



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS MÉDICO-  
CIRÚRGICAS**

**AURÉLIO FROTA LEITÃO JÚNIOR**

**AVALIAÇÃO DA HISTOMORFOMETRIA DO COLÁGENO DO  
LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR DE FETOS**

Fortaleza  
2024

AURÉLIO FROTA LEITÃO JÚNIOR

AVALIAÇÃO DA HISTOMORFOMETRIA DO COÁGENO DO LIGAMENTO CRUZADO  
ANTERIOR DE FETOS

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

Orientador: Prof. José Alberto Dias Leite.

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)

---

- L548a Leitão Júnior, Aurélio Frota.  
Avaliação da histomorfometria do colágeno do ligamento cruzado anterior de fetos /  
Aurélio Frota Leitão Júnior. – 2024.  
42 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,  
Mestrado Profissional em Farmacologia Clínica, Fortaleza, 2024.  
Orientação: Prof. Dr. José Alberto Dias Leite.
1. colágeno. 2. feto. 3. ligamento cruzado anterior. I. Título.

CDD 615.1

---

AURÉLIO FROTA LEITÃO JÚNIOR

AVALIAÇÃO DA HISTOMORFOMETRIA DO COLÁGENO DO LIGAMENTO CRUZADO  
ANTERIOR DE FETOS

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

Orientador: Prof. José Alberto Dias Leite

Aprovada em, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. José Alberto Dias Leite

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof Dr. Diego Ariel de Lima

UFERSA

## RESUMO

O ligamento cruzado anterior(LCA) é o principal restritor da translação anterior da tíbia sobre o fêmur, sendo responsável por 85% da estabilização anterior do joelho. Os ligamentos desempenham um papel vital na manutenção da estabilidade e na função normal das articulações musculoesqueléticas. Os principais tipos de colágenos presentes nos ligamentos são o tipo I e tipo III, predominando em 90% o colágeno do tipo I. O objetivo desse estudo é avaliar a histomorfometria do colágeno tipo I e do tipo III no ligamento cruzado anterior em fetos humanos. Avaliou-se a composição de colágeno tipo I e tipo III no ligamento cruzado anterior em dez ligamentos de fetos humanos, de idade gestacional variando entre 21 a 37 semanas, onde os ligamentos foram divididos em; campo 1, inserção tibial do LCA; campo 2, corpo do LCA; campo 3, inserção femoral do LCA. Utilizou-se o picosirius red para estudo histológico, sendo as imagens mensuradas através da porcentagem de área de colágeno com birrefringência amarelo avermelhado compatível com colágeno tipo I e a área verde esbranquiçada relativa ao colágeno tipo III. O colágeno tipo I foi o mais frequente em todos os campos estudados, no campo 1, apresentou uma composição de colágeno tipo I em média de 65,51% enquanto a composição de colágeno tipo III apresentou uma média de 21,03%; no campo 2, apresentou uma composição de colágeno tipo I em média de 56,75% e o colágeno tipo III em média de 25,44%; no campo 3, apresentou uma composição de colágeno tipo I em média de 60,52% e o colágeno tipo III em média de 23,54%. Portanto, o colágeno tipo I, na parte distal do ligamento cruzado anterior, apresentou uma relação maior entre os colágenos tipo I e tipo III estatisticamente significativa do que na parte intermediária do ligamento, caracterizando a parte distal mais resistente e parte intermediária mais elástica, devido às propriedades dos colágenos.

**Palavra-chave:** Colágeno, Feto, Ligamento Cruzado Anterior

## ABSTRACT

The ACL is the main restrictor of the anterior translation of the tibia over the femur, being responsible for 85% of the anterior stabilization of the knee. Ligaments play a vital role in maintaining the stability and normal function of musculoskeletal joints. The main types of collagen present in ligaments are type I and type III, with type I collagen predominating in 90%. The objective of this study is to evaluate histomorphometry of type I and type III collagen in the anterior cruciate ligament in human fetuses. The composition of type I and type III collagen in the anterior cruciate ligament was evaluated in ten ligaments of human fetuses, of gestational age varying between 21 and 37 weeks, where the ligaments were divided into; field 1, tibial insertion of the ACL; field 2, body of the ACL; field 3, femoral insertion of the ACL. Picrosirius red was used for histological study, the images were measured through the percentage of collagen area with yellow-red birefringence compatible with type I collagen and the green-white area related to type III collagen. Type I collagen was more common in all fields studied; In field 1, a type I collagen composition averaged 65.51%, while the type III collagen composition averaged 21.03%; in field 2 it presented an average composition of type I collagen of 56.75% and type III collagen of an average of 25.44%; in field 3 it presented an average composition of type I collagen of 60.52% and type III collagen of an average of 23.54%. Therefore, type I collagen in the distal part of the anterior cruciate ligament presented a statistically significant greater relationship between type I and type III collagen than in the intermediate part of the ligament, characterizing the distal and more resistant part and the intermediate part as more elastic, due to the properties of collagens.

Keyword: Collagen, Fetal, Anterior Cruciate Ligament

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Anatomia do joelho.....	11
Figura 2 - Anatomia do LCA .....	11
Figura 3 - Acesso anterior ao joelho com artrotomia parapatelar medial.....	20
Figura 4 - Visualização da articulação do joelho após dissecação .....	20
Figura 5 - Visualização do LCA dissecado .....	20
Figura 6 - Quantificação do colágeno (Software ImajeJ).....	22
Figura 7 - Imagem corada em hematoxilina-eosina (Colágeno).....	25
Figura 8 - Imagem corada em picrosirius sem polarização (Colágeno total).....	25
Figura 9 - Imagem corada Picrosirius com polarização (Colágeno I).....	25
Figura 10 - Imagem corada Picrosirius com polarização (Colágeno III).....	26

## LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1 - Identificação, lado, peso e idade do feto .....	24
Tabela 2 - Percentual colágeno I e III no campo 1 .....	26
Tabela 3 - Percentual colágeno I e III no campo 2.....	27
Tabela 4 - Percentual colágeno I e III no campo 3.....	28
Tabela 5 - Análise percentual geral entre as concentrações (%) de colágenos entre os campos analisados .....	29
Gráfico 1 - Quantificação dos colágeno total entre os campos... ..	30
Gráfico 2 - Quantificação do colágeno tipo I entre os campos .....	30
Gráfico 3 - Quantificação do colágeno tipo III entre os campos.....	31

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	09
2. OBJETIVO.....	18
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	19
3.1 <b>Obtenção do corpo de prova</b> .....	19
3.2 <b>Confecção de lâminas histológicas</b> .....	21
3.3 <b>Coloração de picrosirius red</b> .....	21
3.4 <b>Análise estatística</b> .....	23
4. RESULTADOS .....	24
5. DISCUSSÃO.....	32
6. CONCLUSÃO .....	36
REFERÊNCIAS .....	37

## 1. INTRODUÇÃO

O ligamento cruzado anterior (LCA) é uma estrutura chave na articulação do joelho, pois resiste à translação tibial anterior e às cargas rotacionais (figura 1). É uma das estruturas mais frequentemente lesionadas durante atividades esportivas ou de alto impacto. O LCA não cicatriza quando rompido e a reconstrução cirúrgica é o tratamento padrão no campo da medicina esportiva. Tal reconstrução visa restaurar a cinemática e a estabilidade do joelho lesionado para prevenir futuras alterações degenerativas (DUTHON, 2006). A maioria das rupturas do LCA ocorre na ou perto da sua inserção femoral, com as fibras pósterolaterais do ligamento sendo especialmente vulneráveis durante as aterrissagens do pivô (BEAULIEU, 2016). Somente nos EUA, 250.000 indivíduos sofrem ruptura do LCA por ano (FILBAY, 2019).

Os ligamentos cruzados do joelho são condensações do mesênquima sinovial vascular que ocorrem entre a sétima e a oitava semana do desenvolvimento embrionário, antes da formação da articulação do joelho. É circundado por uma prega sinovial semelhante a um mesentério que se origina do aparelho capsular posterior da articulação do joelho. Assim, embora o LCA esteja localizado intra-articular, ele permanece extra sinovial durante todo o seu curso. Na 10ª semana, o LCA se separa do ligamento cruzado posterior (LCP), sendo ambos facilmente diferenciados em estudos histológicos, pela direção e orientação das suas fibras. Com 18 semanas, alguns elementos vasculares são encontrados nos ligamentos e com 20 semanas se assemelham aos da fase adulta. Daí em diante, continuam a crescer sem modificar sua forma e estrutura (SAMPAIO, 2001).

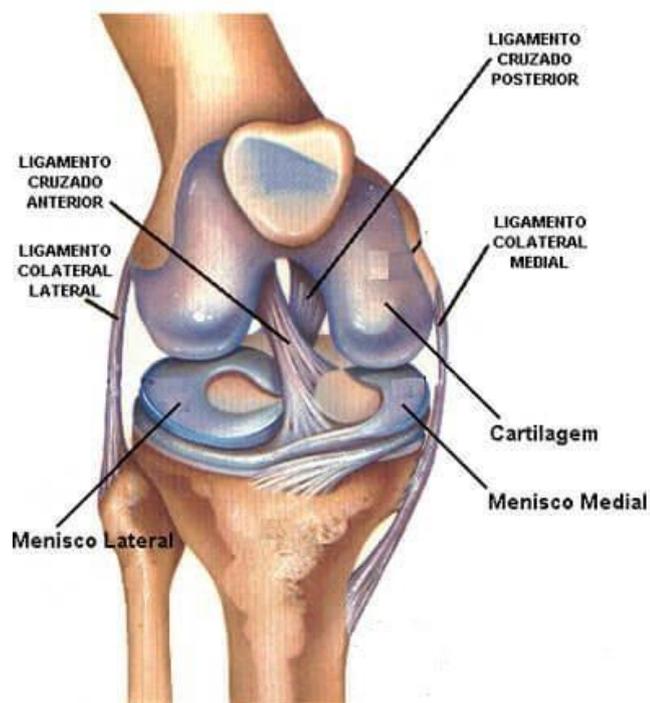
O LCA é uma estrutura semelhante a uma faixa de tecidos conjuntivos densos. Sua inserção femoral apresenta uma forma comparável a um semicírculo disposto verticalmente. A inserção óssea está localizada na parte posterior da superfície interna do côndilo femoral lateral. O LCA é lateral à linha média e ocupa 66% superior da face lateral da incisura em uma visão anterior da articulação do joelho. O tamanho da inserção óssea pode variar de 11 a 24 mm. A partir de sua inserção femoral, o LCA segue anterior, medial e distal à tibia. Seu comprimento varia de 22 a 41 mm (média de 32 mm) e sua largura de 7 a 12 mm. A forma da seção transversal do LCA é “irregular” e não circular, elíptica ou qualquer outra forma geométrica simples. Essa

forma muda com o ângulo de flexão, mas geralmente é maior na direção ântero-posterior. A área da secção transversal aumenta do fêmur até a tibia, como segue: 34 mm<sup>2</sup> proximal, 33 mm<sup>2</sup> médio-proximal, 35 mm<sup>2</sup> no nível médio da substância, 38 mm<sup>2</sup> médio-distal e 42 mm<sup>2</sup> distal. As fibras do LCA se espalham à medida que se aproximam de sua inserção tibial. Eles se fixam a uma fossa localizada anterior e lateral à espinha tibial medial. Esta fossa é uma área ampla e deprimida com aproximadamente 11 mm de largura (variação de 8 a 12 mm) e 17 mm (variação de 14 a 21 mm) na direção ântero-posterior. Perto de sua inserção, o LCA envia uma quantidade variável de fibras anteriormente, abaixo do ligamento intermeniscal transversal, e algumas extensões podem se misturar com a inserção do corno anterior ou posterior do menisco lateral. A inserção tibial é um pouco mais larga e mais forte que a fixação femoral. (DUTHON, 2006) (figura 2).

Funcionalmente, Girgis et al.(1975) dividiram o LCA em duas partes, a banda ântero-medial (BAM) e a banda posterolateral (BPL). Os fascículos da BAM originam-se na face mais anterior e proximal da inserção femoral e se inserem na face ântero-medial da inserção tibial. Por outro lado, os fascículos da BPL originam-se na face posterodistal da inserção femoral e se inserem na face posterolateral da inserção tibial. Um número maior de fascículos compõem a BPL em comparação com a BAM. Com o joelho em extensão, os fascículos do LCA correm de forma bastante paralela quando vistos sagitalmente. Durante a flexão, ocorre uma leve rotação lateral do ligamento como um todo em torno de seu eixo longitudinal, e a BAM começa a espiralar em torno do restante do ligamento. Esse movimento relativo de um feixe sobre o outro é devido à orientação das inserções ósseas do LCA. Em extensão total, há uma diferença significativa de comprimento entre a BAM (34 mm) e a BPL (22,5 mm). Os dois feixes não são isométricos em flexão/extensão, mas experimentam diferentes padrões de mudanças de comprimento durante a flexão passiva do joelho. Hollis et al (1991). mostraram que a BAM alonga e contrai em flexão, enquanto a BPL encurta e fica frouxa. Em comparação com a extensão total, as fibras posteriores tornam-se frouxas na flexão e, assim, deixam as fibras antero-mediais como restrição à carga tibial anterior. Os dois feixes não são mais paralelos porque a BAM gira em torno do resto do ligamento. A torção é resistida por uma combinação de cisalhamento capsular, ação oblíqua do ligamento colateral, superfície articular e geometria

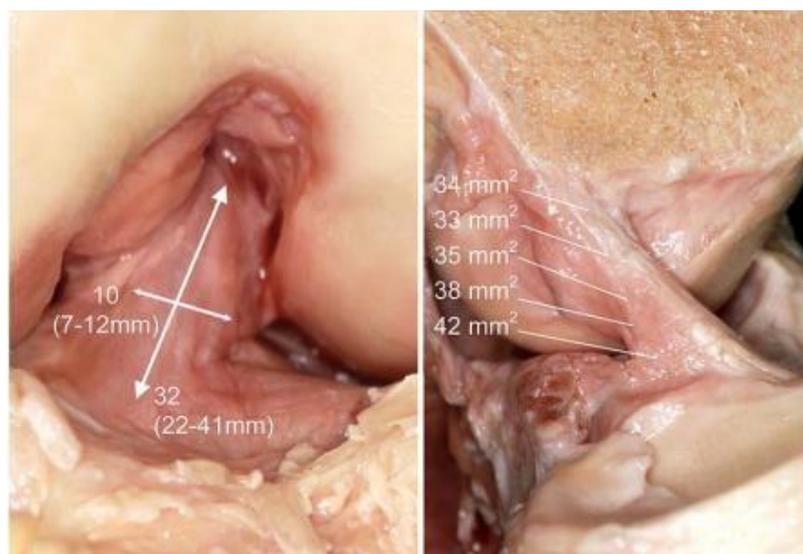
meniscal, enquanto os ligamentos cruzados desempenham apenas um papel secundário(DUTHON, 2006)

Figura 1 - Anatomia do joelho



Fonte: Google (Internet)

Figura 2- Anatomia do LCA



Fonte: DUTHON, 2006. **KSSTA**

O LCA recebe fibras nervosas dos ramos articulares posteriores do nervo tibial. Essas fibras penetram na cápsula articular posterior e correm junto com os vasos sinoviais e periligamentares que circundam o ligamento para alcançar o ponto anterior até a camada de gordura infrapatelar (KENNEDY, 1982).

O suprimento sanguíneo dos ligamentos cruzados é fornecido pela artéria genicular média (AGM). A AGM origina-se em ângulo reto a partir da face anterior da artéria poplítea, mais comumente no nível dos contornos proximais dos côndilos femorais, imediatamente abaixo da origem da artéria genicular superior e logo acima da artéria sural (SCAPINELLI, 1997).

Os ligamentos são estruturas resistentes, entretanto, pouco elásticas, que se situam nas paredes das cápsulas articulares, são formados por tecido viscoelástico, tecido conjuntivo denso, composto por água, colágeno tipos I e III, diversas proteoglicanas, pouca elastina e várias outras substâncias, acrescidos de tecidos conjuntivo fibrosos esbranquiçados, que unem dois ou mais ossos do sistema músculo esquelético. Os ligamentos desempenham um papel vital na manutenção da estabilidade e função normal das articulações musculoesqueléticas, eles cruzam as articulações com amplas amplitudes de movimento, bem como articulações com pouco movimento e podem aparecer como folhas longas de tecido opaco ou tiras espessas e curtas nas cápsulas articulares, tendo um papel de aumentar a estabilidade mecânica das articulações, guiar movimento e prevenir movimento excessivo. São compostos biológicos que geralmente consistem em células, os fibroblastos, que compõe 20% da fração volumétrica e uma matriz densa extracelular, formada por fibras de substância fundamental, colágeno e elastina, onde 70% é de água e 80% a 90%, dos 30% da matriz é composta de fibras de colágeno. Os principais tipos de colágenos presentes nos ligamentos são o tipo I e tipo III, predominando em 90% o colágeno do tipo I. (JUNQUEIRA ; CARNEIRO, 1999).

O colágeno é uma glicoproteína da matriz extracelular, composta de três cadeias polipeptídicas (denominadas de cadeias alfa) enroladas em uma configuração helicoidal, formando uma tripla hélice, sendo que cada molécula de colágeno é um bastão pequeno formado por esta tripla hélice. O colágeno é o principal componente estrutural de vários tecidos moles encontrados, no tecido conjuntivo, ao longo do

corpo, como nos ossos, nos tendões, nas cartilagens, nas veias, na pele, nos dentes e nos músculos, formando o principal tipo de fibra extracelular, sendo a proteína mais abundante no organismo representando cerca de 25% a 30% de toda proteína corporal. (ROSS; PAWLINA, 2016).

A molécula de colágeno mede cerca de 300nm de comprimento e 1,5nm de diâmetro, e ela se associa lateralmente a outra molécula com um deslocamento de 67nm, quase  $\frac{1}{4}$  da molécula. São categorizadas como heterotípicas, consistindo em até três cadeias alfa distintas, como as de colágeno tipo I ou homotrimérico, consistindo em três cadeias alfa idênticas como os do colágeno tipo III (GOLDBERG; RABINOVITCH, 2017).

O colágeno forma fibras insolúveis com alta força elástica, com características de resistência e tensão, fornecendo assim integridade estrutural a diversos tecidos, com capacidade de hidratação, reabsorção e baixa antigenicidade. (FRIESS, 1998).

As fibras colágenas são predominantes do tecido conjuntivo, sendo constituídas por uma escleroproteína denominada colágeno, essas fibras colágenas encontram-se intimamente entrelaçados na derme, a qual é um dos principais tecidos de suporte da pele e servem para fornecer elasticidade e resistência. (VIEIRA, 2006). As fibras colágenas são elásticas e mais resistentes que fios de aço de mesmo diâmetro, são grossas e possuem estrias transversais devido às lacunas formadas durante a sobreposição de moléculas de tropocolágeno. São acidófilas, de coloração branca, possuem afinidade à eosina corando-se de rosa, proporcionam ao tecido resistência à tração (GARTNER; HIATT, 2017). Estas fibras começam a aparecer durante o desenvolvimento embrionário no processo inicial de diferenciação dos tecidos (FRIESS, 1998), em que há uma diversidade na sua estrutura e na função podendo ser observada nas diferentes formas de ocorrência do colágeno. (DUARTE, 2011).

O colágeno do tipo I é formado por três cadeias polipeptídicas, ricas nos aminoácidos glicina, prolina e lisina, sendo que a prolina e a lisina são hidroxiladas, e as hidroxilinas são ainda glicosiladas pela adição de glicose e galactose. Pontes de hidrogênio entre as hidroxiprolinas unem as cadeias polipeptídicas, que se enrolam umas nas outras em uma tripla hélice. Após a liberação para o meio extracelular, as extremidades amino e carboxila das cadeias são clivadas por

peptidases, permitindo a polimerização das moléculas de colágeno em fibrilas (GARTNER; HIATT, 2017).

O colágeno tipo I é a forma predominante na pele tanto fetal quanto adulta, porém na pele humana fetal, o colágeno tipo III representa 30% a 60% do total, enquanto que na pele de adultos representa somente 10% a 20%. À medida que o feto se desenvolve, a proporção de colágenos vai se modificando até chegar àquela existente no adulto. O colágeno tipo I forma fibras espessas, mecanicamente estáveis, com pouca flexibilidade e responsáveis pela resistência do tecido às forças de tensão, estando presente em estruturas rígidas como tendões, ossos e cartilagens. O colágeno tipo III está amplamente presente nos tecidos contendo colágeno tipo I, com exceção do osso, e se mostra em abundância em órgãos relacionados com elasticidade e maior flexibilidade, como pulmão e vasos sanguíneos. É caracterizado como um tipo de colágeno imaturo, considerado jovem, pois as fibras reticulares são constituídas de uma única camada. Uma certa quantidade deste colágeno é necessário para manter o desenvolvimento normal de tensão e contração do órgão, estando também bem expressos na fase de cicatrização de feridas, devido à sua capacidade de formar ligações cruzadas rápidas e estabilizar precariamente o local de reparo, havendo uma diminuição do colágeno tipo I e um aumento do tipo III cicatrizante, à medida que o tecido de granulação se expande e o remodelamento progride. Durante o processo de cicatrização de feridas, as células de tecido nativas migram para repovoar o local da lesão e iniciam a produção de proteínas de matriz extracelular específicas de tecido (SANTANA; SATO; CUNHA, 2012)

O colágeno tipo I é a principal fibra constituinte das aponeuroses e fâscias, seguido de menor quantidade do tipo III. As fibrilas do tipo I são geralmente mais grossas e longas, (20 a 100nm de diâmetro) agregam-se, por intermédio dos colágenos do tipo XII e XIV e de proteoglicanas, em fibras colágenas (cerca de 2µm de diâmetro, portanto, visíveis ao microscópio de luz), de trajeto ligeiramente ondulado. As fibras podem ainda ser agrupadas em feixes (10 a 20µm de diâmetro), a do tipo III tem apresentação de 0,5 a 2µm de diâmetro (ROSS; PAWLINA, 2016).

A falta de colágeno sobre os tecidos pode gerar efeitos drásticos ao seu desenvolvimento, como redução em espessura, resistência e tensão da pele, ocasionando diversas complicações à nível estrutural, tais como: musculatura flácida,

diminuição da densidade óssea, perda da elasticidade e força motora das articulações e ligamentos (TRUBIAN; CAMPOS; MATIS, 2004).

As propriedades tensionais dos tecidos têm relação íntima com os tipos de colágeno, o que depende da interação entre as moléculas e os seus substratos de formação. O arranjo helicoidal das fibras fornece a estrutura físico-químico mecânica adequada para um tecido de sustentação maleável às forças a que ele é submetido. Essas interações entre os principais tipos de colágeno são associadas pelas uniões covalentes a partir da síntese que ocorre no nível intracelular; por conseguinte, a procura do método de identificação dos tipos de colágeno pode ser feita com bases na imuno-histoquímica. (ROBBINS, 2000).

A finalidade da coloração é dar cor a diferentes estruturas que compõem os tecidos, permitindo assim a visualização de suas estruturas. Por meio das técnicas histoquímicas e imuno-histoquímicas, vários aspectos biológicos das macromoléculas de colágenos podem ser evidenciados. As técnicas de coloração histológica conseguem diferenciar de maneira geral as fibras musculares das fibras de colágeno. A combinação de hematoxilina com eosina (HE) é a técnica mais utilizada na coloração dos tecidos, devido à sua simplicidade e à sua capacidade de permitir visualizar uma grande quantidade diferente de estruturas teciduais. A hematoxilina cora em azul ou violeta o núcleo das células e outras estruturas ácidas (como porções do citoplasma rica em RNA e matriz da cartilagem hialina). A eosina cora o citoplasma e o colágeno em cor de rosa, de laranja ou de vermelho. As técnicas que são utilizadas para a coloração do tecido conjuntivo são as tricrômicas, técnicas que seletivamente evidenciam o músculo, fibras de colágeno, fibrina e eritrócitos. São usados três corantes, um dos quais é nuclear. Um dos mais usados corresponde ao Tricrômio de Masson, que cora de vermelho o músculo e a fibrina e de azul-esverdeado o colágeno. As técnicas para demonstração do osso tornam-se difíceis pelas características próprias deste tecido. (JUNQUEIRA; COSSERMELLI; BRENTANI, 1978.)

A coloração por Picrosirius é um procedimento específico para o colágeno, uma vez que não cora fortemente as glicoproteínas. Nos experimentos, ocorrem aumento de pelo menos 700% na intensidade da luz devido à birrefringência do colágeno corado pelo picrosirius, quando comparados com controle. Essa característica é responsável pelas imagens claras, que permitem a observação acurada do colágeno em diferentes tecidos. (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1978).

A diferenciação das cores deve-se a espessura das fibras, o espectro das diferentes cores de polarização, obtidas depois da coloração por picrosírius, e é útil na diferenciação dos vários tipos de colágeno (JUNQUEIRA; MONTES; SANCHEZ, 1982).

O fenômeno de birrefringência, que se refere ao grau de retardamento da luz polarizada linear, é natural nas fibras de colágeno. Isso ocorre pelo ordenamento paralelo das moléculas de colágeno nas fibrilas, bem como pela orientação das próprias fibras. (PICKERING; BOUGHNER, 1990 ).

A coloração pelo Picrosírius é empregada em histologia como específica para colágenos, aumentando a birrefringência desse material. Um método histoquímico utilizado para a avaliação do tecido conjuntivo é o Picrosírius Red, que diferencia os tipos de colágeno pela birrefringência das fibras em microscópio óptico de luz polarizada. Assim, diferentes tonalidades são observadas conforme o tipo de arranjo molecular presente (JUNQUEIRA et al., 1978). Entretanto, no início do desenvolvimento desse método, ficou evidente que a espessura do corte histológico é de grande importância na cor e intensidade da birrefringência exibida pelo colágeno. (JUNQUEIRA; COSSERMELI; BRENTANI, 1978).

A coloração com Picrosírius red sob luz polarizada permite uma análise qualitativa e quantitativa das fibras colágenas do tecido conjuntivo, através da diferente interferência de cores, intensidade e birrefringência dos tecidos corados, diferenciando principalmente fibras do tipo I e III. As fibras tipo I (maduro) se apresentam como fibras grossas, com maior entrelaçamento e maior espessura, altamente birrefringentes e na cor laranja avermelhada, enquanto que as fibras do tipo III (imaturas) se apresentam em feixes finos, mais afilados e menos entrelaçados com fraca birrefringência e na cor amarelo-esverdeado. Esse método é bastante sensível e eficaz para o estudo da biologia do colágeno, correlacionando as características histoquímicas e morfológicas no processo de reparo tecidual, assim como para analisar a quantificação, disposição e organização do colágeno em tecidos normais e patológicos. (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1978).

Em virtude do grande número de lesões ligamentares em joelhos, sendo a mais prevalente a lesão do LCA (INSALL, 2019), seja ela em prática de atividades esportivas ou traumas de alto impacto, ocasionando instabilidade do joelho com prejuízo das atividades laborais, recreacionais e da vida diária, realizou-se um estudo sobre a

expressão do colágeno nesse ligamento, em fetos humanos, através da técnica de coloração Picrosirius sob luz polarizada. Trata-se de um estudo novo, realizado em ligamentos intactos, que nunca sofreram trações ou torções, com o objetivo de compreender melhor a sua composição e a relação com a sua biomecânica.

## **2. OBJETIVO**

Avaliar a histomorfometria do colágeno do tipo I e do tipo III no LCA em fetos humanos.

### 3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foram obtidos dez ligamentos cruzados anteriores, provenientes de seis fetos congelados, sendo que em quatro fetos foram coletadas amostras bilaterais dos joelhos, e nos outros dois apenas um lado. Os fetos eram três do sexo masculino e três do sexo feminino. A idade dos fetos variava entre 21 e 37 semanas de gestação. Os fetos não apresentavam sinais de lesão traumática e degenerativa nos joelhos. Todos os cadáveres se encontravam armazenados, congelados, a uma temperatura de 20°C negativos. Para a realização das coletas, foram descongelados à temperatura ambiente. Para utilização dos corpos de prova nos experimentos, foi obtida a autorização do Comitê de Ética em Pesquisado Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará, sob protocolo N<sup>o</sup> 08196819.3.0000.5050.

#### 3.1 Obtenção das Amostras

Para dissecação, os cadáveres foram posicionados em decúbito dorsal. Realizou-se um acesso na região anterior do joelho, associado a uma artrotomia parapatelar medial transquadrípital (figura 3 e 4). Após adequada dissecação e exposição das estruturas do pivô central do joelho, realizou-se a ressecção de todo o LCA, preservando um pouco de cartilagem na inserção tibial para diferenciação na divisão dos três campos do LCA (origem femoral, corpo do LCA e inserção distal na tíbia) (figura 5). Para fins didáticos, preconizou-se que o campo 1 seria referente à inserção distal tibial, o campo 2 referente ao corpo do LCA, e o campo 3 referente à origem femoral. Posteriormente, o corpo de prova foi colocado em formol neutro a 10% e encaminhado para o Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará.

Figura 3- Acesso anterior ao joelho, com artrotomia parapatelar medial.



Fonte: próprio autor

Figura 4- Visualização da articulação do joelho após dissecação.



Fonte: próprio autor

Figura 5- Visualização do LCA dissecado.



Fonte: próprio autor

### 3.2 Confeção de Lâminas Histológicas

Os fragmentos do tecido foram imersos em formol neutro a 10% por 24 horas. Quarenta e oito horas depois, estes foram lavados em água corrente e analisados macroscopicamente, sendo examinadas alterações na forma, coloração e consistência. Em seguida, as peças foram colocadas em cassetes e colocadas para processamento histotécnico automatizado PT05 LupTec® passando por desidratação em série alcoólica crescente, diafanização em xilol, impregnação em parafina, fundição a 60°C e inclusão dos espécimes formando blocos parafinados à temperatura ambiente.

Os fragmentos foram seccionados com cortes de 3 µm de espessura e corados utilizando a coloração de rotina para histologia hematoxilina-eosina e montadas em bálsamo de Canadá (JUNQUEIRA,1983) para análise em microscópio de luz convencional e verificação das estruturas microscópicas.

### 3.3 Coloração de Picrosirius Red

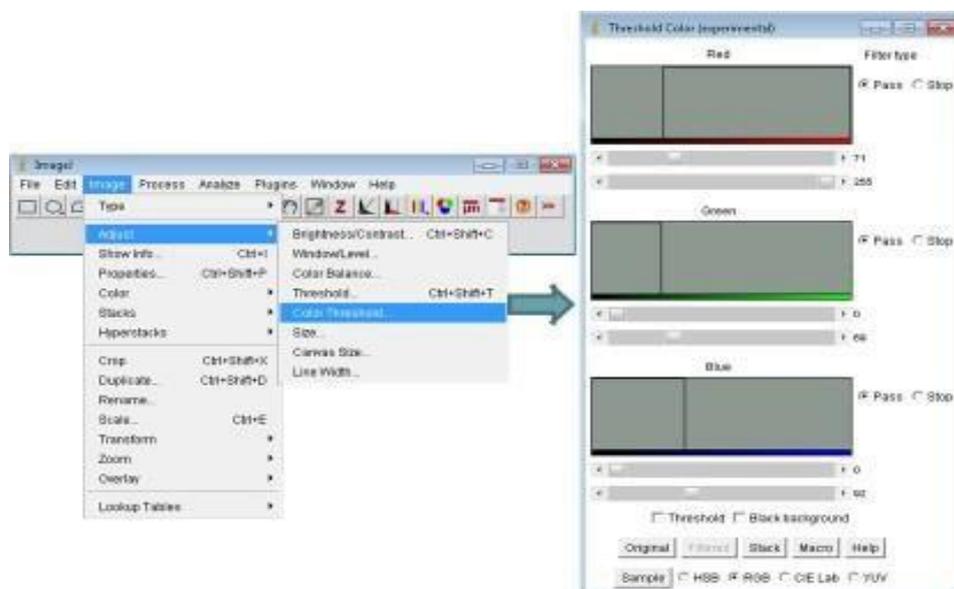
Lâminas foram confeccionadas através de cortes de 3µm dos blocos parafinados selecionados. Foi realizada a desparafinização em estufa a 60°C por 3h, seguida de 3 (três) banhos de 5 minutos em xilol, reidratação em solução de etanol decrescente (90%, 85% e 70%), com posterior lavagem com água, incubação em solução de picrosirius (ScyTek®) por 30 minutos e realização de dois banhos de ácido clorídrico 5%. A contra coloração dos espécimes foi feita com hematoxilina de Harris por 45 segundos e, em seguida, realizou-se a montagem com Enthellan®.

A avaliação dos resultados foi realizada primeiramente pela identificação dos três campos das lâminas em um aumento de 200x, os quais foram fotografados com uso de câmeraDFC 295, acoplada ao Microscópio Leica® DM 2000, seguida pelas análises das fotomicrografias pelo *software* Image J® (RSB) (figura 6). As fotomicrografias foram tomadas em luz convencional e em luz polarizada em cada campo no maior aumento (200x). Após a tomada da fotomicrografia em luz convencional, foi realizada a calibração das imagens pelo comando Color Thershold (Image>Adjust> Color Thersold) na função RGB, para as cores Vermelho (Mínimo de

71 e Máximo de 255), Verde (Mínimo de 0 e Máximo de 69) e azul (Mínimo de 0 e Máximo de 92).

Após a calibração, as imagens foram convertidas para a escala de cor de 8-bits (Image>Type> 8-bits), binarizadas (Process>Binary>MakeBinary) e mensuradas através da porcentagem de área de colágeno marcada em vermelho (Analyse>AnalyseParticles). As imagens em luz polarizada seguiram o mesmo protocolo na função RGB para Vermelho (Mínimo de 0 e Máximo de 255), Verde (Mínimo de 0 e Máximo de 255) e azul (Mínimo de 0 e Máximo de 32). Após ajuste, as imagens foram convertidas para a escala de cor de 8-bits (Image>Type> 8-bits), binarizadas (Process>Binary>MakeBinary), e mensuradas através da porcentagem de área de colágeno com birrefringência amarelo avermelhada (compatível com colágeno tipo I). Em seguida, do total da área marcada em vermelho, foi separado um percentual da região ocupada somente pela birrefringência amarelo avermelhada. A área verde esbranquiçada, relativa ao colágeno tipo III, foi obtida pela subtração da região total marcada em vermelho e o percentual marcado unicamente pela cor amarelo avermelhada.

Figura 6 - Quantificação do colágeno (Software ImajeJ).



Fonte: próprio autor

### **3.4 Análise Estatística**

Os dados foram tabulados no Microsoft Excel, exportados para o software GraphPadPrism 5.0 no qual as análises foram realizadas adotando uma confiança de 95%. Após avaliação da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, foi expressa a média e os erros padrão de cada grupo, comparados por meio do teste Friedman, seguido do pós-teste de Dunn (dados não-paramétricos), para avaliação dos resultados do colágeno tipo I e tipo III entre os campos. Também foram avaliadas a relação de colágeno I / III (divisão de colágeno I pelo colágeno III) em cada um dos campos de cada amostra do ligamento cruzado anterior, perfazendo um total de 30 amostras analisadas estatisticamente.

#### 4. RESULTADOS

Os dez ligamentos cruzados avaliados provenientes de 06 fetos foram de 06 joelhos direitos e de 04 joelhos esquerdos, com peso gestacional entre 320 g e 1346 g e idade gestacional que variava entre 21 semanas e 37 semanas

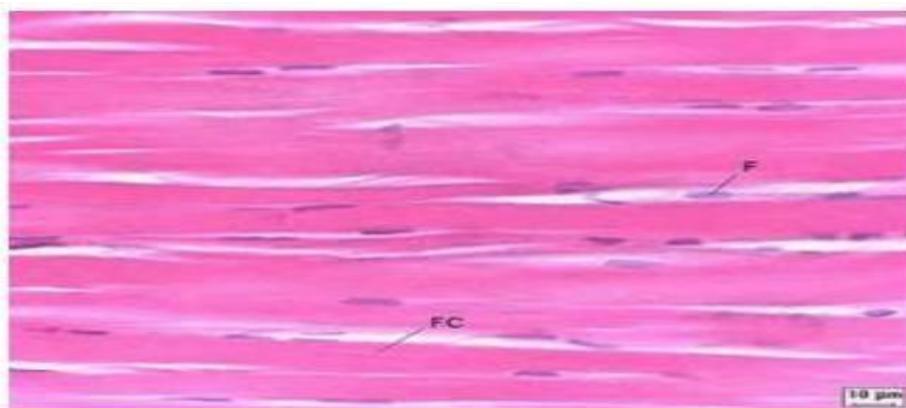
Tabela 1 - Identificação, lado, peso e idade do feto.

<b>IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA</b>	<b>SEXO</b>	<b>LADO</b>	<b>PESO</b>	<b>IDADE GESTACIONAL</b>
101	Feminino	Direito	1346g	31 semanas
102	Masculino	Bilateral	320g	22 semanas
103	Feminino	Bilateral	405g	26 semanas
104	Feminino	Bilateral	880g	25 semanas
108	Masculino	Bilateral	415g	21 semanas
110	Masculino	Direito	418g	37 semanas

Fonte: próprio autor

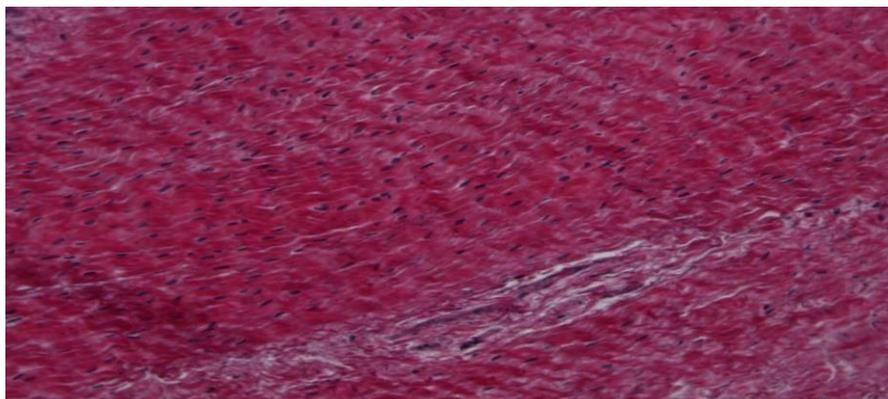
Foram obtidas imagens das lâminas para posteriormente serem analisadas e quantificadas nos três campos: campo 1, 2 e 3, em que o campo 1 representa a área mais próxima da inserção na tíbia, o campo 2 representa a área intermediária (corpo do LCA) e o campo 3 representa a região mais próxima do fêmur. Inicialmente, observamos as lâminas em hematosilina-eosina (figura 7), seguida das imagens em picrosirius sem polarização (figura 8), em que mostra o colágeno total, seguido de imagens com polarização, em que se observou predomínio do colágeno tipo I (figura 9) ou do colágeno III (figura 10).

Figura 7 - Imagem corada hematosilina-eosina (colágeno).



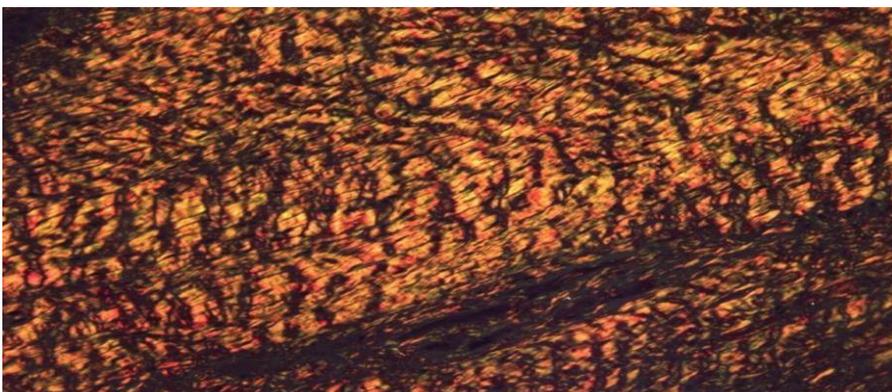
Fonte: [sobiologia.com.br/conteudos/Histologia](http://sobiologia.com.br/conteudos/Histologia)

Figura 8 - Imagem corada em picrosirius sem polarização (Colágeno total)



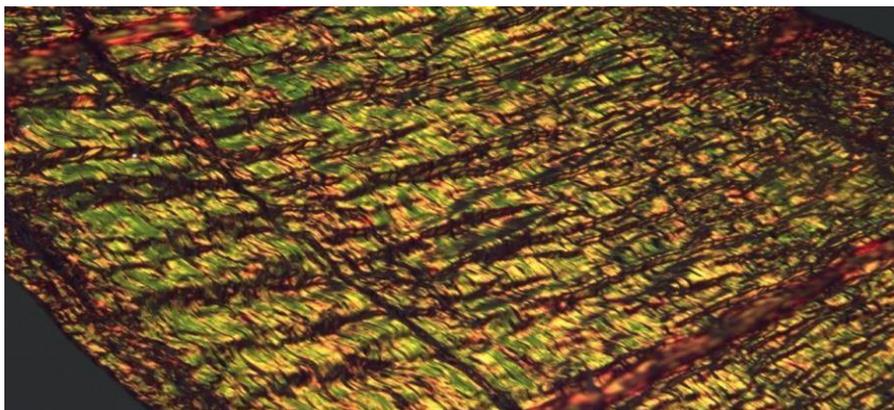
Fonte: Próprio autor

Figura 9 - Imagem corada Picrosirius com polarização (Colágeno I)



Fonte: próprio autor

Figura 10 - Imagem corada Picrosirius com polarização (Colágeno III)



Fonte: próprio autor

O campo 1, que representa o campo distal do LCA, inserção na tíbia, apresentou uma composição de colágeno tipo I que variou entre 25,27% e 90,80%, com uma média de 65,51%, enquanto a composição de colágeno tipo III variou entre 3,6% e 36,26%, com uma média de 21,03% (tabela 2).

Tabela 2 - Percentual colágeno I e III no campo 1.

**PERCENTUAL DE COLÁGENO NO CAMPO 1**

<b>IDENTIFICAÇÃO DO FETO</b>	<b>COLÁGENO TIPO I (%)</b>	<b>COLÁGENO TIPO III (%)</b>
101 d	80,10	15,40
102 d	74,20	3,60
102 e	87,70	8,70
103 d	73,80	22,40
103 e	35,24	36,26
104 d	58,40	32,70
104 e	52,60	30,60
108 d	90,80	8,40
108 e	77,00	22,80
110 d	25,20	29,43
<b>MÉDIA</b>	<b>65,51</b>	<b>21,03</b>

Fonte: próprio autor

O campo 2, que representa o campo intermediário no LCA, apresentou uma composição de colágeno tipo I que variou entre 32,01% e 86,40%, com uma média de 56,75%, enquanto a composição de colágeno tipo III variou entre 6,70% e 43,90%, com uma média de 25,44% (tabela 3).

Tabela 3 - Percentual colágeno I e III no campo 2.

<b>PERCENTUAL DE COLÁGENO NO CAMPO 2</b>		
<b>IDENTIFICAÇÃO DO FETO</b>	<b>COLÁGENO TIPO I (%)</b>	<b>COLÁGENO TIPO III (%)</b>
101 d	76,20	20,30
102 d	66,30	14,90
102 e	71,40	6,70
103 d	55,80	24,30
103 e	32,01	38,39
104 d	47,10	37,10
104 e	38,10	31,10
108 d	86,40	13,50
108 e	53,60	43,90
110 d	40,57	24,23
<b>MÉDIA</b>	<b>56,75</b>	<b>25,44</b>

Fonte: próprio autor

O campo 3, que representa a parte proximal do LCA, apresentou uma composição de colágeno tipo I que variou entre 18,18% e 85,40%, com uma média de 60,59%, enquanto a composição de colágeno tipo III variou entre 3,70% e 37,52%, com uma média de 23,54% (tabela 4).

Tabela 4 - Percentual colágeno I e III no campo 3.

<b>PERCENTUAL DE COLÁGENO NO CAMPO 3</b>		
<b>IDENTIFICAÇÃO DO FETO</b>	<b>COLÁGENO TIPO I (%)</b>	<b>COLÁGENO TIPO III (%)</b>
101 d	70,80	21,50
102 d	68,10	14,70
102 e	85,40	3,70
103 d	73,50	17,30
103 e	56,58	25,52
104 d	47,50	30,20
104 e	50,10	21,80
108 d	73,60	26,00
108 e	62,10	37,20
110 d	18,18	37,52
<b>MÉDIA</b>	<b>60,59</b>	<b>23,54</b>

Fonte: próprio autor

A avaliação da quantificação total de colágenos I e III quando considerados os 03 campos do LCA apresentou um percentual de colágeno I que variou entre 18,18% e 90,80% com uma média de 60,95% e de colágeno tipo III que variou entre 3,60% e 43,90% com média de 23,34% (tabela 5).

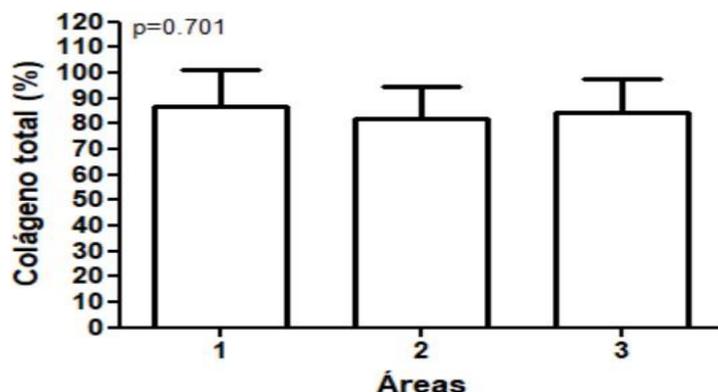
Tabela 5 - Análise percentual geral entre as concentrações (%) de colágenos entre os campos analisados.

Areas	Colágeno total (%)			Colágeno tipo I (%)			Colágeno tipo III (%)			Razão Colágeno Tipo I/III		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<b>Amostra</b>												
101d	95,50	96,50	92,30	80,10	76,20	70,80	15,40	20,30	21,50	5,20	3,75	3,29
102d	77,80	81,20	82,80	74,20	66,30	68,10	3,60	14,90	14,70	20,61	4,45	4,63
102e	96,40	78,10	89,10	87,70	71,40	85,40	8,70	6,70	3,70	10,08	10,66	23,08
103d	96,20	80,10	90,80	73,80	55,80	73,50	22,40	24,30	17,30	3,29	2,30	4,25
103e	71,50	70,40	82,10	35,24	32,01	56,58	36,26	38,39	25,52	0,97	0,83	2,22
104d	91,10	84,20	77,70	58,40	47,10	47,50	32,70	37,10	30,20	1,79	1,27	1,57
104e	83,20	69,20	71,90	52,60	38,10	50,10	30,60	31,10	21,80	1,72	1,23	2,30
108d	99,20	99,90	99,60	90,80	86,40	73,60	8,40	13,50	26,00	10,81	6,40	2,83
108e	99,80	97,50	99,30	77,00	53,60	62,10	22,80	43,90	37,20	3,38	1,22	1,67
110d	54,70	64,80	55,70	25,27	40,57	18,18	29,43	24,23	37,52	0,86	1,67	0,48
<b>Média</b>	<b>86,54</b>	<b>82,19</b>	<b>84,13</b>	<b>65,51</b>	<b>56,75</b>	<b>60,59</b>	<b>21,03</b>	<b>25,44</b>	<b>23,54</b>	<b>5,87</b>	<b>3,38</b>	<b>4,63</b>
<b>DP</b>	<b>14,74</b>	<b>12,42</b>	<b>13,38</b>	<b>22,04</b>	<b>17,92</b>	<b>18,89</b>	<b>11,46</b>	<b>12,07</b>	<b>10,30</b>	<b>6,29</b>	<b>3,12</b>	<b>6,60</b>

Fonte: próprio autor

A análise estatística demonstrou que não há diferença de concentração de colágeno total significativa entre as áreas estudadas (gráfico 1).

Gráfico 1 - Quantificação do colágeno total entre os campos

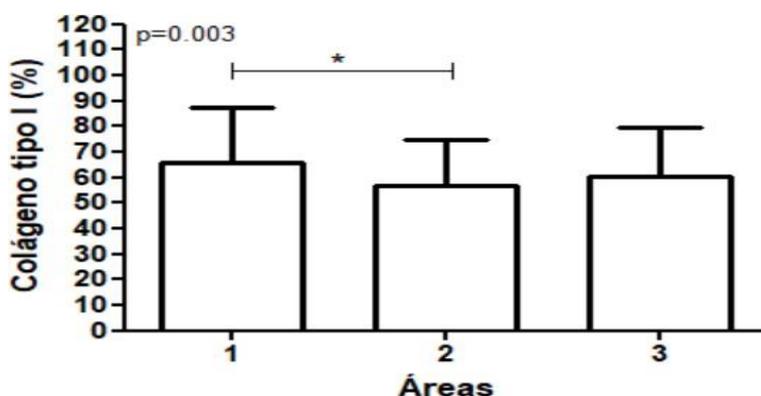


Fonte: próprio autor

A relação do colágeno tipo I e III quando avaliados em cada campo de cada amostra mostrou uma diferença significativa na concentração de colágeno tipo I entre os campos 1 e 2. Qualquer outra relação entre as áreas não mostrou significância estatística (gráfico 2 e 3).

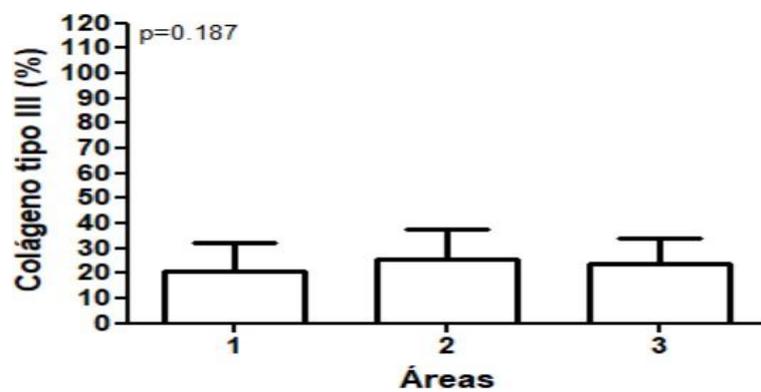
Gráfico 2 - Quantificação do colágeno tipo I nos campos 1, 2, 3

\* $p < 0,05$ , teste Friedman/Dunn (média  $\pm$  DP)



Fonte: próprio autor

Gráfico 3 - Quantificação do colágeno tipo III nos campos 1, 2, 3.



Fonte: próprio autor

## 5. DISCUSSÃO

Em levantamento da literatura, não encontramos nenhum artigo sobre estudo de colágeno em LCA de fetos humanos, sendo este um estudo pioneiro sobre sua histomorfometria. Stalling (2008) fez um estudo de crescimento de colágeno tipo I de fetos e adultos, com crescimento *in vitro*, para estudo de suas velocidades de reparação. Hyunkim (2022) fez estudo comparando fibras de colágeno do ligamento fibulotalar anterior de fetos e adultos. Estudos mais recentes, em fetos humanos, de ligamentos, em nível de joelho, concentram-se mais na pesquisa do ligamento ântero-lateral (SOBZERMAN, 2017) (HELITO, 2017). Outros estudos sobre LCA em fetos, com maior número de amostras foram encontrados, mas com animais como coelhos e bovinos (BLAND-1996) (WAN, 2013) (HUDSON, 2021).

Os métodos de polarização por coloração picrosirius red para distinguir os colágenos tipo I e tipo III, têm sido amplamente utilizados para determinar o conteúdo de colágeno em vários tecidos moles, tais como pele, pulmão, cartilagem, ligamento articular, ligamento periodontal, ligamento vocal e tendão, e têm se mostrado um método confiável para avaliação dessas estruturas (WAN; HAO; WEN, 2013). Esse método mostrou resultados semelhantes aos obtidos com imuno- histoquímica na avaliação de colágeno (CUTTLE et al., 2005).

Nordin, Frankel (2001) descreveu que os ligamentos são materiais compostos biológicos que geralmente consistem em fibras de substância fundamental, colágeno e elastina e que os colágenos tipos I e III são seus principais constituintes, sendo que o colágeno tipo I representa aproximadamente 90% e o tipo III é responsável pelo restante. Junqueira, Bignolas e Brentani (1978) sugeriram que o colágeno tipo I é, principalmente, espesso e densamente acondicionado em fibrilas espessas, mais resistentes, enquanto que o colágeno tipo III é, principalmente, composto por finas fibras, mais elásticas. A diferença entre o diâmetro das fibras do colágeno I e III foram estatisticamente significantes (WAN; HAO; WEN, 2013).

Silver, Horvath e Foran (2002) mostraram que a molécula de colágeno tipo III é mais flexível que a molécula de colágeno tipo I; assim, fibras ricas em colágeno tipo III são mais extensíveis que aquelas ricas em colágeno tipo I, ou seja, o colágeno tipo III é menos rígido que o colágeno tipo I. portanto, as distribuições não homogêneas

dos vários tipos de colágeno podem explicar parcialmente as propriedades de material heterogêneo dos ligamentos.

O presente estudo mostrou que nas dez amostras do LCA, nos três campos estudados, houve um percentual superior significativo de colágeno tipo I (60,95%) em relação ao colágeno tipo III (23,34%). O colágeno tipo III teve uma concentração maior no campo 2 (25,44%) em seguida no campo 3 (23,54%) e por último no campo 1 (21,03%). No adulto, a literatura (DUTHON et al, 2008) descreve, embora sem quantificar, que no LCA o colágeno tipo III tem uma distribuição sempre presente, com concentrações maiores, em suas extremidades, não havendo concordância com nosso estudo, que mostrou maior concentração de colágeno tipo III no seu corpo, campo 2, e maior concentração de colágeno tipo I em suas extremidades.

A relação do colágeno tipo I e tipo III foi alternando nos diferentes campos estudados, entretanto entre os campos 1 e 3 não houve diferença estatisticamente significativa, mas esta diferença foi significativa quando se comparou os campos 1 e 2. Isso mostra que o percentual de colágeno tipo I em relação ao colágeno tipo III foi superior no campo , o que demonstra um predomínio do colágeno tipo I na estrutura distal e mesmo proximal do ligamento, embora sem significância estatística, concordando ao estudo de Wan, Hao, Wen (2014). Esses autores mostram as distribuições de colágeno tipo I e tipo III em ligamentos colaterais mediais de coelho, sendo o conteúdo de colágeno tipo I significativamente menor na porção central dos ligamentos do que na periferia. Das Chagas e at (2018) em estudo semelhante ao nosso, em fetos humanos, mostra a concentração de colágeno tipo I e III em ligamento glenoumeral inferior, demonstrando uma menor concentração de colágeno tipo I na porção intermediária.

O LCA é uma das principais estruturas estabilizadoras do joelho, sendo o ligamento mais frequentemente lesado nessa articulação, sendo que, sua ruptura, frequentemente, ocorre em sua porção proximal, na própria substância ou na sua inserção femoral (INSALL, 2019). Isso se deve as características do ligamento, pois como mostraram Duthon et al.(2006), ele não só é o principal restritor à translação anterior da tíbia em relação ao fêmur como também funciona como um importante restritor secundário à rotação interna, e as tensões em varo e valgo particularmente quando a articulação está próxima da extensão total. O LCA pode desempenhar sua função devido às suas propriedades estruturais únicas. Sampaio et al.(2001)

descrevem que as características do colágeno, no feto, assemelham-se em forma e estrutura, a do adulto a partir da 20ª semana. Pinheiro Junior et al.(2003) demonstraram, em adultos, que na fase elástica e na fase de rigidez, sob estresse, em ligamento glenoumeral inferior(LGUI), existe tendência a alongamento com alteração estrutural, sem ruptura, da porção central e tendência a ruptura em suas extremidades, inserções ósseas. Das Chagas et al.(2018) demonstraram, em fetos humanos, que a concentração de colágeno tipo III no LGUI é maior na sua porção central. Se tivermos no LCA do adulto, uma maior concentração de colágeno tipo III, na porção intermediária, como temos no feto, e considerando a fase elástica e de rigidez como demonstrou Pinheiro Junior (2003), esse poderia ser um fator protetor para haver menor índice de ruptura das fibras do LCA em sua porção intermediária.

Asgari et al (2017) obtiveram resultados que indicaram que as proporções de colágeno tipo I e tipo III variam entre as diferentes faixas etárias, pois à medida que a idade aumenta a proporção de colágeno tipo I, também, aumenta. Em contraste, a proporção de colágeno tipo III diminuiu. As alterações, no colágeno tipo I e tipo III durante a maturação de ligamentos saudáveis, são similares à variação nos conteúdos de colágeno durante a fase inicial da cicatrização do ligamento.

A ruptura do ligamento e as propriedades mecânicas mudam com a idade, visto que as mudanças no tipo I e tipo III de colágeno durante a maturação de ligamentos saudáveis são semelhantes à variação no conteúdo de colágeno durante a fase precoce da cicatrização do ligamento. Esse achado é potencialmente atribuído à diminuição do crescimento ligamentar observado com o envelhecimento, à medida que a idade aumenta o colágeno tipo I aumenta e o colágeno tipo III diminui. Isso indica que os ligamentos se tornam mais rígidos à proporção que o colágeno tipo III reduz, existindo assim uma correlação significativa entre o conteúdo de colágeno (incluindo colágeno tipo I e tipo III) e as propriedades mecânicas dos ligamentos. A alteração na razão da produção de colágeno tipo I e colágeno tipo III está altamente relacionada à idade cronológica, (HAYES et al., 2002).

As rupturas do LCA são determinadas por vários fatores de risco extrínsecos e intrínsecos, incluindo aqueles hormonais, neuromusculares, anatômicos e genéticos (STEPIEN-SLODKOWSKA, 2017). A maioria das rupturas do LCA ocorre em atletas por mecanismo sem contato e em menor incidência por trauma direto na face lateral do joelho, e esses atletas tendem a ter ruptura do LCA mais jovens (EVANS

JENNIFER, 2023). Com a tendência observada de aumento do colágeno tipo I e diminuição do colágeno tipo III com a progressão da idade e do conhecimento de suas propriedades (HAYES et al., 2002), poderia-se sugerir que o tipo de colágeno também seria um fator para diminuir a incidência da lesão do LCA em pacientes de mais idade.

Apesar de a literatura mostrar a modificação do tipo de colágeno com o avançar da idade, teve-se a dificuldade em encontrar trabalho comparativo do LCA entre fetos e adultos, portanto é importante que se realize esse estudo comparativo em trabalhos subsequentes, para melhor compreensão da lesão do LCA. Esse trabalho apresentou dez amostras, considerada pequena, o que torna necessário aumentar esse número, assim como realizar estudos em adultos, para observar se ocorre o aumento da relação colágena I/III com o avançar da idade e a importância dessa composição de colágeno nos ligamentos em diferentes faixas etárias para buscar um melhor entendimento do comportamento biomecânico.

## 6. CONCLUSÃO

A histomorfometria demonstrou que o colágeno tipo I apresenta um percentual maior do que o colágeno III em toda estrutura estudada do LCA, entretanto a relação do colágeno tipo I/III é maior na parte distal, próximo a inserção tibial, do LCA que nas demais partes.

## REFERÊNCIAS

ALVES, A.P.N.N; LIMA VERDE,M.E.Q; FERREIRA JUNIOR,A.E; SILVA,P.G.B; FEITOSA,V.P; LIMA JÚNIOR,E.M; MIRANDA,M.J.B;MORAES FILHO,M.O. Avaliação microscópica, estudo histoquímico e análise de propriedades tensiométricas da pele de tilápido Nilo, **Rev Bras Queimaduras**;14(3);203-10,2015.

AMIS AA (1985) Biomechanics of ligaments. In: Jenkins DHR (ed) Ligament injuries and their treatment. **Chapman and Hall, London**, pp 3-28

AMIS AA, DAWKINS GPC (1991) Functional anatomy of the anterior cruciate ligament. Fibre bundle actions related to ligament replacements and injuries. **J Bone Joint Surg** 73(B):260-267

ARNOCZKY SP (1983) Anatomy of the anterior cruciate ligament. **Clin Orthop** 172:19-25

ASGARI, M; LAFITI, N; HERIS, H.K; VALI, H; MONGEAU, L. In vitro fibrillogenesis of tropocollagen type III in collagen type I affects its relative fibrillar topology and mechanics. **SciRep**, May 3;7(1);1392, 2017.

BERNARD M, HERTEL P, HORNUNG H, et al (1997) Femoral insertion of the anterior cruciate ligament. Radiographic quadrant method. **Am J Knee Surg** 10:14-22

BEAULIEU ML, CAREY GE, SCHLECHT SH, WOJTYS EM, ASHTON-MILLER JA. On the heterogeneity of the femoral enthesis of the human ACL: microscopic anatomy and clinical implications. **Exp Orthop**. 2016 Dec;3(1):14

BLAND YS, ASHHURST DE. Changes in the distribution of fibrillar collagens in the collateral and cruciate ligaments of the rabbit knee joint during fetal and postnatal development. **Histochem J**. 1996 May;28(5):325-34.

CUTTLE, L; NATAATMADJA, M.J; FRASER KEMPF, M; KIMBLE, R.M. Colágeno na pele ferida fetal sem cicatriz Detecção com polarização de Picrosirius . **Wound Repair and Regeneration** 13 : 198-204, 2005.

DAS CHAGAS J , PINHEIRO JR A, LEITE J. Expressão do colágeno Tipo I e Tipo III na banda anterior do ligamento glenoumeral inferior em fetos humanos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza 2018.

DUARTE, F. O. S. Propriedades funcionais do colágeno e sua função no tecido muscular. Programa de Pós - Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2011.

DUTHON, BAREA C, ABRASSART S, FRITSCHY D, MENETREY J, (2006) Anatomy of the anterior cruciate ligament. **KSSTA-** volume 14, pages 204-213

ELLISON AE, BERG EE (1985) Embryology, anatomy, and function of the anterior cruciate ligament. **Orthop Clin North Am** 16:3-14

EVANS J, MABROUK A, NIELSON J. Anterior Cruciate Ligament Knee Injury. 2023 Nov 17. In: **StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024** Jan-

FILBAY S, GRINDEM H, Evidence-based recommendations for the management of anterior cruciate ligament (ACL) rupture, **Best Pract Res Clin Rheumatol.** 2019 Feb; 33(1): 33-47

FRIESS, W. Collagen – biomaterial for drug delivery. **European Journal of Pharmaceuticsand Biopharmaceutics**, vol. 45, no. 2, p.: 113-136, 1998

GALENUS: On the usefulness of the parts of the body, Vol. 2. Transled and edited by **M.T.May.Ithaca**, New York, Cornell University Press, 1968.

GARTNER & HIATT. **Tratado de Histologia**. 4 edição in: LESLIE P.GARTNER. Op. cit.,pp. 75-76, 138, 2017

GIRGIS FG, MARSHALL JL, MONAJEM ARSA (1975) The cruciate ligaments of the knee joint. Anatomical, functional and experimental analysis. **Clin Orthop** 106:216-231

GOLDBERG & RABINOVITCH. **Tratado de Histologia**. 4 edição Op. cit., pp 132, 134, 137-138, 2017

GRAY H (1975) **Anatomy of the human body**, 29th edn. In: Goss CM (eds) Lea & Febiger, Philadelphia, PA

HARNER CD, LIVESAY GA, KASHIWAUGUCHI S, FUJIE H, CHOI NY, WOO SL-Y (1995) Comparative study of the size and shape of human anterior and posterior cruciate ligaments. **J Orthop Res** 13:429-434

HAYES, K; CALLANAN, M; WALTON, J; PAXINOS, A; MURRELL, G.A. Shoulder instability: management and rehabilitation. **J Orthop Sports Phys Ther** ;32: 497-509,2002

HELITO CP, DO PRADO TORRES JA, BONADIO MB, ARAGÃO JA, DE OLIVEIRA LN, NATALINO RJ, PÉCORÁ JR, CAMANHO GL, DEMANGE MK. Anterolateral Ligament of the Fetal Knee: An Anatomic and Histological Study. **Am J Sports Med**. 2017 Jan;45(1):91-96

HYUKIM J, ZHE WU JIN , SHOGO HAYASHI , GENERAL MURAKAMI , JOSE FRANCISCO RODRIGUEZ-VAZQUEZ , HIROSHI ABE Major change in morphology of the talofibular ligaments during fetal development and growth. **Surg Radiol Anat** 2022 Aug;44(8):1121-1129.

HOLLIS JM, TAKAI S, ADAMS DJ, HORIBE S, WOO SL-Y (1991) The effects of knee motion and external loading on the length of the anterior cruciate ligament (ACL): a kinematic study. **J Biomech Eng** 113:208-214

HUDSON DM, ARCHER M, RAI J, WEIS M, FERNANDES RJ, EYRE DR. Age-related type I collagen modifications reveal tissue-defining differences between ligament and tendon. **Matrix Biol Plus**. 2021 Jun 2;12:100070.

INSALL & SCOTT. **Cirurgia do joelho** 6ª edição, 2019. Elsevier Editora Ltda.

JUNQUEIRA, L.C.U; BIGNOLAS, G; BRENTANI, R.R. Picrosirius staining plus polarization microscopy. A sensitive and specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem. J**; 11:447-55,1978

JUNQUEIRA, L.C.U; CARNEIRO, J. Tecidos conjuntivos. In: JUNQUEIRA, L.C.U.;CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.65-87, 1999.

JUNQUEIRA, L.C.U., COSSERMELLI, W., BRENTANI, R.R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. **Archivum Histologicum Japonicum**, v.41, p.267-274, 1978.

JUNQUEIRA, L. C U. & JUNQUEIRA, L.M.M.S. Técnicas Básicas de Citologia e Histologia.Livraria e Editora São Paulo, 123 p, 1983

JUNQUEIRA, L.C.U; MONTES, G.S; SANCHEZ, E.M. The influence of tissue on the study of collagen by the picrosirius-polarization method. **Histochemistry**; 74:153-6, 1982

KENNEDY JC, ALEXANDER IJ, HAYES KC. (1982) Nerve supply of the human knee and its functional importance. **Am J Sport Med** 10:329-335.

MAHASSEN, L.M.A; SADEK,S.A. Developmental Morphological and Histological Studies on Structures of the Human Fetal Shoulder Joint . **Cells Tissues Organs** ,170:1-20, 2002

PINHEIRO JUNIOR JA, LEITE JA, MELO FE, CAVALCANTE JS, CAMPOS AC, MOTA CW. Propriedades biomecânicas da banda anterior do ligamento glenoumeral inferior submetido a estresse. **Acta Ortop Bras**, 11(2) 2003.

ROBBINS. Patologia estrutural e funcional. c4 6. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan, 2000.**

ROSS MH, PAWLINNA W. **Histologia- texto e Atlas- 7 Edição** op. cit., pp 170-175,2016

SANTANA RC, SATO ACK, CUNHA RL. Emulsions stabilized by heat-treated collagen fibers. **Food Hydrocoll.** ;26(1):73-81.18,2012

SCAPINELLI R (1997). Vascular anatomy of the human cruciate ligaments and surrounding structures. **Clin Anat** 10:151-162

SILVER FH, HORVATH I, FORAN DJ. Mechanical Implications of the Domain Structure of Fiber-Forming Collagens Comparison of the Molecular and Fibrillar Flexibilities of the  $\alpha$ 1-Chains Found in Types I-III Collagen. **J Theor Biol** 216: 243-54, 2002

STALLING S, STEVEN B NICOLL. Fetal ACL fibroblasts exhibit enhanced cellular properties compared with adults. **Clin Orthop Relat Res**2008 Dec;466(12):3130-7

STROCCHI R, DE PASQUALE V, GUBELLINI P, ET AL (1992) The human anterior cruciate ligament: histological and ultrastructural observations. **J Anat** 180:515-519  
Kennedy JC, Alexander IJ, Hayes KC (1982) Nerve supply of the human knee and its functional importance. **Am J Sports Med** 10:329-335

SAMPAIO T, LEITE V, SOUZA J, ANTUNES L. **Rev Bras Ortop.** 2001;36(10):

SABZEVARI S. , RAHNEMAI-AZAR A , ALBERS M , LINDE M, SMOLINSKI P, FU F. Anatomic and Histological Investigation of the Anterolateral Capsular Complex in the Fetal Knee. **Am J Sports Med**-2017 May;45(6):1383-1387

STEPIEN-SLODKOWSKA M, FICEK M, ZIETEK P, (2016). Is the Combination of COL1A1 Gene Polymorphisms a Marker of Injury Risk? **J Sport Rehabil**

TRUBIAN, P.S; CAMPOS, A.C.L; MATIAS, J.E.F. Influência do octreotide na cicatrização de sutura gástrica em ratos: Estudo tensiométrico e da morfometria do colágeno. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba 2004.

VIEIRA, G. B. Cosmiatria nos pacientes com sequelas de queimaduras. **Rev. Personalité**, v9,n. 48, p.9, 2006

WAN, C; HAO, Z.X; WEN, S.Z. A quantitative comparison of morphological and histological characteristics of collagen in the rabbit medial collateral ligament. **Ann Anat** 195 (6): 562-569, (2013)