

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DA JUNÇÃO OSTEOCONDRALE EM  
NECROPSIAS PERINATAIS

Ana Karina Marques Salge

Uberaba, MG

2006

Ana Karina Marques Salge

Alterações morfológicas da junção osteocondral em necropsias perinatais

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Patologia –  
Área de Concentração Patologia Geral, da Universidade  
Federal do Triângulo Mineiro – UFTM, como requisito  
parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Eumenia Costa da Cunha Castro

Uberaba – MG

Dezembro, 2006

S158a Salge, Ana Karina Marques.

Alterações morfológicas da junção osteocondral em necropsias perinatais / Ana Karina Marques Salge. - - 2006.

Universidade Federal do Triângulo Mineiro, 2006.

78 f.: tab.; fig + anexos.

Tese - Doutorado em Patologia – Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2006.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Eumenia Costa da Cunha Castro

1. Costelas. 2. Morfologia. 3. Necropsia. I. Título. II. Castro, Eumenia Costa da Cunha.

NLM – WE715

Este trabalho foi realizado graças aos auxílios financeiros recebidos da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), da Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba (FUNEPU), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## Sumário

Lista de Abreviaturas.....	i
Lista de Tabelas.....	iii
Lista de Figuras.....	vi
1. Introdução.....	02
2. Hipótese.....	11
3. Objetivos.....	13
4. Material e Métodos.....	15
5. Resultados.....	20
6. Discussão.....	35
7. Conclusão.....	42
8. Resumo.....	45
9. Abstract.....	47
10.Referências Bibliográficas.....	49
11.Anexos.....	55

## Lista de Abreviaturas

Ala: Alanina

AMC: Aumento de Matriz Cartilaginosa

ANOVA: Análise de variância

BMP: Bone Morphogenetic Protein

BZ: Conformação Bizarra

Ca<sup>+2</sup>: cálcio

CID: Classificação Internacional das Doenças

CME: Células da Medula Óssea nos Canais de Ossificação

COMP: Proteína Oligomérica da Matriz Cartilaginosa

DAB: 3,3' Diaminobenzidine

DNA: ácido desoxirribonucléico

Fig: Figura

FMRP/USP: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

HE: Hematoxilina –Eosina

H: Teste de Kruskal-Wallis

HC-FMRP/USP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

HE-UFTM: Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Gly: Glicina

JOC: Junção Osteocondral

kd: Kilo Daltons

MCO: aumento de matriz cartilaginosa e formação de osso próximo à cartilagem com presença de células da medula óssea nos canais de ossificação

mm: Milímetros

Med: Mediana

n: Número de casos

OMS: Organização Mundial da Saúde

pH: Potencial de Hidrogênio

RCIU: Restrição de Crescimento Intra-uterino

SIDS: Síndrome da Morte Súbita Infantil

T: Teste de Mann-Whitney

TMA: Tricrômico de Masson Azul

UFTM: Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Vmax: Valor Máximo

Vmin: Valor Mínimo

µm: Micrômetros

p: Probabilidade

$X \pm DP$ : Média  $\pm$  Desvio Padrão

"t": Teste de Student

$\chi^2$ : Teste do qui quadrado

%: porcentagem

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Média de idade e gênero das crianças necropsiadas em que analisamos a junção osteocondral, no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, durante o período de 1999 a 2005.....20

Tabela 2: Descrição das doenças de base e causas de óbito das crianças necropsiadas em que analisamos a junção osteocondral, no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, durante o período de 1999 a 2005.....21

Tabela 3: Relação das diferentes alterações morfológicas da JOC em crianças necropsiadas no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, durante o período de 1999 a 2005.....23

Tabela 4: Associação entre as alterações morfológicas da JOC e a época do óbito perinatal das crianças necropsiadas no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, durante o período de 1999 a 2005.....24

Tabela 5: Associação entre as alterações morfológicas da JOC e a época do óbito perinatal das crianças necropsiadas no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo

Mineiro e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, durante o período de 1999 a 2005.....24

Tabela 6: Relação entre as alterações morfológicas da JOC e a idade do óbito das crianças necropsiadas no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, durante o período de 1999 a 2005.....26

Tabela 7: Relação entre as alterações morfológicas da JOC e o processo de RCIU em natimortos necropsiados no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, durante o período de 1999 a 2005.....27

Tabela 8: Relação entre a presença de osso próximo à cartilagem com presença de células da medula óssea nos canais de calcificação (MCO) na JOC e as malformações congênitas das crianças necropsiadas no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, durante o período de 1999 a 2005.....28

Tabela 9: Descrição das malformações congênitas presentes nos casos de osso próximo à cartilagem com presença de células da medula óssea nos canais de calcificação (MCO) na JOC das crianças necropsiadas no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, durante o período de 1999 a 2005.....29

Tabela 10: Associação entre as alterações morfológicas da JOC e as doenças respiratórias em crianças necropsiadas no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, durante o período de 1999 a 2005.....30

Tabela 11: Associação entre as alterações morfológicas da JOC e as alterações placentárias nas crianças necropsiadas no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, durante o período de 1999 a 2005.....30

Tabela 12: Distribuição das medidas da camada hiperplásica e proliferativa nos grupos de alterações morfológicas da JOC de pacientes prematuros necropsiados no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, durante o período de 1999 a 2005.....31

Tabela 13: Distribuição das medidas da camada hiperplásica e dos grupos de alterações morfológicas da JOC em crianças necropsiadas no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, durante o período de 1999 a 2005.....32

Tabela 14: Expressão da COMP na análise imunohistoquímica da JOC de crianças necropsiadas no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e no

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, durante o período de 1999 a 2005.....	33
---	----

## Lista de Figuras

### Prancha 1: Macroscopia da junção osteocondral

Figura A: Junção Osteocondral das costelas, coletada durante a necropsia.

Figura B: Foram coletadas as junções osteocondrais da 5<sup>a</sup> e da 6<sup>a</sup> costelas bilateralmente.

### Prancha 2: Análise morfométrica e morfológica da junção osteocondral

Figura A: Junção Osteocondral normal, (Figura C, TMA-640X) com pouca matriz

extracelular (seta) localizada no limite entre a cartilagem e a trabécula óssea e organização

das colunas de células cartilaginosas nas zonas proliferativa (seta larga) e hiperplásica

(seta).

Figura B: O limite entre a cartilagem e a zona livre de medula óssea e regular e bem

limitado (\*) (HE-640X).

### *Prancha 3: Alterações morfológicas da JOC*

Figura A: Aumento da matriz cartilaginosa (AMC) é diagnosticada quando o aumento da

matriz (seta) ocorre em mais de 50% do comprimento da linha entre a cartilagem e o osso

(HE 640X).

Figura B: Lesão bizarra (BZ) é caracterizada pela completa desorganização das colunas de

células cartilaginosas (HE 640X).

Figura C: A presença de células da medula óssea (seta) nos canais de calcificação (CME) é

encontrada associada aos casos de MCO e AMC (HE 640X).

Figura D: A lesão MCO é caracterizada pela desorganização das colunas de células cartilaginosas com formação de finas trabéculas ósseas (seta) entre a zona hiperplásica e a zona livre de medula (HE 640X).

*Prancha 4: Expressão da proteína oligomérica da matriz cartilaginosa (COMP) na zona hiperplásica da junção osteocondral*

Figura A: Padrão normal de expressão da COMP localizada na membrana citoplasmática (seta) de poucos condrócitos e sem expressão na matriz cartilaginosa .

Figura B: Nos casos com AMC;

Figura C: MCO;

Figura D: BZ identificamos uma expressão da COMP em maior número de condrócitos (cabeça de seta) e também na matriz cartilaginosa (seta) (PAP/DAB 640X).

## 1- Justificativa:

Alguns órgãos fetais apresentam associação com o mecanismo relacionado à morte intra-uterina. O exame anatomopatológico do timo e da supra-renal apresentam alterações histológicas que indicam a presença de uma doença intra-uterina, sendo estes órgãos conhecidos como marcadores de “*stress*” fetal (AGAPITOS et al., 1994; SENIZ, 1992; DOUROV, 1982; DE SÁ et al., 1978).

Outro órgão que possui alterações na vida intra-uterina associadas ao mecanismo que levou à morte é a junção osteocondral (JOC) das costelas fetais.

Crianças com óbito no período perinatal apresentaram, ao exame das costelas, alterações da JOC relacionadas à restrição de crescimento intra-uterino (RCIU), alterações placentárias, desordens maternas e algumas anormalidades congênitas (EMERY; KALPAKTSOGLU, 1967; ROBERTSON; IVEMARK, 1969; SINCLAIR –SMITH et al., 1976; BYARD et al., 1993; JOSHI, 1994).

Os primeiros estudos da JOC das costelas foram realizados na área de cirurgia plástica e cirurgia oral, com o objetivo de estudar o tipo de crescimento da cartilagem da JOC, visando melhorar a qualidade dos enxertos mandibulares em que se utilizavam fragmentos da costela (SARNAT, 1957; MEIKLE, 1973; WARE; BROWN, 1981; KANTOMAA, 1984; COPRAY et al., 1988; PELTOMAKI; ISOTUPA, 1991; PELTOMAKI et al., 2002).

A JOC das costelas de crianças começou a ser estudada no início da década de 60 e estes estudos relacionavam as alterações morfológicas da JOC com alterações de crescimento ósseo causados por distúrbios nutricionais, como o raquitismo. Estudos em crianças no período perinatal demonstraram que intercorrências durante a gestação poderiam causar alterações na JOC e que, pela análise do padrão morfológico da lesão,

seria possível estimar o tempo da doença intra-uterina associada à causa de óbito (EPKER; FROST, 1966; EMERY; KALPAKTSOGLU, 1967; JONES et al., 1969; ROBERTSON; IVEMARK, 1969; SHIMOMURA; FREDERICK, 1973; SINCLAIR –SMITH et al., 1976). A análise da JOC nestas crianças mostrou que cerca de 60% dos nascimentos antes da 32<sup>a</sup> semana de gestação e 75% dos nascimentos pré-termo, apresentaram evidências de sofrimento uterino antes do nascimento (EMERY, 1964; EMERY; KALPAKTSOGLU, 1967; BUCK et al., 1989; WILLIAMS et al., 1990). Na Síndrome da Morte Súbita na Infância foi demonstrada uma desorganização da JOC, que poderia ser usada como um parâmetro para avaliar a duração e a presença de doenças anteriores nestas crianças (SINCLAIR –SMITH et al., 1976; BYARD et al., 1992).

Além disto, anormalidades da JOC foram associadas a malformações bucais, dentais e presença de membrana hialina no pulmão de natimortos e neomortos (JONES et al., 1969; ROBERTSON; IVEMARK, 1969).

Em estudos experimentais, as alterações da JOC foram relacionadas a processos infecciosos e foi demonstrado que em ratos submetidos à estresse, a velocidade de aparecimento das alterações na JOC aumentou (PRATT; MCCANCE, 1960).

As descrições das lesões osteocondrais são freqüentes na literatura, mas, a etiopatogênese do processo permanece desconhecida. O adequado entendimento do crescimento normal da costela pode ser a base para a elucidação dos mecanismos responsáveis pelas alterações encontradas.

## 2- Descrição anatômica das costelas:

As costelas possuem ossificação endocondral e são fitas ósseas arqueadas, de suas junções com a coluna vertebral à porção anterior da parede do tronco. As sete costelas

superiores são ditas costelas verdadeiras, por se articularem com o esterno, através de suas cartilagens. A oitava, nona e décima costelas são ditas falsas por se fixarem ao esterno não só indiretamente, unindo-se suas cartilagens uma à outra e à sétima. As costelas undécima e duodécima, ditas flutuantes, são curtas, terminam entre os músculos da parede lateral do abdome e não possuem cartilagens (GARDNER et al., 1988).

No recém-nascido, as costelas são menos horizontalizadas do que no adulto. Os centros primários de ossificação das costelas aparecem no corpo da costela, no início do quarto mês de vida fetal. Os centros secundários de ossificação para a região da cabeça e do tubérculo da costela aparecem durante a puberdade (CRELIN, 1988).

As costelas são ossos ideais para o estudo do crescimento e desenvolvimento fetal por serem os ossos que possuem o maior crescimento, do ponto de vista linear, durante a vida intra-uterina e por possuírem acesso fácil durante a realização do exame de necropsia. As alterações de crescimento ósseo nas costelas apresentam alterações morfológicas similares àquelas encontradas em ossos longos nas doenças ósseas congênitas (COHEN, 1948; ROY; SARNAT, 1956; EMERY; KALPAKTSOGLU, 1967; BEHMAN, 1976; FAZZALARI et al., 1997).

### 3- Histologia da JOC:

A estrutura histológica da JOC é similar à encontrada em ratos e consiste em várias colunas de células cartilaginosas inseridas no meio de uma matriz celular e trabéculas ósseas (COHEN, 1948; EMERY; KALPAKTSOGLU, 1967; PELTOMAKI, 1994).

As alterações da JOC devem estar associadas às alterações nas zonas que formam a cartilagem: zona de repouso, zona de cartilagem proliferativa, zona de cartilagem hiperplásica, zona de cartilagem calcificada e zona de ossificação, já que a taxa de

crescimento ósseo depende do número de células, da taxa de mitose na zona de proliferação, da quantidade de matriz extracelular produzida e da hipertrofia das células da cartilagem (PELTOMAKI; HAKKINEN, 1992).

A JOC é formada por cartilagem, zona livre medular e osso recém formado. A linha entre a cartilagem e a zona livre medular é estreita. A cartilagem é dividida em três zonas. A zona de repouso, também conhecida como zona de descanso ou zona germinativa, consiste em uma matriz cartilaginosa com células isoladas ou dispostas em pares que parecem estar organizadas ao acaso. Sua exata função ainda causa controvérsia na literatura, alguns autores a consideram inerte e sem participação no crescimento longitudinal ósseo (KEMBER; SISSONS, 1976; ROBERTSON, 1990, PELTOMAKI; HAKKINEN, 1992), enquanto outros acreditam que a aparência estática é meramente ilusória e que qualquer alteração em sua estrutura pode comprometer todo o crescimento ósseo (EMERY; KALPAKTSOGLU, 1967; RING, 1995; CARLSEN et al., 1998; GIANNONI et al., 2003).

A cartilagem cresce de forma linear em colunas e finalmente as células se hipertrofiam. As células da zona hiperplásica sofrem apoptose e deixam filetes de cartilagem na zona livre de medula óssea da JOC que serão utilizados para a formação do novo osso. O comprimento da JOC entre a 5ª e a 6ª costela ao nascimento é de 120 mm. Considerando o tempo total de uma gestação, o padrão de crescimento da JOC é em torno de 220 µm por dia. Diariamente, nos fetos, conjuntos de células cartilaginosas são depositados constantemente em meio a matriz extracelular (EMERY; KALPAKTSOGLU, 1967).

Na zona proliferativa, as células se dividem e formam únicas ou duplas colunas de células orientadas próximas à cavidade da zona medular. Na zona hiperplásica, as células formam colunas, e possuem uma larga área perinuclear, que aumenta de tamanho até as células terminais da zona trabecular, às vezes citada como zona vascular. Estudos demonstram que o mecanismo de morte celular das células da camada hiperplásica pode ocorrer tanto pela diferenciação destas células em osteoblastos quanto com a ocorrência de apoptose nos condrócitos (JONES et al., 1969; ROBERTSON; IVEMARK, 1969; EMERY; KALPAKTSOGLU, 1976; PELTOMAKI; HAKKINEN, 1992; PELTOMAKI, 1994).

A zona proliferativa é a responsável pela produção de matriz cartilaginosa, que em tecidos jovens e na zona de crescimento é encontrada preferencialmente ao redor dos condrócitos, sendo que na JOC das articulações é encontrada em maior quantidade na zona proliferativa (CARLSEN et al., 1998; GIANNONI et al., 2003; WONG et al., 2003). Em relação à zona de repouso e proliferativa, um estudo conduzido em ratos demonstrou a importância da zona proliferativa e da zona de repouso para o crescimento ósseo das costelas e para os transplantes ósseos. Em crianças, a quantidade destas duas zonas é muito importante para o sucesso do enxerto em relação ao crescimento ósseo (PELTOMAKI; HAKKINEN, 1992).

Portanto, o crescimento longitudinal das costelas é o resultado do crescimento da cartilagem costal. É causado pela repetida divisão celular que ocorre na camada proliferativa, que gera mais células para a zona hiperplásica. Nesta zona, os condrócitos aumentam de tamanho e produzem mais matriz extracelular culminando com o crescimento ósseo (PELTOMAKI; HAKKINEN, 1992).

Ossos lamelares só podem crescer por aposição em uma base de substrato já existente, como a cartilagem calcificada ou osso. A cartilagem cresce por proliferação intersticial celular e formação de matriz extracelular. A maior parte do embrião é primeiramente formada por cartilagem, devido à capacidade de crescimento intersticial e proliferação da cartilagem, que exerce um papel importante no desenvolvimento e crescimento do esqueleto fetal (PELTOMAKI; HAKKINEN, 1992).

A matriz cartilaginosa consiste em fibrilas colágenas (predominantemente colágeno tipo II) e substância fundamental amorfa, a qual é formada principalmente de proteoglicanos (proteínas+glicosaminoglicanas). Os glicosaminoglicanos específicos da cartilagem são condroitina-4 e condroitina-6-sulfato e ácido hialurônico. Estes compostos da substância fundamental fornecem à cartilagem sua consistência firme e permite a nutrição de suas células (GRANJEIRO et al., 2005; MAGNE et al., 2005; GOLDRING, 2006).

Da mesma forma, a degradação da matriz cartilaginosa é realizada pelas proteinases, como as catepsinas D, K e L, que degradam o colágeno e os proteoglicanos. Essas enzimas possuem sua ação potencializada em pH ácido, por isso participam de forma ativa do processo de proteólise da cartilagem e do osso. Esse fenômeno é exacerbado em condições especiais como fraturas, ossificação ectópica e durante o desenvolvimento fetal (NAKASE et al., 2000).

A cartilagem hialina forma o esqueleto inicial do feto; é a precursora dos ossos que se desenvolverão a partir do processo de ossificação endocondral. Durante o desenvolvimento ósseo endocondral, a cartilagem hialina funciona como placa de crescimento epifisário e essa placa continua funcional enquanto o osso estiver crescendo em comprimento (MALININ; MALININ, 1999).

#### 4- Descrição da COMP:

Vários fatores influenciam o crescimento e maturação do esqueleto e aquisição de massa óssea em recém-nascidos e em crianças, existindo uma relação estreita e complexa entre eles. Esses fatores são: genéticos, nutricionais, sexuais, hormonais, fatores locais de crescimento e atividade física (DEL RIO et al., 1994; CARRASCOSA et al., 1995; DE LUCA et al., 1999; COLNOT, 2005).

Em relação aos fatores genéticos que controlam a formação da matriz extracelular, a regulação da ossificação endocondral pode ser considerada um processo complexo. Cada estágio de diferenciação é controlado por inúmeros fatores de crescimento, moléculas reguladoras, fatores angiogênicos, proteases e seus inibidores. Fatores mecânicos estão associados à modulação desse processo, bem como a expressão de genes, que aceleram ou retardam a hipertrofia dos condrócitos e a expressão da proteína oligomérica da matriz cartilaginosa – “cartilage oligomeric matrix protein” (COMP) (WONG et al., 2003).

Em 1965, Urist identificou e demonstrou a ação da COMP e de vários outros fatores de crescimento (principalmente as BMP's – “Bone Morphogenetic Protein”) na formação da matriz cartilaginosa, no crescimento celular, na diferenciação e na expressão do fenótipo de vários tipos celulares, incluindo osteoblastos e condrócitos (CHEN et al., 2004).

A COMP é expressa em vários tipos de cartilagens, ligamentos e tendões. Seu principal componente é o colágeno tipo II que é a proteína responsável pela ligação das fibras colagênicas na matriz cartilaginosa. Esta proteína tem 435 kD e contém cinco subunidades de 110 kD, possui a forma de um pentâmero e contém cálcio em sua estrutura. É produzida por condrócitos imaturos e maduros (DEERE et al., 2001).

A importância do estudo da COMP está baseada na ocorrência de mutações e sua relação com as displasias ósseas, pseudocondrodisplasias e as displasias múltiplas epifisárias. Várias alterações estruturais são descritas nessas doenças como sendo resultado de alterações na expressão da COMP, como: desproporção entre peso e altura, frouxidão ligamentar, deformidades no joelho e quadril e osteoartrite. Mais de cinquenta tipos de mutação na COMP foram identificadas em pacientes com essas alterações ósseas, a maior parte delas encontrada na porção que contém cálcio (DEERE et al., 2001).

Os genes envolvidos nas mutações da COMP são os genes pertencentes à família TSP: o gene TSP1, TSP2, TSP3, TSP4 e TSP5. A identificação dos mecanismos de regulação dos genes TSP está associada aos achados de alterações em condrócitos, ligamentos, tendões e fibroblastos (HECHT et al., 1998; DEERE et al., 2001; SVENSSON et al., 2002).

Em estudo experimental, demonstrou-se que a seqüência gênica em ratos e em seres humanos é semelhante, possui pelo menos seis nucleotídeos homólogos (86%) e aminoácido homólogos (90%). Dois tipos de seqüências repetidas são encontradas em ratos, enquanto que em seres humanos existem quatro tipos de repetição e conservação dos vinte e quatro resíduos de cisteína. Acredita-se que a seqüência Gly-265 e Ala-522 e as regiões que contém  $\text{Ca}^{+2}$ , sejam as regiões funcionais e que produzem a ativação das moléculas na COMP. Qualquer mutação em um desses nucleotídeos ou resíduos de cisteína pode ser responsável pela ocorrência de pseudocondrodisplasias e displasias múltiplas epifisárias (HEDBOM et al., 1992; OLDBERG et al., 1992; NEWTON et al., 1994; KIPNES et al., 2000).

Não existem relatos na literatura sobre o local específico de mutação encontrado em alterações JOC, somente alguns estudos relatam os mecanismos básicos de funcionamento

e ativação da COMP, bem como os tipos de mutação, que resultam em algumas doenças genéticas (HEDBOM et al., 1992; OLDBERG et al., 1992; NEWTON et al., 1994; KIPNES et al., 2000).

As pseudocondrodisplasias afetam indivíduos que têm tamanho normal ao nascimento e que apresentam restrição do crescimento só reconhecido a partir dos dois anos de vida (NEWMAN; WALLIS, 2003). É possível que mutações nos genes responsáveis pela codificação da COMP não sejam causadas apenas por fatores gênicos hereditários, mas também, por fatores ambientais como a hipóxia intra-uterina, podendo ter relação com as alterações encontradas nas junções osteocondrais de natimortos.

Os radicais livres gerados pela oxidação do oxigênio podem ser gerados tanto em condições de alta oferta de oxigênio, como em condições de hipóxia. Em estudo realizado em *Caenorhabditis elegans* observou-se que as mutações identificadas no gene *mev-1* mutante desta espécie são mais frequentes em condições de hipóxia (HARTMAN et al., 2004).

Em outro estudo experimental realizado em gatos observou-se que estas substâncias induzem dano no DNA pela ativação da enzima polimerase reparadora do cromossomo e que, esta ativação pode acontecer tanto em estados de hipóxia como em estados de hiperóxia, ambos capazes de gerar radicais-livres derivados da oxidação do oxigênio (STROSZNAJDER et al., 2002).

Apesar das alterações da junção osteocondral serem frequentes em necropsias pediátricas, ainda permanecem dúvidas sobre a etiologia das lesões e a contribuição de cada uma das diferentes camadas da zona de crescimento (camada de repouso, camada proliferativa e camada hiperplásica) e produção de matriz cartilaginosa como causa das alterações da JOC.

As lesões da junção osteocondral das costelas ocorrem por alterações das zonas de crescimento e da produção de matriz cartilaginosa, apresentando diferentes padrões morfológicos dependendo do tipo de doença que levou à morte perinatal.

### **Objetivo geral**

Identificar as alterações morfológicas da junção osteocondral em crianças necropsiadas e os fatores associados com sua patogênese.

### **Objetivos Específicos**

- Identificar as alterações morfológicas das junções osteocondrais em material de autópsia perinatal e a associação com doenças de base e causas de óbito;
- Avaliar morfometricamente as diferentes zonas da cartilagem da junção osteocondral e sua relação com as lesões da JOC;
- Identificar e quantificar a expressão nos condrócitos da proteína oligomérica da matriz cartilaginosa (COMP) e analisar a sua relação com as lesões da JOC.

## **Material e Métodos:**

### 1- Seleção dos pacientes:

Foram utilizadas 254 junções osteocondrais de crianças necropsiadas sequencialmente no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (HE-UFTM), e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP/USP), no período de 1999 até 2005. Foram excluídas do estudo as necropsias realizadas, nas quais não foram coletadas a JOC ou necropsias de pacientes com doenças que apresentaram malformações ósseas.

Foram incluídos todos os pacientes submetidos à necropsia completa que incluiu a coleta da JOC. O projeto foi submetido e aprovado (protocolo nº 504) pela Comissão de Ética em Pesquisa da UFTM.

### 2- Revisão dos laudos de necropsia:

Dos laudos de necropsia foram coletadas as doenças de base, o gênero, a idade do paciente, as causas de óbito e as medidas antropométricas. As doenças de base e as causas de óbito foram agrupadas de acordo com os critérios estabelecidos pela 10ª Revisão da Classificação Internacional de Doenças (CID-10).

Definiu-se como natimorto todo feto com idade gestacional igual ou superior a 22 semanas e/ou peso maior ou igual a 500 gramas, cujo óbito ocorreu antes da separação completa do corpo materno e que, ao nascer, não tenha apresentado quaisquer das seguintes manifestações compatíveis com a vida: batimentos cardíacos, pulsação de cordão umbilical ou movimento de músculos voluntários, de acordo com a 10ª Revisão da Classificação Internacional de Doenças. O termo neomorto foi utilizado para todos os óbitos que ocorreram no período neonatal (menos de 28 dias) (CARTLIDGE; STEWART, 1995).

A restrição de crescimento intra-uterino dos fetos foi classificada de acordo com o peso no gráfico do percentil 10. Utilizamos o peso, circunferência cefálica, circunferência abdominal, medida do pé e comprimento total e comparamos com a curva normal (LUBCHENCO et al., 1966; BATTAGLIA; LUBCHENCO, 1967; CHAMBERS et al., 1993).

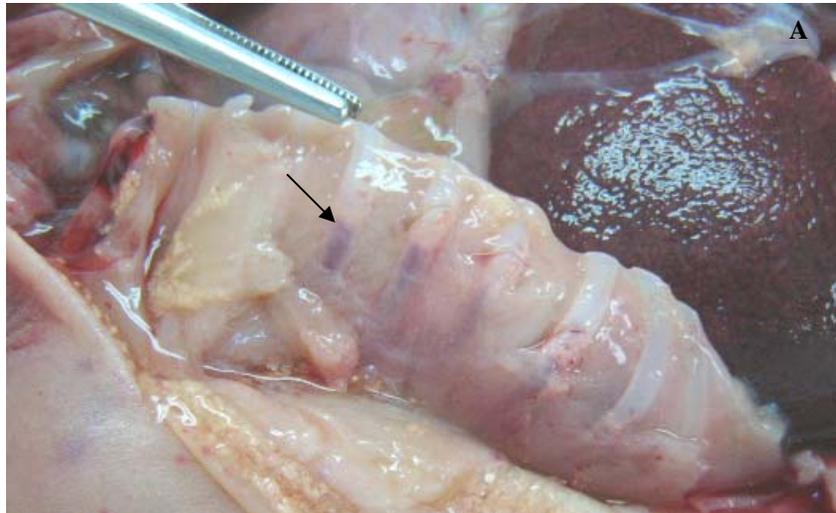
### 3- Coleta das JOC:

Foram coletadas as junções osteocondrais da 5<sup>a</sup> e da 6<sup>a</sup> costelas bilateralmente (Prancha 1; Figura A e B). Estes fragmentos foram fixados em formaldeído a 10% tamponado por 48 horas e descalcificados em ácido tricloroacético 10% por 48 horas. Após, foram imersos em uma solução neutralizante de sulfato de sódio à 5%, durante 8 horas e a reação foi neutralizada com lavagem em água corrente. Posteriormente, foram embebidos em parafina, com a face anterior do corte longitudinal voltada para a face inferior do bloco (EMERY; KALPAKTSOGLU, 1967; ROBERTSON; IVEMARK, 1969).

Os fragmentos foram então processados para a histoquímica e imuno-histoquímica.

### 4- Análise morfológica:

A análise morfológica foi realizada com as lâminas coradas pela coloração de Hematoxilina-eosina (HE) (Prancha 1; Figura C). As lesões da JOC foram classificadas seguindo critérios adaptados dos já descritos na literatura (COHEN, 1948; EMERY, 1964; EMERY; KALPAKTSOGLU, 1967; ROBERTSON; IVEMARK, 1969).



Prancha 1. Junção Osteocondral (seta) das costelas coletada durante a necropsia (Figura A).  
Foram coletadas as junções osteocondrais da 5<sup>a</sup> e da 6<sup>a</sup> costelas (seta) bilateralmente.  
(Figura B).

#### 5- Análise morfológica:

Foi realizada com as lâminas coradas pelo Método de Tricrômico de Masson Azul (TMA) (Prancha 1; Figura D). As medidas foram realizadas utilizando-se uma câmara de vídeo acoplada a microscópio de luz comum, que envia as imagens do microscópio a um sistema analisador de imagens interativo (KS 300 Zeiss® , Kontron, Germany).

Na junção osteocondral foram medidos o comprimento no sentido longitudinal da cartilagem das zonas proliferativa e hiperplásica.

O comprimento de cada camada de todos os casos foi estimado, fazendo-se medidas distribuídas uniformemente pela área visível no vídeo, por todos os campos da lâmina. Utilizamos a objetiva de cinco vezes para estas medidas.

#### 6- Métodos Imuno-histoquímicos:

Foi utilizado o anticorpo policlonal anti-COMP (KAMIYA BIOMEDICAL COMPANY®) para marcação da expressão nos condrócitos da JOC da proteína oligomérica da matriz cartilaginosa (COMP).

Os cortes foram preparados com 5 µm de espessura e fixados nas lâminas com Polilisina®. O complexo secundário (Peroxidase, Avidina Biotina Universal-DAKO®) foi incubado em temperatura ambiente por 30 minutos. A revelação foi feita com 3,3 Diaminobenzidine (DAB), colocando-se o substrato sobre o corte por 7 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz.

As lâminas foram lavadas em água destilada para inativar a diaminobenzidina. A contra coloração foi realizada com Hematoxilina de Harris por 5 segundos. A reação foi interrompida com banhos de água corrente, as lâminas foram desidratadas em bateria de álcool, diafanizadas em xilol e montadas com Entelan®.

Para a análise imuno-histoquímica, os casos normais foram pareados pela idade gestacional com os casos alterados. Em alguns de nossos casos, não foi possível realizar a recuperação anti-gênica.

#### 7- Análise estatística:

Para a análise estatística foi elaborada uma planilha eletrônica. As informações foram analisadas através do programa eletrônico Sigma Stat ®, versão 2.0. Em seguida, as variáveis normais, homocedásticas, foram analisadas utilizando-se testes paramétricos, na comparação entre dois grupos, o teste "t" de Student; e na comparação entre três ou mais grupos a análise de variância (ANOVA), seguidos do teste de Dunn.

Quando a distribuição não foi normal, utilizamos testes não paramétricos, na comparação entre dois grupos, o teste de Mann-Whitney, e na comparação entre três ou mais grupos o teste de Kruskal-Wallis, seguidos do teste de Tukey. As proporções foram comparadas pelo teste do  $\chi^2$ , acompanhado do teste exato de Fisher ou teste de correção de Yates.

Foram consideradas estatisticamente significantes as diferenças em que p foi menor que 5% ( $p < 0,05$ ).

## Resultados

Foram analisadas as alterações morfológicas encontradas na JOC de 254 crianças necropsiadas no HE – UFTM e no HC – FMRP/USP. Destes, 135 casos (53,1%) eram de natimortos e 119 (46,9%) eram crianças com óbito no período neonatal (neomortos). Em relação ao gênero, 100 pacientes (39,4%) eram do gênero feminino, 146 (57,5%) do gênero masculino. Em oito casos (3,1%), não havia o relato sobre o gênero no prontuário. Não há diferença estatisticamente significativa entre a idade em relação ao gênero nos natimortos e nos óbitos neonatais (Tabela 1).

Tabela 1: Média de idade e gênero das crianças necropsiadas em que analisamos a junção osteocondral, no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, durante o período de 1999 a 2005.

Grupo	Idade	n (%)	X±DP	Gênero	n (%)
Natimorto	Semanas	135 (53,1)	30,4±5,6	Masculino	146 (57,5)
Neomorto	Horas	36 (14,2)	6,5±7,8	Feminino	100 (39,4)
	Dias	83 (32,7)	8,5±8,9		
	Total	254 (100)		Total	246 (96,9)*

n: número; X±DP: média ± desvio padrão. \*Em 8 casos não foi identificado o gênero do natimorto.

Os grupos de doenças de base diagnosticadas foram: malformações em 87 casos (34,2%), prematuridade em 40 casos (15,8%), 33 casos (12,9%) de fatores indeterminados e 32 casos (12,6%) de doenças maternas (Tabela 2).

As causas de óbito mais frequentes foram classificadas no grupo de doenças do sistema respiratório e correspondem à 180 casos (70,9%). O segundo grupo de causa de morte mais frequente, foi o grupo das doenças infecciosas, 26 casos (10,2%) seguido pelo grupo das doenças do sistema nervoso, 17 casos (6,7%) (Tabela 3).

Tabela 2: Descrição das doenças de base e causas de óbito das crianças necropsiadas em que analisamos a junção osteocondral, no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, durante o período de 1999 a 2005.

Grupo de Doenças de Base	n (%)	Grupo Causas de Óbito	n (%)
Malformações	87 (34,2)	Doenças do sistema respiratório	180 (70,9)
Prematuridade	40 (15,8)	Doenças infecciosas	26 (10,2)
Doença de Base Indeterminada	33 (12,9)	Doenças do sistema nervoso	17 (6,7)
Doenças maternas	32 (12,6)	Outras	12 (4,7)
Causas placentárias	30 (11,8)	Doenças do sistema vascular	11 (4,3)
Doenças infecciosas	17 (6,7)	Malformação	3 (1,2)
Doenças do sistema respiratório	6 (2,4)	Prematuridade	2 (0,8)
Outras	4 (1,6)	Doenças auto- imunes	1 (0,4)
Doenças auto-imunes	3 (1,2)	Doenças do sistema renal	1(0,4)

Neoplasias	2 (0,8)	Doenças do aparelho digestório	1(0,4)
Total	254 (100)	Total	254 (100)

n: número

Foram consideradas normais 199 (78,3%) JOC dos casos analisados (Prancha 2; Figura A e B). Foram classificadas como normais as JOC que apresentaram organização das colunas de células cartilagenosas nas zonas proliferativa e hiperplásica e pouca matriz extracelular, localizada no limite entre a cartilagem e a trabécula óssea (COHEN, 1948; EMERY; KALPAKTSOGLU, 1967).

Foram encontradas alterações na JOC em 55 (22%) dos casos analisados. As lesões da JOC foram classificadas de acordo com o padrão preponderante nas lâminas.

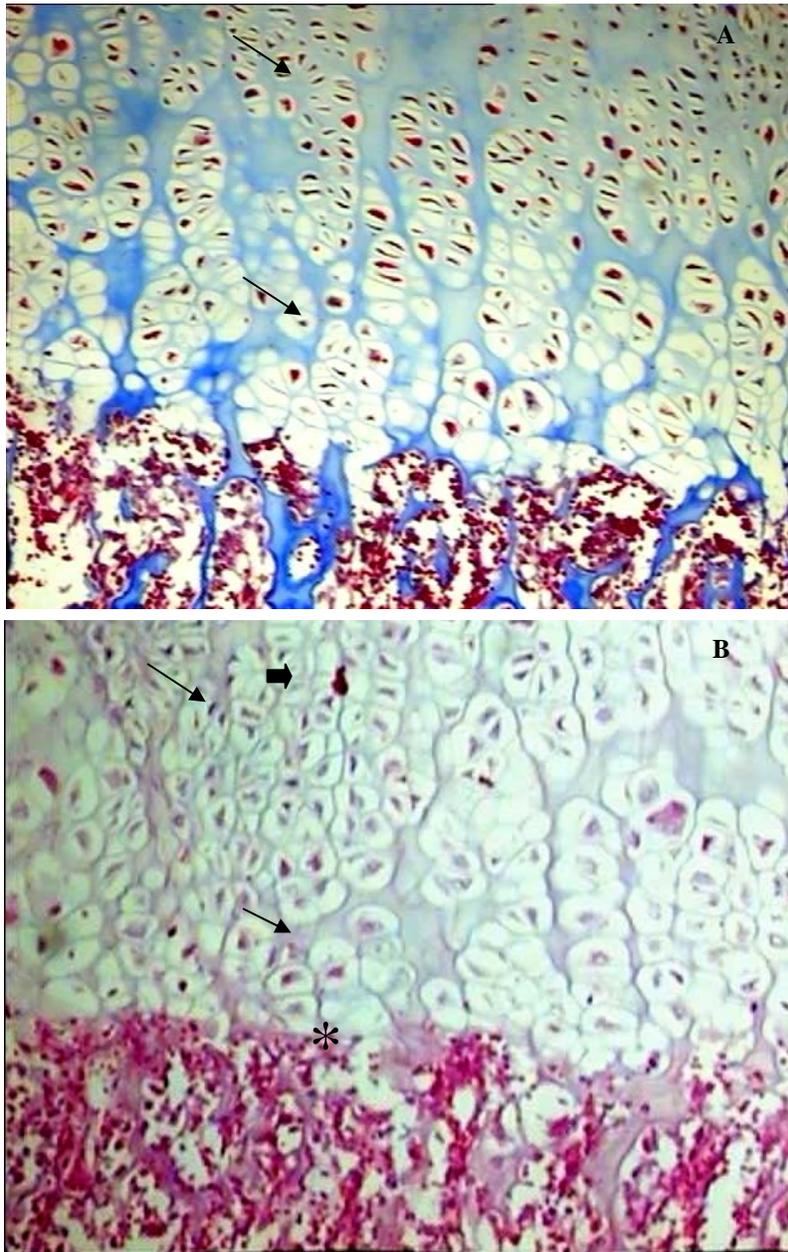
- Aumento da Matriz Cartilaginosa (AMC) em 38 casos (14,9%): o AMC na JOC é diagnosticado, quando encontramos uma faixa de matriz cartilaginosa entre as últimas células da cartilagem e a cavidade óssea, em mais de 50% do comprimento da linha entre a cartilagem e o osso (Prancha 3; Figura A).
- Conformação Bizarra (BZ) em 10 casos (3,9%): as principais características morfológicas de uma JOC com padrão bizarro são a completa desorganização das colunas de células cartilagenosas, o que proporciona irregularidade estrutural nas zonas hiperplásica e proliferativa (Prancha 3; Figura B).
- Células da medula óssea nos canais de calcificação (CME) em 2 casos (0,8%). Esta alteração foi encontrada associada à todos os casos que foram diagnosticados MCO e AMC. (Prancha 3; Figura C).
- Aumento de matriz cartilaginosa e formação de osso próximo à cartilagem com presença de células da medula óssea nos canais de calcificação (MCO), 5 casos

(2%): consideramos MCO, quando há uma desorganização das colunas de células cartilagenosas com formação de finas trabéculas ósseas, entre a zona hiperplásica e a zona livre de medula, formando estruturas similares à pontes, por isso, alguns autores denominam essa alteração morfológica de “ponte óssea” (Prancha 3; Figura D) (Tabela 3).

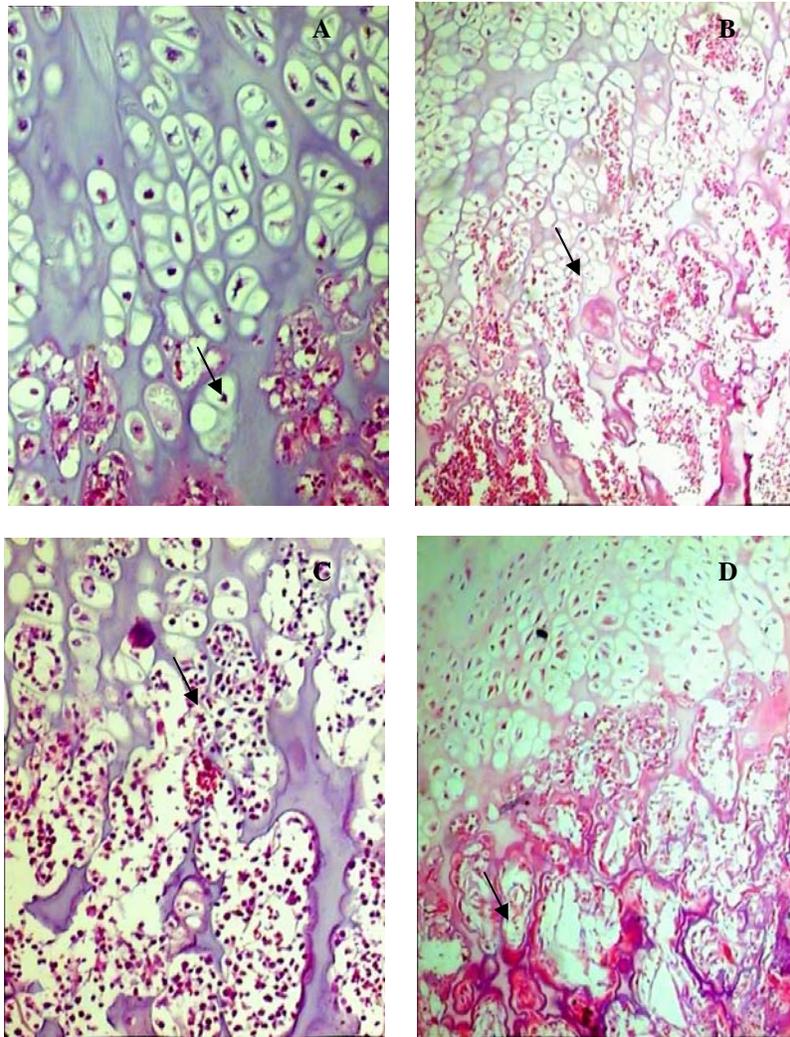
Tabela 3: Relação das diferentes alterações morfológicas da JOC em crianças necropsiadas no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, durante o período de 1999 a 2005.

Alterações da JOC	n (%)
Normal	199 (78,3)
AMC	38 (15)
BZ	10 (4)
MCO	5 (2)
CME	2 (0,7)
Total	254 (100)

AMC: aumento da matriz cartilaginosa; BZ: conformação bizarra; CME: Presença de células da medula óssea nos canais de calcificação; MCO: aumento de matriz cartilaginosa e formação de osso próximo à cartilagem com presença de células da medula óssea nos canais de calcificação; n: número



Prancha 2. Análise morfológica e morfométrica da JOC: junção osteocondral normal, (Figura A, TMA-640X) com pouca matriz extracelular (seta) localizada no limite entre a cartilagem e a trabécula óssea e organização das colunas de células cartilaginosas nas zonas proliferativa (seta larga) e hiperplásica (seta). O limite entre a cartilagem e a zona livre de medula óssea e regular e bem limitado (\*) (Figura B, HE-640X).



Prancha 3. Alterações morfológicas da JOC: Aumento da matriz cartilaginosa (AMC) é diagnosticado quando o aumento da matriz (seta) ocorre em mais de 50% do comprimento da linha entre a cartilagem e o osso (Figura A) (HE 640X); lesão bizarra (BZ) é caracterizada pela completa desorganização das colunas de células cartilaginosas (Figura B) (HE 640X). A presença de células da medula óssea (seta) nos canais de calcificação (CME) é encontrada associada aos casos de MCO e AMC (Figura C) (HE 640X). A lesão MCO é caracterizada pela desorganização das colunas de células cartilaginosas com formação de finas trabéculas ósseas (seta) entre a zona hiperplásica e a zona livre de medula (Figura D) (HE 640X).

As lesões da JOC foram mais freqüentes em neomortos (Tabela 4). A alteração morfológica AMC foi encontrada em 38 dos casos (15%), sendo mais freqüente entre os neomortos, 26 casos (68,4%). A alteração MCO foi diagnosticada em 5 (100%) casos neomortos e o padrão bizarro em 8 (80%) dos casos de natimortos (Tabela 5).

Tabela 4: Associação entre as alterações morfológicas da JOC e a época do óbito perinatal das crianças necropsiadas no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, durante o período de 1999 a 2005.

Alterações da JOC	Grupo n (%)		Total n (%)
	Neomorto	Natimorto	
Sim	33 (61,1)	21 (38,9)	54 (100)
Não	86 (43)	114 (57)	200 (100)
Total	119 (46,8)	135 (53,2)	254 (100)

$\chi^2 = 4,87$  com correção de Yates;  $p = 0,027$   
 JOC: junção osteocondral; n: número

Tabela 5: Associação entre as alterações morfológicas da JOC e a época do óbito perinatal das crianças necropsiadas no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, durante o período de 1999 a 2005.

Alterações da JOC	Grupo n (%)		Total n (%)
	Neomorto	Natimorto	
Normal	86 (43,2)	113 (56,8)	190 (100)
AMC	26 (68,4)	12 (31,6)	38 (100)
BZ	2 (20)	8 (80)	10 (100)
MCO	5 (100)	0 (0)	5 (100)
CME	0 (0)	2 (100)	2 (100)
Total	119	135	254 (100)

AMC: aumento da matriz cartilaginosa; BZ: conformação bizarra; CME: Presença de células da medula óssea nos canais de calcificação; JOC: junção osteocondral; MCO: aumento de matriz cartilaginosa e formação de osso próximo à cartilagem com presença de células da medula óssea nos canais de calcificação; n: número

Em relação à idade das crianças, os pacientes mais jovens e mais velhos apresentam as lesões mais graves na JOC. Os pacientes mais velhos apresentam uma relação estatisticamente significativa com as alterações AMC e MCO, nestes casos, a idade gestacional ao nascimento das crianças também foi maior. Os pacientes com MCO foram os mais velhos do estudo, tendo idade com mediana de 14 dias (1,7 – 27 dias). A alteração BZ é encontrada em sua maioria nos pacientes prematuros. Nos dois casos em que foi encontrada em neomortos, as crianças nasceram com 22 e 27 semanas de idade gestacional (Tabela 6).

Tabela 6: Relação entre as alterações morfológicas da JOC e a idade do óbito das crianças necropsiadas no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, durante o período de 1999 a 2005.

Natimortos	n (%)	X da IG ao nascimento±DP (semanas)	Med (semanas)	Vmin	Vmax	Teste
Normal	113 (83,7)	30,0±25,5	30,0	25,5	36,0	H = 0,991;
BZ	8 (5,9)	32,0±27,5	32,0	27,5	33,5	p = 0,803
AMC	12 (8,9)	29,0±24,6	29,0	24,6	36,7	
CME	2 (1,5)	34,0±30,0	34,0	30,0	38,0	
Total	135 (100)					
Neomorto	n (%)	X da IG ao nascimento±DP* (horas)	Med (horas)	Vmin	Vmax	H = 0,000;
Horas						
Normal	32 (88,8)	29,26±4,93	4,0	0,4	9,0	p = 1,000
AMC	4 (11,2)	35,25±4,03	2,7	0,8	16,0	
Total	36 (100)					
Neomorto	n (%)	X da IG ao nascimento±DP** (dias)	Med (dias)	Vmin	Vmax	H = 12,822;
Dias						p = 0,005
AMC	22 (26,5)	34,15±28,30	10,5	5,0	19,0	Teste de
Normal	54 (65)	32,50±27,00	2,5	1,0	8,0	Dunn
CMO	5 (6)	38,30±34,77	14,0	1,7	27,0	P<0,05
BZ	2 (2,5)	24,90±22,00	12,0	8,0	16,0	BZxNormal
						;
						AMCxNor
						mal
Total	83 (100)					

\*t = -2,319; p = 0,027

\*\* H = 7,722; p = 0,052

AMC: aumento da matriz cartilaginosa; BZ: conformação bizarra; CME: Presença de células da medula óssea nos canais de calcificação; IG: idade gestacional; JOC: junção osteocondral; MCO: aumento de matriz cartilaginosa e formação de osso próximo à cartilagem com presença de células da medula óssea nos canais de calcificação; med; mediana; n: número; Vmax: valor máximo; Vmin: valor mínimo; X±DP: média ± desvio padrão

Não há associação entre RCIU e alterações morfológicas da JOC (Tabela 7).

Tabela 7: Relação entre as alterações morfológicas da JOC e o processo de RCIU em natimortos necropsiados no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, durante o período de 1999 a 2005.

Alterações da JOC	RCIU		Total n (%)
	n (%)		
	Sim	Não	
Sim	1 (5)	19 (95)	20 (100)
Não	19 (17)	94 (83)	113 (100)
Total	20 (15)	113 (85)	133 (100)

$\chi^2 = 1,047$  com correção de Yates;  $p = 0,306$

Dois casos analisados não possuíam o relato do peso, não sendo possível avaliar a ocorrência de RCIU.

JOC: junção osteocondral; ; n: número; RCIU: restrição de crescimento intra-uterino

Existe diferença estatística entre a alteração morfológica MCO e malformações congênitas. Todos os casos com MCO apresentaram algum tipo de malformação ( $p = 0,007$ ) (Tabela 8).

Tabela 8: Relação entre a presença de osso próximo à cartilagem com presença de células da medula óssea nos canais de calcificação (MCO) na JOC e as malformações congênitas das crianças necropsiadas no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, durante o período de 1999 a 2005.

Alterações da JOC (MCO)	Malformação n (%)		Total n (%)
	Sim	Não	
Sim	5 (100)	0 (0)	5 (100)
Não	80 (32)	169 (68)	249 (100)
Total	85 (33)	169 (67)	254 (100)

$\chi^2 = 7,322$  com correção de Yates;  $p=0,007$

JOC: junção osteocondral; MCO: aumento de matriz cartilaginosa e formação de osso próximo à cartilagem com presença de células da medula óssea nos canais de calcificação; n: número

Tabela 9: Descrição das malformações congênitas presentes nos casos de osso próximo à cartilagem com presença de células da medula óssea nos canais de calcificação (MCO) na JOC das crianças necropsiadas no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, durante o período de 1999 a 2005.

Alterações da JOC	n (%)	Malformações congênitas
MCO	1 (20)	Cardiopatia congênita
MCO	1 (20)	Hérnia diafragmática
MCO	1 (20)	Seqüência de lateralidade
MCO	1 (20)	Transposição de grandes artérias
MCO	1 (20)	Trissomia do cromossomo 18
Total	5 (100)	

JOC: junção osteocondral; MCO: aumento de matriz cartilaginosa e formação de osso próximo à cartilagem com presença de células da medula óssea nos canais de calcificação; n: número

Não há associação entre doenças respiratórias e as alterações morfológicas da JOC (p=0,908) (Tabela 10). Quando comparamos as placentas em que diagnosticamos alterações morfológicas com as alterações morfológicas da JOC, não encontramos diferença estatística (p=0,372) (Tabela 11).

Tabela 10: Associação entre as alterações morfológicas da JOC e as doenças respiratórias em crianças necropsiadas no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, durante o período de 1999 a 2005.

Alterações da JOC	Doenças respiratórias n (%)		Total n (%)
	Sim	Não	
Sim	11 (20)	43 (80)	54 (100)
Não	37 (18,5)	163 (81,5)	200 (100)
Total	48 (19)	206 (81)	254 (100)

JOC: junção osteocondral; n: número  
 $\chi^2 = 0,0134$  com correção de Yates; p=0,908

Tabela 11: Associação entre as alterações morfológicas da JOC e as alterações placentárias nas crianças necropsiadas no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, durante o período de 1999 a 2005.

Alterações da JOC	Alterações placentárias n (%)		Total n (%)
	Sim	Não	
Sim	4 (13)	50 (22)	54 (100)
Não	26 (87)	174 (78)	200 (100)
Total	30 (12)	224 (88)	254 (100)

JOC: junção osteocondral; n: número  
 $\chi^2 = 0,796$  com correção de Yates;  $p = 0,372$

Nos pacientes prematuros sem alteração na JOC, o comprimento das zonas proliferativa e hiperplásica é menor do que nos pacientes à termo (Tabela 12).

Tabela 12: Distribuição das medidas da camada hiperplásica e proliferativa nos grupos de alterações morfológicas da JOC de pacientes prematuros necropsiados no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, durante o período de 1999 a 2005.

Prematuro		Zona Hiperplásica*			Zona Proliferativa**		
Grupo	n (%)	Med	Vmin	Vmax	Med	Vmin	Vmax
Sim	209 (82,2)	306,6	192,2	558,6	2552,0	738,2	5673,7
Não	45 (17,7)	459,3	266,4	809,7	2790,3	817,8	6047,0

\* T = 42982,000;  $p = <0,001$

\*\* T = 37364,500;  $p = 0,513$

med; mediana; n: número; Vmax: valor máximo; Vmin: valor mínimo

Não há diferença entre o comprimento da camada hiperplásica nos diferentes grupos de alterações morfológicas da JOC ( $p = 0,225$ ). A zona proliferativa representa uma

diferença estatisticamente significativa nos diferentes grupos de lesão da JOC ( $p < 0,001$ ). No grupo de pacientes com MCO e no grupo de pacientes com AMC, o comprimento foi maior ( $p < 0,05$ ) e no grupo BZ, o comprimento foi menor ( $p < 0,05$ ) (Tabela 13).

Tabela 13: Distribuição das medidas da camada hiperplásica e dos grupos de alterações morfológicas da JOC em crianças necropsiadas no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, durante o período de 1999 a 2005.

Alterações da JOC		Zona Hiperplásica*			Zona Proliferativa**		
Grupo	n (%)	Med	Vmin ( $\mu\text{m}$ )	Vmax	Med	Vmin ( $\mu\text{m}$ )	Vmax
Normal	199 (78,2)	317,16	189,04	616,36	2360,86	733,13	5673,75
AMC	38 (15)	325,56	191,14	656,90	3650,52	967,36	7196,53
BZ	10 (4)	235,81	171,06	436,88	696,73	579,10	4671,31
MCO	5 (2)	349,00	206,63	472,59	3770,24	2479,47	7218,59
CME	2 (0,8)	552,27	203,94	743,12	1905,01	1174,28	3654,72
Total	254 (100)						

\*H = 5,669;  $p = 0,225$

\*\*H = 30,584;  $p = < 0,001$ ; Método de Dunn  $p < 0,05$  para as comparações: AMC x Normal; BZ x Normal; MCO x Normal

AMC: aumento da matriz cartilaginosa; BZ: conformação bizarra; CME: Presença de células da medula óssea nos canais de calcificação; MCO: aumento de matriz cartilaginosa e formação de osso próximo à cartilagem com presença de células da medula óssea nos canais de calcificação; med; mediana; n: número; Vmax: valor máximo; Vmin: valor mínimo

Houve uma maior expressão da COMP nos casos que apresentaram alterações mais graves. A mediana da área de expressão da COMP no grupo normal foi de 1,56% nos casos

normais (Prancha 4; Figura A), enquanto que os casos de AMC (Prancha 4; Figura B), MCO (Prancha 4; Figura C) e BZ (Prancha 4; Figura D) a área foi aproximadamente cinco vezes maior (8,1%). Foi encontrada diferença estatisticamente significativa ( $p=0,003$ ) em relação à expressão da COMP e as alterações da JOC. A expressão da COMP foi maior na zona hiperplásica (Tabela 14).

Tabela 14: Expressão da COMP na análise imunohistoquímica da JOC de crianças necropsiadas no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, durante o período de 1999 a 2005.

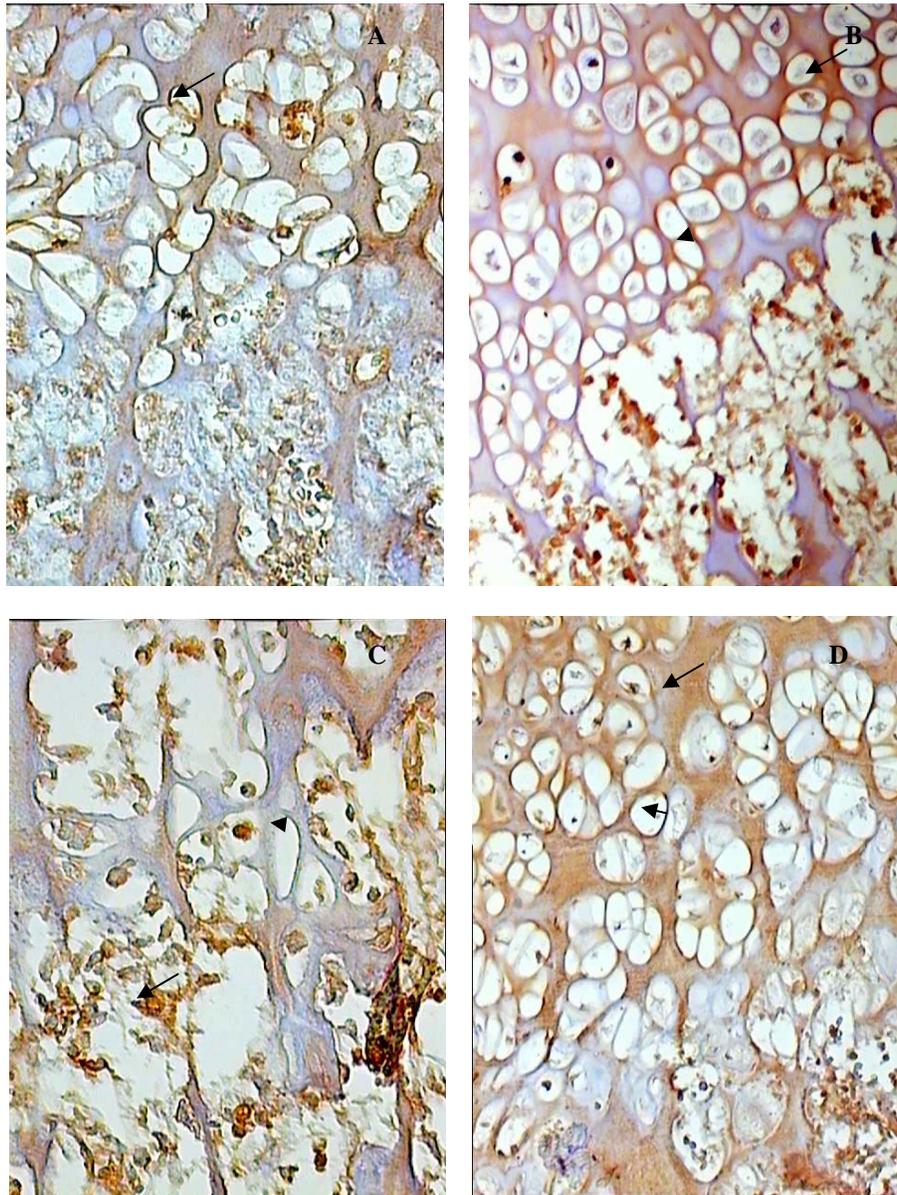
Alterações da JOC	n (%)	Med	Vmin (%)	Vmax
Normal	21 (8,2)	1,56	1,17	2,26
AMC	20 (7,8)	4,76	2,78	5,81
BZ	2 (0,4)	6,7	6,7	6,7
MCO	3 (0,4)	8,1	8,10	8,1
Total	46 (18,1)			

$H = 16,930$ ;  $p < 0,001$

Método de Dunn  $p < 0,05$  para as comparações: AMC x Normal; BZ x Normal; MCO x Normal

AMC: aumento da matriz cartilaginosa; BZ: conformação bizarra; CME: Presença de células da medula óssea nos canais de calcificação; MCO: aumento de matriz cartilaginosa e formação de osso próximo à cartilagem com presença de células da medula óssea nos canais de calcificação; med; mediana; n: número; Vmax: valor máximo; Vmin: valor mínimo

A análise imuno-histoquímica não foi realizada nos 254 casos devido a problemas na recuperação anti-gênica.



Prancha 4. Expressão da proteína oligomérica da matriz cartilaginosa (COMP) na zona hiperplásica da junção osteocondral: padrão normal de expressão da COMP localizada na membrana citoplasmática (seta) de poucos condrócitos e sem expressão na matriz cartilaginosa (Figura A); nos casos com AMC (Figura B), MCO (Figura C) e BZ (Figura D) identificamos uma expressão da COMP em maior número de condrócitos (cabeça de seta) e também na matriz cartilaginosa (seta) (PAP/DAB 640X).

## **Discussão**

Em nosso estudo encontramos alterações da junção osteocondral em 22% dos casos analisados. Em estudos anteriores foram relatadas percentuais de 26% de casos com alterações da JOC em crianças com morte no período perinatal e em crianças com morte súbita na infância (SINCLAIR-SMITH et al., 1976; EMERY; KALPAKTSOGLU, 1967), estando estes estudos de acordo com nossos achados.

Nos demais estudos da literatura com descrição de alterações da JOC, os métodos utilizados para a análise morfológica das JOC não foram os mesmos descritos por nosso estudo. Nos estudos sobre associação de alterações da JOC com membrana hialina em lactentes, a incidência das alterações descritas foi de 70%. Neste estudo, um dos padrões descritos é de rarefação das trabéculas ósseas, que foi a lesão mais frequentemente diagnosticada (ROBERTSON; IVEMARK, 1969; 1970). Este padrão foi diagnosticado por microrradiograma e correspondeu a 21% dos casos estudados. Em nossos casos, utilizamos a análise microscópica pela coloração da hematoxilina-eosina, não sendo possível a comparação com os dados apresentados pelos autores. Um dos padrões descrito pelo autor, foi o de aumento de matriz cartilaginosa, que foi diagnosticado em 26% dos casos, estando esta porcentagem semelhante a nossa casuística (ROBERTSON; IVEMARK, 1969; 1970).

Em nosso estudo, foi encontrada uma associação estatisticamente significativa entre as alterações da JOC e o óbito no período neonatal. Estes dados estão de acordo com a literatura em que as lesões da JOC foram encontradas com maior frequência associadas ao óbito neonatal (EMERY; KALPAKTSOGLU, 1967; ROBERTSON; IVEMARK, 1969; 1970). Em um destes estudos, os autores não encontraram JOC normais em crianças com idade acima de três dias de vida (ROBERTSON; IVEMARK, 1969). Este dado é diferente

do que encontramos em nosso estudo. Em nossa casuística, em 43,2% de nossos casos encontramos JOC com padrões normais nos neomortos.

O único padrão de alteração da JOC que está associado com prematuros é o padrão bizarro. Encontramos conformação bizarra da JOC em 3,9% dos nossos casos, sendo 100% dos casos prematuros. Os dados da literatura trazem valores em relação à ocorrência do padrão bizarro na JOC próximos à 10% em natimortos entre a 30<sup>o</sup> e a 38<sup>o</sup> semana de gestação (EMERY; KALPAKTSOGLU, 1967). Segundo a literatura, o padrão bizarro deve estar ligado a imaturidade do sistema enzimático em reabsorver a cartilagem recém formada (FROST, 1966; EMERY; KALPAKTSOGLU, 1967). Estes dados estão de acordo com as nossas observações.

Em nossa análise morfométrica, o padrão bizarro apresentou o menor comprimento da zona proliferativa em relação aos grupos das demais lesões e ao grupo normal. Os condrócitos situados em cada zona de crescimento são responsáveis diretos pela síntese e organização da matriz, que é composta basicamente por proteoglicanos e colágeno tipo II (DEERE et al., 2001).

A diminuição da proliferação celular no padrão bizarro com um aumento na produção de matriz, evidenciado pelo aumento da expressão da COMP, indica um desequilíbrio acentuado da osteogênese, podendo ter sido causado por imaturidade das enzimas responsáveis pela absorção da matriz em responder ao distúrbio na homeostase causado pela doença que levou ao parto prematuro. A produção de matriz cartilaginosa é regulada pela expressão de proteinases produtoras e degradadoras de matriz e este processo está alterado em condições especiais como fraturas, ossificação ectópica e durante o desenvolvimento fetal (NAKASE et al., 2000).

As intercorrências gestacionais que tiveram como conseqüência a morte intra-uterina do feto prematuro em nosso estudo, podem estar alterando a atividade destas proteinases dando origem a desorganização da JOC verificada no padrão bizarro.

O aumento de matriz cartilaginosa (AMC) na JOC foi a lesão mais freqüentemente encontrada em nossos dados. É a lesão mais freqüentemente encontrada nos estudos que descrevem alterações da JOC (EMERY, 1964; EMERY; KALPAKTSOGLU, 1967; ROBERTSON; IVEMARK, 1969; 1970). É uma lesão freqüente na JOC que, de acordo com a literatura, pode indicar intercorrências no período gestacional sem estar relacionada com a causa de morte ou a doença de base, sendo considerada uma cicatriz de intercorrências na gestação (EMERY; KALPAKTSOGLU, 1967).

O processo parece ocorrer como se segue: a produção aumentada de a matriz cartilaginosa circunda os condrócitos próximos à zona livre de medula óssea, impedindo-os de formar os moldes de matriz, que serviriam como base da ossificação endocondral, dificultando a formação do novo osso. Com isso, o crescimento ósseo é interrompido naquele momento associado a intercorrência gestacional, mas, de acordo com os dados do presente estudo, esta interrupção no crescimento ósseo pode ser suspensa, se retirado a causa, não necessariamente sendo refletido no crescimento total do feto ao final da gestação (EMERY; KALPAKTSOGLU, 1967). Portanto, a presença de matriz cartilaginosa na JOC indicaria problemas sucessivos na gestação, podendo estar associada com diferentes doenças de base ou causas de morte.

Os casos com formação óssea na linha de separação da cartilagem com o osso (MCO) parecem ter significado diferente do aumento de matriz cartilaginosa (AMC) na JOC. Estes casos apresentam IG significativamente maior que os demais casos e tem associação estatisticamente significante com malformações congênitas. Todos os casos com

MCO foram óbitos neonatais e foram os pacientes mais velhos do estudo. Nos estudos anteriores, esta lesão foi descrita como um padrão dentro do espectro de AMC, não sendo discutida separadamente (EMERY, 1964; EMERY; KALPAKTSOGLU, 1967). A formação destas lesões na JOC deve depender da maturidade fetal para sua ocorrência. Um outro fator importante é a associação com malformações congênitas, o que indica que estas lesões podem estar associadas a um processo intrínseco do desenvolvimento, devendo a causa da malformação estar associada à lesão da JOC.

No presente estudo, demonstramos que as alterações morfológicas da JOC não tem relação com restrição de crescimento intrauterino diagnosticado pela diminuição do peso e do tamanho fetal para a idade gestacional, alterações placentárias ou doenças respiratórias.

Em estudo de recém-nascidos que morreram em decorrência da Síndrome da Morte Súbita Infantil (SIDS), os autores demonstraram que 60% das crianças com SIDS apresentavam sinais de aumento da matriz cartilaginosa na JOC, sendo este dado interpretado como um sinal de doença prévia a morte (SINCLAIR –SMITH et al., 1976). O AMC já tinha sido descrito anteriormente como um sinal da diminuição do crescimento ósseo, mas não foi relatado, que estas crianças apresentavam uma restrição do crescimento final do feto (EMERY; KALPAKTSOGLU, 1967). Em outro estudo onde os autores realizaram marcação imunohistoquímica da JOC de crianças com SIDS, não se identificou lesões da JOC e a expressão dos proteoglicanos formadores da matriz cartilaginosa foi a mesma, quando comparado com o controle (BYARD et al., 1993). Em nossos dados, encontramos as lesões descritas como representando uma diminuição do crescimento ósseo e a descrevemos no grupo de AMC, mas não encontramos associação entre esta lesão e a restrição de crescimento intra-uterino fetal, não podendo ser utilizada para associação ou marcador deste distúrbio do crescimento intra-uterino.

Em relação às doenças respiratórias, os estudos que descreveram esta associação, utilizaram um método diferente do nosso e descreveram uma lesão que não encontramos em nossa casuística (ROBERTSON; IVEMARK, 1969; 1970), não podendo ser comparado com os nossos dados.

As alterações placentárias são descritas como causas das lesões da JOC por insuficiência placentária e conseqüente desnutrição fetal intra-uterina (EMERY; KALPAKTSOGLU, 1967). Não temos em nossos casos diagnósticos de insuficiência placentária um número suficiente para maiores considerações.

Em relação a etiopatogênese das lesões, vimos em nosso estudo que ocorre um aumento da expressão da proteína oligomérica da matriz cartilaginosa (COMP), na zona hiperplásica em todas as lesões. Este aumento está associado a um aumento na zona proliferativa nas lesões AMC e MCO demonstrando que o mecanismo que levou ao aparecimento das lesões, está relacionado a um estímulo dos condrócitos para proliferação e maior síntese de matriz cartilaginosa na zona hiperplásica. O papel da COMP no paciente vivo ainda não está muito bem elucidado, mas sabe-se que clinicamente, a COMP se eleva no sangue do paciente com artrose (osteartrite) e com artrite reumatóide, estando seu aumento relacionado a um maior dano articular (CLARK et al., 1999). No tecido, ocorre uma maior expressão de COMP próximo às zonas com reação inflamatória e este aumento da expressão parece ocorrer para diminuir a destruição cartilaginosa na área de inflamação (KOELLING et al., 2006). Em nosso estudo, a COMP foi expressa em maior quantidade na lesão bizarra e na MCO da JOC, que são as lesões mais severas da JOC, devendo ser o seu aumento, um mecanismo protetor ao dano tecidual observado. O entendimento de fatores que regulam a expressão da COMP em tecidos não inflamados deverá ser no futuro a chave

para o entendimento de quais são os mecanismos envolvidos na etiopatogênese das lesões da JOC.

Em conclusão, nosso estudo demonstrou que as alterações da JOC são mais freqüentes em necropsias pediátricas de óbitos no período perinatal e as formas mais graves estão relacionadas a malformações congênitas. A zona proliferativa está aumentada nas lesões encontradas nas necropsias de neonatos e tem associação significativa com o aumento da expressão da proteína oligomérica da matriz cartilaginosa. Uma das lesões descritas ocorre em prematuros e sua etiopatogênese parece estar relacionada à imaturidade fetal à resposta ao stress intrauterino. O exame da JOC pode ajudar à diferenciar as causas de óbito intrauterino e no período perinatal e este estudo contribuiu para melhor entendimento dos mecanismos relacionados a etiologia destas alterações.

## **Conclusões**

Em relação à identificação das alterações morfológicas e morfométricas das junções osteocondrais em material de autópsia perinatal e a associação com doenças de base e causa de óbito, concluímos que:

- As alterações da JOC são comuns em autópsia perinatal e estão associadas com os óbitos no período perinatal;
- Os padrões de lesões encontradas são AMC, MCO, Bizarro e CME;
- A lesão AMC é a mais frequentemente encontrada, é um padrão cicatricial e é causada por um aumento da proliferação celular associada com maior produção de COMP;
- A lesão BZ está associado com a prematuridade; é provavelmente consequência da imaturidade fetal em responder a estímulos patológicos durante a gestação e é causado por um desequilíbrio entre proliferação celular e expressão de COMP;
- Os casos com MCO apresentam IG significativamente maior que os demais casos e tem associação estatisticamente significativa com malformações congênitas;
- As alterações morfológicas da JOC não tem relação com restrição de crescimento intra-uterino, doenças respiratórias e alterações placentárias;

Em relação à avaliação morfométrica das diferentes zonas da cartilagem da junção osteocondral e sua relação com as lesões da JOC, concluímos que:

- O comprimento da camada hiperplásica nos diferentes grupos de alterações morfológicas da JOC não apresenta diferença estatística;
- A zona proliferativa está aumentada nas lesões encontradas nas necropsias de neonatos, no grupo de pacientes com MCO e no grupo de pacientes com AMC, porém apresenta menor comprimento no grupo BZ;

Em relação à identificação e quantificação da expressão nos condrócitos da proteína oligomérica da matriz cartilaginosa (COMP) e análise da relação com as lesões da JOC, concluímos que:

- Houve uma maior expressão da COMP nos casos que apresentaram alterações mais graves;
- Ocorre um aumento da expressão da proteína oligomérica da matriz cartilaginosa (COMP) na zona hiperplásica em todas as lesões;
- O aumento da COMP está associado a um aumento na zona proliferativa nas lesões AMC e MCO demonstrando que o mecanismo que levou ao aparecimento das lesões está relacionado a um estímulo dos condrócitos para proliferação e maior síntese de matriz cartilaginosa na zona hiperplásica.

**Introdução:** crianças com óbito no período perinatal podem apresentar ao exame das costelas, alterações da junção osteocondral (JOC) relacionadas à restrição de crescimento intra-uterino, alterações placentárias, desordens maternas e anormalidades congênitas

**Objetivo:** identificar as alterações morfológicas da JOC em crianças necropsiadas e os fatores associados com sua patogênese. **Métodos:** foram utilizadas 254 JOC de crianças necropsiadas sequencialmente. Realizamos as colorações de Hematoxilina-eosina e Tricrômico de Masson Azul. Para marcação da expressão nos condrócitos da JOC da proteína oligomérica da matriz cartilaginosa (COMP), foi utilizado o anticorpo policlonal anti-COMP. **Resultados:** foram analisadas as alterações morfológicas encontradas na JOC de 254 crianças necropsiadas. Foram consideradas normais 199 (78,3%) JOC dos casos analisados. Foram encontradas alterações na JOC em 55 (22%) dos casos analisados: aumento de matriz cartilaginosa (AMC) em 38 casos (14,9%), padrão bizarro (BZ) em 10 casos (3,9%), formação de osso próximo aos canais de crescimento (MCO), 5 casos (2%) e células da medula óssea na zona livre (CME) em 2 casos (0,8%). O comprimento da zona proliferativa é diferente nos grupos de lesão da JOC ( $p < 0,001$ ). No grupo de pacientes com MCO e no grupo de pacientes com AMC o comprimento foi maior ( $p < 0,05$ ) e no grupo BZ o comprimento foi menor ( $p < 0,05$ ). Houve uma maior expressão da COMP nos casos que apresentaram alterações mais graves ( $n(p) = 0,003$ ). A expressão da COMP foi maior na zona hiperplásica. **Conclusão:** as alterações da JOC são mais frequentes em necropsias pediátricas no período perinatal. A zona proliferativa está aumentada nas lesões encontradas e tem associação significativa com o aumento da COMP. O exame da JOC pode ajudar a diferenciar as causas de óbito intrauterino e no período perinatal e este estudo contribuiu para melhor entendimento dos mecanismos relacionados a etiologia destas alterações. **Palavras-chave:** costelas, morfologia, necropsia

**Introduction:** children with death in the perinatal period can present at the exam of the ribs, alterations of the osteochondral junction (OCJ), which could be related with intrauterine growth restriction, placental alterations, maternal disorders and congenital abnormalities. **Aim:** to identify the morphological alterations of the OCJ in autopsied children and the factors associated with its pathogenesis. **Methods:** we used OCJ from 254 children, which were sequentially autopsied. The Eosin and blue Masson's trichrome stain were used for morphological and morphometrical analyses. For the measurement of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) expression in the chondrocytes, we utilized a polyclonal antibody. **Results:** from the 254 OCJ analyses we found 199 (78.3%) cases with normal OCJ. In the altered OCJ group we found 55 cases (22%); 38 cases (14.9%) have matrix cartilage increased at the free bone marrow zone of the OCJ (AMC), in 10 cases (3.9%) the bizarre pattern (BZ), in 5 cases (2%) a bone closing de growth channels (MCO) of the OCJ and in 2 (0.8%) cases bone marrow cells encroaching de bone marrow free zone. The length of the proliferative zone is different in the groups with alterations of the OCJ lesions ( $p < 0.001$ ), being higher in MCO and AMC patients group ( $p < 0.05$ ). In the BZ group the length was shorter ( $p < 0.05$ ). The highest expression of the COMP was found in the cases, which presented the worst alterations of the OCJ ( $p = 0.003$ ). The COMP expression was higher in the hyperplasic zone. **Conclusion:** the OCJ alterations are more frequent in children's autopsies in the perinatal period. The proliferative zone is increased in the morphological alterations and has significant association with the increase of the COMP expression. The OCJ analyses is a important part of the autopsies performed in the perinatal period and this study contributed for a better understanding of the mechanisms related to the etiology of these alterations.

**Key-words:** autopsy, morphology, ribs

ABNT - (Associação Brasileira de Normas Técnicas). **NBR6023. Informação e documentação – referências – elaboração.** Rio de Janeiro: ABNT, 2002. 24 p.

AGAPITOS, E.; KAVANTZAS, N.; MAVROGEORGIS, A.; PANOLARIDIS, A.; DAVARIS, P.; KOUTSELINIS, A. Perinatal death and thymus gland. **Arch. Anat. Cytol. Pathol.**, v. 42, n. 3, p. 163-70, 1994.

BATTAGLIA, F. C.; LUBCHENCO, L. O. A practical classification of newborn infants by weight and gestational age. **J. Pediatr.**, v. 71, p. 159-163, 1967.

BEHRMAN, R. E. **Tratado de Neonatologia: enfermedades del feto y del recién nacido.** 1. ed., Buenos Aires, Editora Médica Panamericana, p. 11-55, 1976.

BUCK, G. M.; COOKFAIR, D. L.; MICHALEK, A. M.; NASCA, P. C.; STANDFAST, S. J.; SEVER, L. E.; KRAMER, A. A. Intrauterine growth retardation and risk of sudden infant death syndrome (SIDS). **Am. J. Epidemiol.**, v. 129, n. 5, p. 874-84, 1989.

BYARD, R. W.; FOSTER, B. K.; BYERS, S. Immunohistochemical characterization of the costochondral junction in SIDS. **J. Clin. Pathol.**, v. 46, p. 108-112, 1993.

CARLSEN, S.; HANSSON, A. S.; OLSSON, H.; HEINEGARD, D.; HOLMDAHL, R. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) -induced arthritis in rats. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 114, n. 3, p. 477-84, 1998.

CARRASCOSA, A.; GUSSINYE, M.; YESTE, D.; DEL RIO, L.; AUDI, L. Bone mass acquisition during infancy, childhood and adolescence. **Acta Paediatr. Suppl.**, v. 411, p. 18-23, 1995.

CARTLIDGE, P. H. T.; STEWART, J. H. Effect of changing the stillbirth definition on evaluation of perinatal mortality rates. **Lancet**, v. 346, p. 4486-8, 1995.

CHEN, D.; ZHAO, M.; MUNDY, G. R. Bone morphogenetic proteins. **Growth Factors**, v. 22, n. 4, p. 233-41, 2004.

CID. 10ª Revisão. OMS, Genebra, Suíça. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo FSP-USP / OMS / OPAS. Edusp – Editora da Universidade de São Paulo, 1997.

CLARK, A. G.; JORDAN, J. M.; VILIM, V.; RENNER, J. B.; DRAGOMIR, A. D.; LUTA, G. B. Serum cartilage oligomeric matrix protein reflects osteoarthritis presence and severity. **Arthritis Rheum.**, v. 42, p. 2356-2364, 1999.

CHAMBERS, H. M.; KNOWLES, S.; STAPLES, A.; TAMBLYN, M.; HAAN, E. A. Anthropometric measurements in the second trimester fetus. **Early Hum. Dev.**, v. 33, p. 45-49, 1993.

COHEN, J. Normal variation of the costochondral junction. **Arch. Path.**, v. 45, p. 246, 1948.

COLNOT, C.; ROMERO, D. M.; HUANG, S.; HELMS, J. A. Mechanisms of action of demineralized bone matrix in the repair of cortical bone defects. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, n. 435, p. 69-78, 2005.

COPRAY, J. C.; DIBBETS, J. M.; KANTOMAA, T. The role of condylar cartilage in the development of the temporomandibular joint. **Angle Orthod.**, v. 58, p. 369-372, 1988.

CRELIN, E. S. **Anatomia do recém-nascido**. 1. ed, São Paulo, Editora Panamericana, p. 34-36, 1988.

DE LUCA, F.; BARON, J. Control of Bone Growth by Fibroblast Growth Factors. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 10, n. 2, p. 61-65, 1999.

DEERE, M.; HALL, C.; GUNNING, K. B.; LEFEBVRE, V.; RIDALL, A. L., HECHT, J. T. Analysis of the promoter region of human cartilage oligomeric matrix protein (COMP). **Matrix Biol.**, v. 19, n. 8, p. 783-92, 2001.

DEL RIO, L.; CARRASCOSA, A.; PONS, F.; GUSINYE, M.; YESTE, D.; DOMENECH, F. M. Bone mineral density of the lumbar spine in white Mediterranean Spanish children and adolescents: changes related to age, sex, and puberty. **Pediatr. Res.**, v. 35, n. 3, p. 362-6, 1994.

DE SA, D. J. Stress response and its relationship to cystic (pseudofollicular) change in the definitive cortex of the adrenal gland in stillborn infants. **Arch. Dis. Child.**, v. 53, n. 10, p. 769-76, 1978.

DOUROV, N. Microscopy of the thymus in the perinatal period. **Ann. Pathol.**, v. 2, n. 3, p. 255-61, 1982.

EMERY, J. L. The assessment of the duration of illness in children unexpectedly dead. **Med. Sci. Law.**, v. 14, p. 39-42, 1964.

EMERY, J. L.; KALPAKTSOGLU, P. K. The costochondral junction during later stages of intrauterine life, and abnormal growth patterns found in association with perinatal death. **Arch. Dis. Child.**, v. 42, p. 1-13, 1967.

EPKER, B. N.; FROST, H. M. Biomechanical control of bone growth and development: a histologic and tetracycline study. **J. Dent. Res.**, v. 45, n. 2, p. 364-370, 1966.

FAZZALARI, N. L.; MOORE, A. J.; BYERS, S.; BYARD, R. W. Quantitative analyses of trabecular morphogenesis in the human costochondral junction during the postnatal period in normal subjects. **Anat. Rec.**, v. 248, p. 1-12, 1997.

FROST, H. M. Bone dynamics in metabolic bone disease. **J. Bone Joint Surg. Am.**, v. 48, n. 6, p. 1192-203, 1966.

GARDNER, E.; GRAY, D. J.; RAHILLY, R. O. **Anatomia: estrutura regional do corpo humano**. 4. ed., Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, p. 256-261, 1988.

GIANNONI, P.; SIEGRIST, M.; HUNZIKER, E. B.; WONG, M. The mechanosensitivity of cartilage oligomeric matrix protein (COMP). **Biorheology**, v. 40, n. 1-3, p. 101-9, 2003.

GOLDRING, M. B. Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases. **Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.**, v. 20, n. 5, p. 1003-25, 2006.

GRANJEIRO, J. M.; OLIVEIRA, R.C.; BUSTOS-VALENZUELA, J. C.; SOGAYAR, M. C.; TAGA, R. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 38, n. 10, p. 1463-73, 2005.

HARTMAN, P.; PONDER, R.; LO, H. H.; ISHII, N. Mitochondrial oxidative stress can lead to nuclear hypermutability. **Mech. Ageing Dev.**, v. 125, n. 6, p. 417-20, 2004.

HECHT, J. T.; MONTUFAR-SOLIS, D.; DECKER, G.; LAWLER, J.; DANIELS, K.; DUKE, P. J. Retention of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and cell death in redifferentiated pseudoachondroplasia chondrocytes. **Matrix Biol.**, v. 17, n. 8, p. 625-33, 1998.

HEDBOM, E.; ANTONSSON, P.; HJERPE, A.; AESCHLIMANN, D.; PAULSSON, M. Cartilage matrix proteins: na acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 6132-6136, 1992.

JONES, R.; BAHN, R. C.; RANDALL, R.; SULLIVAN, C. R. The human costochondral junction. I. Patients without primary growth disturbances. **Mayo Clin. Proc.**, v. 44, p. 324-329, 1969.

JOSHI, V.V. **Common Problems in Pediatric Pathology**. 1.ed., New York, Igaku-Shoin, p. 1-33, 1994.

KANTOMAA, T. The role of the mandibular condyle in the facial growth. **Proc. Finn. Dent. Soc.**, v. 80, p. 1, 1984.

KEMBER, N. F.; SISSONS, H. A. Quantitative histology of the human growth plate. **J. Bone Joint Surg.**, v. 58, p. 426-435, 1976.

KIPNES, J. R.; XU, L.; HAN, F.; RALLAPALLI, R.; JIMENEZ, S.; HALL, D. J. Molecular cloning and expression patterns of mouse cartilage oligomeric matrix protein gene. **Osteoart Cartilage**, v. 8, n. 3, p. 236-9, 2000.

KOELLING, S.; CLAUDITZ, T. S.; KASTE, M.; MIOSGE, N. Cartilage oligomeric matrix protein is involved in human limb development and in the pathogenesis of osteoarthritis. **Arthritis Res. Ther.**, v. 8, n. 3, p. 56, 2006.

LUBCHENCO, L.O.; HANSMAN, C.; BOYD, E. Intrauterine growth in length and head circumference as estimated from live births at gestational ages from 26 to 42 weeks. **Pediatrics**, v. 37, p. 403-406, 1966.

MAGNE, D.; JULIEN, M.; VINATIER, C.; MERHI-SOUSSI, F.; WEISS, P.; GUICHEUX, J. Cartilage formation in growth plate and arteries: from physiology to pathology. **Bioessays**, v. 27, n. 7, p. 708-16, 2005.

MALININ, G. I.; MALININ, T. I. Microscopic and histochemical manifestations of hyaline cartilage dynamics. **Prog. Histochem. Cytochem.**, v. 34, n. 3, p. 163-242, 1999.

MEIKLE, M. C. In vivo transplantation of the mandibular joint of the rat: an autoradiographic investigation into cellular changes at the condyle. **Arch. Oral Biol.**, v. 18, p. 1011, 1973.

NAKASE, T.; KANEKO, M.; TOMITA, T.; MYOUI, A.; ARIGA, K.; SUGAMOTO, K.; UCHIYAMA, Y.; OCHI, T.; YOSHIKAWA, H. Immunohistochemical detection of cathepsin D, K and L in the process of endochondral ossification in the human. **Histochem. Cell Biol.**, v. 114, p. 21-27, 2000.

NEWMAN, B.; WALLIS, G. A. Skeletal dysplasias caused by a disruption of skeletal patterning and endochondral ossification. **Clin. Genet.**, v. 63, n. 4, p. 241-51, 2003.

NEWTON, G.; WEREMOWICZ, S.; MORTON, C. C.; COPELAND, N. G.; GILBERT, D. J.; JENKINS, N. A.; LAWLER, J. Characterization of human and mouse cartilage oligomeric matrix protein. **Genomics**, v. 24, n. 3, p. 435-9, 1994.

OLDBERG, A.; ANTONSSON, P.; LINDBLOM, K.; HEINEGARD, D. COMP (cartilage oligomeric matrix protein) is structurally related to the thrombospondins. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 31, p. 22346-50, 1992.

PELTOMAKI, T. Histologic Structure of human costochondral junction. **Plast Rec Surg.**, v. 94, n. 5, p. 585-589, 1994.

PELTOMAKI, T.; HAKKINEN, L. Growth of the ribs at the costochondral junction in the rat. **J. Anat.**, v. 181, p. 259-264, 1992.

PELTOMAKI, T.; ISOTUPA, K. The costochondral graft: a solution or a source of facial asymmetry in growing children. A case report. **Proc. Finn. Dent. Soc.**, v. 87, p. 167-174, 1991.

PELTOMAKI, T.; QUEVEDO, L. A.; JELDES, G.; RONNING, O. Histology of surgically removed overgrown osteochondral rib grafts. **J. Craniomaxillofac. Surg.**, v. 30, n. 6, p. 355-360, 2002.

PRATT, C. W.; MCCANCE, R. A. Severe under nutrition in growing and adult animals. **Brit. J. Nutr.**, v. 14, p. 75-79, 1960.

RING, P. A. The effects of partial or complete excision of the epiphyseal cartilage of the rabbit. **J. Anat.**, v. 89, p. 79-91, 1995.

ROBERTSON, B.; IVEMARK, B. Abnormalities of the costochondral junction in cases of perinatal death, with special reference to hyaline membrane disease. **Acta Path. Microbiol. Scan.**, v. 77, p. 172-175, 1969.

ROBERTSON, B.; IVEMARK, B. The association between trabecular rarefaction in the costochondral junction and the idiopathic respiratory distress syndrome. **Biol. Neonate.**, v. 16, p. 342-353, 1970.

ROBERTSON, W. W. Newest knowledge of the growth plate. **Clin. Orthop. Related Res.**, v. 235, p. 270-278, 1990.

ROY, E. W.; SARNAT, B. G. Growth I length of rabbit ribs at costocondral junction. **Surg Gynecol Obstet.**, v. 103, p. 481-486, 1956.

SARNAT, B. G. Facial and neurocranial growth after removal of the mandibular condyle in the *Macaca rhesus* monkey. **Am. J. Surg.**, v. 94, p. 19, 1957.

SENIZ, F. N. The thymic findings in stillborns with neural tube defects. **Clin. Genet.**, v. 41, n. 2, p. 62-4, 1992.

SHIMOMURA, Y.; WEZEMAN, F. H.; RAY, R. D. The growth cartilage plate of the rat rib: cellular differentiation. **Clin. Orthop. Related Res.**, v. 90, p. 246-255, 1973.

SINCLAIR-SMITH, C.; DINSDALE, F.; EMERY, J. Evidence of duration and type of illness in children found unexpectedly dead. **Arch. Dis. Child.**, v. 51, p. 424-429, 1976.

STROSZNAJDER, R. P.; JESKO, H.; POKORSKI, M. Poly(ADP-ribose) polymerase activity in the cat carotid body in hypoxia and hyperoxia. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 53, n. 3, p. 491-6, 2002.

SVENSSON, L.; ASZODI, A.; HEINEGARD, D.; HUNZIKER, E. B.; REINHOLT, F.P.; FASSLER, R.; OLDBERG, A. Cartilage oligomeric matrix protein-deficient mice have normal skeletal development. **Mol. Cell Biol.**, v. 22, n. 12, p. 4366-71, 2002.

URIST, M. R. Bone: formation by autoinduction. **Science**, v. 12, n. 150, p. 893-9, 1965.

WARE, W. H.; BROWM, S. L. Growth centre transplantation to replace mandibular condyles. **J. Maxilofac.**, v. 9, p. 50-56, 1981.

WILLIAMS, S.M.; TAYLOR, B.J.; FORD, R.P.; NELSON, E. A. Growth velocity before sudden infant death. **Arch. Dis. Child.**, v. 65, n. 12, p. 1315-8, 1990.

WONG, M.; SIEGRIST, M.; GOODWIN, K. Cyclic tensile strain and cyclic hydrostatic pressure differentially regulate expression of hypertrophic markers in primary chondrocytes. **Bone**, v. 33, n. 4, p. 685-93, 2003.