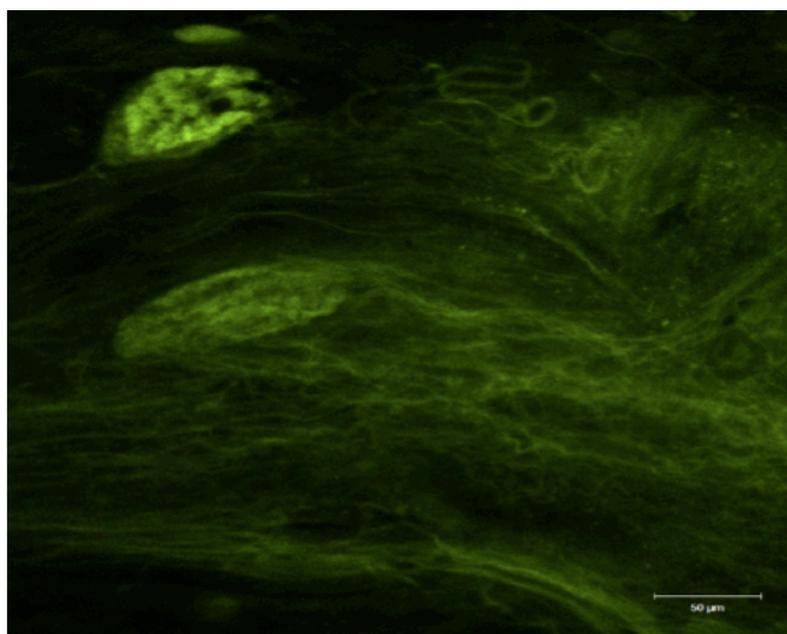
Terminações nervosas livres foram encontradas com largura variando de 7,14 a 17,85  $\mu\text{m}$  e multifilamentadas (figura 20), terminações nervosas complexas com padrões variáveis: estruturas de forma ovalada e não classificáveis com largura variando de 9,52 a 42,85  $\mu\text{m}$  e comprimento variando de 47,61 a 104,76  $\mu\text{m}$  (figura 21).

figura 20: detalhe de uma terminação nervosa livre entre os feixes de colágeno. (200X). À direita fibra nervosa multifilamentada.



Fonte: autor

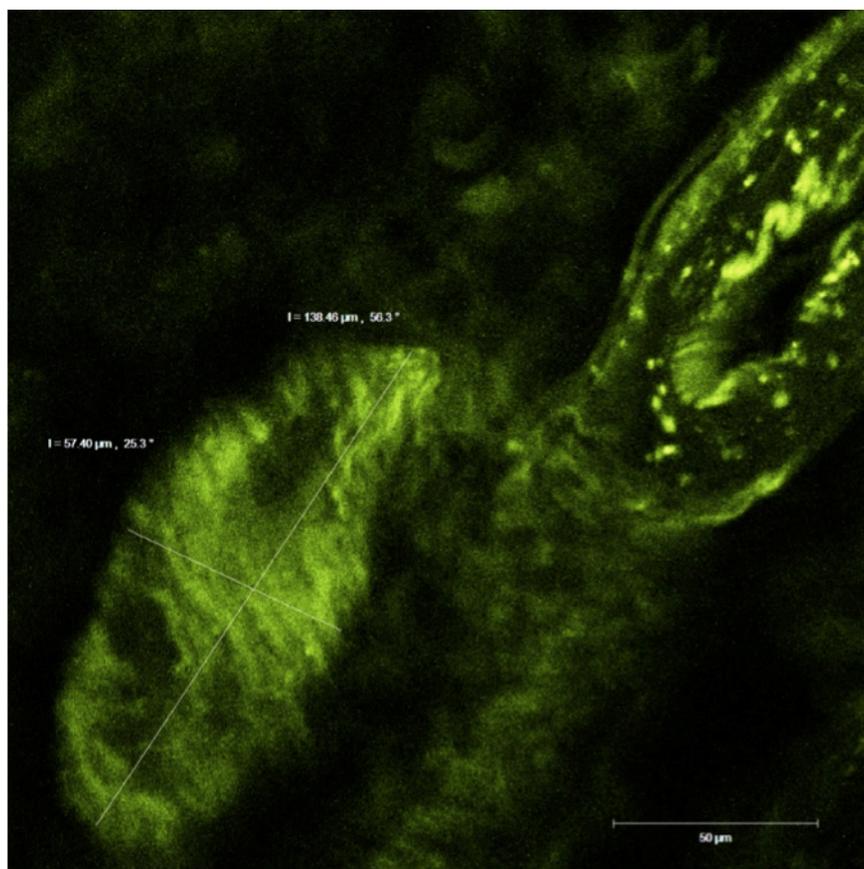
figura 21: detalhe de estruturas ovaladas não classificáveis e terminações nervosas livres (200x).



Fonte: autor

As estruturas vasculares encontradas apresentavam largura entre 43,33 e 50  $\mu\text{m}$  e comprimento entre 83,33 e 116,66  $\mu\text{m}$  (figura 22).

figura 22: vaso sanguíneo com sua luz e estrutura nervosa não classificável. Aumento de 400X



Fonte: autor

### 4.3 ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA

Foram encontradas terminações nervosas livres (tipo IV) filiformes com largura média de 4,363  $\mu\text{m}$  e desvio padrão de  $\pm 2,994$ . Foram também encontradas terminações nervosas livres multifilamentares que não se enquadram na classificação de Freeman e Wike, com largura média de 2,715  $\mu\text{m}$  e desvio padrão de  $\pm 2,142$ . Visualizou-se estruturas nervosas com padrão arboriforme (tipo I - Rufinni-Like) com comprimento médio de 92,25  $\mu\text{m}$ , com desvio padrão de  $\pm 56,186$  e largura média de 33,575  $\mu\text{m}$  e desvio padrão de  $\pm 35,518$ . Estruturas ovaladas foram encontradas com comprimento médio de 76,185  $\mu\text{m}$  com desvio padrão de  $\pm 40,411$ , largura média de 26,185  $\mu\text{m}$  com um desvio padrão de  $\pm 23,567$  (tabela 2).

Tabela 2: análise histomorfológica das terminações nervosas do ligamento collateral ulnar do polegar

<b>Forma das estruturas nervosas</b>	<b>Tamanho médio (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Desvio padrão</b>
Terminações nervosas livres filiformes	Largura: 4,363 $\mu\text{m}$	$\pm 2,994$
Terminações multifilamentadas não classificáveis	Largura: 2,715 $\mu\text{m}$	$\pm 2,142$
Arboriformes	Comprimento: 92,25 $\mu\text{m}$ Largura: 33,575 $\mu\text{m}$	$\pm 56,186$ $\pm 35,518$
Ovaladas	Comprimento: 76,185 $\mu\text{m}$ Largura: 26,185 $\mu\text{m}$	$\pm 40,411$ $\pm 23,567$

Fonte: autor

#### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O estudo apresentou uma amostragem com predominância do sexo masculino com 60% (3 indivíduos) e 40% (2 indivíduos) do sexo feminino. Quanto a lateralidade o predomínio foi do lado direito com 60% (3 indivíduos) e 40% (2 indivíduos). Quanto a cor houve predomínio da cor parda com 60% (3 indivíduos), seguido de 20% da cor negra (1 indivíduo) e 20% da cor branca (1 indivíduo). A idade aparente variou entre 50 e 70 anos com uma média de 60 anos e um desvio padrão de  $\pm 7,90$  (tabela 3).

Tabela 3: identificação das amostras e análise estatística

LCU	P1	P2	P3	P4	P5
<b>SEXO</b> 60%♂ / 40%♀	♀	♂	♂	♂	♀
<b>IDADE APARENTE</b> 50-70 anos Média 60 anos DP: $\pm 7,90$	65	50	70	60	55
<b>LATERALIDADE</b> 60% D / 40% E	D	D	D	E	E
<b>COR</b> 60%parda 20%negra 20% branca	NEGRA	PARDA	PARDA	BRANCA	PARDA

Fonte: autor

## 5.DISSCUSSÃO:

Ao iniciarmos a busca de informações sobre a inervação do LCUP nos deparamos com a ausência de trabalhos abordando especificamente o estudo histomorfológico dos mecanorreceptores nessa estrutura. O LCUP é um importante estabilizador da metacarpofalangeana do polegar durante a preensão e a realização dos movimentos de pinça. A lesão do LCUP resulta em grande prejuízo funcional, instabilidade, dor e se não tratada adequadamente pode levar osteoartrose na metacarpofalangeana do polegar, causando um dano articular e perda funcional permanente (Daniel M. et Al, 2015). Isso despertou-nos o interesse estudar a inervação e a histologia do LCUP, pois diversos estudos já comprovaram a importância do mecanismo de propriocepção na proteção de articulações, tendões, ligamentos e músculos (COOPER et al, 1992; VAGNESS et al, 1995). O estudo foi feito com uma amostragem de cinco peças retiradas de polegares. Duas peças foram excluídas da amostragem por apresentarem sinais degenerativos no LCUP. Das cinco amostras selecionadas 03 (três) foram do sexo masculino e 02 (dois) do sexo feminino, 03 (três) do lado direito e 02 (dois) do lado esquerdo. Analisando outros artigos (MOBARGHA et al, 2013; LEE; LADD; HARGET, 2011), observamos uma variação da amostragem de cinco a vinte e duas peças, sendo a nossa amostragem pequena quando comparada a média de outros estudos similares.

A escolha da coloração com PGP 9.5 foi estabelecida em nosso estudo, após uma análise dos métodos disponíveis para corar estruturas nervosas. O cloreto de ouro é uma técnica muito utilizada pelos pesquisadores, entretanto são coradas outras estruturas como vasos, axônios, fibroblastos e tecido adiposo, dificultando a identificação precisa das estruturas neurais, especificamente na diferenciação entre estruturas neurais e vasos (AMIR; LOWE; FINSTERBUSH, 1995; ASSIMAKOPOULOS et al, 1992; DE AVILA et al, 1989; HOSOKAWA, 1964; MICHELSON; HUTCHINS, 1995; PETRIE et al, 1998; VANGNESS et al, 1995; ZIMNY; ONGE; SHUTTE, 1985). Outro método usado para corar estruturas nervosas é a prata, sendo particularmente indicada para o estudo de nervos motores e sensitivos. Portanto é de difícil manuseio e requer experiência no controle do nível de acidez para não impregnar em

outros tecidos ( KENNEDY; ALEXANDER; HAYES, 1982; KIM; AZUMA, 1995; OHMORI; AZUMA, 1998; SCHULTZ et al, 1984). O uso de proteína S-100, também não oferecia uma especificidade satisfatória e também cora tecidos indesejáveis (DEL VALLE et al, 1998; EJNISMAN et al, 2002; KIM; AZUMA, 1995; MASHOOF et al, 2001; NAKAMURA et al, 1998; OHMORI; AZUMA, 1998). O uso do PGP9.5 mostrou-se eficiente para diferenciar tecido nervoso em diversos trabalhos na literatura. MOBARGHA et al, em 2013, optaram por um estudo com tripla coloração usando P75, PGP 9.5 e DAPI. Essa técnica mostrou-se eficiente na visualização de mecanorreceptores, nervos e artérias/arteríolas, em contraste com os feixes de colágeno dos ligamentos. Porém o alto custo desses anticorpos é um fator importante a ser considerado e não encontramos benefícios relevantes quando comparados a trabalhos que utilizaram apenas o PGP9.5.

Na coleta optamos em deixar um pouco das inserções ósseas do LCUP, no intuito de estudar o padrão histológico nas zonas de inserção óssea proximal (1º MTC) e distal (falange proximal), bem como nos certificar que o LCUP foi retirado em toda a sua extensão. Nos trabalhos analisados não foi encontrado nenhuma informação sobre a inclusão das inserções ósseas no material de análise.

O objetivo do estudo foi demonstrar a presença de estruturas nervosas no LCUP, suas formas, além de descrever um pouco sobre a estrutura histológica do LCUP . Encontramos dificuldade em obter uma fluorescência forte com o uso do PGP 9,5 para algumas estruturas nervosas ovaladas e redondas. Não sabemos ao certo se é algo relacionado com a estrutura histológica do LCUP ou devido às suas pequenas dimensões. Esse fator dificultou a análise das estruturas nervosas coradas com o PGP9.5, pelo fato de que algumas delas não fluoresciam semelhantes às estruturas nervosas encontradas em outros tipos de tecido, como por exemplos nas mucosas. Para nos auxiliar na classificação das estruturas por nós encontradas, recorremos a outros estudos comparando imagens e características entre as estruturas descritas.

Em 2012, Julia Lee, Amy Ladd e Elisabet Hagert, publicaram um artigo, onde foram colhidos 5 complexos ligamentares CMC de 10 mãos de cadáveres frescos e congelados. Os tecidos foram fixados em parafina e usado, simultaneamente, PGP 9.5, p75 e DAPI e imunofluorescência para analisar os

padrões de inervação da CMC do polegar, encontrando corpúsculos de Pacini, terminações de Ruffini e terminações nervosas dendríticas, estruturas semelhantes às encontradas no nosso estudo. Esse estudo serviu de ponto de partida para a compreensão das condições mecânicas normais e patológicas na articulação CMC, bem como o nosso servirá de ponto de partida para uma melhor compreensão da inervação e propriocepção da MTCFP. O uso de três tipos diferentes de anticorpos, nos chamou a atenção para dificuldade de diferenciação entre as estruturas nervosas encontradas pela imunofluorescência, nos sugerindo que outros pesquisadores também encontraram a mesma dificuldade encontrada no presente estudo e a tripla coloração seria uma alternativa, na tentativa de facilitar a identificação do tecido nervoso encontrado.

Em 2013, MOBARGHA et al, apresentaram um estudo semelhante com a CMC do polegar em pacientes com osteoartrite na CMC do polegar, dessa vez com uma amostra de 22 peças, descrevendo mais detalhadamente a inervação da CMC do polegar. Nesse estudo foram avaliados ligamentos normais e patológicos. Em nossa análise eliminamos os ligamentos com sinais degenerativos. Essa análise teria sido importante para avaliar se o processo degenerativo alteraria a concentração das terminações nervosas livres e mecanorreceptores, quando comparado ao tecido normal. Assim como em nossa amostragem, MOBARGHA et al, não observaram diminuição da quantidade de mecanorreceptores nos pacientes mais idosos embora algumas publicações mostrem uma diminuição da quantidade de mecanorreceptores com o aumento da idade.

Ao pesquisarmos sobre a histologia ligamentar, nos deparamos com uma pequena quantidade de informações contidas nos livros textos e na literatura, o que nos estimulou a escrever sobre a histologia encontrada no LCUP e nesse aspecto as colorações de HE e Masson nos foram muito úteis. Para identificar as estruturas nervosas optamos pela imunofluorescência com PGP 9.5 por tratar-se de um anticorpo específico para tecido nervoso e por mostrar-se eficiente em diversos estudos, como já citamos anteriormente.

O uso da microscopia com focal possibilitou a visualização do tecido em camadas permitindo uma compreensão espacial das estruturas nervosas coradas. Encontramos estruturas vaso-nervosa no terço proximal da

porção principal do ligamento collateral ulnar do polegar (Grupo I), bem como fibras de colágeno dispostas em feixes paralelos. No terço médio (Grupo II) encontramos poucas estruturas vículo-nervosas, essencialmente terminações nervosas livres em meio aos feixes de colágeno e alguns vasos sanguíneos, sendo essa a porção do ligamento provavelmente com menor inervação e vascularização. No terço distal, incluindo inserção óssea na falange proximal, encontramos a maior parte da vascularização e dos mecanorreceptores, localizados em maior concentração da porção dorsal e distal. Isso reforça a importância do reparo ligamentar precoce nas lesões de Stenner, no intuito de manter o mecanismo propioceptor, protegendo a articulação MTCF de uma osteoartrite precoce.

Em estudos futuros, outros métodos de coloração podem ser adicionados (prata), visando uma melhor descrição da composição histológica do LCUP, bem como o uso de outros marcadores tipo P75 e o DAPI, facilitando a identificação das estruturas nervosas.

A presença de terminações nervosas tipo Ruffini-Like no terço médio e distal do LCUP, poderá dar indícios que o ligamento tem importante papel no mecanismo de propriocepção da MTCFP, estabilizando-a durante o movimento de pinça. De acordo com a classificação de de Freeman e Wyke esse mecanorreceptor é de adaptação lenta e o tempo aumentado para adaptação pode ser um fator que contribua o desenvolvimento de lesões degenerativas do LCUP, mas para validar essa hipótese, há a necessidade de estudos eletrofisiológicos.

## **6. CONCLUSÃO:**

O estudo mostrou a presença de mecanorreceptores e terminações nervosas livres conforme a classificação de Freeman e Wyke em todos os grupos da porção principal do ligamento collateral ulnar do polegar.

Observou-se terminações nervosas do tipo Rufinni-like nas porções medial e distal da porção principal do ligamento collateral ulnar do polegar.

Foram identificadas terminações nervosas ovaladas, arredondadas, multifilamentadas e não classificáveis, em todos os grupos da porção principal do ligamento collateral ulnar do polegar.

**REFERÊNCIAS:**

AIELLO, L.C; WHEELER, P. CURRENT ANTHROPOLOGY. **The Wenner-Gren Foundation for Anthropological Research** Vol. 36, No. 2, pp. 199-221, Apr., 1995.

AKIYAMA, K. et al. Neurohistology of the sinus tarsi and sinus tarsi syndrome. **Journal of Orthopaedic Science**, v. 4, n. 4, p. 299–303, 1999.

AMIR, G.; LOWE, J.; FINSTERBUSH, A. Histomorphometric analysis of innervation of the anterior cruciate ligament in osteoarthritis. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 13, n. 1, p. 78-82, Jan. 1995.

ASSIMAKOPOULOS, A.P.; KATIONS, P.G.; AGAPITOS, M.V.; EXARCHOU, E.I. The innervation of the human meniscus. **Clin. Orthop.** v. 275, p. 232 – 236, 1992.

BRODIN, L. et al. Tree-dimensional reconstruction of transmitter-identified central neurons by ‘in bloc” immunofluorescence histochemistry and confocal scanning microscopy. **Experimental Brain Research**. 73;441-6; 1988

CAUNA, N.; MARAN, G. Development and postnatal changes of digital Pacinian corpuscle (corpuscula lamellosa) in the human hand. **J. Anat.**, v. 93, p. 291-296, Jan. 1959.

CAVALCANTE, M. L. C.; RODRIGUES, C. J.; MATTAR, R. Mechanoreceptors and nerve endings of the triangular fibrocartilage in the human wrist. **Journal of Hand Surgery**, v. 29, n. 3, p. 432–435, 2004.

CHEN, Y. G.; MCCLINTON, M. A.; Da SILVA, M. F.; SHAW WILGIS, E. F. Innervation of the metacarpophalangeal and interphalangeal joints: A microanatomic and histologic study of the nerve endings. **Journal of Hand Surgery**, v. 25, n. 1, p. 128-133, Jan. 2000.

CHUSID, J. G. Sensibilidade. In: **Neuroanatomia correlativa e neurologia funcional**. 14<sup>a</sup> ed. São Paulo, Koogan. cap. 10, p. 194-195, 1972.

Daniel M. Avery III, Nicholas M. Caggiano, Kristofer S. Matullo, Ulnar Collateral Ligament Injuries of the Thumb. A Comprehensive Review, **Orthop Clin N Am** 46 (2015) 281–292

DE AVILA, G.A.; O'CONNOR, B. L.; VISCO, D. M; SISK, T.D. The mechanoreceptor innervation of the human fibular collateral ligament, **J. Anat.** v. 162, p.1-7, 1989.

Del VALLE, M. E. *et al.* Immunohistochemical analysis of mechanoreceptors in the human posterior cruciate ligament: a demonstration of its proprioceptive role and clinical relevance. **Journal Arthroplasty**, v. 13, n. 8, p. 916–922, Dec. 1998.

EJNISMAN, B.; FALOPPA, F.; CARRERA, E. F.; ANDREOLI, C. V.; ALVES, M. T. S.; ODASHIRO, A.; COHEN, M. Estudo imunohistoquímico dos mecanorreceptores do ligamento glenoumeral inferior em cadáveres humanos. **Rev. Bras. Ortop.**, v. 37, p. 289-298, Jul. 2002.

FREIRE, M; BOYDE, A. Study Golgi impregnated material using the confocal tandem scanning reflected light microscope. **Journal of Microscopy**, v. 158, pt. 2, p. 285-290, May 1990.

FREEMAN, M.A.; WYKE, B. The innervation of the knee joint. An anatomical and histological study in the cat. **Journal Anat.** 101: 505–532, 1967

GUANCHE, C.A.; NOBLE, J.; SOLOMONOW, M.; WINK, C.S. Periarticular neural elements in the shoulder joint. **Orthopedics**, 22(6):615-7, Jun 1999.

HALATA, Z.; HAUS, J. The ultrastructure of sensory nerve endings in human anterior cruciate ligament. **Anatomy and embryology.** (Berl.), v. 179, n. 5, p. 415–421, Jan. 1989.

HASEGAWA, S.; *et al.* Study of mechanoreceptors in fibrocartilage masses in the defect of pars interarticularis. **Journal of Orthopaedic Science**, v.4; p 413-20,1999

HOSOKAWA, O. The histological study on the type and distribution of the sensory nerve endings in human hip joint capsule and ligament. **J. Jpn Orthop. Assoc.** v. 38, p. 887 – 901, 1964.

JEW, J. Y. *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.

JULIA LEE, AMY LADD, ELISABET HAGERT, Immunofluorescent Triple-Staining Technique to Identify Sensory Nerve Endings in Human Thumb Ligaments. **Cells Tissues Organs** 2012;195:456–464

KATHLEEN E, *et al*, Ulnar Collateral Ligament Injuries of the Thumb Phalangeal Translation During Valgus Stress in Human Cadavera, **The Journal of Bone & Joint Surgery**, 2013;95;881-7

KENNEDY, J.C.; ALEXANDER, I.J.; HAYES, K.C. Nerver supply of the human knee and its functional importance. **Am. J. Sports Med.**, v. 10, no. 6, p 329-335,1982.

KIM, Y.T.; AZUMA, H. The nerve endings of the acetabular labrum. **Clinical orthopaedics and related research**, v. 320, p. 176 – 181, 1995.

MAHAJAN, M.; RHEMREV, S. J. Ulnar collateral ligament of the thumb, rupture – a review. **International Journal of Emergency Medicine**. p.1–6, 2013

MASHOOF, A. A. *et al.* Neural Anatomy of the Transverse Carpal Ligament. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 386, p. 218-221, 2001.

MCKEON, K. E.; GELBERMAN, R. H.; CALFEE, R. P.. Ulnar Collateral Ligament Injuries of the Thumb. **The Journal of Bone and Joint Surgery-American**, Vol. 95(10), 881–887, 2013.

MICHELSON, D. J.; HUTCHINS, C. Mechanoreceptors in human ankle ligaments. **The Journal of bone and joint surgery. British volume**. v. 77-B, p. 219 – 24, 1995.

MORAES, MIGUEL, Histomofometria dos mecanorreceptores e terminações nervosas livres no quadril: estudo comparativo em pacientes com artrose secundária e normais, 2008.

MORISAWA, Y. Morphological study of mechanoreceptors on the coracoacromial ligament. **Journal of Orthopaedic Science**, v. 3, p. 102–110, Jan. 1998.

NAKAMURA–OHSHIMA, K. *et al.* Immunocytochemical detection of S-100  $\beta$  in the periodontal Ruffini endings in the rat incisor. **Neurosc. Letters**, v. 258, p. 163–166, Oct. 1998.

NATHALIE MOBARGHA, CASSIE LUDWIG, AMY L. LADD, ELISABET HAGERT, Ultrastructure and Innervation of Thumb Carpometacarpal Ligaments in Surgical Patients With Osteoarthritis, **The Association of Bone and Joint Surgeons**, 013-3083-7, 2013

OHMORI, M; AZUMA, H. Morphology and distribution of nerve endings In the human triangular fibrocartilage complex, **Journal Hand Surgery**. 23B:4, p. 522-524, 1998.

PAGNANI, M.J.; WARREN, R.F. Stabilizers of the glenohumeral joint. **Journal Shoulder Elbow Surgery.**, 3:173–190, 1994.

PARDINI, A.; FREITAS, A., **Traumatismos da mão**, Medbook, 24:598, 2008.

PETRIE, S. *et al.* Mechanoreceptors in the human elbow ligaments. **Journal Hand Surgery. [Am.]**, v. 23, n. 3, p. 512–518, May 1998.

PETRIE, S. *et al.* Mechanoreceptors in the palmar wrist. **Journal Bone Joint Surgery**, v. 79-B, p.494–96, 1997

RUI DIOGO A, BRIAN G. RICHMOND B,C, BERNARD WOOD, **Journal of Human Evolution**, 63 (2012) 64-78

SCHULTZ, R.A. *et al.* Mechanoreceptors in human cruciate ligaments: a histological study. **Journal Bone Joint Surgery [Am]**, v.66, p. 1072 – 6, 1984.

SHELAIN, P *et al.* Collateral ligament injuries of the metacarpophalangeal joint of the thumb: a treatment algorithm. **Strat Traum Limb Recon**, (2010) 5:1–10

STACEY E. Mills; **Histology for Pathologists - 3rd**, Lippincott Williams & Wilkins, 5:110, 2007.

TAMAI, K. *et al.* Fibrous architecture of the glenoid labrum. In: Takagishi N, editor. **The Shoulder**; (Proc 3rd Int Conf Surg Shoulder); Fukuoka: Professional Postgraduate Services; pp. 27–29, 1986.

TUBIANA, R.; THOMINE, J.M.; MACKIN, E. **Diagnóstico clínico da mão e do punho**, *Interlivros*, 1:144, 1996.

VANGNESS, J.R. *et al.* Neural anatomy of the glenohumeral ligaments, labrum, and subacromial bursa. **Arthroscopy** v. 11, p. 180 – 4, 1995.

VANGNESS, J.R.; ENNIS, M.; TAYLOR, J.G.; ATKINSON R. Neural anatomy of the glenohumeral ligaments, labrum, and subacromial bursa. **Arthroscopy**, v. 11, p. 180 – 4, 1995.

VILENSKY, J. A. *et al.* Histologic analysis of neural elements in the human sacroiliac joint. **Spine** v.27; p.1202-7; 2002.

ZIMNY, L. M.; ONGE, M.; SCHUTTE, M. A modified gold chloride method for demonstration of nerve endings in frozen sections. **Stain Technology**, v. 60, p. 305–306, May 1985.

**ANEXOS:**