SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

SÉRGIO LUIS FELISBINO

A CARTILAGEM EPIFISÁRIA E O DESENVOLVIMENTO DOS OSSOS LONGOS EM *Rana catesbeiana*

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas, na área de Biologia Celular.

ORIENTADOR - PROF. DR. HERNANDES FAUSTINO DE CARVALHO

UNICAMP
1997

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Felisbino, Sérgio Luis

F336c A cartilagem epifisária e o desenvolvimento dos ossos longos em Rana catesbeiana / Sérgio Luis Felisbino. -- Campinas, SP:[s.n.], 1997.
78f: ilus.

Orientador: Hernandes Faustino de Carvalho
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Cartilagem. 2. Rã touro. 3. Matriz extracelular. I.Carvalho, Hernandes Faustino de. II. Universidade Estadual de Campinas.Instituto de Biologia. III. Título.

UNIDADE BC
N.º CHAMADA:
T/UNICAMP
F335c
V. Ex.
TOMBO BC/ 31020
PROC. 281/97
C [ ] D [X]
PREÇO R$ 11,00
DATA 12/07/97
N.º CPD

CM-00098688-5

LOCAL E DATA: Campinas, 22 de maio de 1997

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Prof.Dr. HERNANDES FAUSTINO DE CARVALHO **(Orientador)** ______________ Assinatura

Prof. Dr. EDSON ROSA PIMENTEL ______________ Assinatura

Profa.Dra. IARA MARIA SILVA DE LUCA ______________ Assinatura

SUPLENTE:

Profa.Dra. ELISA APARECIDA GREGÓRIO ______________ Assinatura

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) Sérgio Luis Felisbino e aprovada pela Comissão Julgadora. 22/05/97

LOCAL E DATA: Campinas, 22 de abril de 1997

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Prof.Dr. HERNANDES FAUSTINO DE CARVALHO
(Orientador)

Assinatura

Prof. Dr. EDSON ROSA PIMENTEL

Assinatura

Profa.Dra. IARA MARIA SILVA DE LUCA

Assinatura

SUPLENTE:

Profa.Dra. ELISA APARECIDA GREGÓRIO

Assinatura

"De que vale ao Homem ganhar o mundo inteiro
se para isto perder a sua alma"

Jesus Cristo

Dedicatória:

Dedico este trabaho aos meus pais, Valdomiro e Luisa, que na simplicidade de suas vidas, souberam dar o que de melhor se pode dar a um filho, amor e compreensão.

E também à Silvia por me revelar a cada dia uma bela canção que a razão desconhece.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho pela dedicada orientação, pela valiosa preocupação com o meu futuro profissional e acima de tudo pela amizade.

Ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal pelas importantes sugestões durante a fase inicial deste trabalho.

Ao Professor e amigo Sebastião Roberto Taboga pela amizade e pela colaboração durante as primeiras etapas de minha formação, que também se refletiram neste trabalho.

Ao Departamento de Biologia Celular por fornecer as instalações para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Biologia Celular pela contribuição à minha formação e receptividade amistosa.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Celular, Lilian, Cidinha, Klélia, Sidney, Mário, D. Maria, D. Irma e Chico, sempre prestativos e atenciosos no trato com os alunos.

Ao Ranário Atibaia, em especial ao Renato e ao César pelas facilidades no fornecimento de rãs nas condições necessárias.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia, na pessoa de seu coordenador Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada, pelas facilidades obtidas, assim como à técnica Sra. Antonia Maria Ferreira Lima, pela confecção dos cortes ultra-finos.

Ao laboratório de Microscopia Eletrônica da UNESP de Botucatu, nas pessoas da coordenadora Profa. Dra. Elisa Aparecida Gregório, pelas facilidades obtidas para uso do Microscópio Eletrônico de Transmissão, e à tecnica Sra. Maria Elena Moreno e ao Nivalde pelo auxílio junto ao Microscópio e pela revelação dos filmes.

Ao Departamento de Zoologia, em especial ao técnico Sr. Paulo, pelo auxilio na realização da técnica de diafanização e coloração dos ossos e cartilagens dos girinos.

Aos alunos do Departamento de Biologia Celular pela amizade e alegrias nos almoços.

Às amigas de laboratório, Daniela, Patricia, Sylvia Stuchi e Silvia Pimentel pelos sorrisos e pela convivência agradável, que com certeza contribuíram muito para o meu trabalho.

Ao pessoal da Pastoral Universitária pela amizade e pelas valiosíssimas discussões que nos ajudam a crescer.

Aos amigos de Rio Preto, que nem a distância impediu as alegrias.

Às minhas queridas primas, Kika, Vera Lúcia e Iara, que, na ausência de irmãos, tornaram-se minhas irmãs e me ensinaram a tratar aos outros como irmãos.

Aos amigos e amigas da república: Luis "Zezinho", Andrês, Germano, Marco Antonio, Maria Elena, Patricia, Ana, Ana Paula e Nilda, por me acolherem e me aturarem com paciência.

Ao CNPq pelo apoio financeiro, sem o qual este trabalho não seria realizado nas mesmas condições.

E, finalmente, mas não por isto menos importante, a Deus pela vida e por Jesus Cristo, que com amor gratuito elevou-me a condição de filho de Deus. A ciência, em si só, nem com toda a sua evolução, dará ao homem tamanha grandiosidade.

Abreviaturas:

AT = Azul de Toluidina

cc = canal de cartilagem

ccv = célula com citoplasma vacuolizado

cel = célula eletrolúcida

ci = cisternas

col = colágeno

CS = condroitim sulfato

edf = epífise distal do fêmur

fe = fêmur

G34 = girino em estágio 34

G37 = girino em estágio 37

G39 = girino em estágio 39

G46 = girino em estágio 46

Hav = canal de Havers

KS = Queratam sulfato

MEC ou mec = matriz extracelular

N ou n = núcleo

op = osso periosteal

pe = pericôndrio

PSH = picrossírius e hematoxilina

tf = tíbio-fíbula

ve = vesículas

zr = zona de reserva

zm = zona de maturação

XP = xylidine Ponceau

ca = cartilagem articular

ccr = cartilagem de crescimento

ce = célula endotelial

ch = cartilagem hipertrófica

cl = cartilagem lateral

cp = capilar

DS = dermatam sulfato

eptf = epífise proximal da tíbio-fíbula

G32 = girino em estágio 32

G35 = girino em estágio 35

G38 = girino em estágio 38

G41 = girino em estágio 41

GAGs = glicosaminoglicanos

HE = Hematoxilina e Eosina

me = mesenquima

mo = medula óssea

oe = osso endosteal

otb = osteoblastos

PG = Proteoglicanos

tcf = tecido conjuntivo fibroso

to = trabécula óssea

v = vasos

zp = zona de proliferação

zh = zona hipertrófica

Resumo

A cartilagem pode ser descrita como um tecido avascular contendo células arredondadas separadas por uma matriz predominantemente basófila. As células da cartilagem, os condrócitos, produzem uma matriz extracelular constituída principalmente de fibrilas de colágeno tipo II e de grandes proteoglicanos agregantes. Em menores quantidades são encontrados outros tipos de colágeno e proteínas não colagênicas. Existem diferentes tipos de cartilagens distintas principalmente, na composição e organizacão dos componentes da sua matriz extracelular. Durante o desenvolvimento, os ossos longos são precedidos por um modelo cartilaginoso. Deste modelo cartilaginoso inicial, persiste nas extremidades dos ossos um tipo de cartilagem hialina denominada de cartilagem epifisária, que compreende a cartilagem articular e a cartilagem de crescimento. Dos diferentes tipos de cartilagens, a cartilagem de crescimento é talvez a mais dinâmica. Nesta cartilagem ocorrem processos de proliferação, maturação e hipertrofia celular. Estes processos são essenciais para o crescimento longitudinal do osso e formação de osso endocondral. Estas descrições são baseadas principalmente nos aspectos encontrados em aves e mamíferos, que já foram exaustivamente estudados. Pouco se sabe destes processos em anfíbios anuros, sendo que os trabalhos anteriores muitas vezes mostram-se contraditórios no que diz respeito à ossificação endocondral e à calcificação da cartilagem epifisária. Este trabalho teve por objetivos acompanhar o desenvolvimento e o envelhecimento da cartilagem epifisária de *Rana catesbeiana*, descrevendo os aspectos celulares e da matriz extracelular, com especial referência ao crescimento ósseo e a calcificação da cartilagem. Cartilagens epifisárias da epífise distal do fêmur e proximal da tíbio-fíbula de animais em diferentes fases de desenvolvimento e envelhecimento foram utilizadas e submetidas a testes histoquímicos, citoquímica enzimática e análises ultraestruturais. Os resultados demonstram que o fêmur e a tíbio-fíbula são formados por ossificacão periosteal de um modelo cartilaginoso. Este osso periosteal forma uma estrutura tubular cujas extremidades se encaixam na cartilagem epifisária. Esta cartilagem epifisária possui uma cartilagem articular bem desenvolvida e apresenta projeções laterais que recobrem a face externa do osso periosteal. Entre a cartilagem lateral e o osso periosteal encontra-se o ligamento osteo-condral. Este ligamento osteo-condral contem muita fibras de colágeno do tipo I e é muito vascularizado. Internamente à extremidade do osso periosteal encontra-se a cartilagem de crescimento com as zonas de reserva, proliferação, maturação e hipertrófica. As células da zona de proliferação são achatadas e separam-se no sentido perpendicular ao longo eixo do osso, ao contrário do que acontece nos mamíferos. Os condrócitos hipertróficos mais distais apresentam aspectos de degeneração. Existem trêm sítios distintos de calcificação da cartilagem epifisária. A calcificacão da cartilagem lateral é a mais freqüente e aumenta com o envelhecimento, os outros dois sítios são encontrados na cartilagem de crescimento. Os testes de atividade de fostatase alcalina revelaram intensa atividade desta enzima nos condrócitos próximos às áreas de calcificação e nos osteoblastos dos periósteo. Ossificação endocondral só é encontrada na epífise distal do fêmur de animais velhos, sendo muito reduzida e, aparentemente, associada à presença de canais da cartilagem. É nos animais velhos que aparece também a ossificação endosteal, com a formação de canais de Havers. Células mononucleadas são aparentemente responsáveis pela erosão da matriz da cartilagem hipertrófica não mineralizada e células semelhantes a osteoclastos ou condroclastos erodem a matriz calcificada. Em conjunto, os resultados revelam um tipo especializado de cartilagem epifisária capaz de permitir um crescimento ósseo rápido e de resistir aos impactos impostos às articulações durante os saltos.

Abstract

Cartilage is described as an avascular tissue with round cells embedded in a rather basophilic matrix. Cartilage cells, the chondrocytes, produce an extracellular matrix containing mainly type II collagen fibrils and proteoglycans. Minor collagens and non-collagens proteins are also present in the cartilage matrix. There are different types of cartilage, differing by the composition and organization of the matrix components. Developmentally, long bones are precceded by a cartilaginous scaffold. Cartilage tissue remains at the bone extremities where it is called epiphyseal cartilage. This cartilage can be divided in articular cartilage and in growth cartilage. Growth cartilage is probably the most dynamic cartilage because it bears processes such as cell proliferation, maturation and hypertrophy. These processes are essential for the growth of long bones and for endochondral bone formation. These processes are described following studies developed with birds and mammals, that were already exhaustivelly studied. Little knowledge exists on the growth of long bone in amphibians and previous publications are contradictory with regard to the endochondral ossification and the calcification of the epiphyseal cartilage. The objective of this work was to study the development and aging of the epiphyseal cartilage of *Rana catesbeiana*, describing the cells and extracellular matrix, with especial attention to their role in bone growth and cartilage calcification. Epiphyseal cartilage from the distal femoral epiphysis and from the proximal tibio-fibula epiphysis of animals with different ages were used and subjected to histochemistry, enzyme cytochemistry and ultrastructural analyses. The results showed that the femur and tibio-fibula are constructed by periosteal ossification of a cartilaginous scaffold. This periosteal bone become a tubular structure which inserts into the epiphyseal cartilage. Epiphyseal cartilage contains a well developed articular cartilage and presents lateral projections that cover the external face of the periosteal bone. In between the lateral cartilage and the periosteal bone there is a osteochondral ligament. This ligament contains many collagen fibers and blood vessels. The growth cartilage is found within the periosteal bone with its reserve, proliferation, maturation and hypertrophic zones. Cells of the proliferation zone are flat and divide in the longitudinal direction with to respect to the length of the bone, as opposed to what happens in mammals. Hypertrophic chondrocytes present degeneration aspects. There are three distinct calcification sites in the epiphyseal cartilage. Lateral cartilage calcification is more frequent and increase with age, while the other sites are found in the growth cartilage. Alkaline phosphatase activity was found in chondrocytes close to the calcification sites and also in the osteoblasts of the periosteum. Endochondral ossification is only found in the distal femoral epiphysis of old animals. However, it was very reduced and apparently associated with cartilage canals. Old animals also has endosteal bone containing haversian systems. Mononucleated cells are responsible for the erosion of the uncalcified cartilage matrix and osteoclast-like or chondroclast-like cells erode the calcified matrix. Together, the results show that the bullfrog epiphyseal cartilage is very especialized tissue able of allow a fast bone growth and to support impacts on the joint during jumps.

ÍNDICE

Agradecimentos i
Abreviaturas ii
Resumo iii
Abstract iv
1. Introdução 1
Cartilagens 1
Tipos de Cartilagens 2
Matriz extracelular da cartilagem hialina 3
Cartilagem epifisária e o desenvolvimento e crescimento de ossos longos 5
O crescimento de ossos longos e a cartilagem epifisária dos anfíbios anuros 9
Objetivos 11

2. Material e Métodos 12

3. Resultados 15
O desenvolvimento dos girinos 15
A estrutura da cartilagem epifisária de rãs adultas jovens e de rãs velhas 25
Análise ultraestrutural da cartilagem epifisária o fêmur da rã adulta jovem 45

4.Discussão 57

5.Conclusões 67

6.Referências 68

1 INTRODUÇÃO

CARTILAGENS

A cartilagem pode ser descrita como um tecido avascular que contém células arredondadas ou ovóides separadas por uma matriz predominantemente basófila no contorno da célula.

A cartilagem ocorre como o endoesqueleto de todos os embriões de vertebrados acima de Agnata bem como do endoesqueleto de adultos de todos os Agnatas contemporâneos e Condrícties, e muitos dos Condrostei. Ela persiste como parte do endoesqueleto dos anfíbios e decresce em quantidade nos répteis, aves e mamíferos (PATT, 1969).

A formação da cartilagem no embrião envolve um pequeno número de "stem cells" mesenquimais multipotentes. Estas células existem em diferentes tecidos e regiões do corpo. Alguns destes precursores, podem também dar origem a outras linhagens, e em particular, para as linhagens muscular, adiposa e óssea. Aparentemente, durante o processo de diferenciação, as células precursoras perdem progressivamente sua multipotência. Nas cartilagens estas células mesenquimais dão origem aos condroblastos e condrócitos. Na diferenciação dos condrócitos as células mudam drasticamente sua síntese de macromoléculas da matriz extracelular (MEC) (CANCEDDA **et alii**, 1995).

Os condrócitos são células esféricas ou ovóides com núcleo esférico e nucléolos evidentes. O citoplasma contém grânulos de glicogênio e numerosos vacúolos de lipídios. Eletromicrografias de condrócitos revelam um complexo de Golgi bem formado, mitocôndrias alongadas e abundante retículo endoplasmático rugoso. São os condrócitos que produzem e renovam constantemente a matriz extracelular que os envolvem.

Rodeando a área de diferenciação da cartilagem forma-se uma membrana de tecido conjuntivo fibroso, o pericôndrio. Nesta área logo se estabelecem duas camadas mais ou menos distintas, a camada fibrosa mais externa e a camada condrogênica mais interna.

O crescimento de uma peça cartilaginosa processa-se de forma intersticial, onde as células do interior da cartilagem dividem-se, formando grupos de 2, 4 e até 8 células e secretando matriz, e/ou de forma aposicional, que é a origem de novos condrócitos a partir de células da camada condrogênica do pericôndrio (PATT, 1969).

O tecido cartilaginoso inclui a superfície articular de todas a diartroses e o sistema de sustentação dos sistemas respiratório e auditivo. Ele ocorre como anéis na laringe, na traquéia e nos brônquios, em todos os vertebrados.

As cartilagens são conhecidas como tecidos avasculares, nutridas por difusão dos nutrientes a partir dos vasos do pericôndrio. Isto reflete num metabolismo altamente adaptado às condições de baixa tensão de oxigênio, sendo que a conservação de energia parece estar próxima do máximo (RAJPOROHIT **et alii**, 1996)

Embora a cartilagem seja comumente conhecida como um tecido avascular, algumas cartilagens apresentam vasos sanguíneos que são comumente conhecidos como canais da cartilagem (HAINES, 1933).

Os canais da cartilagem podem ser encontrados nas cartilagens costal, laringeal, traqueal e, principalmente, nas cartilagens epifisárias fetais (HAINES, 1933; SKAWINA **et alii**, 1994). Estes canais da cartilagem contêm arteríolas, vênulas, capilares e diversos outros tipos celulares ao redor destes vasos.

Considera-se que a função destes canais é a nutrição, principalmente de grandes massas de cartilagem (HAINES, 1933). Experimentos em que estes canais foram bloqueados levaram à necrose da cartilagem (SKAWINA **et alii**, 1994). Entretanto, vários estudos com canais da cartilagem epifisária têm revelado que eles participam não só da nutrição, mas também de outros processos importantes que ocorrem nesta cartilagem.

TIPOS DE CARTILAGEM

Em sua forma básica a cartilagem é clara e transparente, sendo conhecida como cartilagem hialina. Podemos ainda definir outros tipos, as fibrocartilagens, a cartilagem elástica, a cartilagem calcificada e a cartilagem mucosa ou condróide (PATT, 1969).

A cartilagem hialina, mais freqüente dentro do corpo dos animais, apresenta as características descritas acima para o tecido cartilaginoso em geral. Sua matriz extracelular (MEC) será descrita em detalhe mais à frente.

Fibrocartilagem

A fibrocartilagem é um tecido de transição que não apresenta um pericôndrio e tem funções e propriedades intermediárias entre um tecido conjuntivo fibroso e a cartilagem hialina (BENJAMIN & EVANS, 1990).

As células na fibrocartilagem estão dispostas entre os feixes de colágeno, acompanhando o eixo longitudinal do órgão. Condrócitos e fibroblastos são encontrados nas fibrocartilagens. Em geral os condrócitos estão localizados na porção central rodeados por uma matriz territorial basófila, enquanto os fibroblastos localizam-se perifericamente no órgão (BENJAMIN & EVANS, 1990).

As fibras de colágeno podem estar irregularmente arranjadas na matriz da fibrocartilagem, apresentando ondulações ou formando ângulos em relação ao eixo longitudinal. O colágeno tipo I é o mais abundante na matriz, mas o colágeno tipo II pode ser encontrado principalmente na matriz territorial (BENJAMIN & EVANS, 1990).

O maior constituinte não colagênico da matriz são os proteoglicanos que estão concentrados ao redor das células. Estes proteoglicanos assemelham-se bioquimicamente aos da cartilagem hialina (VOGEL & KOOB, 1989).

Podemos encontrar fibrocartilagens no disco intervertebral (anel fibroso), no menisco, em sítios de ancoragem de ligamentos e tendões nas epífises e regiões de tendões sujeitos a forças de compressão (VOGEL & KOOB, 1989; BENJAMIN & EVANS, 1990; CARVALHO, 1995)

Cartilagem Elástica

A cartilagem elástica, encontrada na orelha e na laringe, contém um número considerável de fibras do sistema elástico em sua matriz extracelular. É basicamente semelhante à cartilagem hialina, mas seus condrócitos produzem junto com colágeno e proteoglicanos, fibras elásticas maduras (EGERBACHER **et alii**, 1995; CARVALHO **et alii**, 1996).

A presença de fibras do sistema elástico não está restrita a cartilagem elástica. COTTA-PEREIRA e cols. (1984) também descreveram a presença destas fibras na cartilagem hialina da traquéia e na fibrocartilagem do disco intervertebral de ratos. CARVALHO e cols., (1994) detectaram a presença de fibras do sistema elástico na fibrocartilagem de tendões sujeitos a forças de compressão em coelhos e cães e FELISBINO e cols., (1994 e 1995) detectaram a presença de tais fibras no pericôndrio da cartilagem xifóide de *Gallus gallus domesticus*. Em cartilagem articular, HESSE (1987) revelou a presença de fibras do sistema elástico tanto na camada superficial como nas camadas mais profundas.

Enquanto a função das fibras do sistema elástico na cartilagem elástica é bem conhecida, pouco se conhece da participação destes componentes na fisiologia das demais cartilagens.

A cartilagem calcificada

Na histogênese da ossificação endocondral, que será vista mais adiante, a calcificação da cartilagem é tida como um pré-requisito para a sua degeneração e destruição. Isto é verdade nas situações em que a cartilagem tem uma função provisória e é normalmente substituída por osso. Em algumas espécies de condríctes, entretanto, a cartilagem calcificada representa um tecido em si, e esta pode também ser encontrada como um constituinte normal de pequenas partes do esqueleto dos anfíbios e répteis, especialmente em partes do esqueleto hióide e do côndilo occipital. Estas observações sugerem que outros fatores, além da calcificação durante a osteoneogênese, são responsáveis pelo processo degenerativo dos condrócitos (PATT, 1969).

Condróide

Possivelmente a mais primitiva categoria de cartilagem, o condróide é um tecido conjuntivo fibroso que contém uma matriz de ácido hialurônico e condroitim sulfato, além de uma rica população de condrócitos e tem distribuição limitada, ocorrendo como o endoesqueleto dos ciclóstomos e no ouvido externo de alguns roedores, tal como ratos e morcegos. O núcleo pulposo do disco intervertebral é uma categoria de condróide (PATT, 1969).

Além destes tipos mais comuns de cartilagens, podemos encontrar outros mais restritos como o "hyaline-cell-cartilage" e "fibrous-cell-cartilage" (BENJAMIN, 1989).

MATRIZ EXTRACELULAR DA CARTILAGEM HIALINA

Os componentes predominantes da matriz da cartilagem são as fibrilas formadas de colágeno tipo II e os grandes proteoglicanos agregantes. Em menores quantidades os colágenos tipo VI, IX, X e XI e outras glicoproteínas, comumente chamadas proteínas não-colagênicas, estão normalmente presentes (HEINEGÅRD & OLDEBERG, 1989; EYRE **et alii**, 1992).

Ao que parece, os colágenos II, IX e XI formam fibrilas copoliméricas dentro da matriz. Tem sido demonstrado que os tipos IX e XI, e outros componentes da matriz podem de alguma forma regular a formação e o diâmetro das fibrilas de colágeno tipo II (HEINEGÅRD & OLDBERG, 1989; EYRE **et alii**, 1991 e 1992).

Já o colágeno X é uma proteína encontrada, em condições normais, somente na cartilagem hipertrófica, onde aparentemente favorece a mineralização e a invasão vascular (ERLEBACHER **et alii**, 1995). Estudos indicam uma direta correlação entre o desenvolvimento do aspecto hipertrófico dos condrócitos e a síntese de colágeno tipo X (GIBSON & FLINT, 1985).

O agrecan é o proteoglicano agregante (PG) mais abundante na matriz das cartilagens. Esta macromolécula apresenta um eixo protéico com várias cadeias laterais de glicosaminoglicanos (GAGs), ligados covalentemente ao eixo protéico. Estes GAGs são formados por seqüências repetidas de dissacarídeos, e estes dissacarídeos apresentam grupos carboxilas e grupos sulfatos. Os tipos principais são o condroitim 4 ou 6-sulfato (CS), dependendo da posição do grupo sulfato, o queratam sulfato (KS) e o dermatam sulfato (DS). Um outro GAG encontrado nas cartilagens é o ácido hialurônico que, entretanto, não é sulfatado e não forma ligações covalentes com o eixo protéico dos PG. Ao longo do eixo protéico, entre as cadeias de GAGs, são encontrados oligossacarídeos.

Nas extremidades do eixo protéico encontram-se três domínios globulares (G), na extermidade N-terminal temos G1 e G2 e na extremidade C-terminal o G3. G1, junto com uma proteína de ligação (muito semelhante a G1), é responsável pela interação do proteoglicano com o ácido hialurônico para formar os agregados de proteoglicanos. Logo após

G2, no eixo protéico, existe uma região rica em cadeias curtas de queratam sulfato, em seguida uma região com alta densidade de cadeias longas de condroitim sulfato, que vai diminuindo em direção a G3 (HEINEGÅRD & OLDBERG, 1989; HAY, 1991).

Muitas propriedades do tecido dependem da função combinada destas moléculas. As fibrilas de colágeno são resistentes a tensão e reforçam o gel de proteoglicano mecanicamente frágil. O gel de proteoglicano tem uma alta densidade de cargas negativas, a qual resulta em uma grande pressão osmótica, por causa do efeito Donnan. Assim, em solução, proteoglicanos expandem-se para ocupar um volume 5 vezes maior ao que eles ocupam no tecido *in situ*. Este inchamento é contido pela intrincada rede tridimensional de fibrilas de colágeno e permite o tecido suportar forças de compressão. É este estado de pressão osmótica que produz a resistência das cartilagens e a permite atuar como base estrutural, por exemplo, no esqueleto primitivo dos embriões dos vertebrados, no aparelho respiratório, no ouvido externo e nas narinas dos humanos e outros mamíferos (HEINEGÅRD & OLDBERG, 1989).

Estas propriedades funcionais do tecido dependem da organização das fibrilas de colágeno e suas associações dentro da matriz. Estes processos são provavelmente regulados por outros constituintes, tais como outras proteínas não colagênicas de matriz (HEINEGÅRD & OLDBERG, 1989). Algumas destas são ligadas a glicosaminoglicanos e são como pequenos proteoglicanos (HEDBOM **et alii**, 1992).

A cartilagem contém três tipos de pequenos proteoglicanos, são eles o fibromodulim, o decorim e o biglicam. O decorim apresenta uma cadeia lateral de CS ou DS, dependendo do tecido e o biglicam apresenta duas cadeias de condroitim sulfato ou duas cadeias de dermatam sulfato, dependendo do tecido. O fibromodulim apresenta 4 cadeias de queratam sulfato. Pouco se conhece sobre a função do biglicam, mas o decorim e o fibromodulim ligam-se ao colágeno via eixo protéico e regulam a fibrilogênese dos colágenos dos tipos I e II, diminuindo *in vitro* a espessura atingida pelas fibrilas (HEDBOM & HEINEGÅRD, 1989; HEINEGÅRD & SOMMARIN, 1987; VOGEL **et alii**, 1989).

Também foi demonstrado que o decorim liga-se ao TGF-β (YAMAGUCHI **et alii**, 1990), atuando, então, na regulação do crescimento e diferenciação celular.

Outras proteínas de matriz com supostas funções são: Proteína de 58 KDa, pode promover a ancoragem da célula; Fibronectina, promove a ancoragem da célula via sequência RGD, interagindo com o colágeno e proteoglicanos; Proteína de 148 KDa (CMP) pode interagir com proteoglicanos e/ou formar fibrilas; A CMP é também um componente das fibrilas de colágeno II, ela liga-se nas extremidades da tripla-hélice da molécula de colágeno e na fibrila ela localiza-se nas zonas "gap" (WINTERBOTTOM **et alii**, 1992); COMP (proteína oligomérica de matriz de cartilagem), constituída de cinco subunidades de 100 KDa, encontrada ao redor dos condrócitos, parece ser uma proteína específica deste tecido. Acredita-se que ela tem um papel na manutenção do fenótipo de condrócito (HEDBOM **et alii**, 1992). Proteína de 36 KDa, promove a ancoragem da célula; Ancorina, liga-se ao colágeno II e pode mediar a ancoragem do colágeno no condrócito; Condrocalcina ou pro-peptídeo C- terminal do colágeno II, proteína associada com a ossificação endocondral, liga-se ao cálcio e tem forte afinidade por hidroxiapatita (POOLE **et alii**, 1984); e a proteína Ch 21, da qual não se conhece a função, é produzida por condrócitos hipertróficos (HEINEGÅRD & OLDBERG, 1989; HEINEGÅRD & PIMENTEL, 1992).

Recentemente foi descrita a presença de componentes de lâmina basal na superfície de condrócitos da cartilagem do septo nasal, da cartilagem articular e da placa de crescimento. Estes componentes são o perlecan, um proteoglicano de heparam sulfato e a laminina, uma glicoproteína, ambos característicos de lâmina basal. Nestes trabalhos foi

proposta a participação destes componentes na ancoragem dos condrócitos à matriz extracelular (SUNDARRAJ **et alii**, 1995; DÜRR **et alii**, 1996).

CARTILAGEM EPIFISÁRIA E O DESENVOLVIMENTO E CRESCIMENTO DE OSSOS LONGOS

Formação do modelo cartilaginoso de ossos longos

Os membros começam a brotar como uma pequena saliência lateral, a partir de uma massa de mesênquima encaixada na ectoderme. Esta epiderme tem um espessamento ao longo do eixo distal, chamado "Apical ectodermal ridge" (AER) (CANCEDDA **et alii**, 1995).

Informações posicionais ao longo do eixo antero-posterior são determinadas por uma zona da margem posterior do brotamento, chamada zona de atividade polarizada (TICKLE **et alii**, 1975; CANCEDDA **et alii**, 1995).

O crescimento do membro ao longo do eixo proximo-distal é feito pela proliferação de células no interior do mesênquima imediatamente sob a ectoderme (zona de progressão), em resposta aos sinais vindos da AER (SUMMERBELL **et alii**, 1973).

Fatores peptídicos de crescimento (FPC) têm sido implicados na indução do mesoderma e diferenciação dos primeiros modelos cartilaginosos do osso no primitivo embrião e no crescimento e diferenciação de condrócitos dentro da placa epifisária de crescimento, levando à formação de osso endocondral (CANCEDDA **et alii**, 1995).

Três classes principais de FPC têm sido associadas com estes processos: a família do TGF-β e moléculas relacionadas; a família dos fatores de crescimento de fibroblastos; e os fatores de crescimento tipo-insulina (incluindo a insulina). Outros fatores peptídicos de crescimento, hormônios e moduladores solúveis com papeis na diferenciação da cartilagem e metabolismo, incluem ácido retinóico, hormônios triiodotironina (T_3) e tiroxina (T_4), hormônios esteróides, hormônios de crescimento, hormônio da paratireóide, hormônio de crescimento derivado de plaquetas, transferrina, condromodulina, "retinoic-acid-induced-heparin-binding growth factor" (CANCEDDA **et alii**, 1995; JOYCE **et alii**, 1990; PAULSEN, 1994) e as proteínas morfogenéticas de osso e de cartilagem (REDDI, 1994).

Condensação e diferenciação do modelo cartilaginoso

Após a proliferação das células mesenquimais na zona proximal e central do brotamento, células mesenquimais pré-condrogênicas começam a se empacotar e depois estabelecem um contato célula-célula com "gap junctions" e começam a se diferenciar em condrócitos, num processo chamado de condensação (CANCEDDA **et alii**, 1995).

Um movimento celular ativo pode estar envolvido no processo de condensação *in vivo*. Vários estudos histoquímicos têm demonstrado uma diminuição do espaço extracelular com aumento na densidade celular na área de pré-cartilagem. Estas observações sugerem mudanças dinâmicas do material extracelular. A atividade de hialuronidase coincide com o início da condrogênese no membro, além disto, os colágenos tipo I e III são os principais componentes do mesênquima do broto do membro antes da condensação, apresentando-se uniformemente distribuídos através do tecido (SHINOMURA & KIMATA, 1990).

A condensação é também caracterizada pela produção de proteoglicanos sulfatados e pela mudança na síntese de colágeno tipo I para colágeno tipo II (EDE, 1983). Depois disto, os condrócitos proliferam e aumentam a produção de macromoléculas da MEC até que cada célula esteja completamente rodeada por uma matriz (CANCEDDA **et alii**, 1995).

Já existem no estágio de condensação algumas evidências da polarização das células, a qual é manifestada pelo posicionamento do complexo de Golgi em relação ao núcleo (GOULD **et alii**, 1972).

A produção de matriz começa no centro do modelo cartilaginoso, na futura região da diáfise, sendo caracterizada por uma marcação metacromática com azul de toluidina e um aumento no espaço intercelular. Concomitante com a secreção de matriz está a emergência de dois tipos distintos de orientação das células. Um é a orientação perpendicular das células da cartilagem em relação ao eixo longo do modelo. Esta é melhor vista em cortes longitudinais, onde as células aparecem achatadas e empilhadas como moedas. A outra orientação ocorre no futuro pericôndrio, sendo melhor observada em cortes transversais, onde as células podem ser vistas em uma direção circunferencial, sendo que estas orientações são sempre associadas com a secreção de matriz (RONEY **et alii**, 1984).

Na futura região da epífise não existe, até então, o pericôndrio. Desta forma as células da cartilagem misturam-se com o mesênquima ao redor. Contudo, com o desenvolvimento, um pericôndrio mais definido se forma (RONEY **et alii**, 1984).

RONEY e cols. (1984) sugeriram que a forma do modelo cartilaginoso primitivo pode ser determinada pelo pericôndrio. Se as células da cartilagem e sua matriz são como um fluido viscoso que vai dilatando, o pericôndrio pode dirigir esta dilatação agindo como uma bainha contínua.

Crescimento e ossificação periosteal e endocondral do modelo cartilaginoso

Logo depois do modelo cartilaginoso do osso estar organizado, os condrócitos da região central começam a aumentar seu volume (hipertrofiar), secretando e organizando uma matriz extracelular diferente. Talvez a mais dramática mudança observada na MEC da cartilagem hipertrófica seja o aparecimento do colágeno tipo X. Este colágeno em condições normais só é sintetizado por condrócitos hipertróficos, antes que ocorra a mineralização da MEC (GIBSON & FLINT, 1985; CANCEDDA **et alii**, 1995).

Coincidente com a hipertrofia dos condrócitos e com a mineralização de sua matriz extracelular, ocorre a transformação do pericôndrio em periósteo. Isto é acompanhado pelo aumento da vascularização do pericôndrio e pela diferenciação de células em osteoblastos a partir da camada condrogênica do pericôndrio. Estas células formam a camada osteogênica do periósteo. Desta camada proliferam osteoblastos que depositam matriz óssea ao redor da região mediana do modelo cartilaginoso, formando um colar periosteal. Esta região é também chamada de diáfise ou região diafisária. A extensão do colar, distal e proximalmente, é sincronizada com a degeneração da cartilagem internamente. Desta forma, em nenhum momento os membros do esqueleto falham na sua função de suporte. Este processo é denominado ossificação periosteal (PATT, 1969).

A degeneração da cartilagem hipertrófica internamente ocorre pela invasão de vasos sangüíneos e osteoblastos, sendo ela reabsorvida ou substituída por osso. Os condrócitos nas extremidades começam a proliferar e a formar nova cartilagem, que sucessivamente será calcificada e substituída por osso (HOLTROP, 1972).

Desta forma um gradiente de diferenciação de condrócitos até a hipertrofia é estabelecido em ambas as extremidades do osso. A estrutura cartilaginosa das extremidades é chamada de cartilagem epifisária.

Estas regiões de proliferação e hipertrofia são conhecidas como placa epifisária de crescimento ou cartilagem de crescimento. Em cada placa de crescimento, da extremidade em direção ao centro do osso, são observadas as seguintes regiões histológicas: 1) zona de reserva, que contêm células esféricas com pouca ou nenhuma divisão celular; 2) zona de proliferação, onde células se dividem e dão origem a uma coluna de células achatadas,

secretando uma MEC hialina rica em colágeno tipo II; 3) zona de maturação, onde as células são redondas e começam a aumentar seu volume; 4) zona de cartilagem hipertrófica superior, caracterizada por células com volume de 5 a 10 vezes maior, pela síntese de colágeno tipo X e pela redução no volume da matriz por volume total do tecido; e 5) zona de cartilagem hipertrófica profunda, onde ocorre a calcificação da MEC, principalmente nos septos longitudinais (HOLTROP, 1972; GILBERT, 1991). Está última região é também chamada de metáfise, originada do centro primário de ossificação endocondral (GANEY **et alii**, 1992).

Na matriz dos condrócitos hipertróficos foram encontradas inúmeras estruturas vesiculares, conhecidas como vesículas da matriz. Sugere-se que estas vesículas tenham participação na calcificação da matriz extracelular do septo longitudinal entre os condrócitos hipertróficos. Estas vesículas originam-se de brotamentos da membrana plasmática dos condrócitos, apresentam atividade de fostatase alcalina e contêm cristais de fosfato de cálcio (ANDERSON, 1969; AKISAKA **et alii**,1988; ARSENAULT & HUNZIKER, 1988).

Em algumas cartilagens epifisárias de aves e na maioria dos mamíferos pode ocorrer a formação de um centro secundário de ossificação endocondral. Eles se formam entre a superfície articular e o centro primário de ossificação endocondral.

A morfologia da placa de crescimento, tal como a quantidade da placa de crescimento e o volume da cartilagem, variam de acordo com a espécie, dentro das espécies nas diferentes idades e dentro do mesmo osso, cada extremidade pode crescer com velocidades diferentes (BARRETO **et alii**, 1993).

Acompanhando todas estas transformações dos condrócitos na placa de crescimento ocorrem mudanças no conteúdo da MEC e muitas especulações têm sido feitas sobre o papel dos componentes da matriz nesses processos. Estudos demonstraram a diminuição no tamanho dos agregados de proteoglicanos e um aumento no número de monômeros de proteoglicanos não agregantes, progressivamente em direção à zona hipertrófica calcificada (BUCKWALTER **et alii**, 1987).

Em um outro estudo com a placa de crescimento da região proximal da tíbia de feto bovino observou-se um aumento progressivo da concentração do agrecam e do ácido hialurônico da zona de maturação para a hipertrófica, sendo máxima durante a mineralização (ALINI **et alii**, 1992). SHEPARD & MITCHEL (1985) demonstraram que os proteoglicanos aumentam de concentração justamente nos sítios de calcificação, formando estruturas em rosetas na matriz da cartilagem hipertrófica.

VIDAL (1977) demonstrou mudanças na orientação macromolecular das cadeias de GAGs acompanhando a maturação dos condrócitos, enfatizando o aumento no grau de sulfatação dos GAGs. HARAB & MOURÃO (1989) detectaram bioquimicamente um aumento na concentração de condroitim 4-sulfato na cartilagem de crescimento de cão, sugerindo a participação deste nos processos de calcificação e ossificação endocondral. Este resultado foi confirmado recentemente por HAGIWARA e cols. (1995) utilizando estudos imunocitoquímicos.

O pequeno proteoglicano decorim é produzido na cartilagem epifisária e na zona de reserva, mas não nas zonas de proliferação, maturação e hipertrofia (POOLE & PIDOUX, 1986).

Tem-se sugerido que a proteína tenascina mantém o fenótipo dos condrócitos da cartilagem articular. PACIFICI e cols. (1993) demonstraram a associação da proteína tenascina com o desenvolvimento da cartilagem articular e outras cartilagens permanentes, enquanto está ausente ou em quantidades reduzidas na matriz de cartilagens transitórias, e placas de crescimento, que sofrem maturação e são substituídas por osso.

O papel dos componentes da matriz extracelular nos processos que ocorrem na cartilagem de crescimento está começando a ser agora entendido.

O destino dos condrócitos hipertróficos e a absorção da cartilagem hipertrófica

Os condrócitos hipertróficos da placa de crescimento são conhecidos por terem uma breve história de vida. Acredita-se que, com a calcificação da matriz da cartilagem hipertrófica, a matriz perde a capacidade de difundir os gases e nutrientes, causando a morte dos condrócitos (STAMBAUGH & BRIGHTON, 1980). Outros demonstraram que a morte celular programada, apoptose, também contribui para a degeneração da cartilagem hipertrófica (GIBSON **et alii**, 1995; ROACH **et alii**, 1995).

Outros estudos demonstraram que os condrócitos hipertróficos são metabolicamente ativos, produzindo componentes específicos de sua matriz extracelular, como por exemplo o colágeno tipo X e as vesículas de calcificação, sugerindo que eles são um tipo celular especializado e não uma célula em degeneração (FARNUM & WILSMAN, 1987).

Atualmente alguns trabalhos têm comprovado antigas suposições que sugeriam outro destino para os condrócitos hipertróficos. Estudos demonstraram a presença de osteopontina em alguns condrócitos hipertróficos. Estes também sintetizam outras proteínas que são características da matriz óssea. Essas incluem o colágeno tipo I e a fosfatase alcalina específica de osteoblastos. Estes resultados têm dado suporte à possibilidade de conversão de condrócitos hipertróficos em células osteogênicas. Outros estudos têm considerado a metaplasia da cartilagem em osso (HAINES, 1942; HALL, 1970; FRANZEN **et alii**, 1989; CANCEDA **et alii**, 1995).

Quanto à absorção da cartilagem hipertrófica, observações indicam que a mesma ocorre por dois mecanismos diferentes. A absorção de cartilagem não mineralizada é mediada por diversos tipos de células mononucleadas, células endoteliais e pericapilares enquanto que a erosão da cartilagem mineralizada é mediada por condroclastos (SCHENK **et alii**, 1967).

Nos capilares responsáveis pela absorção da cartilagem são encontrados diversos prolongamentos citoplasmáticos das células endoteliais e das células perivasculares que invadem a cartilagem não mineralizada (SCHENK **et alii**, 1967).

O processo de absorção da cartilagem mineralizada por condroclastos é semelhante ao executado por osteoclastos para matriz óssea, como descrito por MARKS, Jr. & POPOFF (1988). Alguns autores consideram poucas as diferenças estruturais e funcionais entre condroclastos e osteoclastos (SCHENK **et alii**, 1967).

Além dos mecanismos típicos de absorção de cartilagem mineralizada e não mineralizada, LEE e cols. (1995) classificaram de septoclastos as células responsáveis pela absorção do septo transversal que não é mineralizado. Estas células, antes consideradas como mais uma entre as perivasculares, apresentam inúmeras vesículas ricas em catepsina B, é mononucleada e não é reconhecida por anticorpos específicos para osteoclastos, macrófagos e monócitos.

Canais da Cartilagem epifisária

O sistema vascular que invade as condroepífises antes da formação do centro secundário de ossificação é conhecido como canais da cartilagem. Estes canais contêm arteríolas, vênulas, capilares e um tecido conjuntivo circundante com diferentes tipos celulares.

Existem duas teorias principais para explicar o aparecimento dos canais nas condroepífises a partir do pericôndrio: eles seriam incluídos passivamente pelo crescimento da cartilagem sobre os vasos do pericôndrio (HAINES, 1933), ou penetrariam por um crescimento ativo dos vasos com destruição da matriz da cartilagem (LUFTI, 1970).

Outros capilares também invadem as condroepífises, mas na região metafisária. Estes se originam da medula óssea e invadem os espaços ocupados pelas células da cartilagem hipertrófica, entre os septos longitudinais calcificados.

Não se conhece totalmente a função destes canais nas epífises. Já foi sugerida uma função na nutrição da cartilagem (HAINES 1933). Outros pesquisadores sugeriram,ainda, que os canais conduzem células mesenquimais necessárias para o crescimento intersticial da cartilagem (LUFTI, 1970). Existe também a hipótese de que estes canais participem ds processos de ossificação endocondral e de formação do centro secundário de ossificação. Para esta última função os canais deveriam possuir também células que absorvem a cartilagem e osteoblastos que formariam a matriz óssea (WILSMAN **et alii**, 1970; CHAPARD **et alii**, 1986; GANEY **et alii**, 1992; KUGLER **et alii**, 1979).

Contudo, a formação dos canais da cartilagem, suas funções necessitam ainda de estudos mais aprofundados.

Cartilagem articular

Simultaneamente com a formação da cartilagem de crescimento, outro tipo muito especial de cartilagem também se forma nas extremidades das epífises, a cartilagem articular. Esta cartilagem apresenta constituição e morfologia particulares, que garantem ao tecido o desempenho de suas funções.

Uma das principais funções da cartilagem articular é dissipar os impactos de cargas nas articulações, protegendo as extremidades ósseas. Esta propriedade é dependente da integridade dos agregados de proteoglicanos e das fibrilas de colágeno tipo II que formam uma rede resistente (BROOM & POOLE, 1983).

Os proteoglicanos com suas cargas negativas geram uma pressão osmótica dentro da matriz. Aproximadamente 60-80% da matriz é constituída por água. A configuração espacial e grau de entrelaçamento das fibrilas de colágeno irão determinar a eficiência com a qual os proteoglicanos hidratados são imobilizados, influenciando assim as propriedades da matriz (OLOYEDE **et alii**, 1992).

A orientação das fibrilas de colágeno varia dentro da cartilagem articular, nas regiões superficiais ela corre tangencialmente e, mais profundamente, orientam-se de forma radial. Esta organização está relacionada à direção de dissipação das forças mecânicas. Já o gel de proteoglicanos hidratados está virtualmente ausente da camada superficial mas é encontrado em grande quantidade na camada intermediária e profunda (BROOM & POOLE, 1983).

As forças de compressão na cartilagem articular parecem fazer parte da sua fisiologia normal, sendo necessárias para a manutenção da composição da matriz extracelular dos condrócitos. Estudos em que estas forças foram retiradas provocaram uma diminuição no conteúdo dos proteoglicanos (URBAN, 1994). Entretanto, excesso de peso ou compressão podem provocar danos à rede colagênica e, consequentemente, perda de proteoglicanos. Estes danos estão relacionados com doenças traumáticas, principalmente osteoartrite (HOCH **et alii**, 1983; LOHMANDER, 1994).

O CRESCIMENTO DE OSSOS LONGOS E A CARTILAGEM EPIFISÁRIA DOS ANFÍBIOS ANUROS

Até aqui foram relatados aspectos relacionados aos ossos e cartilagens de répteis, aves e mamíferos. Pouco se conhece sobre estes processos para os anfíbios anuros. Os estudos com anfíbios estão limitados a trabalhos antigos de KASTICHENKO (1881), LUBOSCH (1927), FROBÖSE (1927) e HAINES (1938 e 1942). Nestes trabalhos, que não apresentam fotomicrografias, mas desenhos esquemáticos das estruturas epifisárias de diversas espécies de anuros, foram descritos modelos de epífises presentes em todas as espécies estudadas.

As epífises estão encaixadas num tubo ósseo diafisário (como a cabeça de uma raquete na haste, figura 9), a cartilagem articular das epífises apresenta uma projeção lateral que recobre a face externa do tubo ósseo, formando um sulco estreito preenchido por um tecido conjuntivo frouxo entre a "cartilagem lateral" e a face externa do tubo ósseo. Este tecido, altamente vascularizado, atua como uma camada celular do periósteo para o osso e como pericôndrio para a superfície interna da "cartilagem lateral".

Abaixo da cartilagem articular, por dentro do tubo ósseo diafisário, encontra-se a cartilagem de crescimento com as zonas de proliferação, maturação e hipertrófica. As células desta cartilagem não apresentam um arranjo colunar evidente.

Estas epífises apresentam diversas regiões de calcificação, distribuídas de forma distinta daquelas descritas para os outros grupos. HAINES (1942) denominou de "centro secundário de calcificação" as regiões de calcificação da cartilagem articular e lateral. Além disso, ocorre a formação de trabéculas longitudinais e transversais na borda da cartilagem hipertrófica com a medula óssea, o que tem sido sugerido como resultado de ossificação endocondral.

A formação das trabéculas ósseas também pode ocorrer na parede de canais da cartilagens denominados de "canais perfurantes". Estes canais podem ser considerados projeções da medula óssea para o interior da cartilagem hipertrófica.

O osso endocondral pode ser bem desenvolvido como em *Rana esculenta* ou, em outros sem dúvida mais especializados, pode ser totalmente ausente. O tipo de encaixe da cartilagem epifisária produz uma inserção muito firme da cartilagem na extremidade do tubo ósseo, tornando o desenvolvimento de osso endocondral desnecessário (HAINES, 1938 e 1942). As epífises, no conjunto, parecem constituir uma recente e peculiar especialização para o salto (imposta às estruturas primitivas). Em urodelos que são considerados menos evoluidos o mesmo padrão de distribuicão irregular das células da cartilagem de crescimento é encontrado. Entretanto, estes animais não apresentam as expansões laterais da cartilagem articular (HAINES, 1942).

KEMP & HOYT (1969) estudaram o processo de ossificação do fêmur dos girinos de *Rana pipens*, mas não se referiram à calcificação da cartilagem epifisária e à ossificação endocondral. MOPTY & CIMAROSTI (1979), num estudo com cinco espécies de anuros, relacionou diferentes graus de calcificação da cartilagem articular, lateral e de crescimento e a quantidade de osso endocondral com o peso. As maiores quantidades de calcificação e osso endocondral foram encontradas nos animais de maior peso.

McEVEN (1957), num estudo sem documentações, descreveu que os ossos longos de *Rana catesbeiana* são periosteais e que não ocorre ossificação endocrondral, enfatizando que as epífises permanecem cartilaginosas, mas não mencionou sobre os processos de calcificação da cartilagem epifisária.

Num trabalho mais recente, DIKSON (1982), descreveu a ultraestrutura da cartilagem de crescimento do fêmur de *Rana temporaria*. Ao contrário do que afirmavam FROBÖSE (1927) e HAINES (1938), de que não ocorre calcificação da cartilagem e nem formação de osso endocondral nesta espécie, ele demonstrou processos de calcificação e de ossificação endocondral, principalmente nos animais mais velhos.

Fatos como este sugerem a necessidade de novas observações em outras espécies, principalmente naquelas que carecem de documentações mais precisas, acompanhando as diversas fases do desenvolvimento e o envelhecimento, descrevendo mais detalhadamente a estrutura da cartilagem epifisária, as estruturas ósseas, o tecido conjuntivo que preenche o sulco, e os processos de calcificação e ossificação endocondral. Estes aspectos são de grande importância para a compreensão da fisiologia desta cartilagem nos anfíbios e também para os outros grupos animais.

OBJETIVOS

Considerando a grande especialização da cartilagem epifisária dos anfíbios anuros e a necessidade de se conhecer os aspectos relacionados à capacidade de resistir às forças mecânicas e ao crescimento, este trabalho teve por objetivos acompanhar o desenvolvimento e o envelhecimento da cartilagem epifisária de *Rana catesbeiana*, descrevendo os aspectos celulares e da matriz extracelular, com especial referência ao crescimento ósseo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizadas articulações do joelho de rãs da espécie *Rana catesbeiana*. As rãs foram obtidas de ranário comercial da cidade de Atibaia-SP.

Os animais foram divididos em três grupos: girinos (3 a 6 meses de idade), adultos com 1 ano, pesando entre 140-180g e adultos velhos com idade de 3 anos. Os girinos foram separados em estádios de desenvolvimento segundo a tabela de GOSNER (1960).

Clareamento enzimático e coloração de ossos e cartilagens

Alguns girinos nos estágios de desenvolvimento 32, 37, 38, 40 e 46 foram processados pelo método de diafanização e coloração de ossos e de cartilagens pelo vermelho de alizarina e azul de alcian, respectivamente. Foi empregado o método de TAYLOR (1985).

O material foi fixado em formol 10% por 3 dias. Após sua lavagem por 2 dias em água destilada foram retiradas a pele e as vísceras. O material foi então imerso em solução de Azul de alcian (10 mg de Azul de Alcian, 80 ml de álcool 95% e 20 ml de ácido acético PA) e deixado por 48 horas. Após a coloração das cartilagens o material foi transferido para uma solução de álcool etílico 95% por 3 horas e hidratado em série etalólica decrescente. Em seguida o material foi transferido para água destilada e deixado até afundar-se (3 horas). Após esta etapa o material foi colocado em solução de tripsina 0,1% em borato de sódio (70 ml de água destilada e 30 ml de solução saturada de borato de sódio). A solução foi trocada toda vez que se tornou azulada, para que os ossos e cartilagens ficassem claramente visíveis e a musculatura perdesse a cor azulada (2-3 semanas). O material foi transferdo para uma solução aquosa de KOH 0,5% + alizarina 0,01% e deixado por 48 horas, até quando os ossos tornaram-se distintamente vermelhos. Quando os ossos estavam totalmente visíveis o material foi transferido para uma série de soluções de KOH 0,5% + glicerina nas proporções de 3:1, 1:1 e 1:3, respectivamente. Nesta última série foram colocadas 4 gotas de água oxigenada 3% por 100 ml de solução para remover os pigmentos escuros. Finalmente, o espécime foi preservado em glicerina pura com alguns cristais de Timol, para evitar crescimento de fungos e/ou bactérias.

Histologia e Citoquímica

Os animais foram imobilizados por resfriamento e mortos por secção da medula cervical. Dos girinos foram processados inteiramente os membros inferiores. Os joelhos dos adultos foram dissecados e retirados em conjunto a região distal do fêmur e a região proximal da tíbio-fíbula.

O material foi fixado por 2 dias em uma solução contendo formaldeído 10% e NaCl 0,85% em tampão fosfato 0,1M pH 7,2. A descalcificação foi feita em solução de ácido acético 10%, NaCl 0,85% e folmaldeído 10% em água destilada durante 10 dias (MULLINK **et alii**, 1985; JOYCE **et alii**, 1990). Após a descalcificação, o material foi lavado em água corrente por 24 horas, desidratado em série etanólica crescente, a seguir, diafanizado em óleo de Cedro (2-3 dias) e incluído em Paraplast Plus. O material foi cortado com navalha de aço em micrótomo Jung.

Cortes longitudinais sagitais de 6-8 μm foram corados pela Hematoxilina de Erlich e Eosina-Floxina (H&E) para as observações histológicas gerais, e pelas seguintes técnicas citoquímicas:

Azul de Toluidina (AT) 0,025% em tampão citrato McIlvaine a pH 4,0, para radicais aniônicos ($-PO_3^-$, $-SO_3^-$ e $-COO^-$). Os cortes foram corados por 15 minutos, lavados em três banhos de água destilada, secos ao ar, clarificados em xilol e montados em bálsamo do Canadá (MELLO & VIDAL, 1980).

Xylidine Ponceau (XP) 0,1 % em solução aquosa de ácido acético 2%, pH 2,5, para radicais catiônicos (NH_3^+). Os cortes foram corados por 30 minutos, lavados em água destilada por 5 minutos e secos ao ar, clarificados em xilol e montados em bálsamo do Canadá (MELLO & VIDAL,1980).

Picrossírius-Hematoxilina (PSH) para colágenos. Os cortes foram corados com sirius red 0,1% em solução aquosa saturada de ácido pícrico por 60 minutos e lavados por 5 minutos em água destilada. Foram, a seguir, contra-corados com hematoxilina, lavados por 10 minutos em água corrente, desidratados em série etanólica crescente, clarificados em xilol e montados em bálsamo do Canadá (JUNQUEIRA **et alii**, 1979).

Impregnação pela prata para fibras de colágeno. Os cortes foram oxidados em solução de permanganato de potássio a 2% por dois minutos, lavados em água destilada. Depois, foram imersos em solução de ácido oxálico a 1% por um minuto e lavados em água destilada. Logo após, foram tratados pelo alúmen de ferro a 2% por um minuto, lavados em água destilada e submetidos à impregnação pela prata amoniacal por dois minutos. Foram lavados em água destilada por dois minutos e tratados com solução de formalina 10% por três minutos e lavados em água destilada. A reação foi diferenciada com solução de cloreto de ouro a 2%, controlada ao microscópio. Os cortes foram então lavados em água destilada e tratados com hipossulfito de sódio por três minutos, lavados em água destilada, desidratados em série etanólica, clarificados em xilol e montados em bálsamo do Canadá (GOMORI 1937).

von Kossa para cálcio. Para este teste o material não foi descalcificado. Os cortes foram imersos em solução aquosa de nitrato de prata a 10% e expostos ao sol durante 30 minutos, lavados em água destilada e diferenciados rapidamente em hipossulfito de sódio a 5% (BEHMER **et alii**, 1976), lavados em água destilada e contra-corados com verde de metila 0,25% em tampão acetato pH 4,0. Os cortes foram secos ao ar, clarificados em xilol e montados em bálsamo do Canadá.

Outros fragmentos de cartilagens de girinos e animais adultos foram fixados e descalcificados nas mesmas condições, mas foram desidratados parcialmente em álcool 70%, embebidos por 12 horas e depois incluídos em Historesina JB4 (Polysciences). Cortes de 2-3 μm foram submetidos a alguns dos testes citados acima.

Citoquímica enzimática

Fragmentos da cartilagem epifisária do fêmur de animais adultos de 1 ano foram fixados em formol 10% em tampão cacodilato de sódio 0,2 M, pH 7,2 por 4 horas, lavados no mesmo tampão por 4 horas, desidratados parcialmente em álcool 70%, embebidos por 12 horas e incluídos em Historesina JB4.

Cortes de 2-3 μm foram submetidos aos testes da fosfatase alcalina e fosfatase ácida.

Para fosfatase ácida os cortes foram imersos numa solução de tampão acetato 0,1M, pH 5,0, contendo α-naftil fosfato 0,1 % e vermelho rápido 0,1%. Para fosfatase alcalina os cortes foram imersos numa solução tampão Tris-HCl 0,2 M pH 10,0 com as mesmas substâncias. Após a reação, os cortes foram lavados em água destilada e montados em glicerina 80% (BANCROFT, 1982).

O material foi observado em Axioskop Zeiss, com luz normal e luz polarizada, e fotografado em cores com filme Kodak Gold ASA 100-135 mm e em branco e preto com filme Kodak Plus X Pan ASA 125-135 mm.

Microscopia Eletrônica de Transmissão

Fragmentos da cartilagem epifisária distal do fêmur (zona articular, zona de proliferação e maturação, zona hipertrófica superior, borda de contato da medula óssea e cartilagem hipertrófica, canais da cartilagem com cartilagem hipertrófica ao redor e a extremidade de crescimento longitudinal do osso periosteal) foram fixados por 2 horas à temperatura ambiente em uma solução de tampão de Millonig 0,2 M pH 7,2 contendo glutaraldeído 3% e ácido tânico 0,25%, lavados no mesmo tampão, pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%, lavados novamente e desidratados em série crescente de acetona (MILLONIG, 1962; COTTA-PEREIRA **et alii**, 1976). Fez-se a embebição "overnight" em acetona-epon 812 (1:1/v:v) e posteriormente a inclusão em epon por 3 dias em estufa a 60° C.

Cortes semi-finos obtidos com navalhas de vidro em ultra-micrótomo LKB foram corados com Azul de toluidina 1% em carbonato de sódio 1%. Cortes ultra-finos foram obtidos em navalhas de diamante em ultra-micrótomo LKB e recolhidos em telinhas de cobre de 200 "mesh". Os cortes ultra-finos foram contrastados com acetato de uranila 2% em metanol (RIVA, 1974) e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963).

Os cortes foram observados em microscópio eletrônico de transmissão Philips EM301 e eletromicrografados em filme Kodak 135 mm ASA 100.

3 RESULTADOS

O desenvolvimento dos girinos

O desenvolvimento dos girinos observado pelo método do clareamento e coloração de ossos e cartilagens

Este método revelou que, inicialmente, formam-se primórdios cartilaginosos do fêmur e da tíbio-fíbula (Figura 1a), que nos anuros são fundidos. Posteriormente ocorre a deposição de osso periosteal ao redor da região central, primeiro no fêmur e depois na tíbio-fíbula (Figuras 1b-d). Este osso periosteal cresce longitudinalmente em direção as extremidades (Figuras 1e-f) e as estruturas cartilaginosas ficam restritas às extremidades, formando a cartilagem epifisária (Figuras 1g-h).

Análise histológica do desenvolvimento dos girinos

Os dados sobre o desenvolvimento começam a partir dos girinos com estádio 34. Provavelmente os processos que ocorreram anteriormente são muito semelhantes àqueles descritos na Introdução para outros grupos.

No estágio de 34, observou-se uma estrutura totalmente cartilaginosa, formando o modelo ósseo do fêmur e da tíbio-fíbula (Figura 2a). Muitas células mesenquimais concentravam-se entre as epífises distal do fêmur e proximal da tíbio-fíbula. A cartilagem apresentou-se muito celular e os condrócitos estavam rodeados por uma MEC predominantemente basófila (Figura 2a). Ao centro do fêmur observaram-se condrócitos hipertróficos contornados por um delgado pericôndrio fibroso (Figuras 2 b-c).

No estágio de 35 (Figuras 3a-d), a estrutura cartilaginosa era muito celular nas extremidades e apresentava condrócitos hipertróficos na região diafisária (Figuras 3a-b). No pericôndrio ao redor dos condrócitos hipertróficos encontrou-se uma matriz calcificada, formando uma estrutura tubular. Esta matriz era mais espessa no centro e diminuía de espessura em direção as epífises (Figuras 3a, tf). Entretanto não se observou calcificação da matriz dos condrócitos hipertróficos (Figura 3c).

Esta matriz óssea corresponde ao osso periosteal que foi depositado no pericôndrio, que passou a ser o periósteo, pois já apresenta osteócitos no seu interior (Figura 3d). Internamente, esta matriz óssea apresentava uma borda lisa com a cartilagem hipertrófica, mas externamente demonstrava um aspecto granulado da deposiçãao de cálcio (Figuras 3 c-d)

Nas próximas idades, girinos de 37, 38 e 39 (Figuras 4a-c), além do crescimento da estrutura cartilaginosa, observou-se o aparecimento da cartilagem lateral nas extremidades das epífises (Figura 4a), o crescimento longitudinal do osso periosteal em direção às extremidades e a formação inicial da cavidade da medula óssea (Figura 4b). As zonas da cartilagem de crescimento ainda não estavam nítidas, mas pôde-se definir uma zona de proliferação e uma zona hipertrófica (Figura 4b), que não apresentou aspectos de calcificação, sendo que apenas o osso periosteal apresentou reação positiva para cálcio (Figura 4c). Foi possível observar a fina camada fibrosa do periósteo, separando os osteoblastos da matriz ossificada (Figura 4c).

Nos girinos de estágio 41 (Figuras 5 a-d), a cartilagem de crescimento estava totalmente envolvida pelo tubo ósseo periosteal. Esta cartilagem de crescimento apresentava as zonas de proliferação, maturação e hipertrófica, com muitas células sem arranjo colunar. Existia uma maior proporção da zona hipertrófica em relação as outras duas (Figura 5a). A borda da cartilagem hipertrófica com a medula óssea era uniforme, sem penetrações de capilares (Figura 5b)

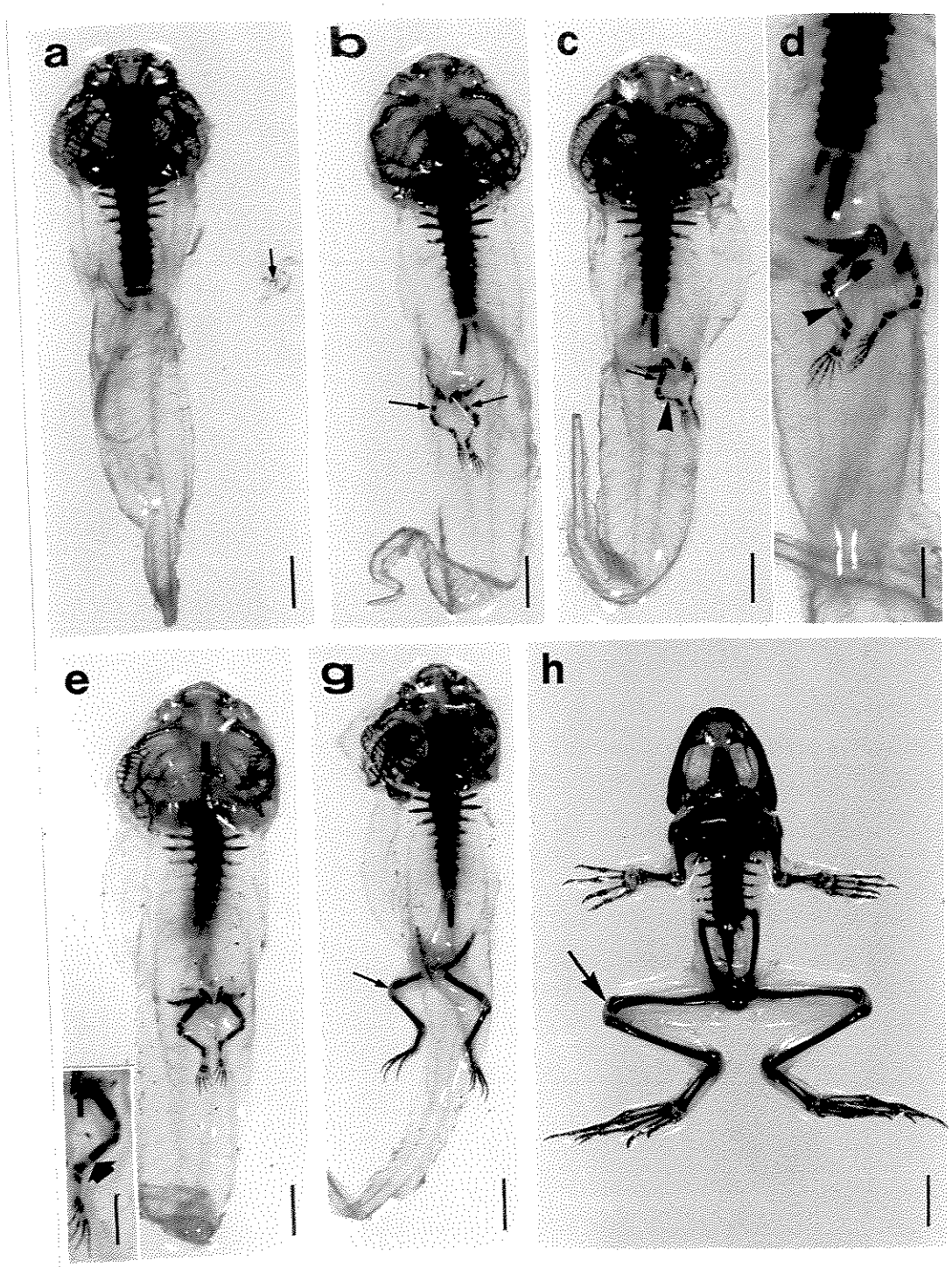

FIGURA 1. Girinos em vários estágios de desenvolvimento processados pelo método de diafanização e coloração de cartilagens em azul e ossos em vermelho. **a)** Girino em estágio 32 (G32), estruturas em forma de bastão aderidas a pele e coradas em azul (seta). **b)** G37, membros inferiores formados e corados principalmente de azul, mas já existe uma marcação em vermelho na região mediana ou diafisária do fêmur (setas). **c-d)** G38, uma maior marcação em vermelho no fêmur (seta) e o aparecimento da mesma marcação no centro da tíbio-fíbula (cabeça de seta). A marcação azul é vista principalmente nas articulações. **e-f)** G39, no fêmur a marcação vermelha está próxima às articulações enquanto que na tíbio-fíbula está mais distante (seta). **g)** G41, marcação vermelha predomina nos ossos e a marcação azul nas articulações (seta). **h)** G46, animal após recente metamorfose, com todos os membros formados, ossos corados em vermelho e as cartilagens em azul, restritas à superfície articular dos ossos (seta). Aumentos: a) barra = 0,66 cm, b) barra = 0,66 cm, c) barra = 1 cm, d) barra = 0,5 cm, e) barra = 1 cm, f) barra = 0,5 cm, g) barra = 1 cm e h) barra = 0,75 cm.

A extremidade de crescimento longitudinal do osso periosteal estava encaixada num sulco de tecido conjuntivo formado entre a cartilagem lateral e a cartilagem de crescimento. Este tecido conjuntivo continha muitos vasos e células, provavelmente osteoprogenitoras. Na superfície do osso periosteal existiam muitos osteoblastos com citoplasma basófilo direcionado para a superfície óssea (Figura 5c).

Nesta mesma idade, na tíbio-fíbula, que sempre apresentou os mesmos aspectos de desenvolvimento com um certo atraso em relação ao fêmur, na cavidade da medula óssea, junto a superfície interna do osso periosteal, foram observados restos de matriz metacromática da cartilagem hipertrófica (Figura 5d).

Nos girinos de estádio 46 (Figura 6a-b), acompanhando o crescimento longitudinal do osso ocorreu também um aumento no diâmetro da cartilagem epifisária. A cartilagem articular e a lateral, muito semelhantes, apresentavam um aumento de volume e a zona hipertrófica apresentou uma redução no seu tamanho longitudinal.

A borda da cartilagem hipertrófica com a medula óssea apresentou um aspecto uniforme com muitas células mononucleadas em contato com a matriz da cartilagem (Figura 5b e 6b).

Em condições anormais de ossificação periosteal (Figuras 7a-c), foram encontradas células polinucleadas e células com muitas vesículas, aparentemente erodindo a matriz óssea e também a matriz cartilaginosa.

Até a metamorfose não foi observado calcificação da cartilagem hipertrófica e nem ossificação endocondral. A cartilagem epifisária era formada somente por cartilagem hialina não mineralizada e o osso periosteal continuava em forma tubular.

As observações destas fases de desenvolvimento do girino estão resumidas na figura 8.

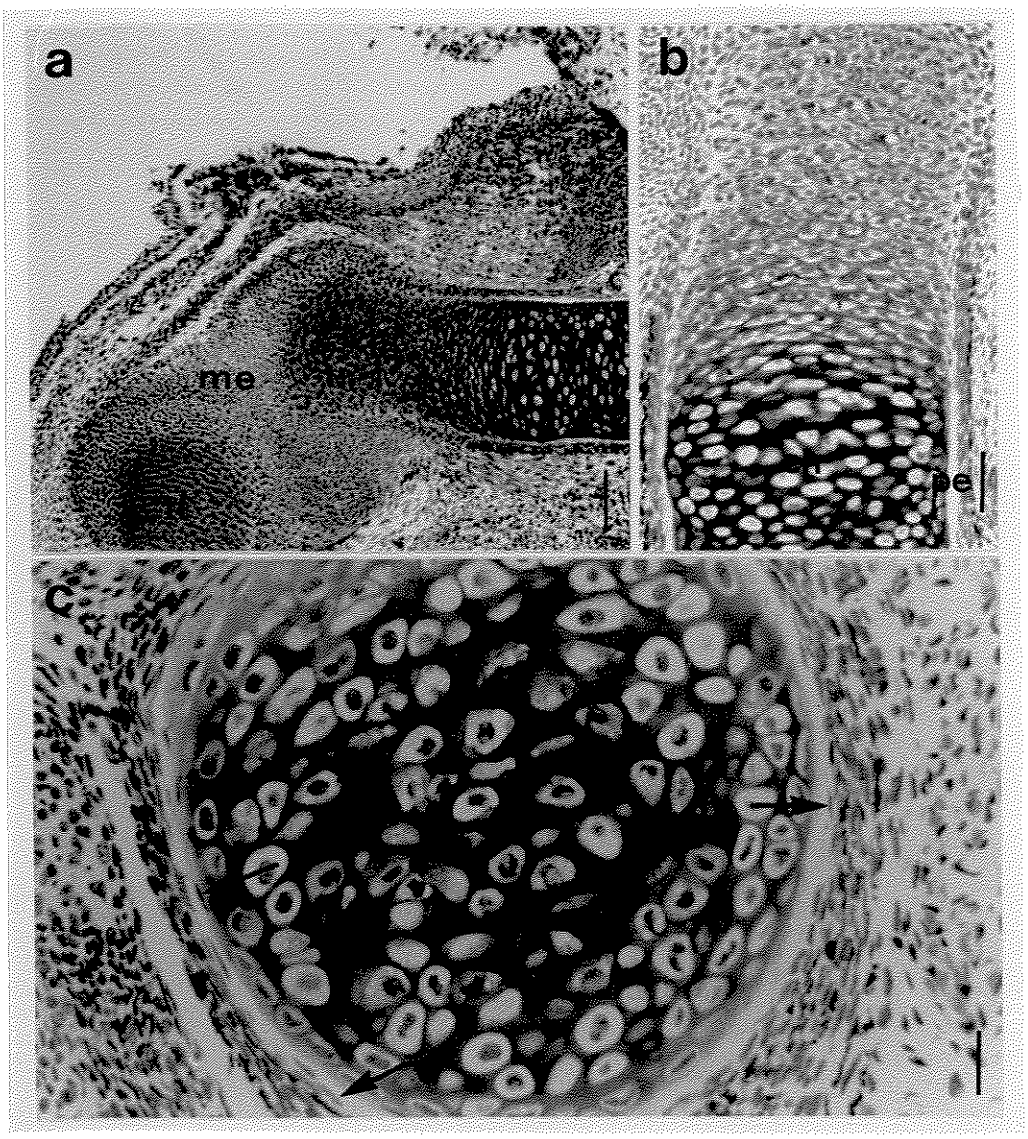

FIGURA 2. Cortes em historesina do membro inferior de G34 corados com AT. **a-b)** cortes sagitais e **c)** corte transversal da região diafisária do fêmur. **a)** Visão do modelo cartilaginoso do fêmur (fe) e da tíbio-fíbula (tf), com a matriz extracelular metacromática, e entre as cartilagens muitas células, provavelmente mesenquimais (me), sem matriz metacromática. **b)** Detalhe da cartilagem do fêmur com células hipertróficas (ch) na região mediana contornadas por um pericôndrio (pe). **c)** Corte transversal da região hipertrófica do fêmur. Células alongadas no pericôndrio (setas), este não se cora pelo AT. Aumentos: a) barra = 100 μm, b) barra = 50 μm, c) barra = 25 μm.

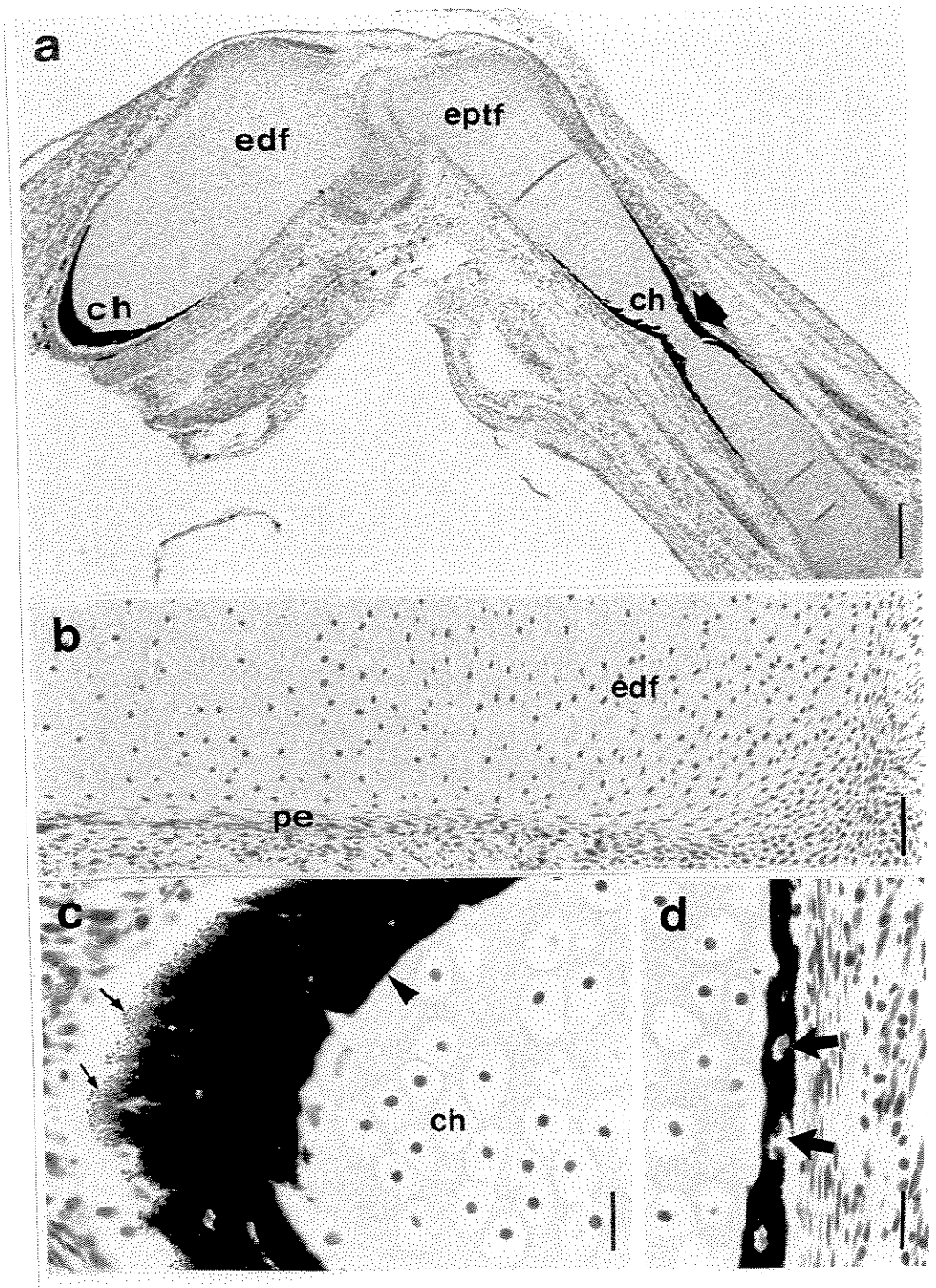

FIGURA 3. Cortes em Paraplast de fêmur e tíbio-fíbula submetidos a técnica de von Kossa e contra-corados com Hematoxilina. **a)** Epífise distal do fêmur (edf) e epífise proximal da tíbio-fíbula (eptf), reação positiva para cálcio na região diafisária ao redor da cartilagem hipertrófica (ch). A marcação é mais espessa no centro (seta). **b)** Detalhe da cartilagem epifisária do fêmur (edf). Células alongadas na região do pericôndrio (pe) e os condrócitos da extremidade não muito diferenciados. **c)** Aspecto granular da reação na superfície externa (setas) e internamente, uma borda lisa (cabeça de seta) com a cartilagem hipertrófica (ch), que não apresenta reação positiva. **d)** Detalhe da tíbio-fíbula mostrando algumas células no interior da matriz que apresenta reação positiva para cálcio (setas). Aumentos: a) barra = 200 μm, b-d) barra = 25 μm.

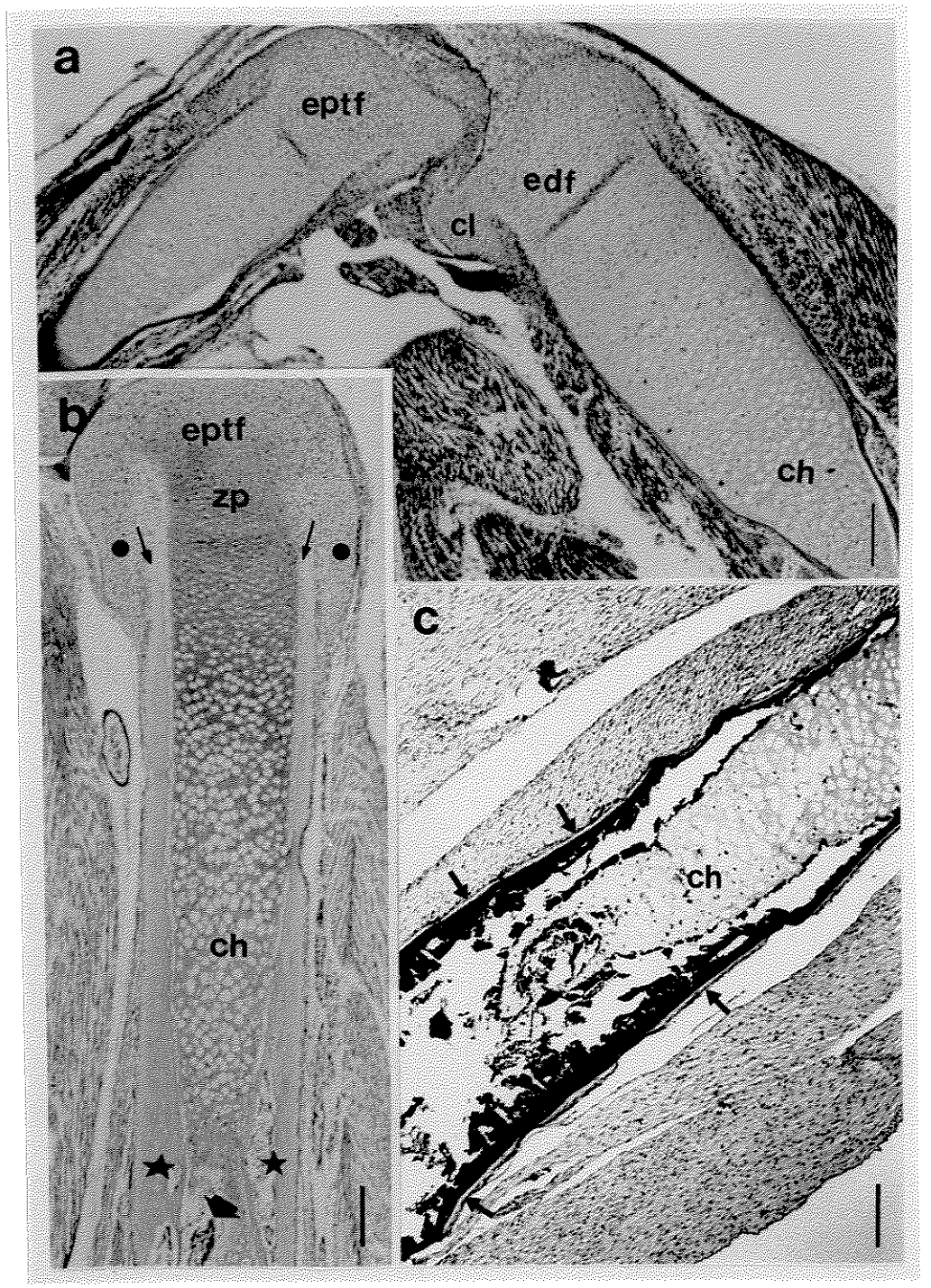

FIGURA 4. a) Corte em Paraplast corado com H&E. G 37, cartilagem lateral (cl) da epífise distal do fêmur (edf) e, em menor tamanho, na epífise proximal da tíbio-fibula (eptf), a cartilagem hipertrófica mais ao centro (ch). **b)** Epífise proximal da tíbio-fíbula do G 38, corte em paraplast corado com H&E. Entre a cartilagem lateral (●) e a zona de proliferação (zp), encaixa-se a extremidade de crescimento longitudinal do osso periosteal (setas menores). Este osso é mais espesso na região diafisária (estrelas). Grande quantidade de cartilagem hipertrófica (ch) e as primeiras formações da medula óssea (seta maior). **c)** Corte em paraplast de material não descalcificado submetido a técnica de von Kossa e contra corado com Hematoxilina. G 39, reação positiva na matriz óssea, que apresenta uma fina superfície fibrosa (setas). A cartilagem hipertrófica (ch) não apresenta reação positiva para cálcio. Aumentos a-b) barra = 200 μm e c) barra = 150 μm.

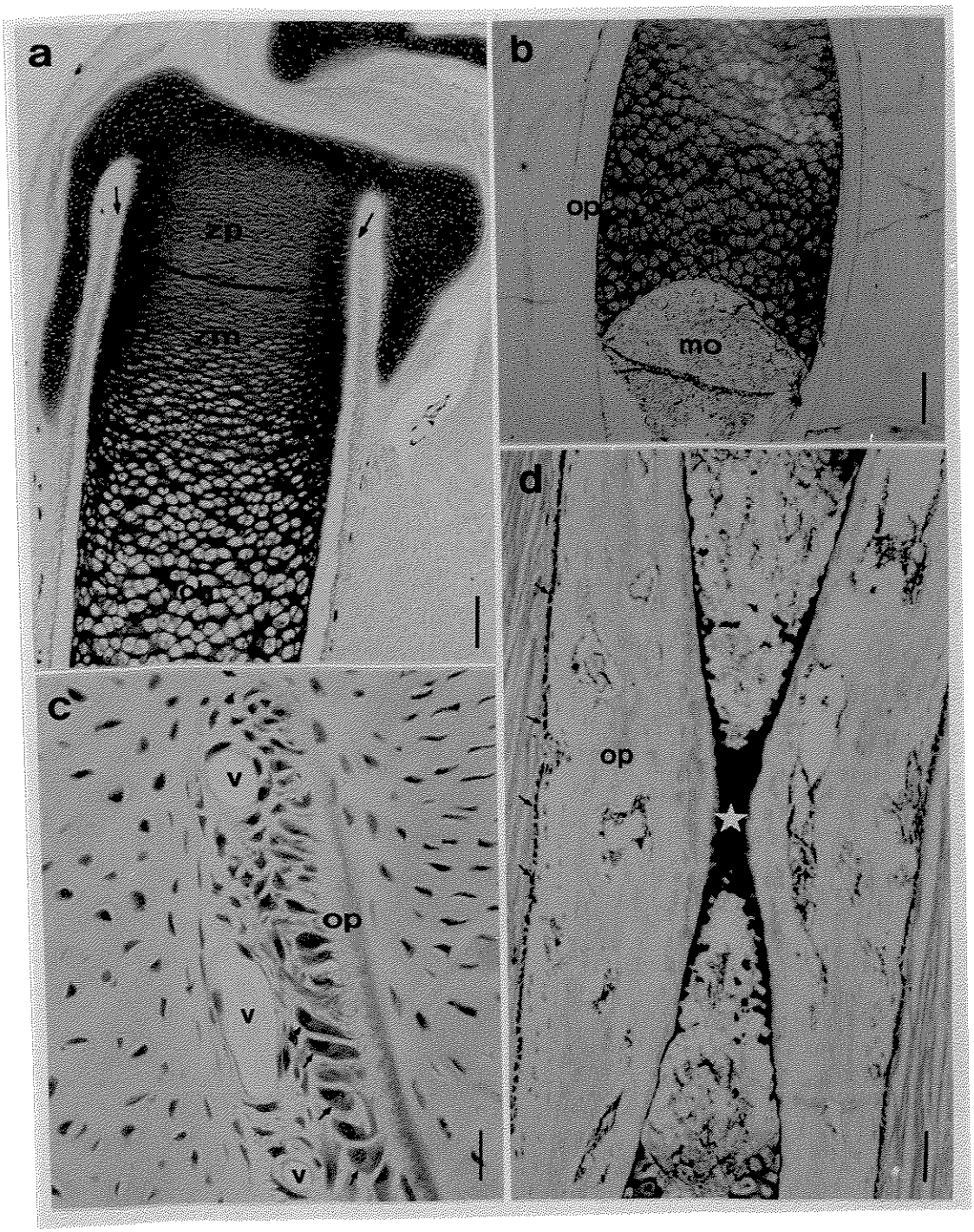

FIGURA 5. Fêmur e tíbio-fíbula de G41. a e d) cortes em paraplast corados com AT, b) corte em historesina corado com AT e c) corte em historesina corado com H&E. **a)** Visão geral o fêmur mostrando que a cartilagem lateral recobre a extremidade de crescimento longitudinal do osso periosteal (setas). Internamente ao osso, está a cartilagem de crescimento, bastante extensa, com condrócitos achatados na zona de proliferação (zp), condrócitos mais ovais na zona de maturação (zm) e muitos condrócitos hipertróficos (ch). **b)** Borda lisa da cartilagem hipertrófica (ch) com a medula óssea (mo) e o osso periosteal contornando estas estruturas (op). **c)** Extremidade crescimento longitudinal do osso periosteal (op). Nesta região entre a cartilagem lateral e o osso esta presente um tecido conjuntivo muito vascularizado e na superfície do periósteo observam-se células com amplo citoplasma, polarizado em direção ao osso (setas). V = vasos. **d)** Região diafisária do osso periosteal (op) da tíbio-fíbula. Corte tangencial da superfície interna do osso com intensa marcação metacromática (estrela). O osso é mais espesso no centro e vai diminuindo progressivamente de espessura em direção as extremidades. Muitas células cobrem toda a superfície externa do osso (setas). Aumentos: a) barra = 200 μm, b) barra = 200 μm, c) barra = 25 μm e d) barra = 100 μm.

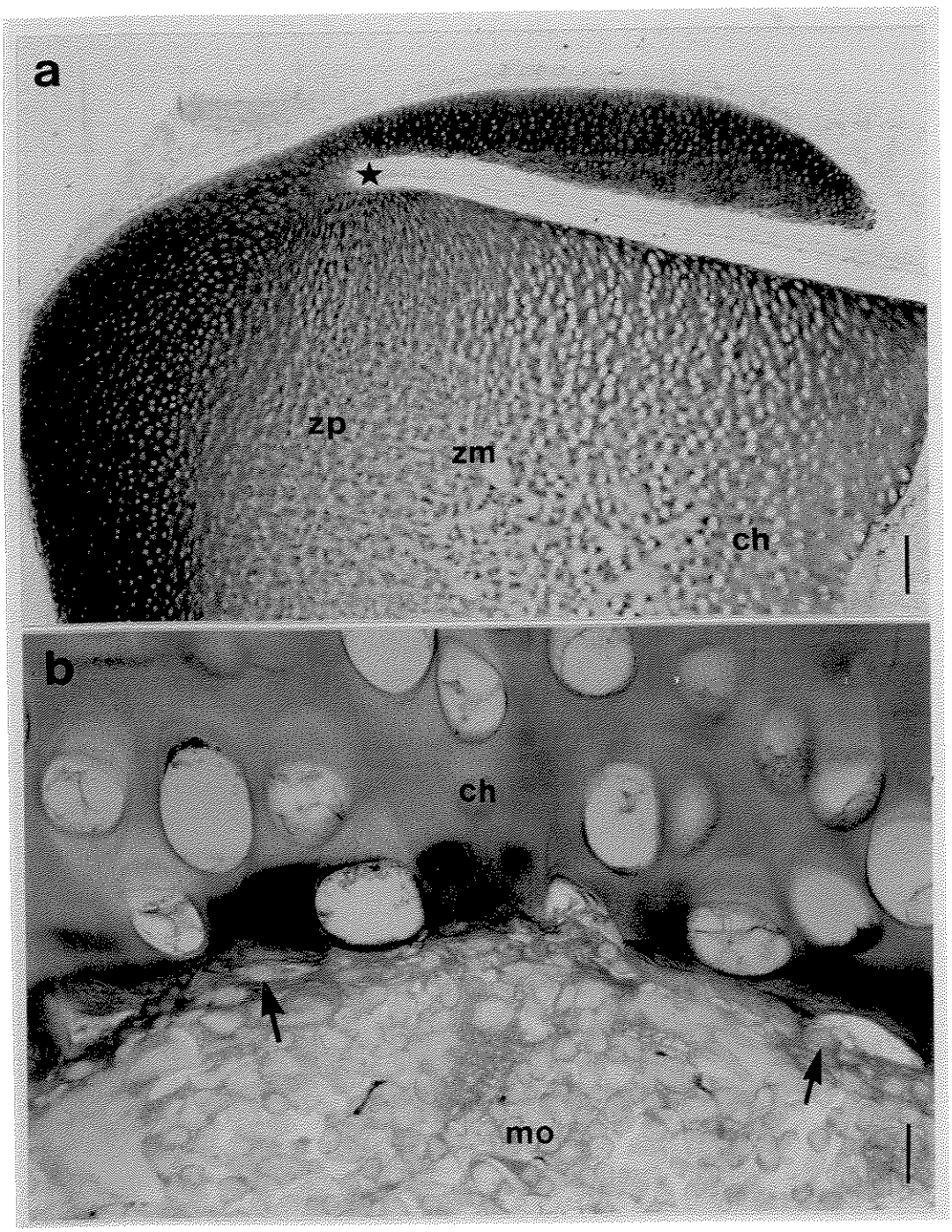

FIGURA 6. Cortes em historresina de cartilagem epifisária distal do fêmur de G46, corado com AT. **a)** Cartilagem articular (ca) em união com a cartilagem lateral (cl). Extremidade de crescimento longitudinal do osso periosteal (estrela). Zona de proliferação (zp), zona de maturação (zm) e zona hipertrófica (ch) da cartilagem de crescimento. **b)** Interface da medula óssea (mo) e a cartilagem hipertrófica (ch). Células medulares mononucleadas em contato com a cartilagem hipertrófica, algumas dentro dos espaços antes ocupados por condrócitos (setas). Aumentos: a) barra = 200 μm, b) barra = 25 μm.

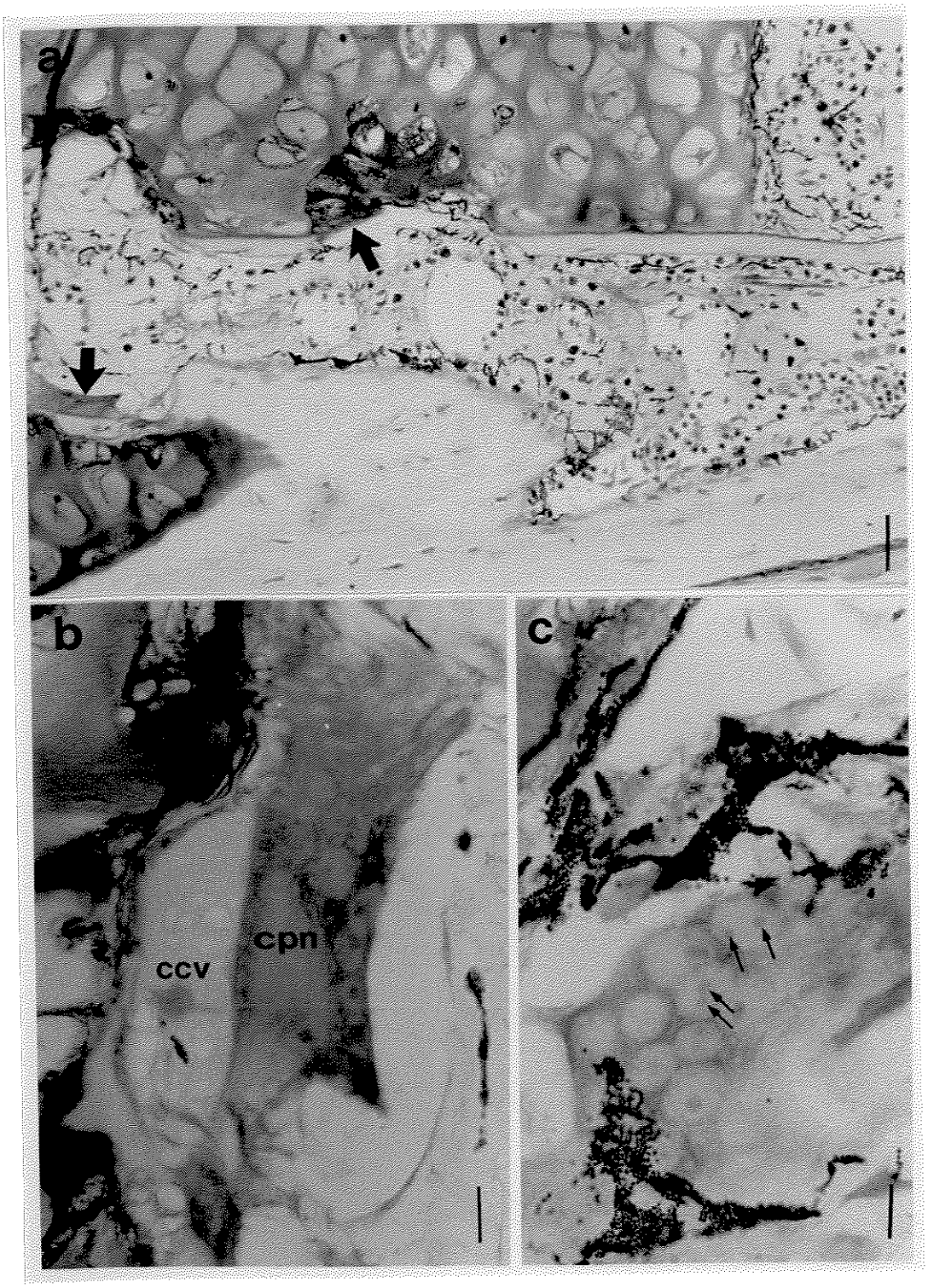

FIGURA 7. Cortes em historresina de G44 corados com AT. **a)** Uma aparente zona de ossificação distinta das descritas anteriormente. Presença de células polinucleadas, com citoplasma basófilo, aparentemente erodindo a matriz óssea e a cartilagem hipertrófica (setas). A matriz da cartilagem hipertrófica apresenta uma maior metacromasia nesta região (estrela). **b)** Detalhe de uma célula polinucleada (cpn). Entre ela e a matriz cartilaginosa há uma outra célula com abundante citoplasma vacuolizado (ccv). **c)** Célula polinucleada com um ou dois nucléolos por núcleo (setas). Aumentos: a) barra = 50 μm, b-c) barra = 10 μm.

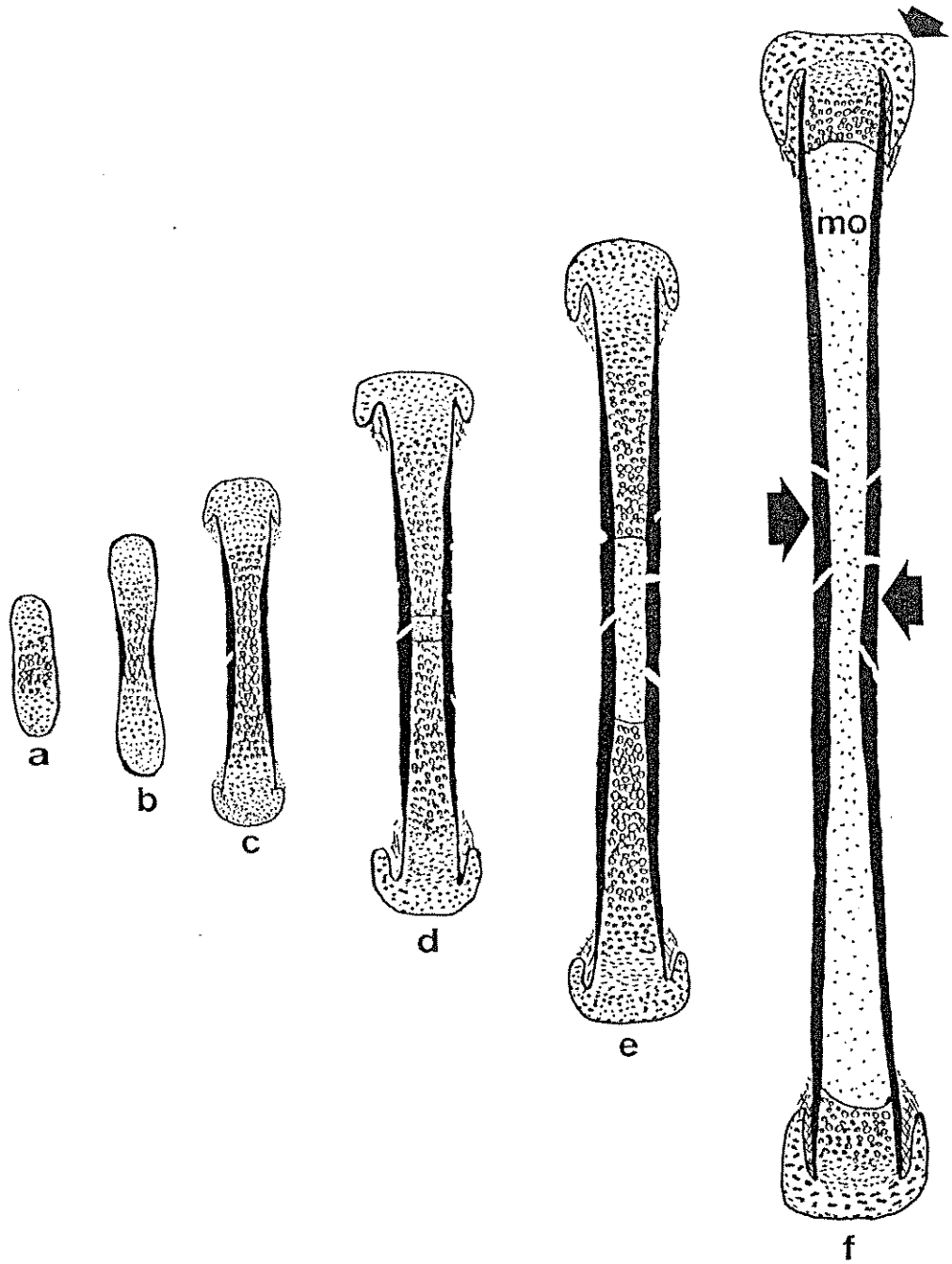

FIGURA 8. Representação esquemática do desenvolvimento do fêmur e da tíbio-fíbula. a) G32-34, estrutura inteiramente cartilaginosa com condrócitos hipertróficos no centro e células achatadas nas extremidades. b) G35, forma-se um colar de osso periosteal ao redor do centro da estrutura cartilaginosa. c) G36-G37, há um aumento da estrutura cartilaginosa com muitas células hipertróficas acompanhado do osso periosteal, e nas extremidades o início da formação da cartilagem lateral. d) G38-39, cartilagem lateral recobre externamente a extremidade de crescimento do osso periosteal e na região mediana vasos penetram na cartilagem hipertrófica e começam a formar a cavidade da medula óssea. e) G40-41, a estrutura cartilaginosa é muito celular, com distinção entre a cartilagem articular, que continua lateralmente, e a cartilagem de crescimento interna ao tubo ósseo,. O osso é mais espesso no centro e diminui em espessura nas extremidades. A superfície de contato da cartilagem hipertrófica com a medula óssea é lisa . f) G46, a cartilagem fica restrita a extremidade do osso, formando a cartilagem epifisária (seta menor). Internamente ao tubo ósseo encontra-se a cartilagem de crescimento. Na extremidade está a cartilagem articular e, lateralmente, a cartilagem lateral. Esta última é semelhante a cartilagem articular. A estrutura óssea é puramente de osso periosteal (setas maiores), não apresentando trabéculas ósseas abaixo da cartilagem hipertrófica, que também não apresenta aspectos de calcificação. Não foi observado também osso endosteal. Medula óssea (mo).

A ESTRUTURA DA CARTILAGEM EPIFISÁRIA DE RÃS ADULTAS JOVENS E DE RÃS VELHAS

A cartilagem epifisária da rã adulta é aproximadamente duas vezes maior que a dos girinos em metamorfose e apresenta as características básicas da estrutura das epífises dos anfíbios anuros. Uma estrutura cartilaginosa encaixada na extremidade do tubo ósseo periosteal, e cobrindo a superfície externa do tubo ósseo, um tecido conjuntivo fibroso muito vascular que se insere na cartilagem lateral, que é uma projeção da cartilagem articular. Esta cartilagem epifisária pode ser dividida morfologicamente em três cartilagens, a cartilagem de crescimento, a cartilagem articular e a cartilagem lateral (Figura 9).

Estrutura das diferentes cartilagens da epífise

A cartilagem de crescimento apresentou as características zonas de reserva, proliferação, maturação e hipertrófica (Figura 10a). Esta cartilagem era muito celular apresentando ampla matriz ao redor das células.

A zona de reserva foi identificada mais por localização do que por uma morfologia própria, pois era muito semelhante a cartilagem articular. Ela continha células ovais, com núcleos esféricos, isoladas ou aos pares, separadas por uma abundante matriz extracelular (Figuras 10a e 11a).

Abaixo da zona de reserva encontrou-se uma ampla zona de proliferação com muitas células achatadas. Estas células apresentavam um núcleo alongado, às vezes periférico e citoplasma basófilo (Figuras 10a e 11b-c). Após a divisão, as células separam-se lateralmente, no sentido perpendicular ou diagonal ao longo eixo da cartilagem, pela deposição de matriz extracelular entre elas.

Na zona de maturação as células tinham um formato mais oval, com núcleos esféricos mais centrais (Figura 11d).

Na zona hipertrófica, as células apresentavam abundante citoplasma vacuolizado e núcleos com diversos fenótipos. Separando os condrócitos hipertróficos existia uma grande quantidade de matriz extracelular (Figuras 10a e 11e).

Em todas as zonas da cartilagem de crescimento pôde-se observar que as células não apresentavam nenhum arranjo colunar.

A cartilagem articular e a cartilagem lateral eram muito semelhantes, contendo condrócitos com forma oval e núcleos esféricos, formando grupos de 2 ou 4 células, principalmente. Estas células estavam separadas por uma abundante matriz extracelular, que se mostrava metacromática quando corada com AT (Figuras 12a, 14 e 15). Na superfície destas cartilagens encontrou-se o um pericôndrio fibroso com células alongadas (Figura 12a). Na camada condrogênica do pericôndrio foram encontradas diversas figuras de mitose (Figuras 12 b-g).

Na extremidade da cartilagem lateral foi encontrada uma estrutura semelhante a uma fibrocartilagem, com um aspecto fibrilar na matriz interterritorial dos condrócitos (Figuras 13a-b).

A estrutura tubular do osso periosteal envolvia toda a cartilagem de crescimento, e entre o osso periosteal e a cartilagem lateral encontrou-se um tecido conjuntivo fibroso muito vascularizado (Figura 14a). Na superfície interna do osso periosteal em contato com a cartilagem de crescimento foram observados condrócitos com matriz calcificada, e estas células apresentam um melhor aspecto de preservação que os condrócitos mais distantes da matriz calcificada (Figura 14b).

O tecido conjuntivo ou *ligamento osteo-condral* que liga osso periosteal a cartilagem lateral

Separando a face interna da cartilagem lateral da superfície externa do osso periosteal foi encontrado um tecido conjuntivo fibroso que foi denominado de *ligamento osteo-condral*.

Este tecido conjuntivo era mais frouxo próximo a extremidade do osso periosteal e mais fibroso progressivamente em direção ao centro (Figura 14a). Em corte transversal foi possível observar vários fibroblastos alongados, orientados no sentido das fibras de colágeno (Figura 15a-b). Estas fibras de colágeno eram mais grossas quando se inseriam na cartilagem lateral e mais finas quando próximas à superfície óssea (Figuras 16a,c-d). Na cartilagem estas fibras conferiam um aspecto fibroso a matriz na região de inserção (Figuras 15a e 16a). Algumas destas fibras apresentavam um aspecto ondulado, que pode ser uma morfologia em "crimp" (Figuras 16a e d). Não foram encontradas fibras reticulares nesta região, apenas ao redor dos capilares (Figura 16b). Não foram observadas fibras do sistema elástico.

Muitos osteoblastos foram encontrados formando uma monocamada na superfície externa do osso periosteal (Figuras 14a, 15a e 16a). Outro tipo celular foi encontrado nesta região, localizado preferencialmente acima dos osteoblastos, entre as finas fibras de colágeno. Estas células foram identificadas principalmente pelo distinto fenótipo nuclear (Figura 16a).

Os canais da cartilagem e as células que absorvem a cartilagem de crescimento

Canais da cartilagem contendo capilares e diversos tipos celulares foram encontrados na cartilagem de crescimento da epífise distal do fêmur. Estas estruturas não foram encontradas na epífise proximal da tíbia, nem mesmo nos animais mais velhos.

Estes canais se originavam da medula óssea e penetravam na zona hipertrófica, e às vezes, atingiam a zona de maturação (Figuras 17a-b). Entre os canais e a superfície da matriz da cartilagem foram encontrados sítios de ossificação, com osteócitos no interior da matriz óssea e muitos osteoblastos na superfície (Figuras 17 a e d). Esta matriz óssea formava trabéculas ósseas depositadas na superfície da cartilagem e permaneciam no interior da medula óssea após a absorção da cartilagem.

Diversos tipos celulares foram encontrados em contato com a matriz da cartilagem, seja no interior dos canais ou na borda da cartilagem hipertrófica com a medula óssea. Estas células mononucleadas foram divididas em três tipos principais: células com núcleo esférico e citoplasma vacuolizado (Figura 18a), células com núcleo periférico e citoplasma basófilo (Figura 18b) e células com núcleo alongado (ou, às vezes, irregular) com um ou dois nucléolos evidentes e citoplasma disperso (Figuras 17c, 18c-e). Estas células estavam em íntimo contato com a matriz da cartilagem e, às vezes, ocupando os espaços dos condrócitos.

Também foram encontradas células binucleadas e células polinucleadas com citoplasma basófilo, às vezes associadas à matriz da cartilagem (Figura 18f-g) ou com a matriz óssea (Figura 18f). A presença destas células esteve sempre associada com uma matriz cartilaginosa mais basófila (Figura 18g) ou com a matriz óssea (Figuras 7a-c e 18f).

Calcificação da cartilagem

A técnica de von Kossa revelou a presença de cálcio em uma faixa extensa da cartilagem lateral acompanhando o tubo ósseo periosteal e em algumas regiões da cartilagem articular (Figuras 19a-c). Estas regiões apareciam como "descontinuidades" no material descalcificado (Figuras 10b, 14a e 19d-e). Quando a reação de von Kossa foi mais diferenciada com hipossulfito de sódio (Figura 19c) revelou-se um arranjo concêntrico da

calcificação. Em outros cortes descalcificados pôde-se observar um aspecto granulado desta calcificação (Figura 19d).

Manchas mais basófilas na matriz da cartilagem, que são consideradas na literatura como indícios de calcificação, foram encontradas na maioria dos animais estudados, tanto no fêmur como na tíbia, na zona de maturação em contato com a superfície do osso periosteal. Estas manchas apresentavam uma distribuição delimitada, não estendendo-se por toda cartilagem nos animais adultos jovens (Figuras 20a-c), mas nos animais velhos ocorre em toda a zona de maturação somente (Figura 10b).

Estes aspectos de calcificação foram encontrados tanto na epífise distal do fêmur quanto na epífise proximal da tíbia.

Uma outra alteração com aspectos distintos dos descritos anteriormente foi encontrada esporadicamente na zona hipertrófica, às vezes atingindo a zona de maturação da cartilagem de crescimento da epífise distal do fêmur de animais adultos jovens de maior peso (180g). São estruturas basófilas esféricas que apresentavam um centro mais corado e apareciam isoladas ou fundidas (Figuras 10a e 21a e c). Elas se concentravam mais nas bordas da cartilagem hipertrófica associadas com trabéculas ósseas.

Ossificação endocondral na cartilagem de crescimento

Na maioria dos animais adultos jovens, assim como nos girinos, não foram observados indícios de ossificação endocondral. A cartilagem tinha uma borda lisa com a medula, como observado nos girinos (Figuras 5b e 6b) e apenas células mononucleadas estavam em contato com a cartilagem. Entretanto, nos animais de maior peso (180g) e nos animais velhos, diversas estruturas semelhantes a trabéculas ósseas foram encontradas na superfície da cartilagem de crescimento da epífise distal do fêmur (Figuras 10a-b, 17a e d e 21a-b). Muitos osteoblastos estavam presentes na superfície destas trabéculas (Figura 17d).

Estas trabéculas não apresentavam uma orientação preferencial, mas acompanhavam as bordas da cartilagem.

Algumas vezes esta ossificação era acompanhada de uma maior basofilia da matriz da cartilagem (Figuras 10a e 21a-b) e em outras não (Figuras 10b e 17a e d).

Nos adultos jovens estas trabéculas, quando presentes, estavam sempre associadas à superfície da cartilagem (Figuras 10a, 17a e d e 21a-b), mas nos animais velhos, após a constante absorção da cartilagem de crescimento, estas trabéculas apareciam isoladas na medula óssea (Figuras 10b e 23a) e, às vezes, apresentavam resquícios de matriz de cartilagem no seu interior (Figura 23a).

Em todos os animais estudados não foram encontradas trabéculas ósseas ou canais da cartilagem na epífise proximal da tíbia, estas estruturas só foram encontradas na epífise distal do fêmur.

Ossificação endosteal

Osso endosteal foi encontrado, tanto no fêmur quanto na tíbia, na superfície interna do osso periosteal. Entre eles estavam presentes alguns resquícios de matriz basófila de cartilagem (Figura 22b). Este osso endosteal era mais fino próximo à cartilagem de crescimento e se espessava progressivamente em direção a região diafisária. Na região diafisária pôde-se observar canais de Havers (Figuras 22b-c).

Os aspectos de calcificação da cartilagem, ossificação endocondral, ossificação periosteal e ossificação endosteal estão esquematicamente resumidos na Figura 24.

Atividades de fosfatase alcalina e ácida

Atividade de fosfatase alcalina foi detectada nos osteoblastos encontrados na superfície do osso periosteal e nos condrócitos da cartilagem de crescimento e nos condrócitos da cartilagem lateral próximos à área de calcificação. Esta atividade apareceu em todo citoplasma dos osteoblastos e nos condrócitos apareceu associada a sua superfície principalmente (Figuras 23a-b). Também foi detectada atividade de fosfatase alcalina associada à superfície dos condrócitos hipertróficos mas não na sua matriz extracelular (dados não mostrados).

Atividade de fosfatase ácida foi detectada em células polinucleadas associadas com as trabéculas ósseas (Figuras 23c-d). Esta atividade também foi detectada em células mononucleadas encontradas em contato com a matriz da cartilagem (dados não mostrados).

Animais velhos

As observações feitas nos animais velhos revelaram uma diminuição na espessura da cartilagem de crescimento, principalmente da zona de proliferação e hipertrofia. Observou-se um maior número de trabéculas ósseas no interior da medula óssea, associadas ou não com a cartilagem de crescimento (Figura 10b). Além disso, ocorreu uma maior calcificação da cartilagem lateral e articular e da zona de maturação da cartilagem de crescimento (dados não mostrados). Ocorreu também um espessamento da estrutura óssea, devido principalmente à produção de osso endosteal lamelar, com canais de Havers.

Na cartilagem de crescimento da epífise proximal da tíbio-fíbula não foram encontrados canais da cartilagem e nem trabéculas ósseas. A borda da cartilagem com a medula óssea é uniforme, com células mononucleadas em contato com a matriz. Esta cartilagem apresenta-se muito reduzida contendo apenas uma estreita zona de proliferação e maturação (dados não mostrados).

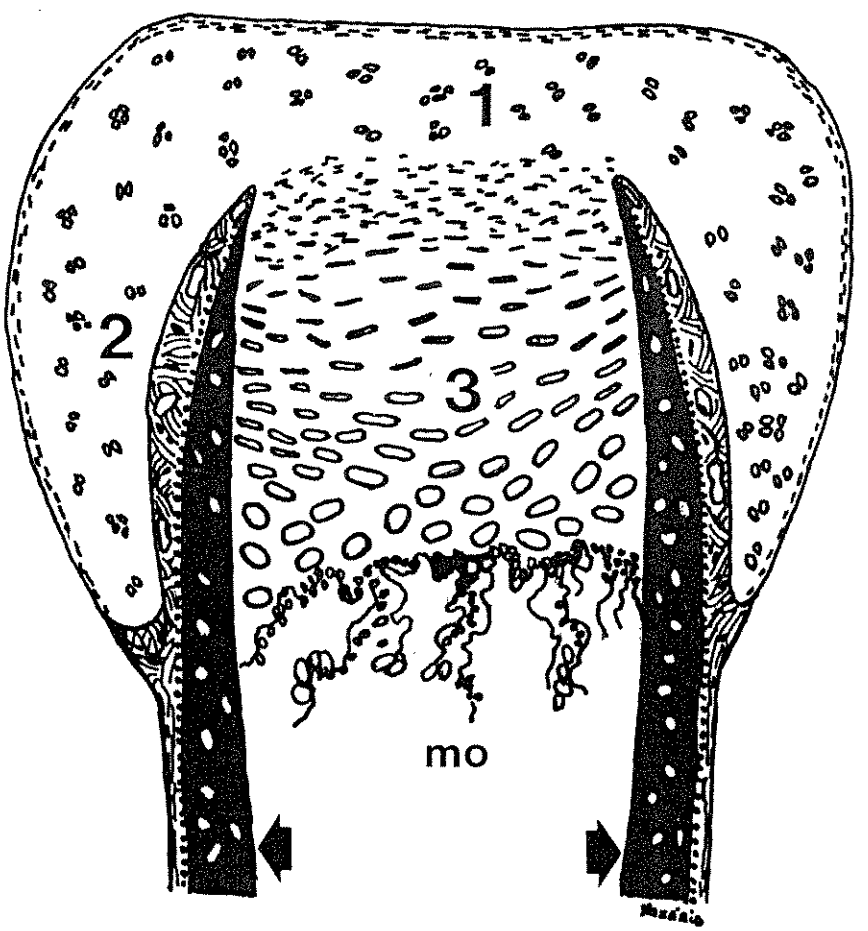

FIGURA 9. Desenho esquemático da cartilagem epifisária da rã adulta jovem. Diferentes estruturas cartilaginosas formam esta epífise: cartilagem articular (1), cartilagem lateral (2) e cartilagem de crescimento (3) com suas diferentes zonas. A cartilagem de crescimento está totalmente contida dentro da extremidade do tubo ósseo (setas). Entre a cartilagem lateral e a face externa do tubo ósseo encontra-se um tecido conjuntivo fibroso muito vascularizado, contendo diferentes tipos celulares. Medula óssea (mo).

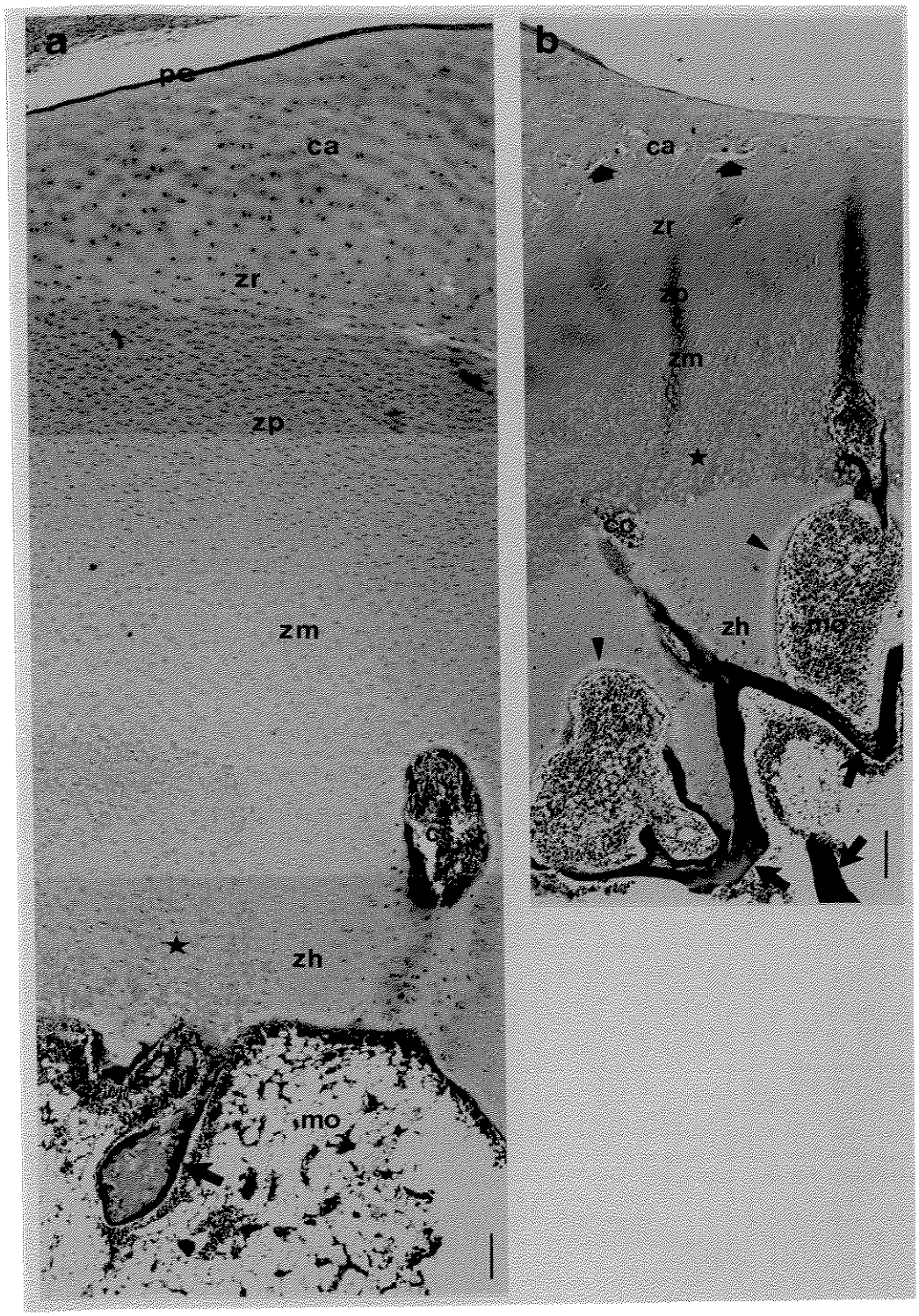

FIGURA 10. Cartilagem epifisária de rã adulta jovem em **a** e cartilagem epifisária de rã velha em **b**, cortes sagitais em Paraplast corados pela H&E. **a)** Pericôndrio (pe) da cartilagem articular (ca) e a distribuição das diferentes zonas da cartilagem de crescimento, zona de reserva (zr), zona de proliferação (zp), zona de maturação (zm) e zona hipertrófica (zh), mas as células não apresentam um arranjo colunar. Trabécula óssea na borda da cartilagem hipertrófica com a medula óssea (seta) e um canal da cartilagem no interior da cartilagem (cc). Marcação mais basófila em algumas regiões da matriz da zona hipertrófica (estrela). Medula óssea (mo). **b)** Redução no tamanho das zonas da cartilagem de crescimento e um aumento no número de estruturas trabeculares (setas maiores) na borda da cartilagem hipertrófica com a medula óssea (mo). Alguns canais da cartilagem (cc) e uma outra marcação mais basófila na matriz dos condrócitos da zona de maturação (estrela). Presença de "descontinuidades" da matriz da cartilagem articular (setas menores). Existe uma diminuição da basofilia da matriz nas áreas de erosão (cabeças de setas). Aumentos: a) e b) barra = 200 μm.

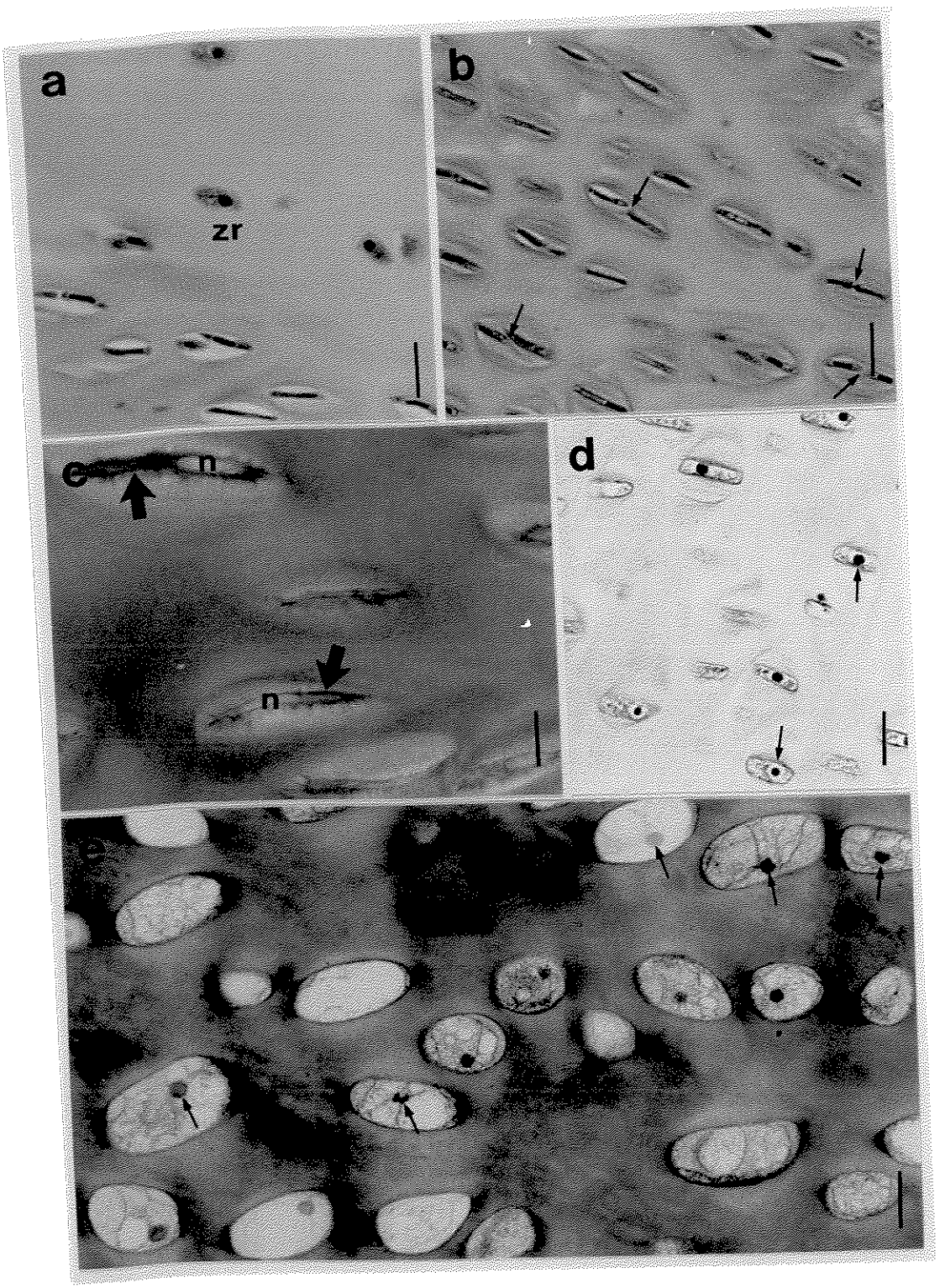

FIGURA 11. Células das diferentes zonas da cartilagem de crescimento. **a**, **b** e **d** cortes em Paraplast corados com H&E e **c** e **e** cortes em historresina corados com AT. **a)** Zona de reserva (zr) com células ovaladas e núcleo esférico e uma abundante matriz extracelular entre as células. **b)** Zona de proliferação com células achatadas em constante divisão e aparentemente com um padrão de separação lateral ou oblíquo das células (setas). **c)** Detalhe das células da zona de proliferação, o citoplasma é muito basófilo (seta) e núcleo (n) apresenta-se também achatado e, às vezes, deslocado para uma das extremidades da célula. **d)** As células da zona de maturação, apresentam-se com uma forma mais oval e um núcleo esférico (setas). **e)** Condrócitos hipertróficos com um amplo citoplasma vacuolizado e diferentes fenótipos nucleares (setas). Aumentos: a), b), c) e e) barra = 25 μm e d) barra = 10 μm.

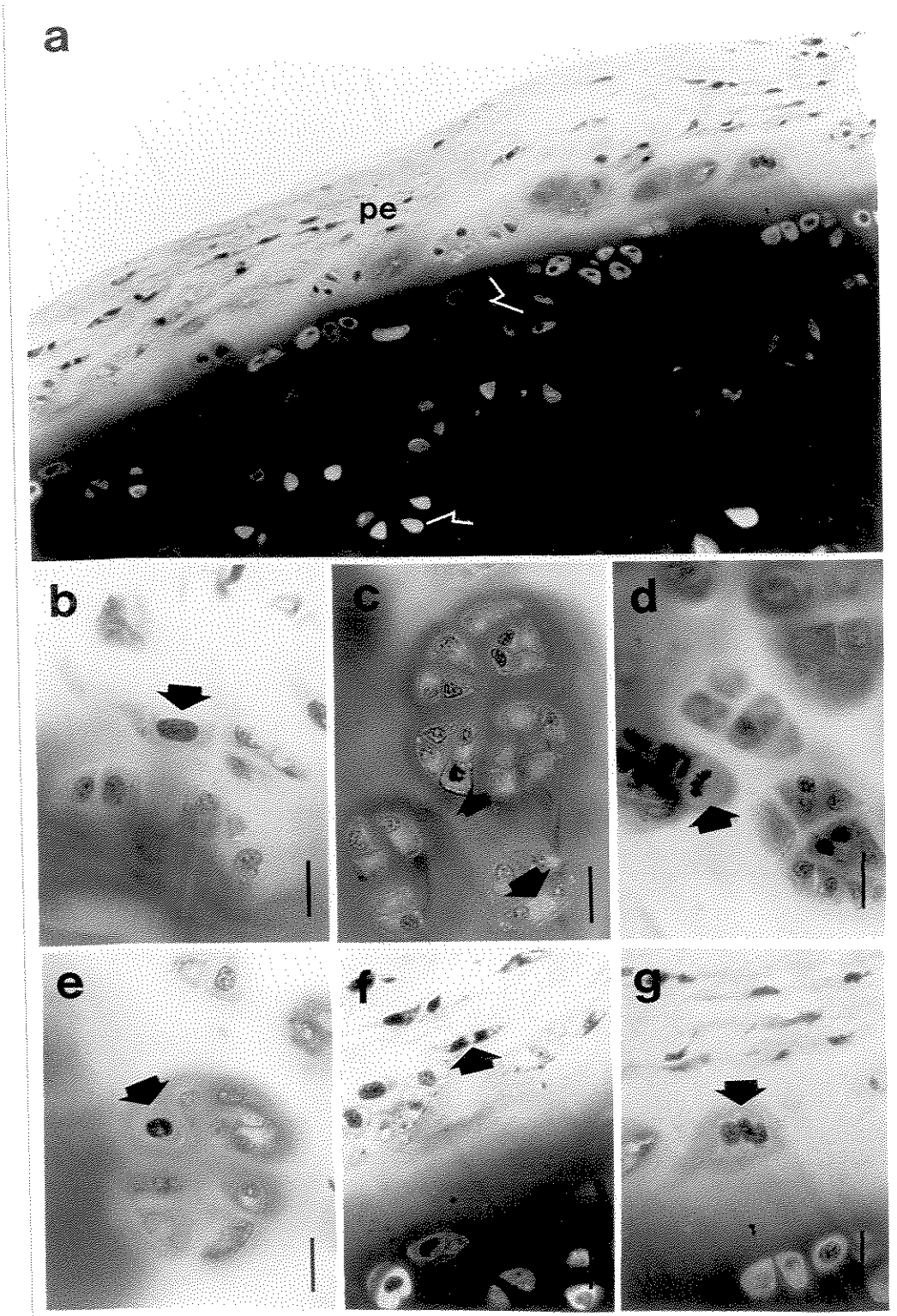

FIGURA 12. Cortes em historresina de cartilagem articular corados com AT. **a)** Superfície articular com um espesso pericôndrio fibroso (pe) contendo células alongadas e abaixo a matriz metacromática da cartilagem com condrócitos em forma oval formando grupos isógenos de duas, três e quatro células (setas) com uma matriz territorial corada mais intensamente. **b-g)** Aspectos de divisão celular encontradas principalmente na região de transição entre o pericôndrio fibroso e a matriz metacromática. **b)** Prófase (seta). **c)** Pró-metáfase (seta menor) e final de telófase (seta maior). **d)** Metáfase (seta). **e)** Anáfase (seta). **f)** Início de uma telófase (seta). **g)** Três células que estão ocupando a mesma lacuna (seta). Aumentos: a) barra = 50 μm e b-g) barra = 25 μm.

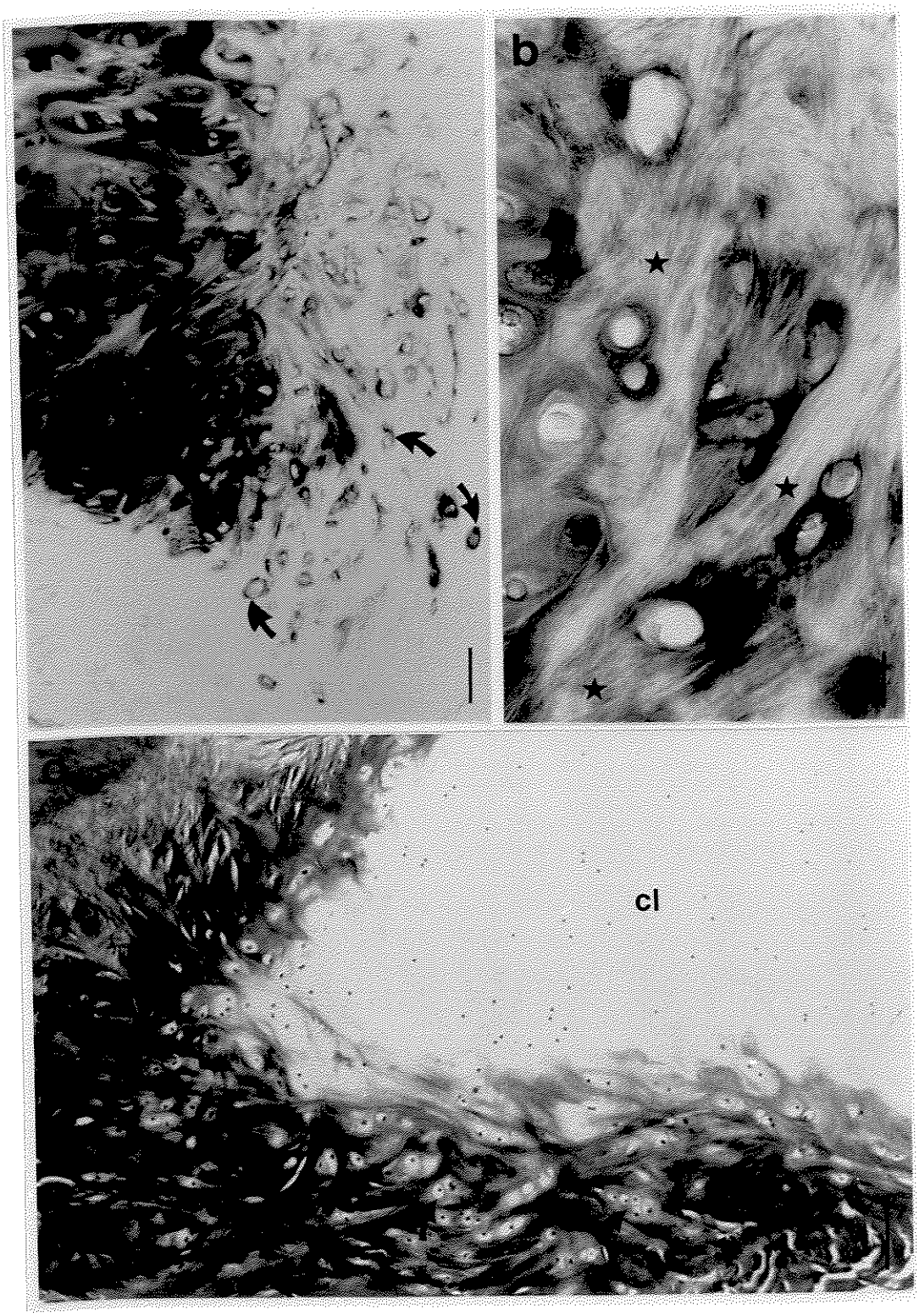

FIGURA 13. Corte longitudinal em Paraplast da cartilagem lateral, corado com AT em **a** e **b** e com XP em **c**. **a)** A região onde termina a cartilagem lateral é semelhante a uma fibrocartilagem. Alguns condrócitos apresentam apenas a matriz territorial corada (setas). **b)** Aspecto fibroso da matriz interterritorial dos condrócitos (estrelas). **c)** Regiões fibrosas coradas em vermelho, e alguns condrócitos com a matriz interterritorial muito corada (setas). A matriz da cartilagem lateral (cl) cora-se muito fracamente. Aumentos: a) e c) barra = 50 μm e b) barra = 25 μm.

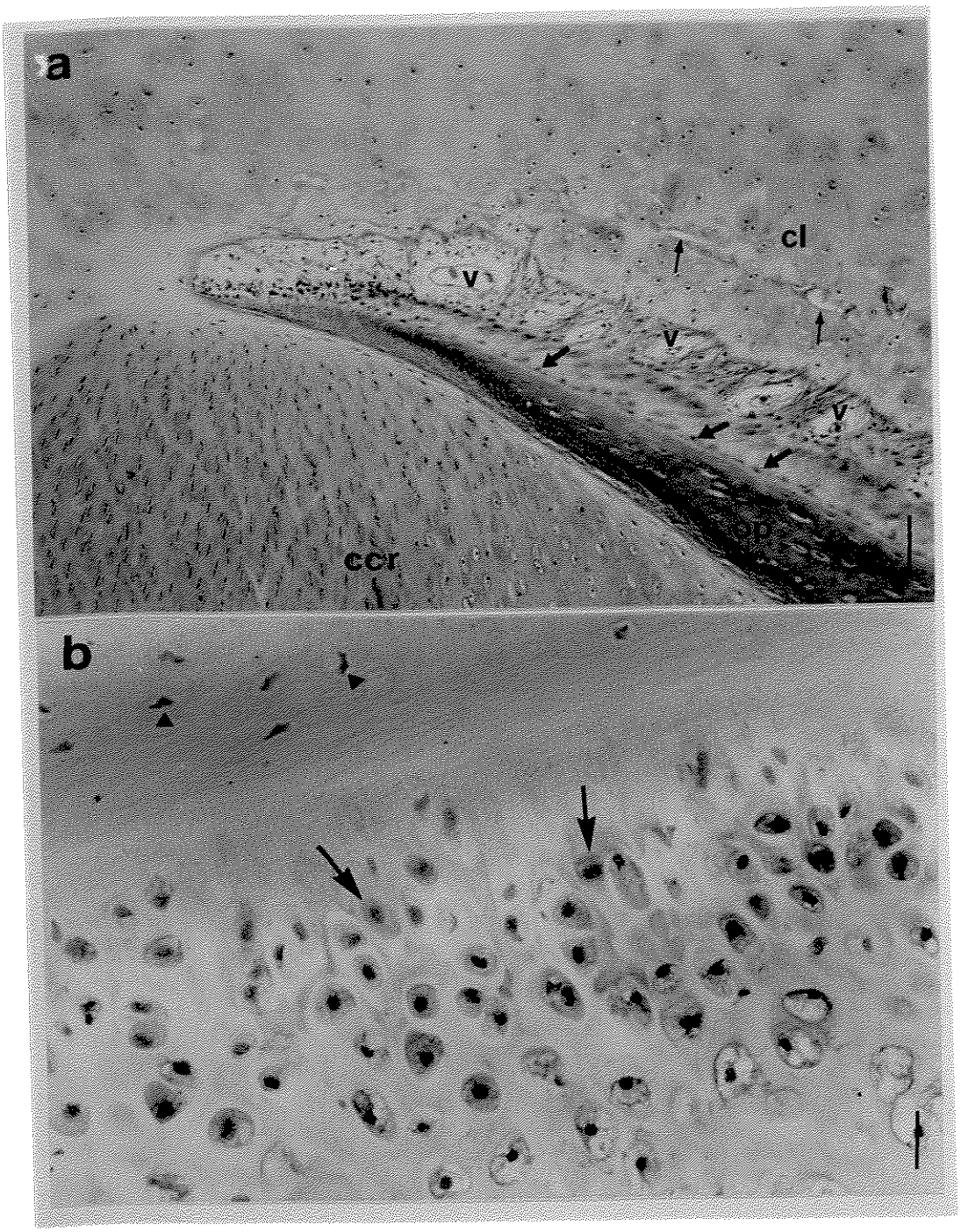

FIGURA 14. Corte longitudinal em Paraplast do encaixe do tubo ósseo, corado com H&E. **a)** Cartilagem lateral (cl), cartilagem de crescimento (ccr), osso periosteal (op), tecido conjuntivo fibroso com muitos vasos (v). Observe osteoblastos na superfície do periósteo (setas maiores) e novamente "descontinuidades" na matriz da cartilagem lateral (setas menores). **b)** Corte tangencial da interface da superfície interna do osso e a cartilagem de crescimento. Observe osteócitos na matriz óssea (cabeça de seta) e na matriz cartilaginosa, células com diferentes estágios de degeneração, sendo que as mais próximas ao osso (setas) apresentam aspectos de calcificação de sua matriz. Aumentos: a) barra = 100 μm e b) barra = 25 μm.

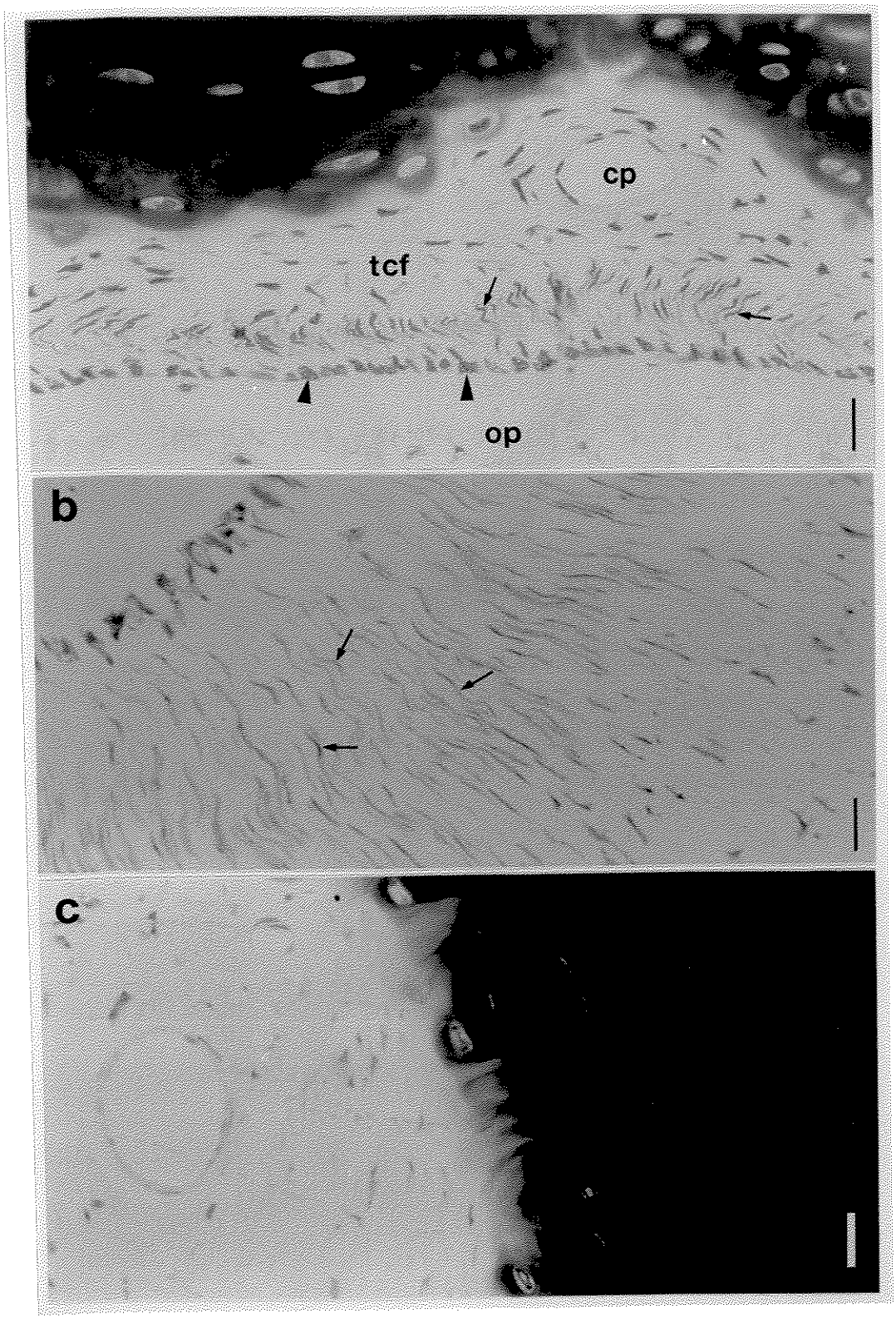

FIGURA 15. Cortes transversais em historresina da cartilagem epifisária corados com AT. **a)** Tecido conjuntivo fibroso (tcf) ou *ligamento osteo-condral* fazendo a ligação entre o osso periosteal (op) e a cartilagem lateral (cl), com vários fibroblastos com seus núcleos orientados no sentido das fibras (setas). Capilar (cp), núcleos de osteoblastos (cabeça de setas). **b)** Em algumas regiões este tecido é mais espesso apresentando muitos fibroblastos alongados na direção das fibras (setas). **c)** Na inserção destas fibras na matriz da cartilagem há uma diminuição na metacromasia da matriz (setas). Aumentos: a-c) barra = 25 μm.

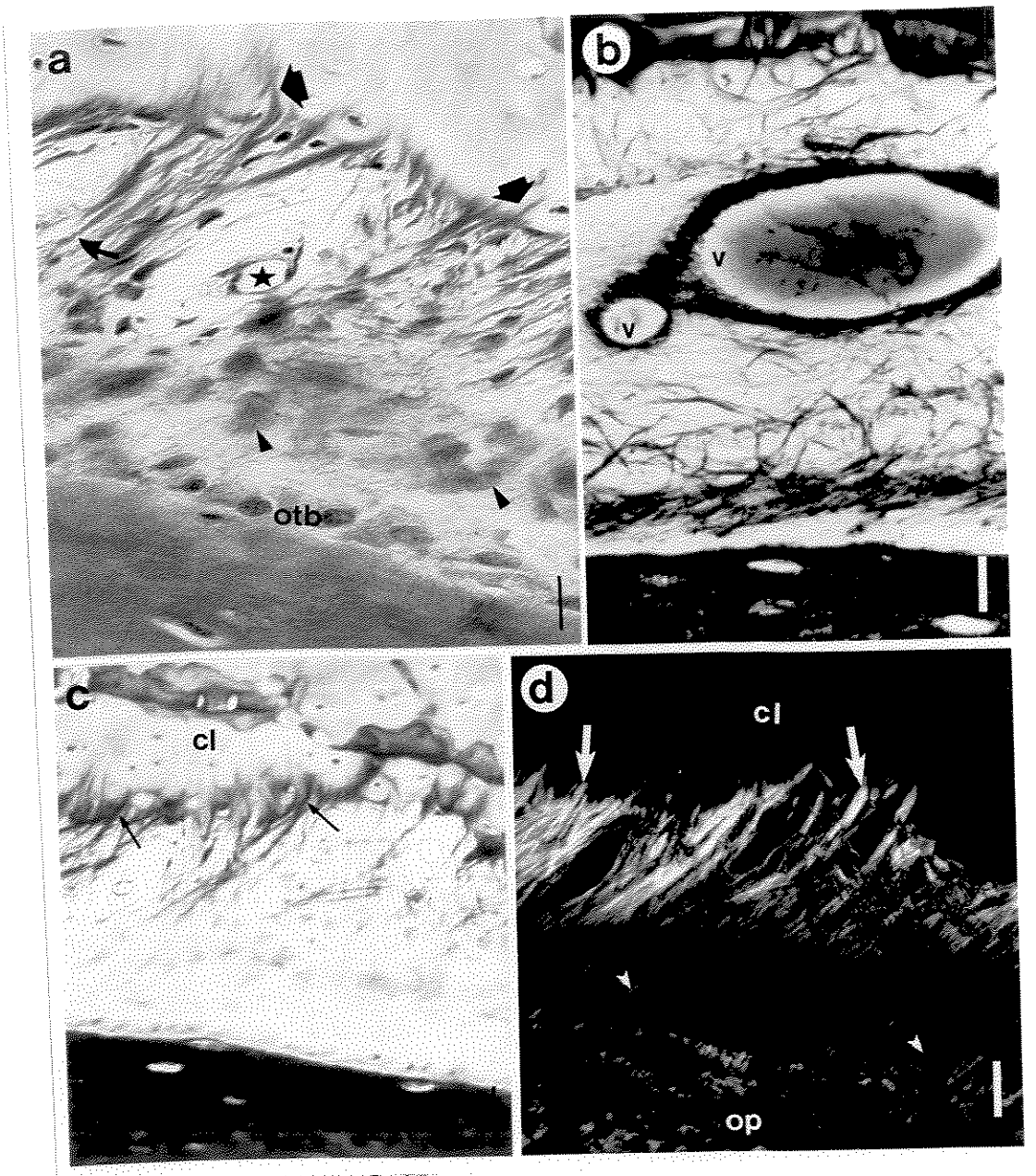

FIGURA 16. Cortes longitudinais em Paraplast de cartilagem epifisária detalhando a estrutura do *ligamento osteo-condral*. **a)** Fibras de colágeno (setas maiores) que se inserem na matriz da cartilagem, às vezes com ondulação (seta menor). Capilar (estrela), osteoblastos (otb) e um outro tipo celular, provavelmente uma célula mesenquimal osteoprogenitora (cabeças de setas). Corado com H&E. **b)** Reação para fibras reticulares. Reação positiva para reticulina principalmente ao redor dos vasos (v), com poucas fibras reticulares no tecido conjuntivo fibroso. **c)** Corte corado com PS-H. Maior marcação vermelha nas fibras (setas) que se inserem na cartilagem lateral (cl). Em **d)**, mesmo campo da figura anterior observado sob luz polarizada. Intensa birrefringência com cores de interferência amarela e vermelha das fibras de colágeno mais espessas (setas maiores) que se inserem na cartilagem lateral (cl) e cor de interferência verde nas fibras mais finas, localizadas principalmente próximo ao osso periosteal (cabeças de setas). Aumentos: a-b) barra = 25 μm e c-d) barra = 50 μm.

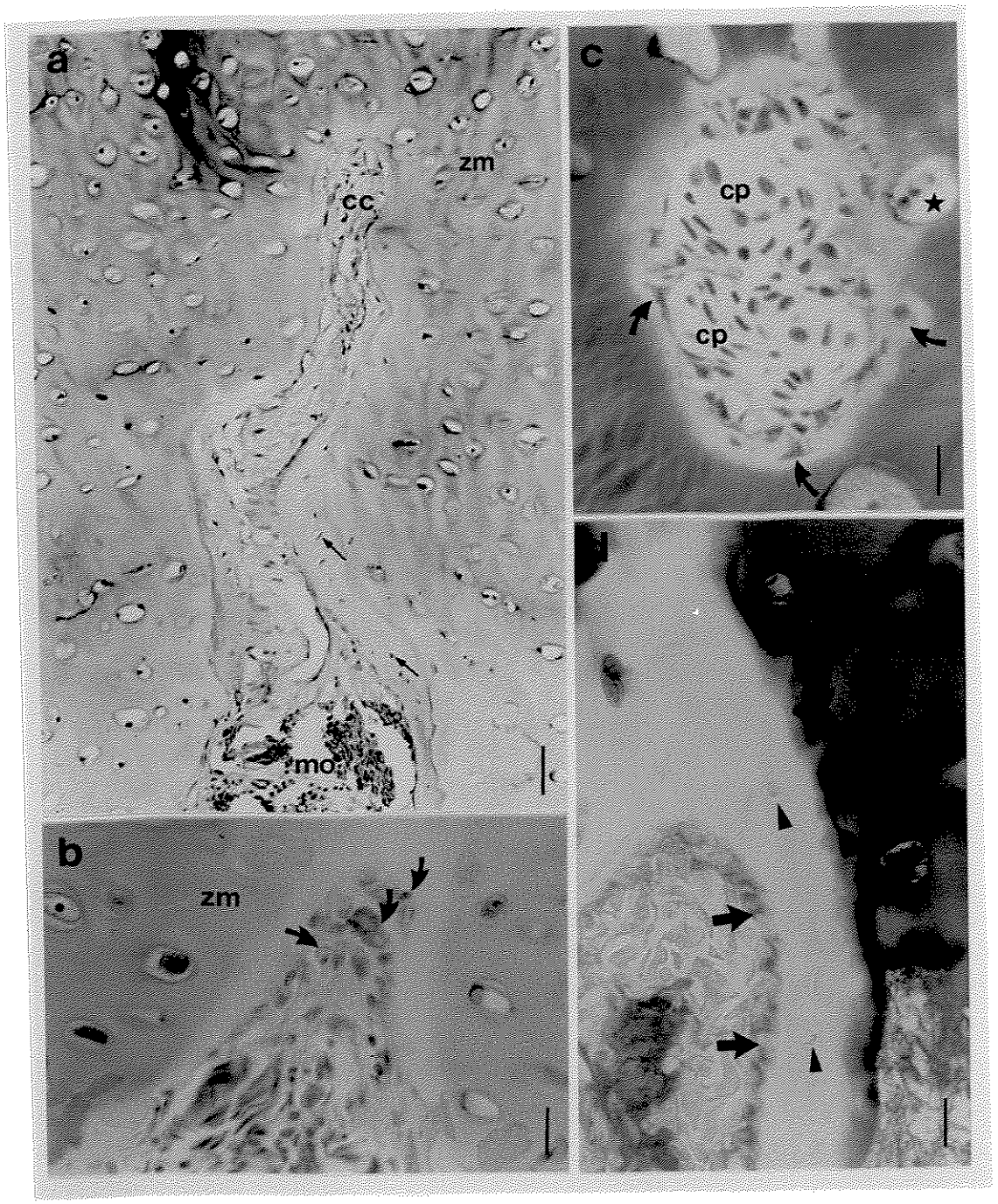

FIGURA 17. Cortes em Paraplast corados com H&E (a e b) e cortes em historresina corados com AT (c e d). **a)** Corte longitudinal de um canal de cartilagem (cc) que penetrou na cartilagem de crescimento até a zona de maturação (zm). Matriz óssea com osteócitos (seta) na superfície da matriz da cartilagem em contato com os canais. Medula óssea (mo). **b)** Diferentes tipos celulares em contato com a cartilagem no topo dos canais (setas). Zona de maturação (zm). **c)** Corte transversal de um canal de cartilagem. Capilares (cp) com células mononucleadas ao seu redor, em contato com a matriz da cartilagem (setas). Três células no interior da lacuna de um condrócito hipertrófico (estrela). **d)** Matriz óssea junto à superfície da cartilagem hipertrófica (ch) em contato com um canal. Osteoblastos (setas) e osteócitos (cabeças de setas). Aumentos: a) barra = 37,5 μm e b-d) barra = 25 μm.

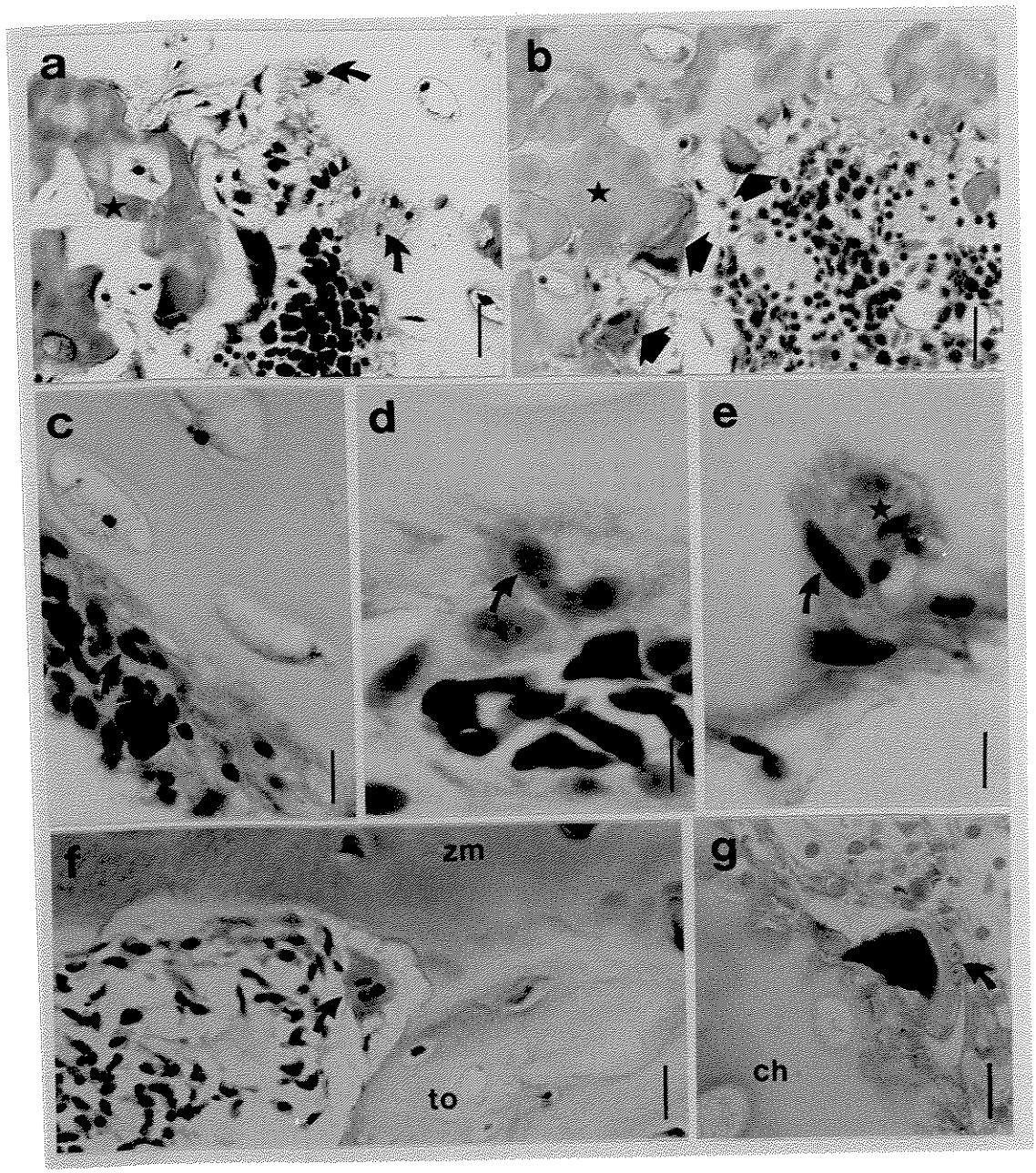

FIGURA 18. Diferentes tipos celulares encontrados em contato com a superfície da cartilagem de crescimento, aparentemente erodindo a cartilagem. **a)** Corte em Paraplast corado com H&E. Células com o citoplasma vacuolizado (seta). **b)** Corte em Paraplast corado com H&E. Células com amplo citoplasma basófilo (setas). Nas duas Figuras a matriz da cartilagem apresenta regiões mais basófilas (estrelas). **c-e)** Cortes em historresina corados com H&E. Células com núcleo alongado e um ou dois nucléolos evidentes (setas). Em **e**, estas células, junto com outras, estão ocupando o espaço lacunar dos condrócitos (estrela). **f)** Corte em Paraplast corado com H&E. Célula polinucleada (seta) associada com uma trabécula óssea (to). O citoplasma apresenta vários prolongamentos em direção à matriz óssea e à zona de maturação (zm) da cartilagem de crescimento. **g)** Célula binucleada com nucléolos evidentes (seta) e um citoplasma basófilo envolvendo um fragmento muito metacromático de matriz da cartilagem hipertrófica (ch). Aumentos: a) , b), c), f), g) e h) barra = 25 μm e d-e) barra = 10 μm.

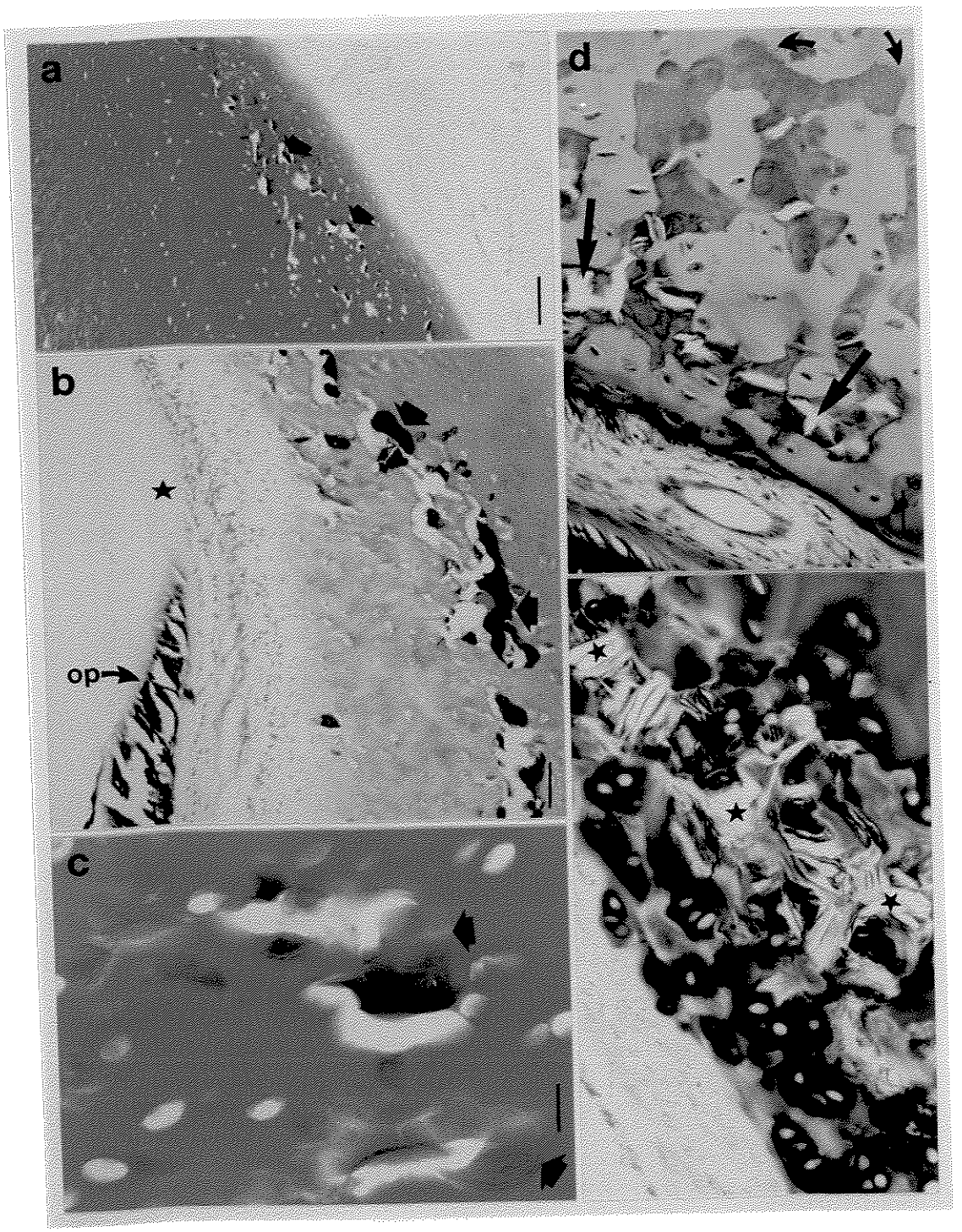

FIGURA 19. Cortes em Paraplast de cartilagem epifisária. **a**, **b** e **c**, material não descalcificado submetido a técnica de von Kossa e contra-corado com verde de metila. **d** e **e**, material descalcificado corado com PSH em **d** e com AT em **e**. **a)** Cartilagem articular com reação positiva nas "descontinuidades" da matriz (setas). **b)** Cartilagem lateral (cl) com reação positiva nas "descontinuidades" (setas) e reação positiva na matriz do osso periosteal (op). Existe uma matriz com reação negativa na extremidade do osso periosteal (estrela). **c)** Arranjo concêntrico do produto da reação de von Kossa na cartilagem articular, revelado por uma maior diferenciação com hipossulfito de sódio (setas). **d)** A cartilagem lateral apresenta "descontinuidades" na matriz quando o material é descalcificado (setas maiores) e, em outras regiões, os aspectos granulares na matriz (setas menores). **e)** Cartilagem lateral. Espaços não corados na matriz da cartilagem (estrela). Aumentos: a) barra = 200 μm, b) barra = 100 μm, c) barra = 25 μm, e-d) barra = 50 μm.

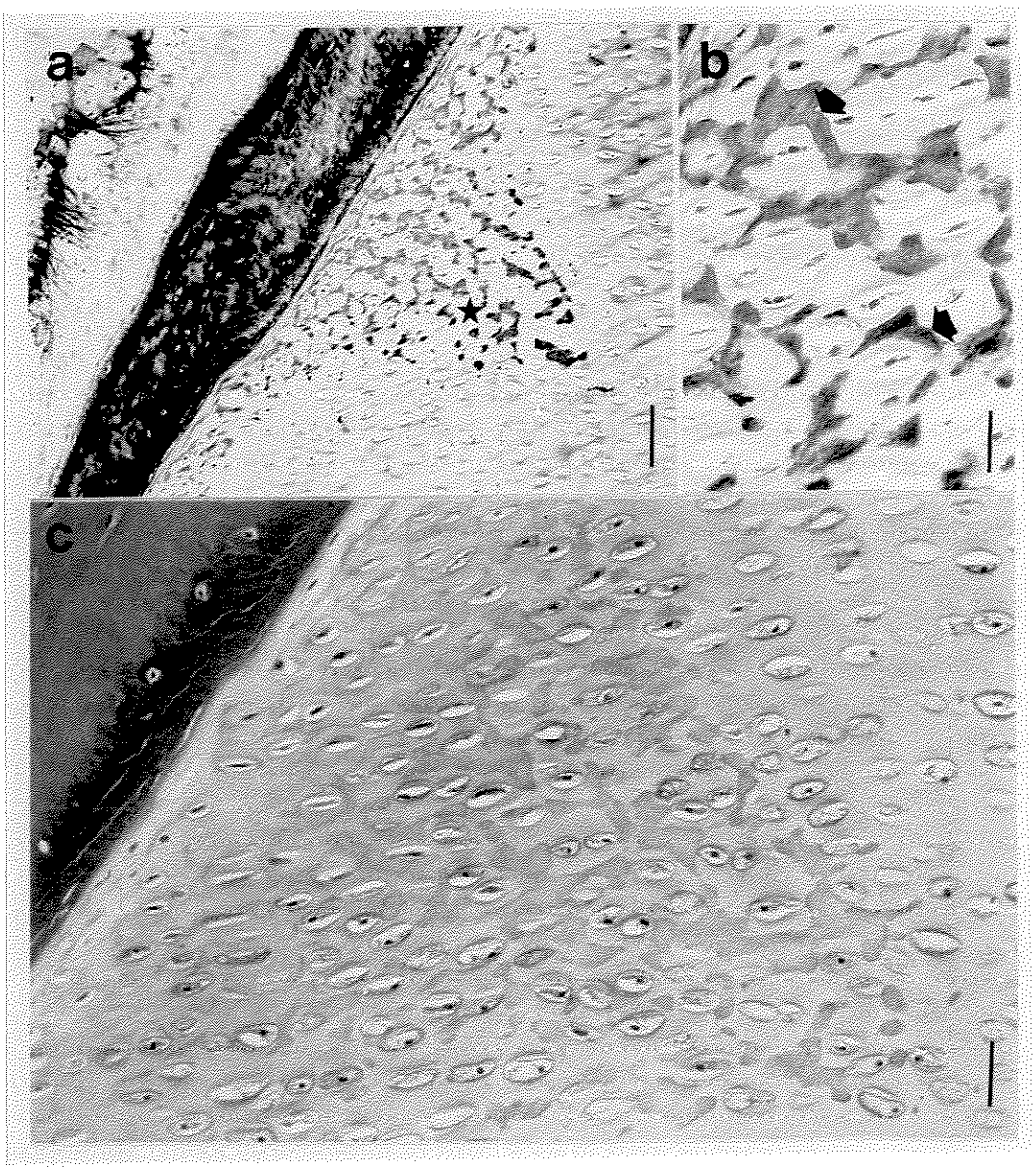

FIGURA 20. Cortes em Paraplast da cartilagem epifisária corados com PSH em **a** e **b** e com H&E em **c**. **a)** Marcação basófila na matriz da zona de maturação próxima ao osso (estrela). Note que esta alteração é restrita a esta região. **b)** Detalhe da região anterior mostrando distribuição irregular da basofilia na matriz ao redor das células (setas). **c)** Outro corte da mesma região após coloraçõ com H&E. Aumentos: a) barra = 100 μm, b) barra = 20 μm e c) barra = 25 μm.

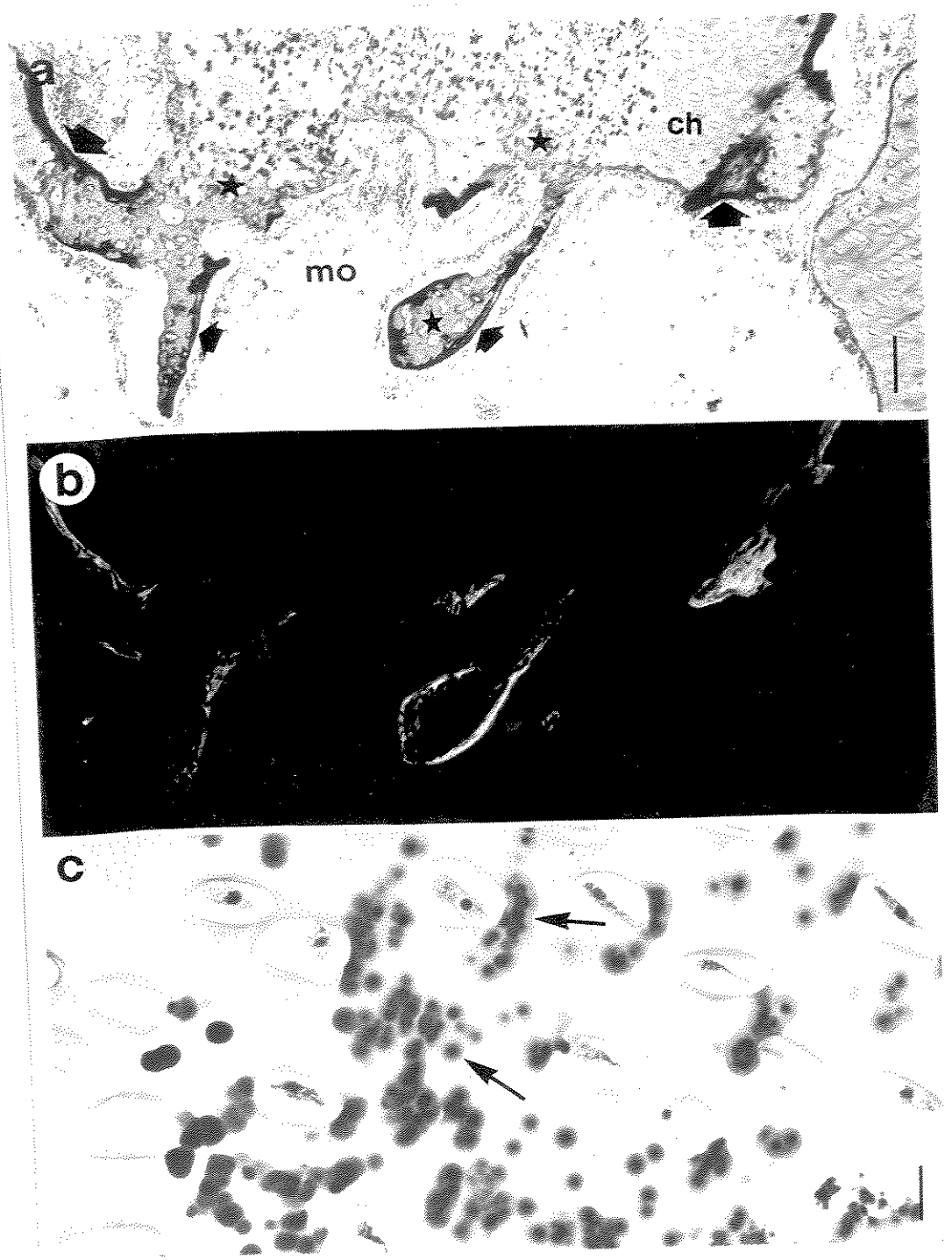

FIGURA 21. Cortes em Paraplast de cartilagem de crescimento corada com PSH. **a)** Forte marcação do corante "sirius red" em algumas bordas (setas) da cartilagem hipertrófica (ch) com a medula óssea (mo). Na matriz da cartilagem hipertrófica aparecem manchas que se concentram mais nas bordas (estrelas). **b)** Observação da mesma região anterior sob luz polarizada. A birrefringência nas mesmas regiões da borda que estão coradas com o "sirius red". **c)** Detalhe das estruturas esféricas presentes na matriz da cartilagem hipertrófica. Elas apresentam um centro mais corado, podendo estar isoladas ou fundidas (setas). Aumentos: a-b) barra = 200 μm e c) barra = 25 μm.

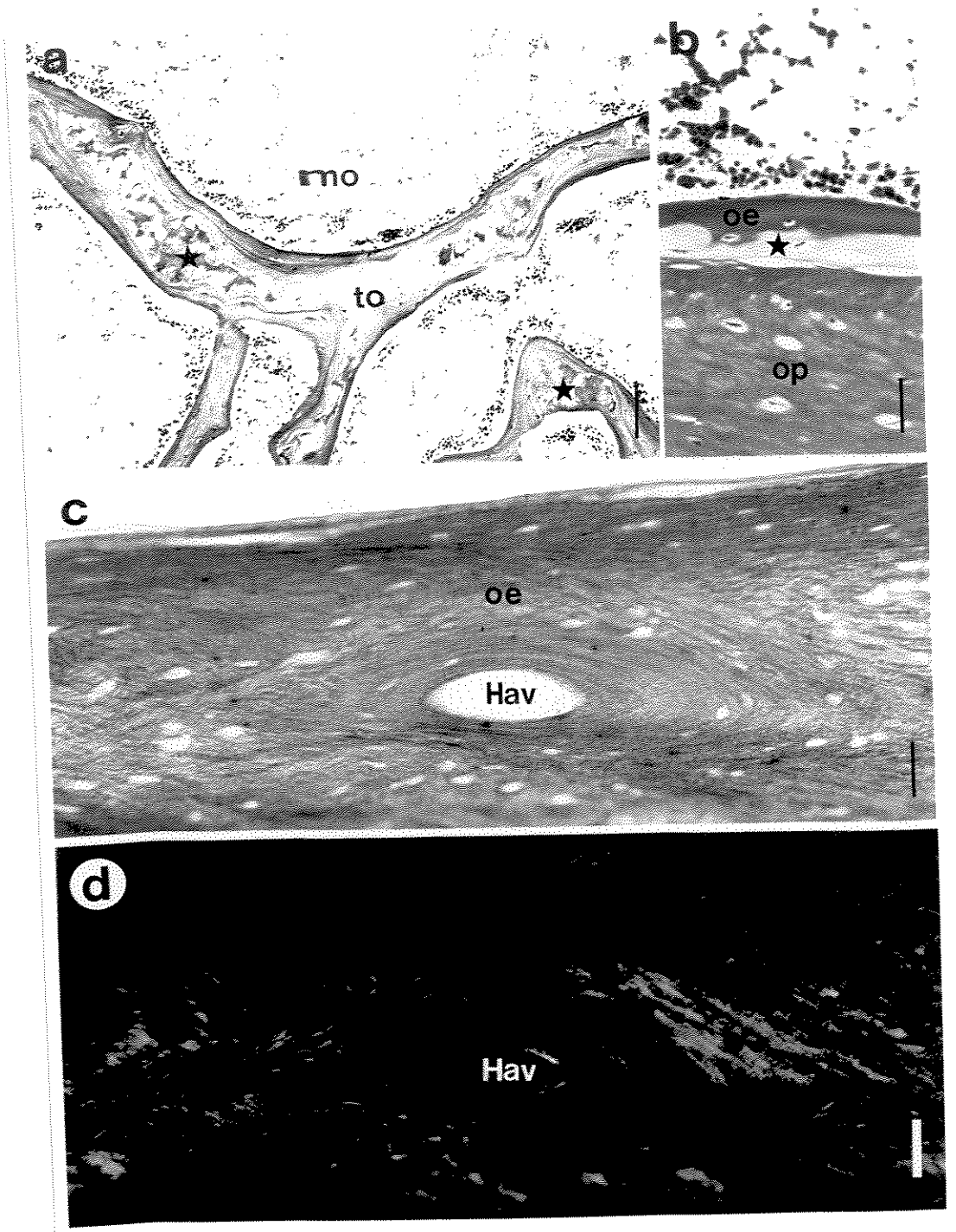

FIGURA 22. Aspectos da ossificação nas cartilagens e ossos de rãs velhas. a-b) Cortes em Paraplast corados com H&E e c-d) cortes em Paraplas corados pelo método de reticulina. **a)** Trabéculas ósseas (to) encontradas no interior da medula óssea (mo), às vezes associadas com a superfície da cartilagem hipertrófica e outras vezes associadas com a superfície interna do osso periosteal. Presença de restos de cartilagem no interior das trabéculas (estrelas). **b)** Osso endosteal (oe) depositado na superfície interna do osso periosteal (op), separados por um resquício de matriz de cartilagem (estrela). Região próxima a cartilagem epifisária. **c)** Canais de Havers (Hav) formados no osso endosteal (oe), numa região mais distante da cartilagem epifisária. **d)** Mesma região da figura c observada sob luz polarizada. Distribuição concêntrica dos elementos fibrilares ao redor do canal de Havers (Hav). Aumentos: a) barra = 100 μm e b-d) barra = 50 μm.

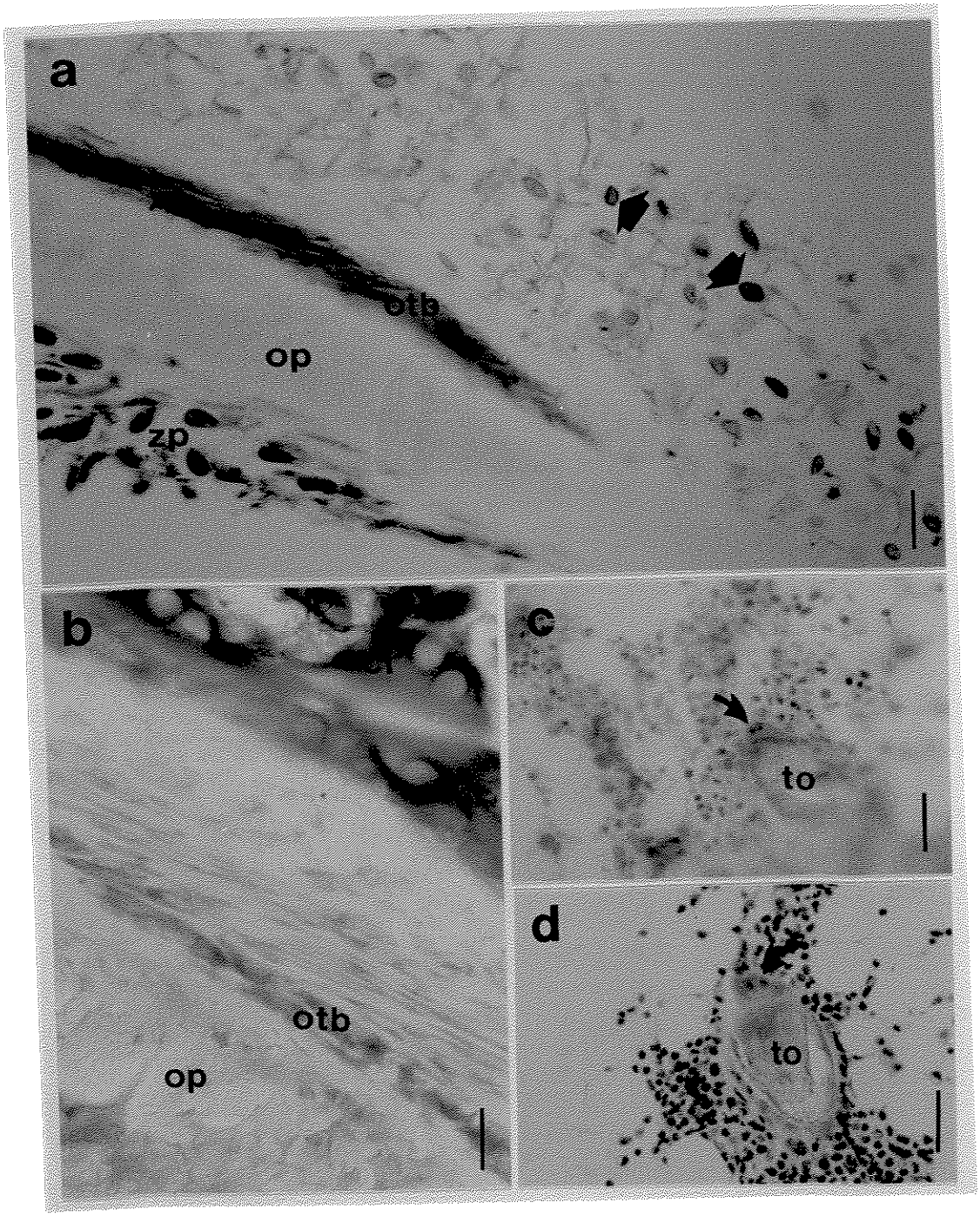

FIGURA 23. Cortes em historresina de cartilagem processada para detecção de atividade de fosfatases. **a)** Precipitado vermelho indica a atividade de fosfatase alcalina. Atividade detectada nos osteoblastos do periósteo (otb) , nos condrócitos da cartilagem lateral (setas) onde existem as "descontinuidades" e também nos condrócitos da zona de proliferação (zp), próxima ao osso periosteal (op). **b)** Outro corte da mesma região da figura anterior corada com AT. Osteoblastos (otb), cartilagem lateral (cl) e osso periosteal (op). **c)** Atividade de fosfatase ácida identificada como um precipitado vermelho, detectada no citoplasma de uma célula binucleada (seta) aderida a uma trabécula óssea (to), no interior da medula óssea (mo). Contra coloração pela hematoxilina. **d)** Corte adjacente corado com AT. Célula polinucleada (seta) aderida a trabécula óssea (to). Aumentos: a) barra = 50 μm, b) barra = 25 μm e c-d) barra = 50 μm.

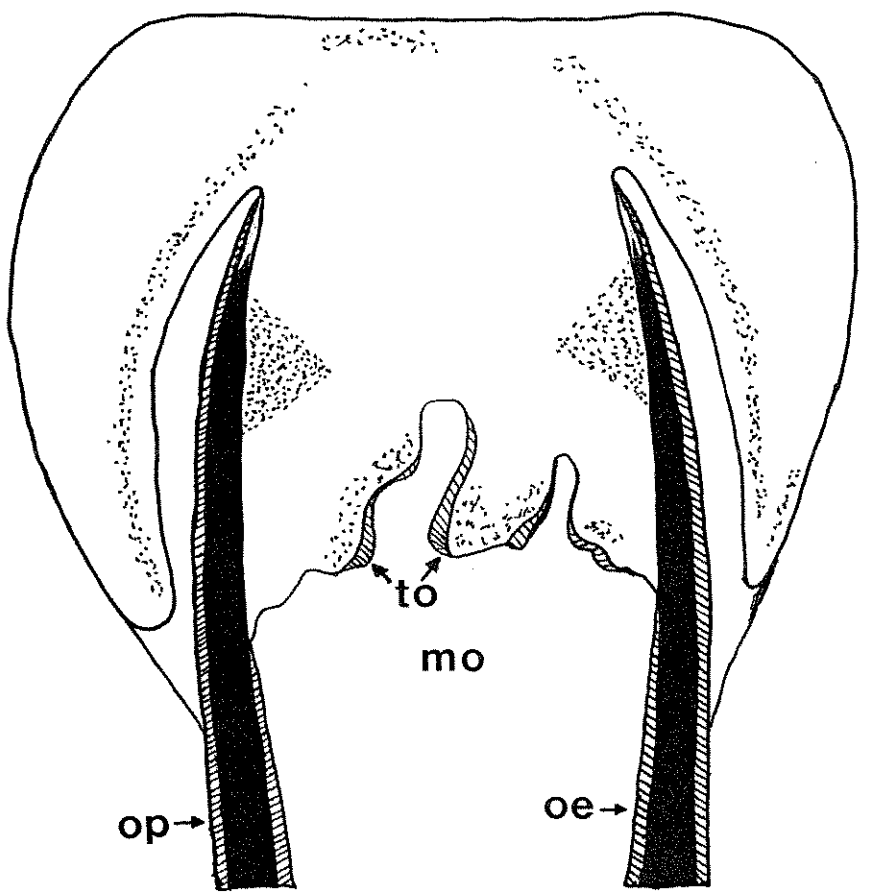

FIGURA 24. Desenho esquemático das regiões de calcificação e de ossificação da cartilagem epifisária e do osso periosteal. Observe regiões de calcificação na cartilagem lateral e cartilagem articular. Ossificação na região do periósteo (op), ossificação endosteal (oe) e nas bordas da cartilagem de crescimento em contato com a medula óssea (mo) e com os canais, formando trabéculas ósseas (to).

ANÁLISE ULTRA-ESTRUTURAL DA CARTILAGEM EPIFISÁRIA DISTAL DO FÊMUR DA RÃ ADULTA JOVEM.

Os condrócitos da cartilagem lateral eram semelhantes aos da cartilagem articular. Eram condrócitos esféricos ou ovais separados por uma grande quantidade de matriz extracelular. (Figuras 25a, b e c).

Os condrócitos continham um núcleo esférico ou alongado com cromatina condensada em contato com o envelope nuclear (Figuras 25a, b e c). O citoplasma apresentava mitocôndrias alongadas, um bem desenvolvido retículo endoplasmático rugoso e um complexo de Golgi com cisternas alargadas rodeadas de vesículas de secreção (Figuras 25a, b, c e d).

Na superfície interna próximo à membrana plasmática foram encontradas inúmeras vesículas eletrolúcidas (Figuras 25a).

Na matriz encontraram-se muitas estruturas fibrilares formando uma densa trama provavelmente representando as fibrilas de colágeno tipo II (Figuras 25b, detalhe).

O pericôndrio da cartilagem lateral e articular era formado por muitos feixes compactos de grossas fibrilas de colágeno (Figuras 26a, b e c). Estes feixes se orientavam em vários sentidos e, entre eles, existiam fibroblastos alongados com pouco citoplasma (Figuras 26a, b e c). Estes fibroblastos emitiam finos prolongamentos citoplasmáticos entre os feixes (Figuras 26a e c). Mais próximo da matriz da cartilagem encontraram-se células tipo condroblastos (Figura 26b) e entre as fibrilas de colágeno desta região foi encontrado um fino material filamentoso (Figura 26b) e em outros locais feixes de microfibrilas (Figura 26d).

As células da cartilagem de proliferação eram achatadas com um citoplasma eletrodenso e núcleos alongados, muitas vezes deslocados para um dos lados da célula. O citoplasma apresentava-se repleto de RER (Figuras 27b e c).

Na sua matriz, grânulos eletrodensos formam pequenos cordões próximos à matriz territorial (Figura 27c).

Os condrócitos hipertróficos apresentaram dois fenótipos principais. Um primeiro fenótipo era representado por células com núcleo esférico central com cromatina frouxa, muitas vezes com nucléolo evidente. O citoplasma destas células era amplo e continha poucas organelas, espalhadas ou agrupadas, mas com aspecto morfológico normal. A membrana plasmática era contínua e estava próxima à matriz territorial (Figuras 28a, b e c). E no segundo fenótipo, os condrócitos apresentavam núcleo e citoplasma condensados e retraídos para um dos lados da lacuna (Figuras 28d e e). Este segundo fenótipo foi encontrado principalmente na cartilagem hipertrófica próxima à medula óssea.

Não foram encontradas vesículas de matriz ou fragmentos celulares próximo aos condrócitos e nem aspectos de calcificação da matriz.

Na região de encaixe da extremidade de crescimento longitudinal do tubo ósseo periosteal foram encontradas diversas células tipo-osteoblastos. Estas células apresentavam núcleos esféricos e citoplasma repleto de retículo endoplasmático rugoso, com diversos prolongamentos e placas de adesão entre as células (Figura 29b). Outras células com citoplasma mais restrito continham grânulos eletrodensos (Figura 29a).

Todas estas células estavam envolvidas por um tecido conjuntivo frouxo vascularizado por capilares. Nesta região de contato da matriz da cartilagem lateral com este tecido conjuntivo, não existia uma transição gradual, mas sim uma brusca transição entre as duas estruturas (Figura 29a).

Formando a superfície fibrosa do osso periosteal desta região encontraram-se muitas fibrilas de colágeno orientadas paralelamente. Como revelado histoquimicamente, existia uma extremidade fibrosa não mineralizada nesta região (Figura 30a).

Nesta região os osteoblastos apresentam o citoplasma polarizado em direção à superfície fibrosa do periósteo e, entre eles, encontraram-se inúmeras vesículas e prolongamentos citoplasmáticos. Esta vesículas apresentavam conteúdos e tamanhos variados (Figuras 30b e c). Algumas vesículas apresentavam conteúdo semelhante ao encontrado na periferia dos osteoblastos (Figura 30c).

Foram encontrados diversos tipos celulares, aparentemente monunucleados, em contato com a borda da matriz da cartilagem hipertrófica, tanto no interior dos canais quanto na borda da medula, aparentemente erodindo a cartilagem (Figuras 31, 32, 33 e 34). Dois tipos celulares foram mais freqüentemente encontrados, são as células com citoplasma eletrodenso, ricas em retículo endoplasmático rugoso e as células com citoplasma reduzido e mais eletrolúcido, que foram designadas de células tipo-fibroblasto.

As células eletrodensas apresentavam-se repletas de retículo endoplasmático rugoso, em conformidade com a intensa basofilia citoplasmática observada nos cortes semi-finos corados com AT. Em alguns locais foram observados prolongamentos citoplasmáticos de diversos tamanhos, semelhantes às vesículas de matriz, e entre estas células, alguns fragmentos isolados de matriz extracelular da cartilagem (Figuras 31a, b e c).

As células tipo-fibroblastos (Figuras 32a, 33 e 34d) apresentavam um núcleo alongado com pouco citoplasma, que emitia prolongamentos em direção à matriz. Em algumas regiões próximas a estas células encontraram-se pequenos feixes de fibrilas de colágeno (Figuras 32a e b e 33) e em outras regiões, alguns fragmentos de citoplasma, às vezes semelhantes a vesículas de matriz. Estas células podiam estar total (Figura 33) ou parcialmente rodeadas (Figuras 32a e 34d) pela matriz da cartilagem.

Também foram encontradas outras células, menos freqüentes. Algumas apresentavam formato irregular e continham cisternas de retículo endoplasmático rugoso muito alargadas e com o espaço perinuclear mais dilatado (fig 34c).

Outras células apresentavam o citoplasma com algumas vesículas e pouco retículo endoplasmático rugoso polarizado em direção à matriz. Na matriz extracelular próxima a estas células, foram observados pequenos arranjos paralelos das fibrilas de colágeno (Figuras 34a e b).

Um outro tipo celular emitia prolongamentos para o interior da matriz. Mas, diferentemente das células anteriores, estes prolongamentos formavam pequenos domínios de matriz de cartilagem entre eles (Figuras 32a e b).

Os capilares presentes no interior dos canais apresentavam, em alguns locais, uma lâmina basal descontínua e, em algumas regiões, foram encontradas pequenas vesículas na matriz próximas à lâmina basal (Figuras 31c e 32a e c).

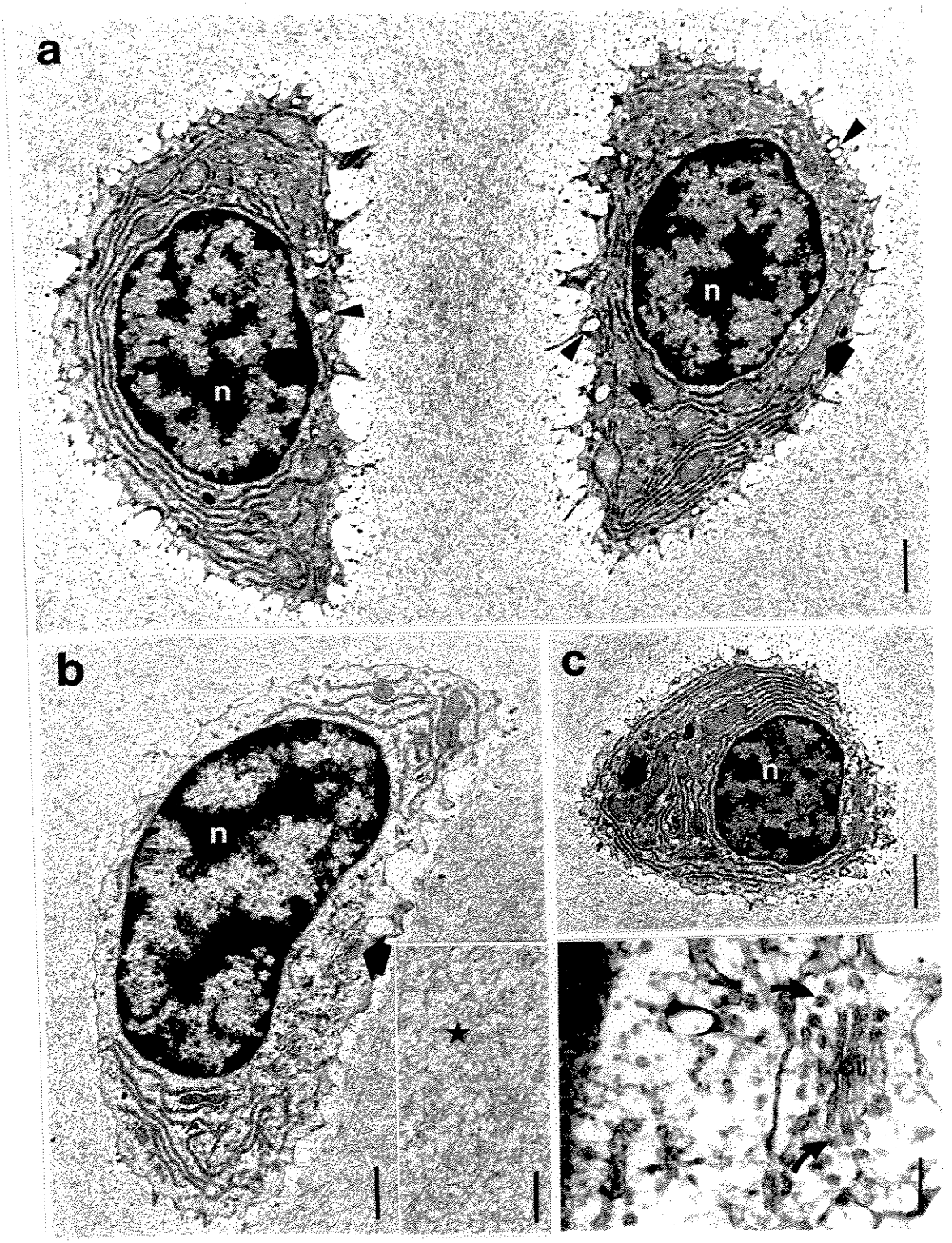

FIGURA 25. Ultra-estrutura das células da cartilagem lateral. **a)** Dois condrócitos com núcleos ovalados (n), citoplasma com muitas cisternas de retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias alongadas (setas). Várias vesículas próximas à membrana plasmática (cabeças de setas). **b)** Condrócito com citoplasma polarizado. Núcleo (n) e complexo de Golgi (seta). No detalhe, observa-se que a MEC apresenta muitas estruturas fibrilares (estrela) ao redor do condrócitos. **c)** Condrócito com núcleo (n) esférico e mitocôndria alongada (seta). **d)** Detalhe do complexo de Golgi da célula da figura b, com suas cisternas (ci) e muitas vesículas ao redor (setas). Aumentos: a-b) barra = 1 μm, detalhe de b) barra = 500 nm, c) barra = 2 μm e d) barra = 230 nm.

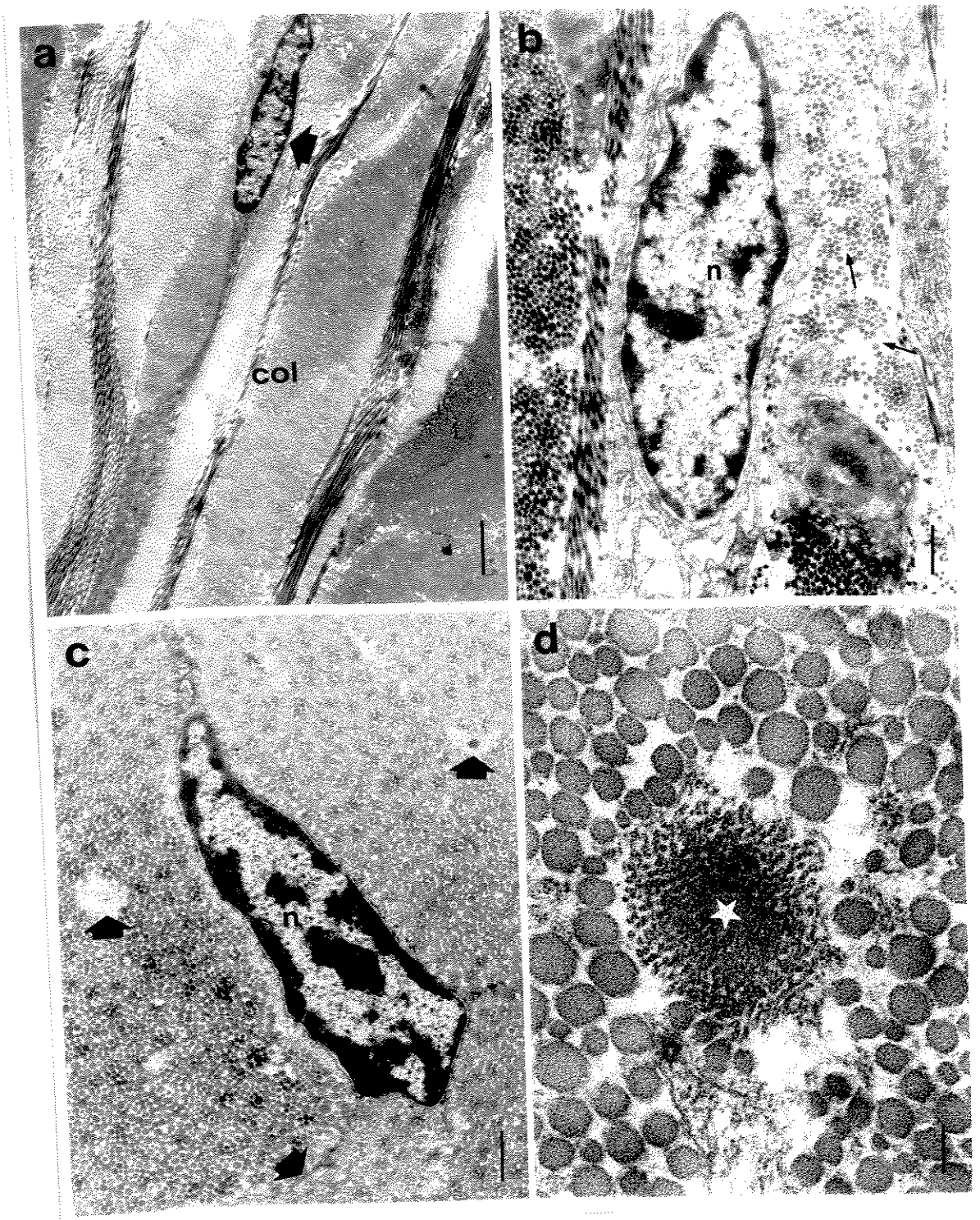

FIGURA 26. Pericôndrio da cartilagem lateral. **a)** Muitos feixes compactos de fibrilas de colágeno (col), orientados em vários sentidos e, entre eles, fibroblastos com núcleos alongados e pouco citoplasma (seta). **b)** Detalhe de uma região mais próxima a matriz da cartilagem. Núcleo de um provável condroblasto (n) e partes de citoplasma de outras célula. Entre as fibrilas de colágeno existe um componente com aspecto fibrilar muito fino (setas). **c)** Corte transversal de um feixe de fibrilas de colágeno, núcleo de um fibroblasto (n) e muitos prolongamentos citoplasmáticos entre as fibrilas (setas). **d)** Componente microfibrilar (estrela) encontrado entre as fibrilas de colágeno do pericôndrio. Aumentos: a) barra = 1,6 μm, b-c) barra = 700 nm, d) barra = 110 nm.

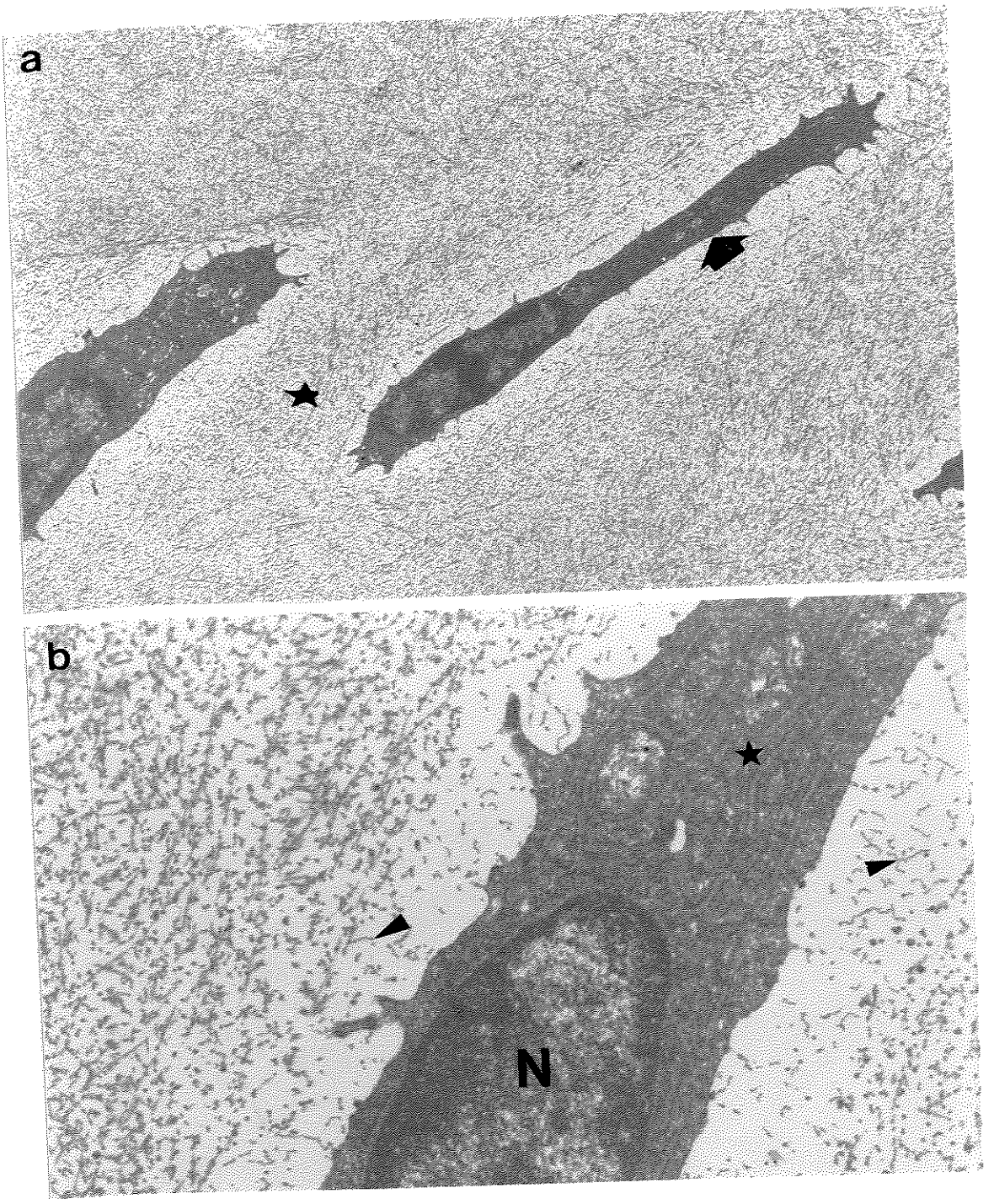

FIGURA 27. Células da zona de proliferação da cartilagem de crescimento. **a)** Ultra-estrutura destas células, mostrando a forma achatada com um citoplasma reduzido e muito eletrodenso (seta). Observe a matriz formada entre as células após a divisão (estrela). **b)** Detalhe de um condrócito da zona de proliferação, citoplasma eletrodenso com muito RER (estrela). Na matriz territorial encontram-se pequenos grânulos formando curtos cordões (pontas de setas). Núcleo (N). Aumentos: a) barra = 1 µm e b) barra = 430 nm.

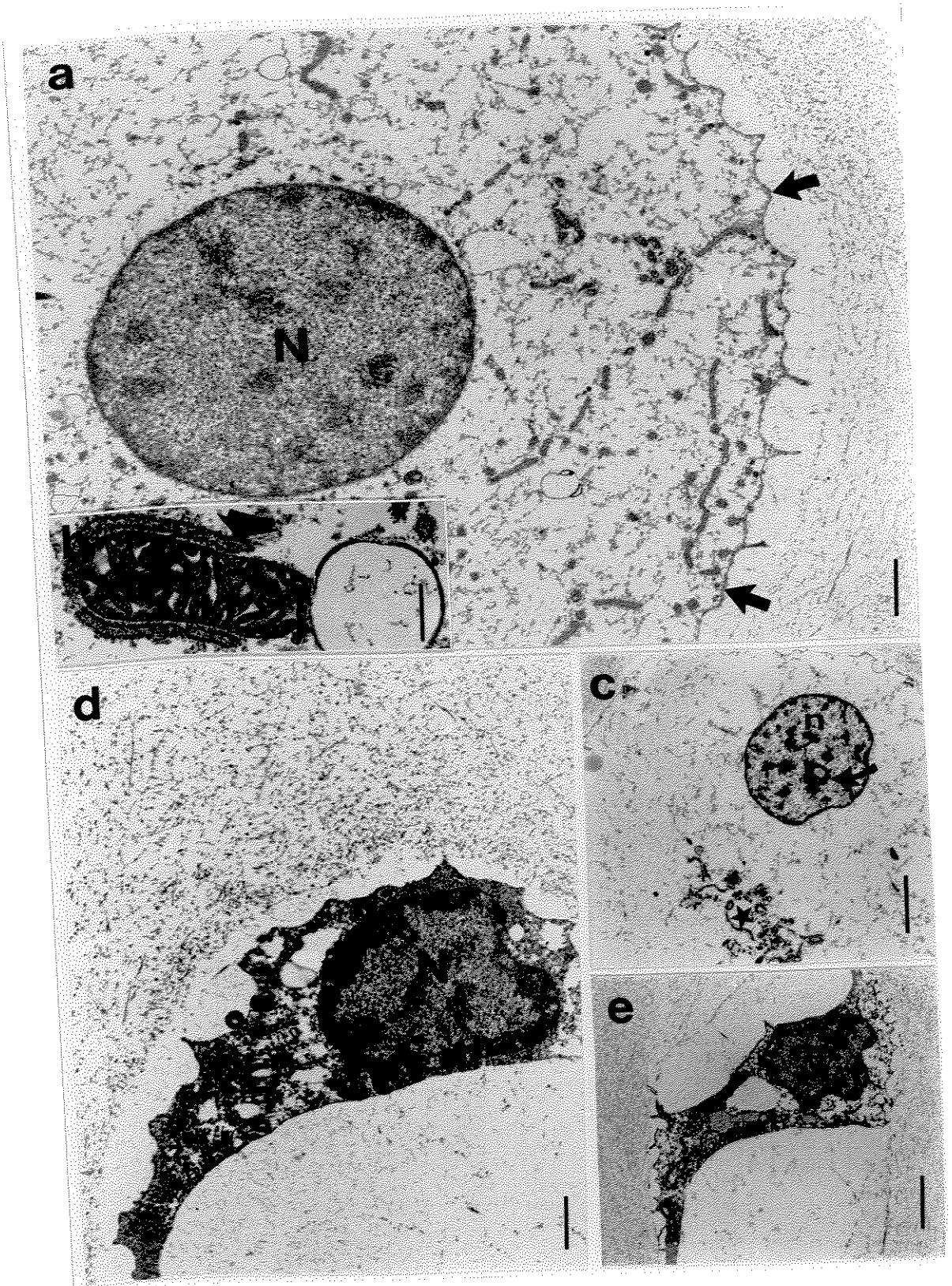

FIGURA 28. Condrócitos hipertróficos com dois aspectos morfológicos principais. **a)** Célula com grande volume citoplasmático com poucas organelas, núcleo esférico central com cromatina descondensada (N) e membrana plasmática com vários pontos de contato com a matriz territorial (setas). **b)** Detalhe do citoplasma da célula da figura anterior. Uma mitocôndria (estrela) associada a uma cisterna de retículo endoplasmático rugoso (seta). Estas organelas apresentam um aspecto morfológico normal. **c)** Condrócito com um amplo citoplasma e organelas agrupadas (estrela), o núcleo esférico (n) com um nucléolo evidente (seta). **d)** Condrócito com o citoplasma retraído junto ao núcleo (N). **e)** Condrócito com citoplasma retraído junto ao núcleo (n) de forma irregular. Aumentos: a) barra = 1,13 μm, b) barra = 420 nm, c) barra = 3,1 μm, d) barra = 1,04 μm e e) barra = 3,1 μm.

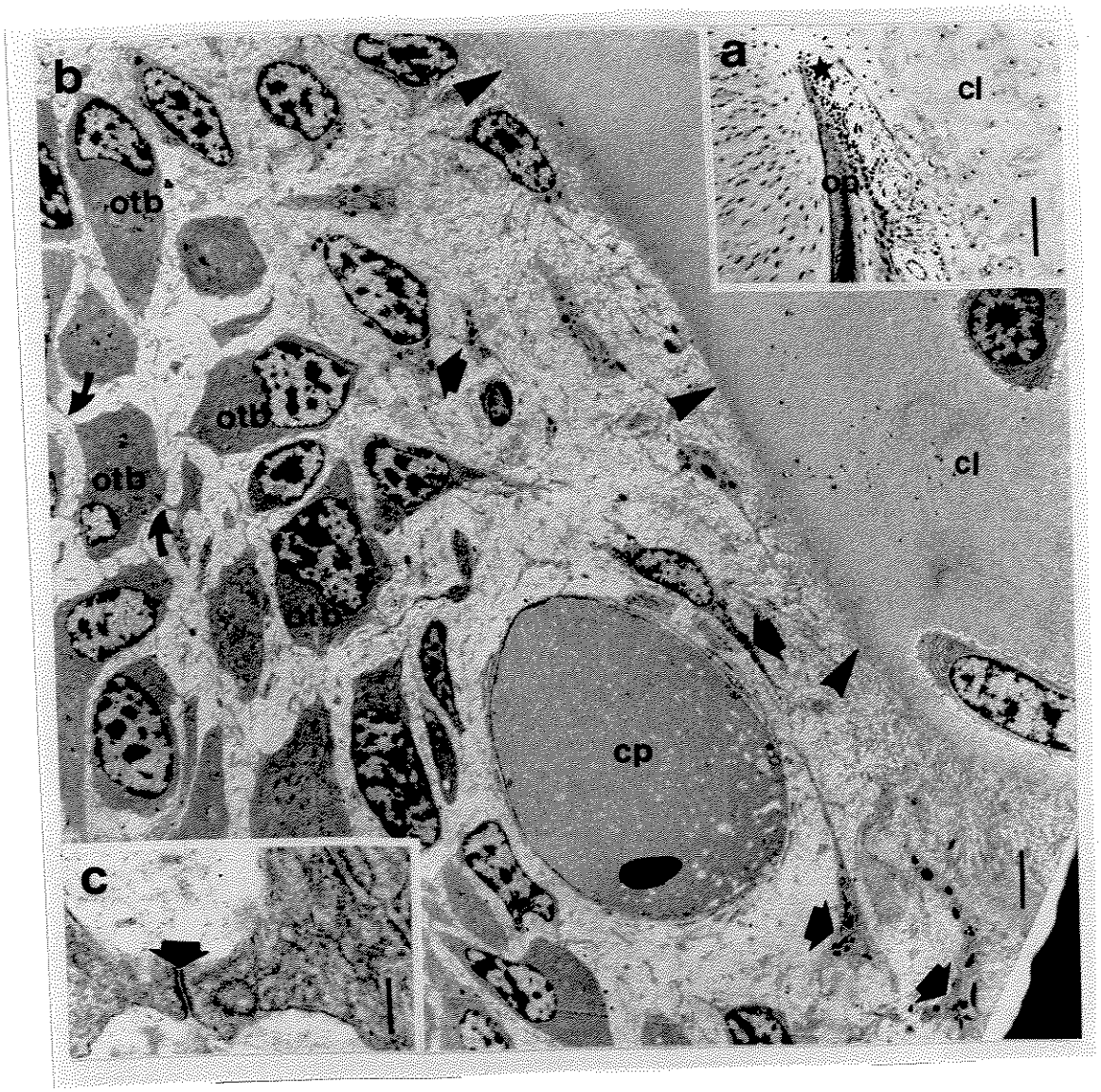

FIGURA 29. Extremidade do osso periosteal em contato com a cartilagem epifisária. **a)** Corte em Paraplast corado com H&E mostrando a região ( ) que corresponde à figura b. Cartilagem lateral (cl) e osso periosteal (op). **b)** Muitas células tipo-osteoblatos (otb) contidas numa matriz finamente fibrilar muito dispersa. Estas células apresentam citoplasma rico em retículo endoplasmático rugoso e muitos prolongamentos com placas de adesão (setas curvas). Outras células com estruturas eletrodensas no citoplasma (setas). O limite nítido (cabeças de setas) entre a matriz extracelular da cartilagem lateral (cl) e a região osteogênica. Nesta região sempre são encontrados capilares (cp). **c)** Detalhe de uma placa de adesão entre dois osteoblastos (seta). Aumentos: a) barra = 100 μm, b) barra = 3,3 μm e c) barra = 250 nm.

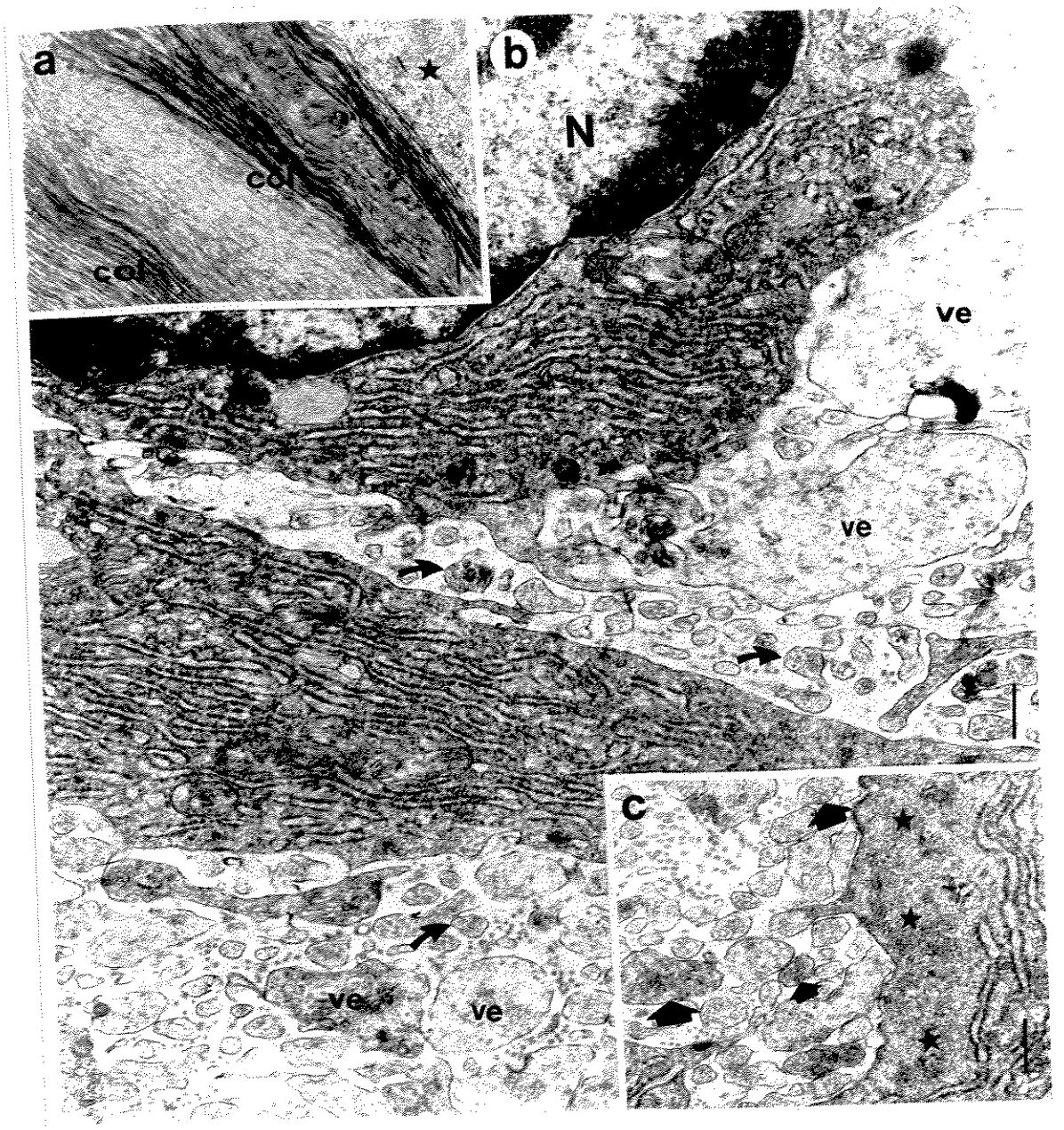

FIGURA 30. a) Extremidade fibrosa não mineralizada do periósteo com muitas fibrilas de colágeno orientadas paralelamente (col) e internamente a matriz extracelular da cartilagem de crescimento (estrela). **b)** Grandes vesículas (ve) e pequenas vesículas (setas) com conteúdos aparentemente diferentes, localizadas entre os osteoblastos e próximas ao periósteo. Núcleo (N). **c)** Osteoblato com um conteúdo citoplasmático granulado próximo à membrana plasmática (estrelas), semelhante ao encontrado no interior de algumas vesículas (setas). Aumentos: a) barra = 1,4 μm, b) barra = 330 nm e c) barra = 330 nm.

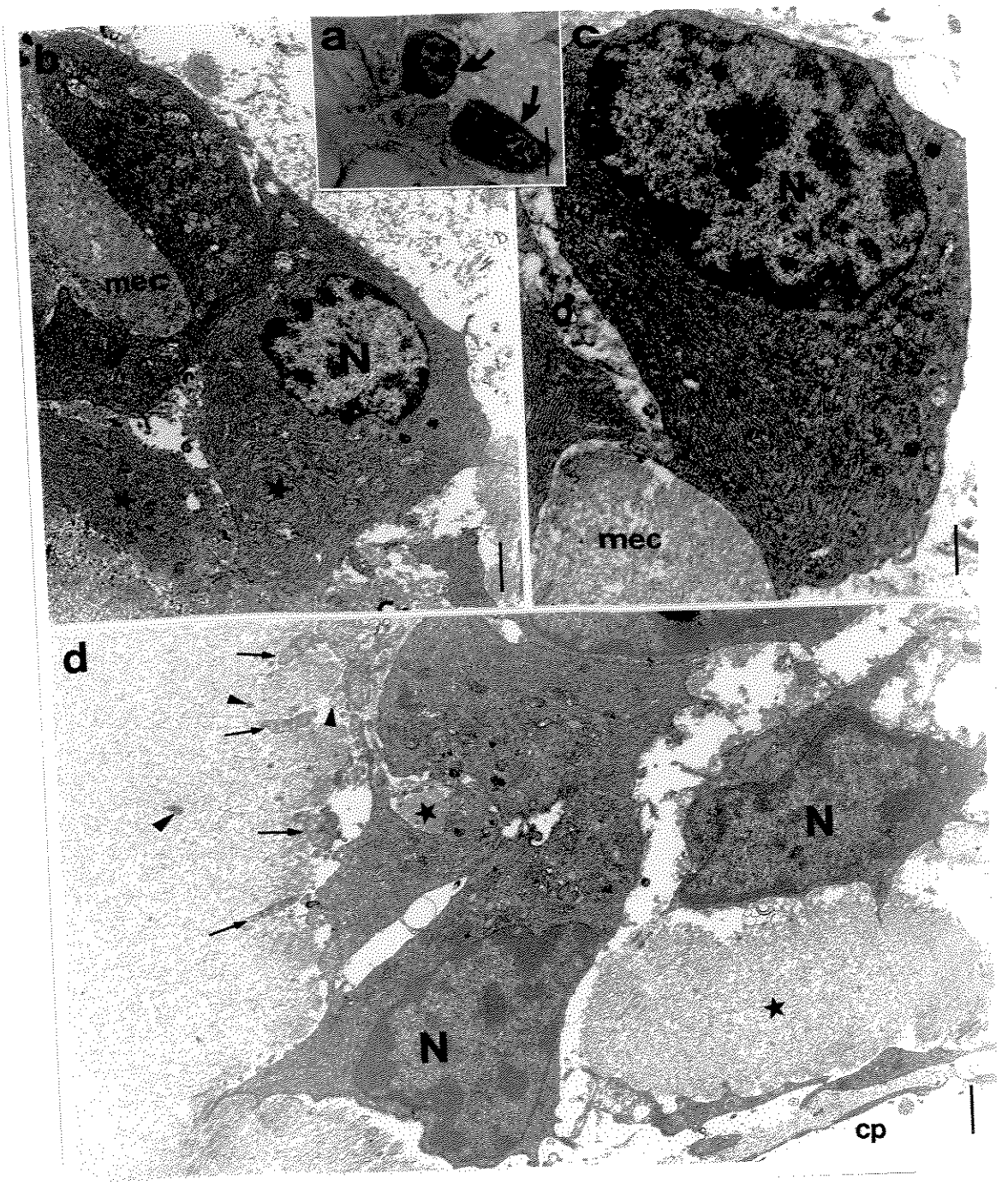

FIGURA 31. Células com citoplasma eletrodenso encontradas nas paredes dos canais da cartilagem em contato com a matriz extracelular da cartilagem hipertrófica. **a)** Corte semi-fino corado com AT, mostrando células com o citoplasma fortemente corado (setas). **b-c)** Ultra-estrutura de células eletrodensas, com muito retículo endoplasmático rugoso (estrelas) no citoplasma, circundando fragmentos da matriz extracelular da cartilagem (mec). Núcleo (N). **d)** Outras células muito eletrodensas na periferia de um capilar (cp). Existem fragmentos isolados de matriz extracelular de cartilagem (estrelas) e em outras regiões, prolongamentos citoplasmáticos na matriz (setas). Às vezes estes prolongamentos parecem ser vesículas (cabeças de setas). Núcleos (N). Aumentos: a) barra = 10 μm, b) barra = 1,5 μm, c) barra = 780 nm e d) barra = 1,1 μm.

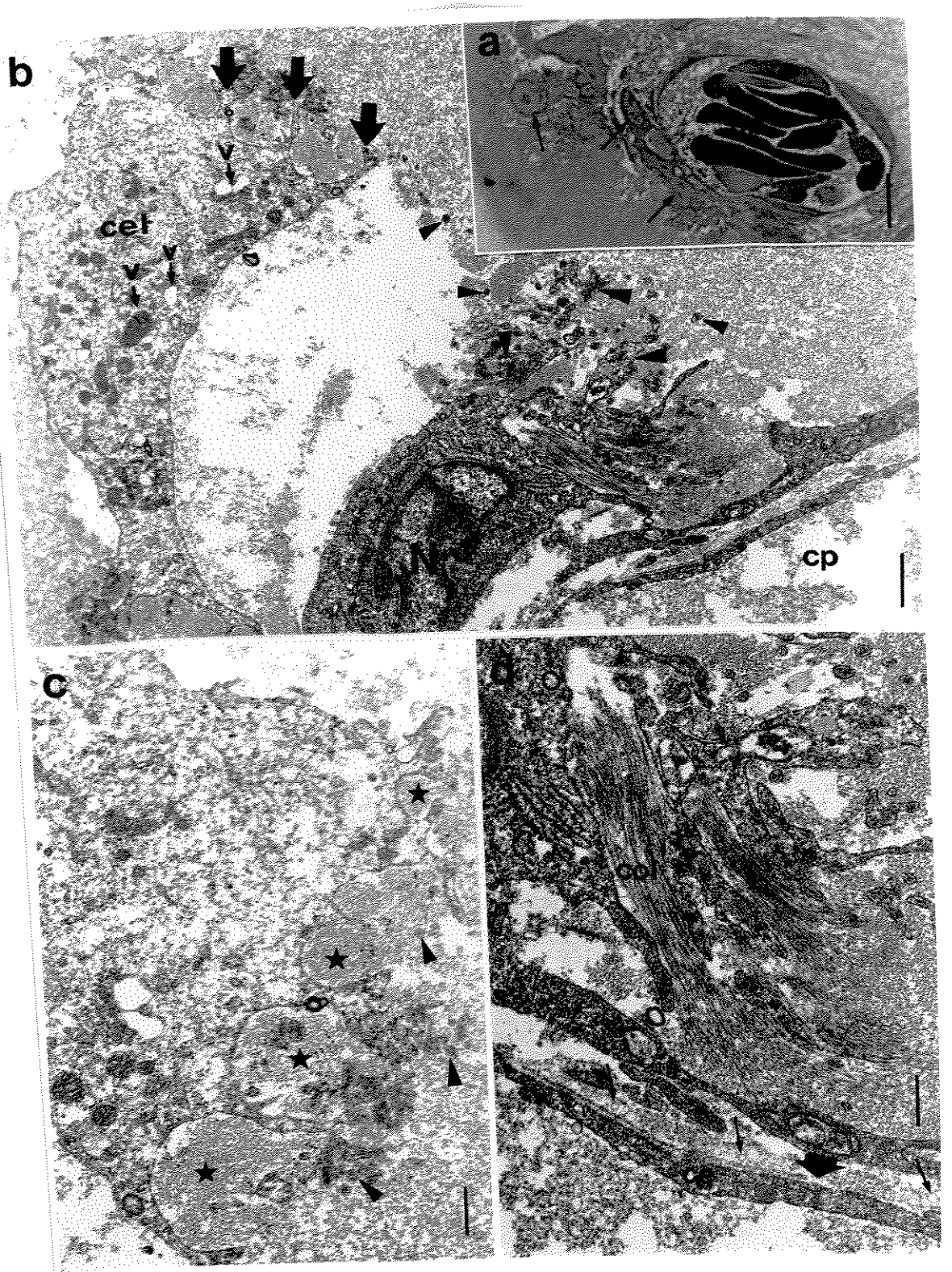

FIGURA 32. Células com citoplasma eletrolúcido encontradas em contato com a matriz extracelular da cartilagem hipertrófica. **a)** Corte semi-fino corado com AT. Células com o citoplasma menos corado (setas) na periferia de um capilar (cp) em contato com a matriz extracelular de cartilagem hipertrófica. **b)** Na ultra-estrutura, uma célula eletrolúcida (cel) contendo muitas vesículas citoplamáticas (v) e prolongamentos celulares (setas) que envolvem a matriz extracelular. Outra célula mais próxima ao capilar (cp) com muitos prolongamentos citoplasmáticos na matriz da cartilagem de diversos tamanhos, alguns semelhantes a vesículas de matriz (cabeças de setas). Núcleo (N). **c)** Detalhe dos prolongamentos citoplasmáticos da célula eletrolúcida. Estes prolongamentos envolvem a matriz da cartilagem, forma pequenos domínios na superfície celular (estrelas). Próximo a estes prolongamentos observaram-se prolongamentos citoplasmáticos de diversos tamanhos (cabeças de setas). **d)** Fibrilas de colágeno (col) mais espessas formando pequenos feixes, localizadas entre a célula e a matriz de cartilagem. Algumas vesículas (setas menores) localizadas entre matriz e a lâmina basal das células endoteliais (ce). Em alguns locais a lâmina basal mostra-se descontínua (seta maior). Aumentos: a) barra = 10 μm, b) barra = 830 nm, c-d) barra = 400 nm.

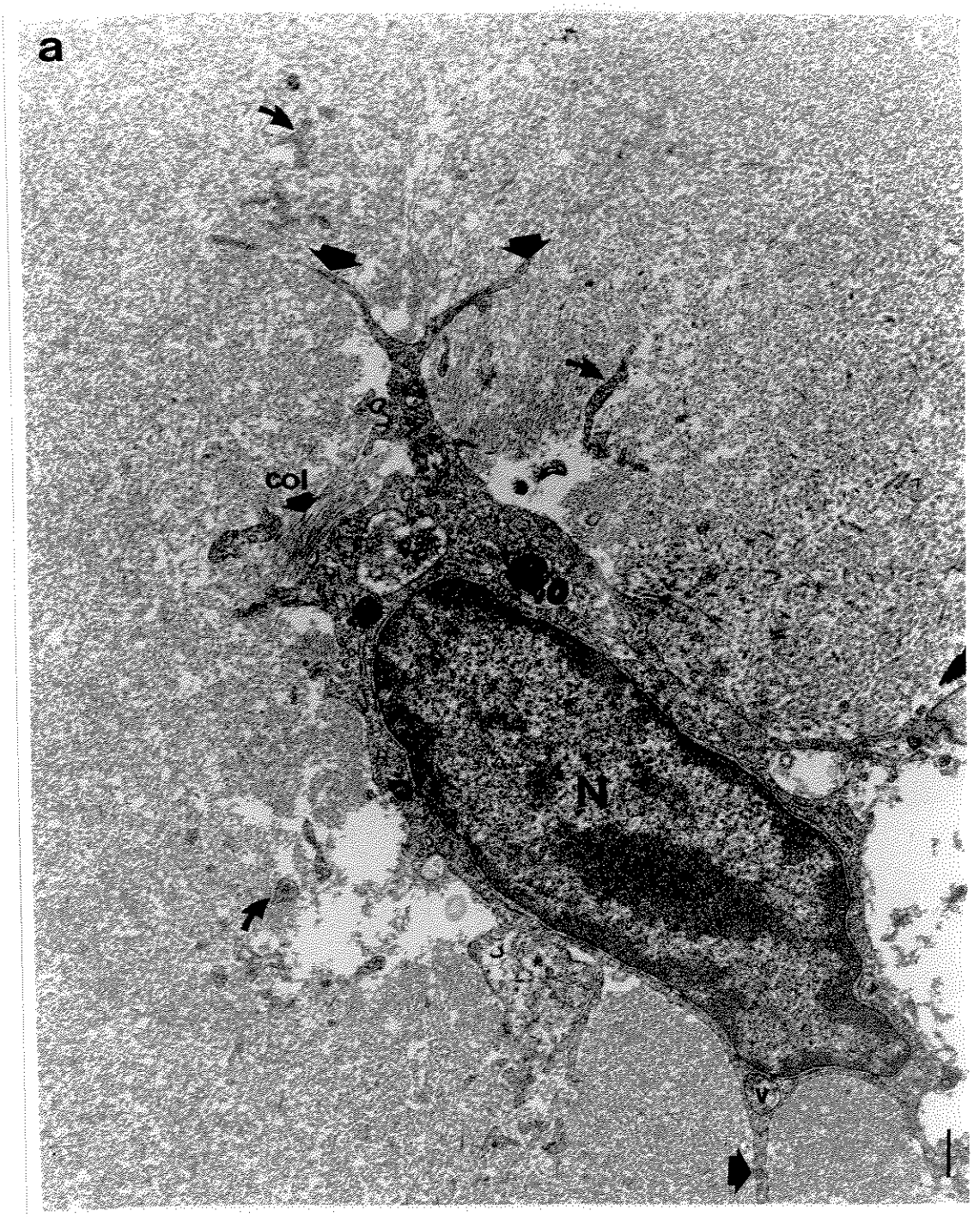

FIGURA 33. Célula mononucleada (N) tipo-fibroblasto no interior da matriz de cartilagem hipertrófica junto a parede de um canal. Esta célula apresenta um citoplasma reduzido com finos prolongamentos (setas maiores) e prolongamentos citoplasmáticos de diferentes formas e tamanhos isolados ao redor da célula (setas curvas). Observar algulmas vesículas (v) tipo-lisossomos no citoplasma e fibrilas de colágeno formando pequenos feixes (col). Aumento: barra = 400 nm.

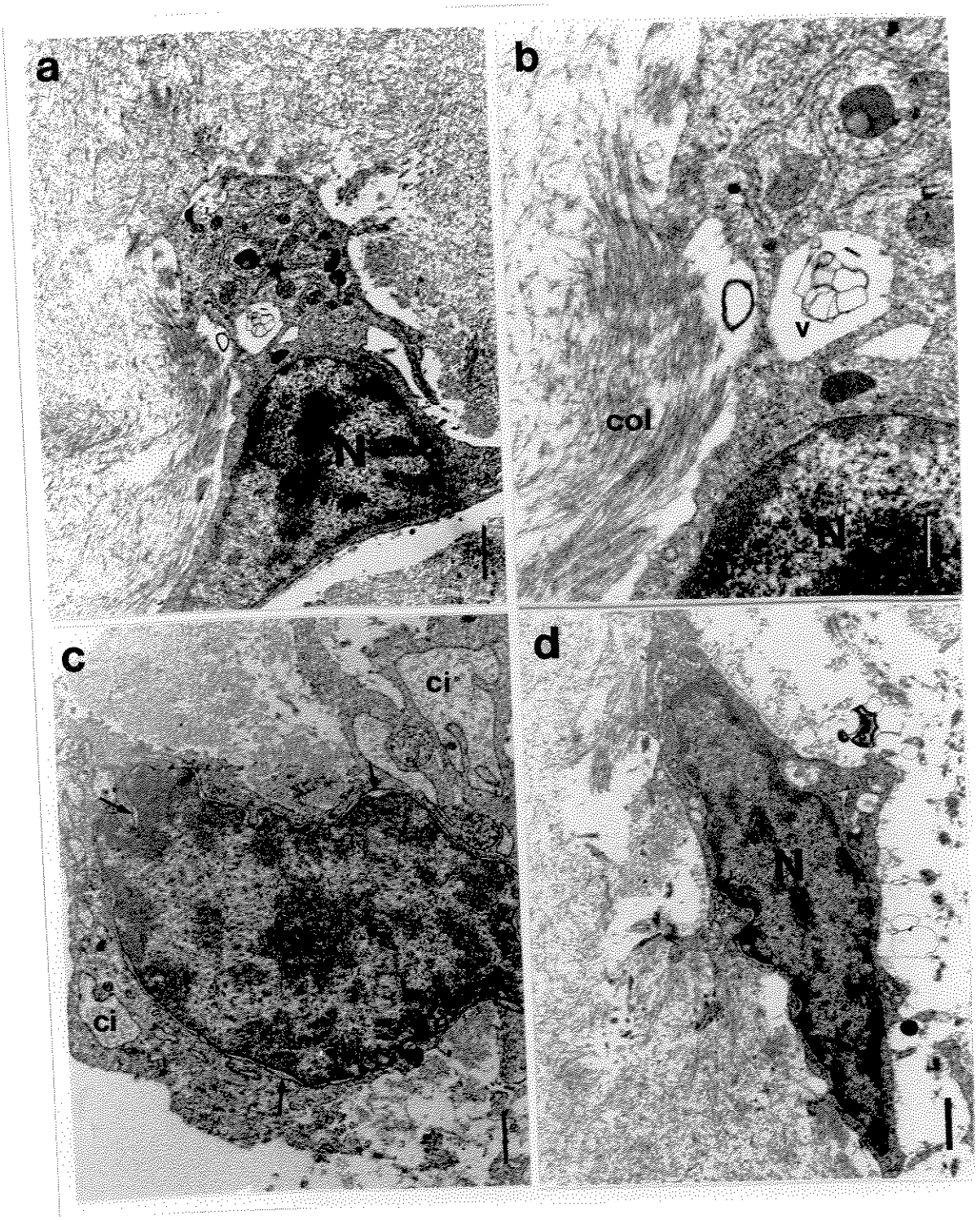

FIGURA 34. Diferentes tipos celulares encontrados em contato com a matriz da cartilagem. **a)** Célula com citoplasma polarizado (estrela) em direção a matriz da cartilagem. Núcleo (N). **b)** Detalhe do citoplasma da figura anterior, uma grande vesícula (v) de conteúdo semelhante a membranas colapsadas, e na matriz, fibrilas de colágeno formando pequenos feixes (col). Núcleo (N). **c)** Célula com cisternas (ci) do retículo endoplasmático rugoso muito dilatadas. Também o espaço perinuclear apresenta-se, em algumas regiões, mais amplo (setas). Núcleo (N). **d)** Célula com núcleo alongado (N) e citoplasma reduzido. Aumentos: a) barra = 1,38 μm, b) barra = 410 nm, c) barra = 960 nm e d) barra = 1,08 μm.

4 DISCUSSÃO

O desenvolvimento e crescimento da cartilagem epifisária e da estrutura óssea do fêmur e da tíbio-fíbula

A forma do osso endocondral é especificada pelo modelo cartilaginoso que o precede durante o desenvolvimento embrionário (ANDRADES **et alii**, 1996). Os estágios iniciais da formação dos ossos de *Rana catesbeiana* são semelhantes aos encontrados nas aves e mamíferos, isto é, ocorre a formação de um modelo cartilaginoso dos ossos, a partir da diferenciação das células mesenquimais em condrócitos, como pôde ser visto na figura 2a.

Nos mamíferos, simultâneamente à formação do colar periosteal, ocorre a calcificação da cartilagem hipertrófica. O osso periosteal cresce inicialmente mais rápido que a erosão da cartilagem e a ossificação endocondral, mas logo é alcançado e passa a crescer simultaneamente à formação do osso endocondral (GARDNER & GRAY, 1970). Nas aves, durante o desenvolvimento inicial, a formação do colar periosteal não é acompanhada da calcificação da cartilagem hipertrófica (SORRELL & WEISS, 1980), esta calcificação ocorre nas fases de crescimento pós-eclosão (TAKECHI & ITAKURA, 1995).

Diferentemente do que ocorre em mamíferos e aves, em *Rana catesbeiana* existe somente o osso periosteal compacto nas fases de desenvolvimento e até grande parte da idade adulta, sem que haja a calcificação da cartilagem de crescimento e sem a formação de osso endocondral.

Estudos morfométricos demonstraram que a produção de matriz extracelular e o inchamento das células é o maior responsável pelo rápido crescimento da cartilagem, sendo que a proliferação celular é mais importante nos primeiros estágios de formação (LUDER, 1994). Nos mamíferos e nas aves, as placas de crescimento são especializadas para um rápido crescimento ósseo. A placa de crescimento dos mamíferos é capaz de uma rápida elongação, em grande parte pelo inchamento celular dos condrócitos hipertróficos. Já em aves, a velocidade no crescimento parece estar relacionada ao aumento na população de condrócitos por proliferação. O inchamento celular, através de acúmulo de água, permite grande aumento do volume sem excessivo gasto de energia. As aves gastam energia com a proliferação celular, mas isto é compensado pela redução na produção de osso endocondral (BARRETO **et alii**, 1993).

A grande quantidade de condrócitos hipertróficos encontrados na cartilagem de crescimento, durante as fases de girino, sugere que a proliferação celular e o inchamento dos condrócitos são de grande importância para o crescimento da cartilagem e, consequentemente, do osso. A ausência de um processo generalizado de calcificação da cartilagem hipertrófica e da formação de osso endocondral parece garantir que o crescimento dos ossos longos nestes animais é mais econômico que em aves e mamíferos, segundo as considerações de BARRETO e cols. (1993).

A estrutura óssea presente nos girinos desta espécie de rã é semelhante à estrutura descrita por RHODIN (1985) para um grupo de tartarugas marinhas. Nestes animais forma-se, inicialmente, uma estrutura tubular de osso periosteal compacto, que envolve toda a cartilagem de crescimento, não calcificada.

Em *Rana pipens* (KEMP & ROYT, 1967) e em *Rana temporaria* (DICKSON, 1982), nas idades jovens, também ocorre a produção de osso periosteal ao redor de uma cartilagem não calcificada.

O crescimento ósseo e a cartilagem epifisária da rã adulta

A cartilagem epifisária de *Rana catesbeiana* é semelhante às estruturas descritas para a maioria dos anfíbios anuros, mas é muito peculiar e distinta quando comparada com aves e mamíferos. Além de uma cartilagem articular bem desenvolvida e uma cartilagem de

crescimento bastante espessa, estes animais apresentam, como principal característica, uma cartilagem lateral sobre a superfície externa do tubo ósseo, que se encaixa na cartilagem epifisária e que contem internamente a cartilagem de crescimento. Considerando as características morfológicas da cartilagem lateral, e o fato destes animais permanecerem a maior parte do tempo com os joelhos flexionados, esta cartilagem lateral pode ser considerada uma expansão da cartilagem articular, propriamente dita, simplesmente ampliando a área de articulação.

O aspecto morfológico dos condrócitos da cartilagem articular e da cartilagem lateral reflete uma alta atividade metabólica. São células repletas de retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias alongadas, evidente complexo de Golgi e vesículas citoplasmáticas próximas à membrana plasmática, provavelmente contendo secreção. Além disto, foi notoria a presença de matriz metacromática muito fibrilar na região territorial, observação que reforça a idéia de alta atividade metabólica destas celulas.

O pericôndrio desta cartilagem apresentou aspectos comuns aos outros grupos, com feixes compactos de fibrilas de colágeno associados à pequenos feixes de microfibrilas. Além disso, as inúmeras figuras de mitose encontradas na camada condrogênica reforçam a participação do pericôndrio no crescimento das cartilagens.

A região de fibrocartilagem na extremidade da cartilagem lateral pode representar um constante repasse da cartilagem para tecido fibroso, durante o crescimento do osso e da cartilagem epifisária (Figura 13). Sabe-se que as fibrocartilagens são tecidos de transição entre as cartilagens e tendões e ligamentos, podendo aparecer temporariamente (BENJAMIN & EVANS, 1990).

Os aspectos mais distintos em relação aos outros grupos estão presentes na cartilagem de crescimento deste animal, embora ela apresentasse as características zonas de reserva, proliferação, maturação e hipertrofia. Em alguns mamíferos, a placa de crescimento no animal adulto é um disco fino, com poucas camadas de células, localizado entre o centro primário e o centro secundário de ossificação, além disso, os condrócitos nesta cartilagem têm uma organização colunar. Em *Rana catesbeiana* a cartilagem de crescimento é muito espessa, apresentando muitas camadas de células nas diferentes zonas e estas células não apresentam nenhum arranjo colunar.

A zona de proliferação é importante para o crescimento da cartilagem e, consequentemente do osso. As células da zona de proliferação são células com citoplasma muito eletrodenso, repleto de RER, o que reflete uma grande atividade de síntese de proteínas destas células.

SHIBATA **et alii** (1993) observaram aspectos morfológicos das mitoses na região de proliferação de ratos jovens, na epífise proximal da tíbia, descrevendo o desaparecimento das organelas durante a divisão e a separação das células filhas por estrangulamento. Nós não encontramos figuras de mitose nesta região, entretanto, observamos a separação destas células após a divisão. Elas apresentaram um padrão de separação lateral ou oblíquo, em relação ao longo eixo do osso, o que pode ser responsável pelo arranjo não colunar dos condrócitos. Em mamíferos, as células se separam na direção vertical, paralela ao longo eixo do osso e isto leva ao arranjo das células em colunas.

A cartilagem de crescimento aumenta em diâmetro por crescimento intersticial dos condrócitos (LANGESKIÖLD, 1993). A produção de novas células, nova matriz e o modelo de separação lateral destas células da zona de proliferação pode promover um crescimento lateral da cartilagem de crescimento e, consequentemente, do osso. Este crescimento lateral parece ser mais lento que o crescimento longitudinal, com isto os ossos tornam-se longos e finos. A matriz fibrosa não mineralizada encontrada na extremidade de crescimento longitudinal do osso periosteal pode permitir a expansão lateral desta cartilagem.

Assim, o osso periosteal será sucessivamente depositado sobre uma cartilagem maior, aumentando o diâmetro interno do tubo ósseo e, consequentemente, da cavidade da medula óssea. Este aspecto era bem visível nos ossos dos girinos.

Os condrócitos da zona de maturação são células transitórias, destinadas à hipertrofia e, ao que parece, participam ativamente na produção de matriz extracelular (TAKECHI & ITAKURA, 1995).

Uma grande característica da cartilagem de crescimento são os condrócitos hipertróficos. Estas células têm despertado grande interesse dos pesquisadores, pois apresenta aspectos muito particulares. Elas são consideradas as grandes responsáveis pelo crescimento ósseo em mamíferos (BARRETO **et alii**, 1993; HUNZIKER & SCHENK, 1989; FARNUM & WILSMAN, 1989). O inchamento dos condrócitos permite o crescimento da cartilagem com pouco gasto de energia. HUNZIKER & SCHENK (1989) observaram, na cartilagem de crescimento de ratos, uma maior quantidade de condrócitos hipertróficos com maior volume nos animais jovens, ocorrendo uma diminuição no número de condrócitos hipertróficos e também no seu volume, nos animais velhos

Os condrócitos hipertróficos são considerados por muitos autores como células em degeneração, que sofrem morte por apoptose. Por muito tempo estas afirmações eram garantidas por descrições morfológicas dos condrócitos. Eles freqüentemente eram observados com citoplasma e núcleo condensados e retraídos. HUNZIKER e cols. (1982) afirmou que muitas das descrições da morfologia dos condrócitos hipertróficos eram resultantes de artefatos de fixação.

Utilizando-se de aprimorados procedimentos de fixação, FARNUM & WILSMAN (1987, 1989) descreveram dois aspectos morfológicos em condrócitos hipertróficos de porco que apresentaram inicialmente um citoplasma altamente hidratado em contato com a matriz e posteriormente, próximo à medula óssea, citoplasma e núcleo condensados e a membrana com alguns pontos de ancoragem, sugerindo morte dos condrócitos. TAKECHI & ITAKURA (1995) também descreveram dois fenótipos de condrócitos hipertróficos na cartilagem de crescimento da epífise proximal da tíbia de galinha *Gallus domesticus*. Na região mais proximal da zona hipertrófica os condrócitos eram células claras, com poucos prolongamentos e continham organelas espalhadas. Já na região distal, próxima à medula óssea, os condrócitos estavam retraídos, com o núcleo e o citoplasma eletrodensos.

Em nossas observações identificamos dois fenótipos principais de condrócitos hipertróficos: um primeiro apresentou núcleo com cromatina descondensada, citoplasma túrgido, com poucas organelas, espalhadas ou concentradas numa região do citoplasma, e a superfície celular mantinha contato com a matriz. O segundo fenótipo apresentou aspectos de degeneração, com condensação dos núcleos e citoplasma e retração da membrana plasmática. Este segundo fenótipo parece representar condrócitos em degeneração.

KIM (1995) formulou a teoria da apoptose na calcificação, considerando que as vesículas de matriz são corpos apoptóticos originados por brotamento da membrana plasmática de condrócitos em degeneração. Segundo aquele autor, a apoptose deve sempre existir onde existem vesículas de matriz, mesmo nos ossos e dentes. Assim, ele sugere que devam ser feitos estudos sobre a formação de vesículas de matriz, procurando estabelecer correlações com a apoptose. Em nossas observações encontramos muitos condrócitos com aspectos morfológicos de degeneração, mas não foram encontradas vesículas de matriz ou aspectos de calcificação da matriz associados a eles. Isto sugere que outros processos, além da formação de vesículas de matriz e a calcificação, participem na determinação do destino dos condrócitos hipertróficos.

Alguns autores, baseados em estudos "in vitro", sugerem que nem todos os condrócitos morrem, mas alguns se transformam em células osteoprogenitoras (ROACH **et alii**, 1995; GALOTTO **et alii**, 1995). Entretanto, "in vivo", ainda nada foi encontrado que pudesse confirmar tal afirmação.

O periósteo consiste de duas camadas principais: um limite fibroso membranoso e uma camada celular osteocondrogênica conhecida como camada cambial. O crescimento do osso periosteal em *Rana catesbeiana*, assim como em *Rana pipens* (KEMP & ROYT, 1967) e *Rana temporaria* (DICKSON, 1982), faz-se por diferenciação de células do pericôndrio em osteoblastos e assim sucessivamente em direção às extremidades. DICKSON (1982) sugeriu que esta ossificação seria do tipo intramembranosa. A existência de uma matriz fibrosa não mineralizada na extremidade do osso periosteal concorda com a afirmação de DICKSON (1982).

Depois da diferenciação, estes osteoblastos formam um "pseudo-epitélio simples" sobre a superfície externa do osso periosteal. Este aspecto já foi observado em outros tecidos ósseos (MARKS & POPOFF, 1988). Entre os osteoblastos e as superfícies não mineralizada e mineralizada da extremidade de crescimento longitudinal do osso periosteal foram encontradas vesículas de matriz.

A presença de muitas vesículas de matriz próximas aos osteoblastos, representa uma alta atividade destas células na mineralização do osso. Estas vesículas apresentavam conteúdos com diversos aspectos morfológicos, isto pode representar vesículas com diferentes graus de maturação dos cristais de fosfato de cálcio.

As vesículas de matriz foram primeiramente descobertas por BONUCCI **et alii** (1967). Desde então, tem-se revelado a sua participação na mineralização dos tecidos ricos em colágeno, tais como osso, cartilagem e dentina (KATCHBURIAN, 1973). Os mecanismos de seu funcionamento ainda não estão totalmente esclarecidos. Sugere-se que os cristais de fosfato de cálcio vão sendo formados progressivamente no interior das vesículas. Assim, elas funcionam como nucleadoras dos cristais e se aderem ao colágeno fibrilar. Estas vesículas se originam por projeções do citoplasma dos osteoblastos (KIM, 1995).

A presença de atividade de fosfatase alcalina também é frequentemente associada aos processos de mineralização da matriz (ÜSTÜNEL & DEMIR, 1995; BONUCCI **et alii**, 1992). Uma vez que foi detectada a atividade de fosfatase alcalina nos osteoblastos da superfície do osso periosteal, reforça-se a sugestão de sua participação na produção de osso mineralizado.

Apesar de desmossomos serem mais comuns em células epiteliais, eles foram descritos entre osteoblastos da camada periosteal dos raios das nadadeiras em peixes ciclídeos (WENDELAAR BONGA & LAMMERS, 1982). BAIRATI e cols., (1996) encontrou pré-osteoblastos com junções tipo "gap" e de adesão no pericôndrio da cartilagem esternal de galinha. Aqui, foram encontradas "placas de adesão" entre as células na extremidade de crescimento longitudinal do osso periosteal. Isto sugere que as interações celulares nesta região sejam importantes na função de deposição da matriz óssea, à maneira do que se observa na condensação pré-condrogênica (HALL, 1991) e entre osteoblastos em outros sistemas (BAIRATI **et alii**, 1996).

Um importante reforço na estrutura óssea ocorre a partir da idade adulta com a produção de osso endosteal. Este osso é depositado na superfície interna do osso periosteal. Diferentemente do osso periosteal, o osso endosteal é lamelar, e nele formam-se canais de Havers, com arranjos concêntricos das lamelas. A camada basófila encontrada entre o osso endosteal e o osso periosteal corresponde a resquícios de matriz de cartilagem não absorvida. Com isso foi possível distinguir as duas estruturas ósseas.

O ligamento osteo-condral

Nossas observações confirmaram a sugestão de VIDAL (com. pess.) de que o tecido conjuntivo frouxo que faz a ligação da cartilagem lateral com o osso periosteal, como descrito anteriormente por HAINES (1942) E MOPTY & CIMAROSTI, (1979), é morfologicamente, semelhante ao ligamento periodontal, que fixa a raiz do dente no osso mandibular (NOLLIE **et alii**, 1996). Desta forma, ele não pode ser considerado simplesmente um tecido conjuntivo frouxo. A grande quantidade de fibras de colágeno e a suas orientações sugerem que exista um complexo quadro biomecânico nesta região. Assim, este tecido pode ser considerado um *ligamento osteo-condral*, fixando a cartilagem lateral no tubo ósseo e vice-versa.

Este ligamento, como sugerido por HAINES (1942), produz uma firme ancoragem da cartilagem epifisária no tubo ósseo. E garante a integridade desta estrutura durante os movimentos e saltos.

DICKSON (1982) sugeriu que existem forças de tensão sobre este tecido fibroso que é aparentemente originada da expansão da cartilagem de crescimento entre a cartilagem articular e a cavidade da medula e do suporte de peso na cartilagem lateral na qual o tecido fibroso está ancorado.

O aspecto ondulado das fibras, encontrado em alguns locais reflete um potencial de distensão deste ligamento, atuando no acomodamento da cartilagem lateral no osso periosteal frente as forças aplicadas durante os movimentos e os impactos do salto.

Embora HAINES (1942) tenha sugerido que este tecido atuaria como um pericôndrio para a superfície interna da cartilagem, isto parece pouco provável. O pericôndrio é uma estrutura complexa que atua no crescimento e manutenção da estrutura cartilaginosa, e isto resulta de duas características principais do pericôndrio, uma camada fibrosa com feixes de colágeno orientados paralelamente a superfície e abaixo desta superfície um camada condrogênica de células mesenquimais alongadas. Nenhuma destas características foram encontradas neste tecido. Entretanto, pode-se dizer que este ligamento também atue com um pericôndrio especializado que, nesta região, assume outras funções.

HAINES (1942) também sugeriu que este tecido funcionaria como um periósteo para o osso. Os aspectos aqui levantados concordam com tal afirmação, muitos osteoblastos estavam presentes na superfície do osso e logo acima deles existiam muitas células mesenquimais, provavelmente osteoprogenitoras.

Os métodos histoquímicos demonstraram que os componentes fibrilares deste *ligamento osteo-condral* são constituídos principalmente por colágeno tipo I, com diferentes graus de compacidade.

Os processos de calcificação da cartilagem epifisária

O processo de calcificação das cartilagens é bem conhecido para a zona hipertrófica das cartilagens de crescimento. Em mamíferos, cada septo longitudinal que separa as colunas de células sofre calcificação. Esta matriz calcificada servirá de suporte para a deposição de matriz óssea e formação das trabéculas ósseas do osso endocondral metafisário.

Os condrócitos hipertróficos são considerados os maiores responsáveis por este processo de calcificação da cartilagem. Eles apresentam alta atividade de fosfatase alcalina na sua periferia, e ao seu redor são encontradas inúmeras vesículas de matriz.

As vesículas de matriz apresentam tamanho e estrutura variáveis, com uma região central mais eletrodensa, e, aparentemente, originam-se de condrócitos hipertróficos em degeneração (ANDERSON, 1969).

Estas vesículas são ricas em fosfato inorgânico, cálcio e fosfatase alcalina, o que produz um microambiente favorável a nucleação de cristais de fosfato de cálcio. Algumas proteínas da família das anexinas que podem se ligar ao cálcio e fosfolipídios, foram identificadas como constituintes das vesículas de matriz. Entre elas está a ancorina (anexina V). A ancorina foi encontrada na zona de calcificação da placa de crescimento, e é um importante componente de ligação das vesículas de matriz com o colágeno (KIRSCH & PFÄFFLE, 1992; PLATE **et alii**, 1996).

Usando fixação com azul do Nilo e ferricianeto de potássio, MITCHELL & SHEPARD (1990) encontraram vesículas de matriz contendo fosfolipídeos e rodeadas por proteoglicanos

HUYSSEUNE & SIRE (1990) descreveram três passos para a calcificação da matriz da cartilagem: inicial deposição de cristais dentro de vesículas de matriz; formação de grupos de cristais na matriz e fusão destes grupos na região de mineralização.

QUACCI e cols. (1990) descreveram que numa fase anterior à mineralização da matriz interterritorial dos condrócitos hipertróficos, existe uma concentração de fosfato de cálcio na matriz pericelular dos condrócitos da zona de reserva, proliferação, maturação e hipertrófica formando "chain granules" livres ou aderidos a membrana externa das vesículas de matriz.

A atividade de fosfatase alcalina é um importante indicador de mineralização das cartilagens, sendo usada como marcador para vesículas de matriz (IWAMOTO **et alii**,1993). A fosfatase alcalina é também uma glicoproteína que se liga ao cálcio (MARKS & POPOFF, 1988; CHRISTOFFERSEN & LANDIS, 1991).

DICKSON (1978) detectou atividade de fosfatase alcalina no interior das cisternas do complexo de Golgi e na superfície interna da membrana plasmática de condrócitos hipertróficos próximos aos sítios de calcificação, em *Rana temporaria*.

A atividade de fosfatase alcalina em condrócitos hipertróficos e nas vesículas de matriz ao redor destas células já foi descrita por muitos autores em diferentes animais (LIU **et alli**, 1987; BONUCCI **et alii**, 1992; SASANO **et alii**, 1993; HENSOSN **et alli**, 1995; ÜSTÜNEL & DEMIR, 1995).

A calcificação da cartilagem epifisária de anuros foi descrita por LUBOCH (1927), FROBÖSE (1927), HAINES (1942), MOPTY & CIMAROSTI (1979) e DICKSON (1982), para várias espécies. Nestes trabalhos os autores não fazem distinção entre os aspectos de calcificação que ocorrem nas diferentes regiões da cartilagem epifisária.

Na cartilagem epifisária de *Rana catesbeiana* foram encontradas três alterações distintas na matriz da cartilagem, relacionadas a processos de calcificação. A primeira grande alteração foi encontrada na cartilagem lateral e, com menos frequência, na cartilagem articular. Estas alterações apareceram como descontinuidades da matriz extracelular no material que foi descalcificado. No material não descalcificado estas regiões apresentaram positividade à reação de von Kossa. Além disso, em algumas regiões, foi observado um arranjo concêntrico da reação para cálcio.

Esta calcificação acompanhava toda a cartilagem lateral de frente para o osso periosteal e os condrócitos próximos a esta região apresentavam a mesma morfologia dos condrócitos de áreas não mineralizadas. Entretanto eles apresentavam alta atividade de fosfatase alcalina, o que sugere serem estes condrócitos os reponsáveis pela mineralização da cartilagem.

HAINES (1942) denominou de centro secundário de calcificação estas regiões de calcificação da cartilagem lateral e articular, mas não mencionou nada sobre este aspecto descontínuo da matriz, o mesmo tendo acontecido com os trabalhos dos outros autores (MOPTY & CIMAROSTI, 1979; DICKSON, 1982).

Aspectos semelhantes a este são encontrados nas cartilagens articulares em degeneração por doenças traumáticas, como artrite reumatóide e osteoartrite (GARDNER, 1994; PRITZKER, 1994).

DICKSON (1982) assumiu que esta calcificação da matriz cartilaginosa resultaria de necessidades mecânicas. Parece-nos, entretanto, que este processo leva à destruição da cartilagem articular, o que prejudicaria a sua função esperada de resistência à compressão.

A segunda alteração da matriz da cartilagem foi encontrada na zona de maturação e hipertrofia da cartilagem de crescimento do fêmur e da tíbio-fíbula, associada à superfície interna do osso periosteal. Esta alteração foi identificada pela correspondência morfológica às regiões descritas por LUBOCH (1927), FROBÖSE (1927) e HAINES (1942), uma vez que não foi efetuado o teste de von Kossa para os animais de maior idade.

RHODIN (1985) também identificou, em cortes corados com hematoxilina-eosina, sítios de calcificação como sendo uma marcação basofílica na matriz de condrócitos hipertróficos da cartilagem epifisária de tartarugas.

A terceira alteração da matriz da cartilagem foi encontrada, esporadicamente na matriz extracelular dos condrócitos da zona hipertrófica e, em menor proporção, da zona de maturação. Esta alteração só foi encontrada na cartilagem do fêmur e associadas à borda de deposição de osso endocondral dos animais de maior idade.

Eram estruturas basófilas, principalmente na região central. SHEPARD & MITCHELL (1985) encontraram uma grande concentração de proteoglicanos nos sítios de mineralização após a descalcificação do material.

Além disso, estas estruturas esféricas fundem-se e formam grupos próximos a região de ossificação endocondral. Esta associação com as trabéculas ósseas pode reforçar a sugestão de que estas estruturas estão associadas à calcificação.

É comum encontrar resíduos de cartilagem calcificada no interior das trabéculas ósseas. Isto foi observado por GARDNER & GRAY (1970) nas trabéculas ósseas do fêmur humano. Em algumas regiões do interior das trabéculas ósseas nós também encontramos resíduos de cartilagem calcificada. Isto sugere que a sua formação esteve associada com a matriz da cartilagem.

DICKSON (1982) encontrou vesículas de matriz nos sítios de calcificação da matriz territorial dos condrócitos hipertróficos. Em nossas observações, em nível ultra-estrutural, não foi observada a presença de tais vesículas de matriz próximas aos condrócitos hipertróficos.

Pode-se afirmar que nestes animais a expressão do fenótipo hipertrófico não tem relação direta com calcificação.

Nos mamíferos, e em algumas aves é comum o aparecimento de um centro secundário de ossificação nas epífises, separando a superfície articular da cartilagem de crescimento, nesta espécie de rã não foi encontrado nenhum centro secundário de ossificação.

A absorção da cartilagem de crescimento, a formação dos canais da cartilagem e a ossificação endocondral

Existe um consenso de que a absorção da cartilagem não mineralizada é feita pela colaboração de dois tipos celulares: células semelhantes a fibroblastos e células semelhantes a macrófagos (SORRELL & WEISS, 1980, 1982; WILSMAN & VAN SICKLE, 1971; COLE & WEZEMAN, 1985; CHAPPARD **et alii**, 1986; MÜHLHAUSER, 1986). Já a cartilagem mineralizada é absorvida por condroclastos (SCHENK **et alii**, 1967; LEWINSON & SILBERMANN 1992; COLE & WEZEMAN, 1987).

Em mamíferos, os condrócitos são quadrilaterais e cada célula hipertrófica é invadida por capilares e células pericapilares, calcificando cada septo longitudinal da matriz e

erodindo cada septo transversal (BARRETO & WILSMAN, 1994). Recentemente foi descrita um célula rica em catepsina B (uma proteinase capaz de degradar os colágenos tipo II, IX, X e XI encontrados nas cartilagens) que foi associada à degradação do septo transversal, e por isto foi denominada de septoclasto (LEE **et alii**, 1995).

DICKSON (1982) identificou células semelhantes a fagócitos, ricas em lisossomos, erodindo a cartilagem não calcificada em *Rana temporaria*.

Neste estudo nós encontramos células mononucleadas em íntimo contato com a matriz de cartilagem não mineralizada. Nas observações ao microscópio de luz distinguimos três tipos de células: células com citoplasma vacuolizado, células com citoplasma basófilo e células semelhantes a fibroblastos com núcleo alongado e nucléolos evidentes. E nas observações ao microscópio eletrônico vários fenótipos celulares, que podem ser agrupados em células ricas em retículo endoplasmático rugoso e células semelhante a fibroblastos com citoplasma reduzido e eletrolúcido.

Entretanto, células podem representar um mesmo tipo celular em diferentes estágios de diferenciação ou a tipos distintos.

Células multivacuolizadas foram encontradas por RODRIGUES e cols. (1985) que sugeriu serem macrófagos com atividade fagocítica, que degradam a matriz para permitir a invasão dos capilares.

ACEITERO e cols. (1988) identificaram células claras mononucleadas semelhantes a fibroblastos, em cortes corados com AT. Estas células apresentavam um núcleo oval com um ou dois nucléolos evidentes.

SORRELL & WEISS (1980, 1982) descreveram um tipo celular, predominante na região de erosão, com citoplasma rico em retículo endoplasmático rugoso, e sugeriu serem macrófagos num estágio de atividade secretora.

Estas descrições concordam com nossas observações. A grande quantidade de prolongamentos celulares e os fragmentos de matriz encontrados associados a estas células sugerem sua participação na absorção da cartilagem hipertrófica.

Um aspecto interessante foi observado em microscopia eletrônica. O citoplasma eletrolúcido de uma célula mono ou polinucleada mostrava prolongamentos que formavam pequenos domínios ou compartimentos isolados de matriz extracelular. Sabe-se que osteoclastos e condroclastos formam compartimentos próprios para a degradação da matriz mineralizada de osso e cartilagem, respectivamente. Mas, estes compartimentos apresentam uma borda ondulada de membrana plasmática. BIRK e cols. (1989) observaram que fibroblastos em tendões formam compartimentos extra-citoplasmáticos contendo grupos de fibrilas de colágeno. São nestes compartimentos que as células direcionam e controlam a formação de novas fibrilas e dos feixes, adicionando novas moléculas de colágeno. Nestes locais também que ocorre o "turnover" destes componentes pela ação de enzimas específicas. É provável que este aspecto observado represente um mecanismo de controle da deposição da matriz orgânica a ser calcificada.

SILVESTRINI **et alli** (1979) e SORRELL & WEISS (1980) observaram uma diminuição da metacromasia na matriz da cartilagem próxima aos sítios de degradação e, à microscopia eletrônica, a ausência dos grânulos de proteoglicanos colapsados entre as fibrilas de colágeno. Eles sugeriram que o processo de absorção começa com uma solubilização dos proteoglicanos. Isto exporia as fibrilas de colágeno ao ataque de enzimas proteolíticas.

Nós também observamos uma diminuição na basofilia da matriz da borda de erosão. Além disso, algumas células apresentavam pequenos feixes de finas fibrilas de colágeno próximas a superfície, o que pode significar uma maior degradação dos proteoglicanos e consequentemente exposição do colágeno às colagenases. Assim, é provável

que o mecanismo de absorção da cartilagem não calcificada desta rã seja semelhante aos relatados acima para as aves

Células polinucleadas só foram encontradas em contato com a matriz em situações de calcificação e ossificação da matriz. Como descrito para outros grupos animais, osteoclastos e condroclastos são responsáveis por este processo. Pode-se sugerir que as células polinucleadas encontradas aqui são um destes tipos celulares. A reação positiva para fosfatase ácida detectada nestas células pode reforçar esta afirmação, apesar de que o melhor marcador para tais células é a atividade de fosfatase ácida resistente a tartarato (VAN DE WIJNGAERT & BURGER, 1986; COLE & WEZEMAN, 1987).

A participação dos capilares na absorção da cartilagem não mineralizada também foi descrita (SCHENK **et alii**, 1967; LEWINSON & SILBERMANN, 1992).

Na borda de contato da cartilagem hipertrófica com a medula, região metafisária, capilares fazem um "looping" na lacuna dos condrócitos hipertróficos e, ao redor deste vasos, encontram-se macrófagos, osteoblastos e pericitos (AHARINEJAD **et alii**, 1995). SKAWINA e cols. (1994) descreveram estruturas globulares na extremidades destes capilares. Estes capilares crescem por projeções das células endoteliais que, às vezes, apresentam lâmina basal descontínua e prolongamentos em direção à matriz da cartilagem (SCHENK **et alii**, 1967; HUNTER & ARSENAULT, 1990).

Nos capilares próximos à área de erosão da cartilagem hipertrófica desta rã não foram encontrados prolongamentos das células endoteliais em direção a matriz, mas foram observadas descontinuidades na lâmina basal e, interessantemente, muitas vesículas entre a lâmina basal e matriz da cartilagem. Este aspecto nunca fora descrito antes. É provável que representem prolongamentos celulares em corte transversal.

Nos animais jovens, a borda de erosão da cartilagem é lisa, como descrito por HAINES (1942), para várias espécies de anuros e também observado por DICKSON (1982) em *Rana temporaria*. Entretanto, na região distal do fêmur, a partir da idade adulta, formam-se estruturas em forma de "baías de erosão".

Em alguns locais estas "baias de erosão" eram profundas, atravessando toda a cartilagem hipertrófica e atingindo a zona de maturação. Estas estruturas são semelhantes aos canais perfurantes de équidna e aves. THROP (1988) descreveu vasos que penetravam nas epífises do joelho de galinha a partir de vasos metafiseais.

Embora a maioria dos pesquisadores só considerem como canais da cartilagem as estruturas que se originam do pericôndrio, FELL (1925) também considerou como canais da cartilagem os canais medulares ou perfurantes. Estes canais medulares ou perfurantes são projeções dos componentes medulares. Entretanto, eles apresentam os mesmos constituintes que os canais de origem pericondrial. Eles contêm um sistema vascular, células que promovem a erosão da cartilagem e células semelhantes a osteoblatos. Estes são os tipos celulares comumente encontrados no interior dos canais da cartilagem que se originam do pericôndrio (KLUGLER **et alli**, 1979; HUNTER **et alii**, 1991). Por isto, estes canais medulares podem também serem considerados um outro tipo de canal de cartilagem.

WILSMAN & VAN SCIKLE (1971) e AGRAWAL e cols. (1986) sugeriram que os canais que se originam do pericôndrio promovem a nutrição da cartilagem, principalmente para as fases de crescimento e participam da formação do centro secundário de ossificação.

Estes canais podem mesmo estar relacionados com o crescimento da cartilagem, de modo que RHODIN (1985) observou que tartarugas com rápido crescimento apresentavam epífises vascularizadas.

Surpreendentemente, a formação de osso endocondral só foi observada na epífise distal do fêmur de animais adultos com maior peso (180g) e, mesmo assim, era muito

reduzido se comparado com outros grupos, como aves e mamíferos, pois não formava uma estrutura esponjosa. Diferentemente do que ocorre em aves e mamíferos, este osso endocondral era depositado na borda de erosão da cartilagem de crescimento, que podia estar mineralizada (Figuras 10a e 20a-c) ou não (Figuras 10b e 17a e d). Desta forma não existe uma relação de dependência da mineralização da cartilagem para que se formem as trabéculas ósseas. Neste caso, o osso endocondral pode ou não ser depositado em uma matriz calcificada.

Esta matriz óssea era depositada também na borda da cartilagem das paredes dos canais, mesmo na matriz da cartilagem da zona de maturação. Isto dissocia os diferentes aspectos da cartilagem de crescimento com a ossificação endocondral.

É provável que uma das funções destes canais seja aumentar a superfície de cartilagem para a deposição de osso endocondral. Embora, aparentemente, estas trabéculas contribuam muito pouco para o reforço da estrutura óssea

DICKSON (1982) também encontrou deposição de osso endocondral na borda da cartilagem com a medula óssea em *Rana temporaria*. FROBÖSE (1927) e HAINES (1942) descreveram que nesta espécie de rã não ocorria calcificação da cartilagem e nem formação de osso endocondral. McEWEN (1954) afirmou que para *Rana catesbeiana* não ocorria ossificação endocondral e também não se referiu a calcificação da cartilagem epifisária. Contrariando estas afirmações, nós encontramos diversos sítios de calcificação na cartilagem epifisária e também a formação de osso endocondral no fêmur de *Rana catesbeiana*. Estes aspectos controversos reforçam a afirmação de DICKSON (1982) de que são necessários estudos sobre desenvolvimento e o envelhecimento dos anuros para se determinar as alterações que ocorrem nos ossos e cartilagens.

Um fato intrigante foi que na, epífise proximal da tíbio-fíbula, nem os canais medulares e nem trabéculas ósseas foram observadas, mesmo nos animais velhos.

Alterações com a idade.

Os aspectos relacionados ao envelhecimento são semelhantes aos que ocorrem nos outros animais. Foi observada uma diminuição na espessura da cartilagem de crescimento, devido a uma diminuição na proliferação celular e a constante erosão da cartilagem hipertrófica pela células na medula. Também foi observado um aumento na calcificação da cartilagem epifisária e na ossificação do osso periosteal com a deposição de osso endosteal e formação de canais de Havers.

LUDER (1994) também observou um decréscimo na espessura da cartilagem de crescimento do côndilo mandibular com a idade, restando poucos condrócitos hipertróficos abaixo da cartilagem articular.

TAKAHASHI e cols. (1996) demonstraram alterações no conteúdo dos GAGs da cartilagem de crescimento do côndilo mandibular de ratos Wistar. A diminuição do tamanho da cartilagem é acompanhada de uma diminuição na reação para os GAGs, principalmente na matriz territorial.

Muitas das diferenças em relação às aves e aos mamíferos podem estar relacionadas com aspectos biomecânicos. O hábito das rãs permanecerem a maior parte do tempo com os joelhos flexionados, com os ossos na posição horizontal em relação ao solo, geram forças biomecânicas distintas das observadas na maioria das aves e mamíferos, visto que nestes animais os ossos se posicionam verticalmente, um sobre o outro, suportando o peso corpóreo ao longo de toda estrutura óssea e nas articulações. Além disso, as rãs costumam também se apoiar no solo pela região abdominal.

HAINES (1942) identificou alguns dos aspectos descritos neste trabalho e sugeriu tratarem-se do produto de uma especialização secundária e não de características primitivas.

5 CONCLUSÕES

1. O desenvolvimento dos ossos longos de *Rana catesbeiana* é precedido por modelos cartilaginosos;

2. A cartilagem epifisária do fêmur e da tíbio-fíbula é formada por cartilagem hialina não mineralizada até a metamorfose;

3. Os ossos longos destes animais até a metamorfose são de natureza periosteal compacta;

4. A estrutura da cartilagem epifisária é semelhante àquela conhecida para a maioria dos anfíbios. A cartilagem epifisária apresenta centros secundários de calcificação, como descrito para a maioria dos anuros;

5. Os ossos longos estão encaixados na cartilagem epifisária e fixam-se pela presença de um ligamento osteo-condral;

6. A formação de osso endocondral é muito reduzida e, aparentemente, sua presença não contribui para o reforço ósseo;

7. Não existem muitas diferenças entre as estruturas ósseas do fêmur e da tíbio-fíbula, exceto pela ausência de osso endocondral nesta última;

8. Células mononucleadas são as responsáveis pela erosão da cartilagem não mineralizada, enquanto células polinucleadas degradam a matriz mineralizada.

6 REFERÊNCIAS *

ACEITERO J, GAYTAN F, RANZ FB, RIBES R (1988) Heterogeneity of the cartilage-marrow interface during uncalcified cartilage resorption in the chick embryo tibia. *J. Anat.* **160**, 39-50.

AHARINEJAD S, MARKS SC, BÖCK P, MACKAY CA, LARSON EK, TAHAMTANI A, MASON-SAVAS A, FIRBAS W (1995) Microvascular pattern in the metaphysis during bone growth. *Anat. Rec.* **242**, 111-122.

AGRAWAL P, KULKARNI DS, ATRE PR (1986) The participation of cartilage canals in the ossification of the human fetal calcaneum. *J. Anat.* **147**, 135-142.

AKISAKA T, KAWAGUCHI H, SUBITA GP, SHIGENAGA Y, GAY CV (1988) Ultrastructure of matrix vesicles in chick growth plate as revealed by quick freezing and freeze substitution. *Calcif. Tissue Int.* **42**, 383-393.

ALINI M, MATSUI Y, DODGE GR, POOLE AR (1992) The extracellular matrix of cartilage in the growth plate before and during calcification: changes in composition and degradation of type II collagen. *Calcif. Tissue Int.* **50**, 327-335.

ANDERSON HC (1969) Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *J. Cell Biol.* **41**, 59-72.

ANDRADES JA, NIMNI ME, BECERRA J, EISENSTEIN R, DAVIS M, SORGENTE N (1996) Complement proteins are present in developing endochondral bone and may mediate cartilage cell death and vascularization. *Exper. Cell Res.* **227**, 208-213.

ARSNAULT AL, HUNZIKER EB (1988) Electron microscopic analysis of mineral deposits in the calcifying epiphyseal growth plate. *Calcif. Tissue Int.* **42**, 119-126.

BANCROFT JD (1982) Enzyme histochemistry. In *Theory and Practice of histological techniques* (eds. J. D. Bancroft and A. Stevens). Edinburgh: Churchill Livingstone.

BAIRATI A, COMAZZI M, GIORIA M (1996) An ultrastructural study of the perichondrium in cartilages of the chick embryo. *Anat. Embryol.* **194**, 155-167.

BARRETO C, ALBRECHT RM, BJORLING DE, HORNER JR, WILSMAN JN (1983) Evidence of the growth plate and the growth of long bones in juvenile dinosaurs. *Science* **262**, 2020-2023.

BARRETO C, WILSMAN JN (1994) Hypertrophic chondrocytes volume and growth rates in avian growth plates. *Res. Vet. Sci.* **56**, 53-61.

BEHMER OA, TALOSA EMC, NETO AGF (1976) *Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patologica.* EDUSP, SP. 241p.

BENJAMIN M (1989) Hyaline-cell cartilage (condroid) in the heads of teleosts. *Anat. Embryol.* **179**, 285-303.

BENJAMIN M, EVANS EJ (1990) Fibrocartilage. *J. Anat.* **171**, 1-15.

---

* Foram seguidas as instruções do *Journal of Anatomy* para listagem da bibliografia.

BIRK DE, SOUTHERN JF, ZYCBAND EI, FALLON JT, TRELSTAD RL (1989) Collagen fibril budles: branching asseembly unit in tendon morphogenesis. *Development.* **107**, 437-443.

BONUCCI E (1967) Fine structure of early cartilage calcification. *J. Ultrastruct. Res.* **20**, 33-50.

BONUCCI E, SILVESTRINI G, BIANCO P (1992) Extracelular alkaline phosphatase activity in mineralizing matrices of cartilage and bone: ultraestructural localization using a cerium-based method. *Histochemistry.* **97**, 323-327.

BROOM ND, POOLE CA (1983) Articular cartilage collagens and proteoglycans. *Arthritis Rheum.* **26**, 1111-1119.

BUCKWALTER JA, ROSENBERG LC, UNGAR R (1987) Changes in proteoglycans aggregates during cartilage mineralization. *Calcif. Tis. Int.* **41**, 228-236.

CANCEDDA R, CANCEDDA FD, CASTAGNOLA P (1995) Chondrocyte differentiation. *Int. Rev. of Cytol.* **159**, 265-359.

CARVALHO HF, TABOGA SR, LINO NETO J (1994) Microfibrils: neglected components of pressure-bearing tendons. *Ann. Anat.* **176**, 155-159.

CARVALHO HF (1995) Understanding the biomechanics of tendon fibrocartilages. *J. Theor. Biol.* **172**, 293-297.

CARVALHO HF, TABOGA SR (1996) The applicability of hematoxylin-eosin staining plus fluorescence or confocal laser scanning microscopy to the study of elastic fibers in cartilages. *C. R. Acad. Sci.* **319**, 991-996.

CHAPPARD D, ALEXANDRE C, RIFFAT G (1986) Uncalcified cartilage resorption in human fetal cartilage canals. *Tis. Cell.* **5**, 701-707.

CHRISTOFFERSEN J, LANDIS WJ (1991) A contribution with review to the description of mineralization of bone and other calcified tissues in vivo. *Anat. Rec.* **230**, 435-450.

COLE AA, WEZEMAN FH (1985) Perivascular cells in cartilage canals of the developing mouse epiphysis. *Am. J. Anat.* **174**, 119-129.

COLE AA, WEZEMAN FH (1987) Cytochemical localization of tartrate-resistant acid phosphatase, alkaline phosphatase, and nonspecific esterase in perivascular cells of cartilage canals in the developing mouse epiphysis. *Am. J. Anat.* **180**, 237-242.

COTTA-PEREIRA G, RODRIGO FG, DAVID-FERREIRA JF (1976) The use of tannic acid-glutaraldehyde in the study of elastic related fibers. *Stain Technol.* **51**, 7-11.

COTTA-PEREIRA G, DEL-CARO LM, MONTES GS (1984) Distribution of elastic system fibers in hyaline and fibrous cartilages of the rat. *Acta Anat.* **119**, 80-85.

DICKSON GR (1978) Ultrastructural localization of alkaline phosphatase in the hypertrophic chondrocyte of the frog. *Histoch.* **57**, 343-347.

DICKSON GR (1982) Ultrastructure fo growth cartilage in the proximal femur of the frog, *Rana temporaria. J. Anat.* **135**, 549-564.

DÜRR J, LAMMI P, GOODMAN SL, AIGNER T, VON DER MARK K (1996) Identification and immunolocalization of laminin in cartilage. *Exp. Cell Res.* **222**, 225-233.

EDE DA (1983) Cellular condensation and chondrogenesis. In *Cartilage* (B. K. Hall, ed.), Vol. 2, pp. 143-185. Academic Press, New York.

EGERBACHER M, KRESTAN R, BÖCK P (1995) Morphology, histochemistry, and differentiation of the cat's epiglottic cartilage: a supporting organ composed of elastic cartilage, fibrous cartilage, myxoid tissue, and fat tissue. *Anat. Rec.* **242**, 471-482.

ENGFELDT B, REINHOLT FP, HULTENBY K, WIDHOLM SM, MÜLLER M (1994) Ultrastructure of hypertrophic cartilage: histochemical procedures compared with high pressure freezing and freeze substitution. *Calcif. Tis. Int.* **55**, 274-280.

ERLEBACHER A, FILVAROFF EH, GITELMAN SE, DERYNCK R (1995) Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell* **80**, 371-378.

EYRE DR, WU JJ, WOODS PE, WEIS MA (1991) The cartilage collagens and joint degeneration. *Brit. J. of Rheumatol.* **30**, 10-15.

EYRE DR, WU JJ, WOODS PE (1992) Cartilage specific collagens: structural studies. In *Articular Cartilage and Osteoarthritis*. (ed. K.E. Kuettner, R. Schleyerbach, J.G. Peyron & V.C. Hascall), pp. 119-131. New York: Raven Press.

FARNUM CE, WILSMN NJ (1987) Morphologic states of the terminal hypertrophic chondrocyte of growth plate cartilage. *Anat. Rec.* **219**, 221-232.

FARNUM CE, WILSMAN NJ (1989) Condensation of hypertrophic chondrocytes at the chondro-osseous junction of growth plate cartilage in yucatan swine: relationship to long bone groowth. *Am. J. Anat.* **186**, 346-358.

FELISBINO SL, BORGES LF, TABOGA SR (1994) Developmental changes on the distribution of elastic system fibers in the xiphoid cartilage of *Gallus gallus domesticus*. *Annals of 3th Brazilian Symposium on Extracellular Matrix*, 38.

FELISBINO SL, TABOGA SR, ANDRÉ JC (1995) Microtendon structure and elastic system microfibrils in pectoral muscle insertion. *Acta Microscopica* **4**, 178.

FELL HB (1925) The histogenesis of cartilage and bone in the long bones of the embryonic fowl. *J. Morph. Phys.* **40**, 417-450

FRANZEN A, OLDBERG A, SOLURSH M (1989) Possible recruitment of osteoblastic precursor cells from hypertrophic chondrocytes during initial osteogenesis in cartilaginous limbs of young rats. *Matrix* **9**, 261-265.

FROBÖSE H (1927) Der Aufbau der skeletteile en den freien Gliedmassen der anuren Amphibien. *Morph. Jb.* **58**, 473.

GALOTTO M, CAMPANILE G, BANFI A, TRUGLI M, CANCEDDA R (1995) Chondrocyte and osteoblast differentiation stage-specific monoclonal antibodies as a tool to investigate the initial bone formation in developing chick embryo. *Eur. J. Cell Bio.* **67**, 99-105.

GANEY TM, LOVE SM, OGDEN JA (1992) Development of vascularization in the chondroepiphysis of the rabbit. *J. Orthop. Res.* **10**, 496-510.

GARDNER DL (1994) Problems and paradigms in joint pathology. *J. Anat.* **184**, 465-476.

GARDNER E, GRAY DJ (1970) The prenatal development of the human femur. *Am. J. Anat.* **129**, 121-140.

GIBSON GJ, FLINT MH (1985) Type X collagen synthesis by chick sternal cartilage and its relationship to endochondral development. *J. Cell Biol.* **190**, 399-415.

GIBSON GJ, KOHLER WJ, SCHAFFLER MB (1995) Chondrocyte apoptosis in endochondral ossification of chick sterna. *Develop. Dyn.* **203**, 468-476.

GILBERT SF (1991) Early vertebrate development: Mesoderm and endoderm. In *Developmental Biology* (S.F. Gilbert, ed.), pp. 209-215. Sinawer Assoc. Sunderland, MA.

GOMORI G (1937) Silver impregnation of reticulum in paraffin sections. *Am. J. Pathol.* **13**, 993-1002.

GOSNER KL (1960) A simplified table for staging Anura embryos and larval with notes on identification. *Herpetologica* **16**, 183-190.

GOULD RP, SELWOOD L, DAY A, WOLPERT L (1974) The mechanism of cellular orientation during early cartilage formation in the chick limb and regenerating limb. *Exp. Cell Res.* **83**, 287-296.

HAGIWARA H, AOKI T, YOSHIMI T (1995) Immunoelectron microscopic analysis of chondroitin sulfates during calcification in the rat growth plate cartilage. *Histochem.* **103**, 213-220.

HAINES RW (1933) Cartilage canals. *J. Anat.*, **68**, 45-64.

HAINES RW (1942) The evolution of epiphyses and of endochondral bone. *Biol. Rev.* **17**, 267-292.

HALL BK (1970) Cellular differentiation in skeletal tissues. *Biol. Rev.* **45**, 455-484.

HALL BK (1991) Cellular interations during cartilage and bone development. *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.* **11**, 238-250.

HARAB RC, MOURÃO PAS (1989) Increase of chondroitin 4-sulfate concentration in the endochondral ossification cartilage of normal dogs. *Biochim. Biophys. Acta.* **992**, 237-240.

HAY E (1981) Extracellular Matrix. *J. Cell Biol.* **91**, 205-223.

HEDBOM E, ANTONSON P, HIERPE A, AESCHLIMANN D, PAULSSON M, PIMENTEL ER, SOMMARIN Y, WENDEL M, OLDEBERG A, HEINEGÅRD D (1992) Cartilage matrix proteins. An acid oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. *J. Biol. Chem.* **267**, 6132-6136.

HEINEGÅRD D, SOMMARIN Y (1987) Proteoglycans: an overview. In *Methods of Enzimology, Structural and Contractile Proteins, Part. D, Extracellular Matrix* (Cunningham L. W., ed.) **144**, pp. 305-319, Academic, Orlando, Florida.

HEINEGÅRD D, OLDBERG A (1989) Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB J.* **3**, 2042-2051.

HEINEGÅRD D, PIMENTEL ER (1992) Cartilage matrix proteins. In *Articular Cartilage and Osteoarthritis* (ed K.E. Kuettner, R. Schleyebach, J.G. Peyton & V.C. Hascall), pp. 95-111. New York: Raven Press.

HENSON FMD, DAVIES ME, SKEPPER JN, JEFFCOTT LB (1995) Localisation of alkaline phosphatase in equine growth cartilage. *J. Anat.* **187**, 151- 159.

HESSE I (1987) The occurrence of elastic system fibers in the matrix of normal articular cartilage. *Cell Tiss. Res.* **248**, 589-593.

HOCH DH, GRODZINSKY AJ, KOOB TJ, ALBERT ML, EYRE DR (1983) Early changes in material properties of rabbit articular cartilage after menisectomy. *J. Orthop. Res.* **1**, 4-12.

HOLTROP ME (1972) The ultrastructure of the epiphyseal plate. II The hypertrophic chondrocyte. *Calcif. Tissue Res.* **9**, 140-151.

HUNTER WL, ARSENAULT AL (1990) Vascular invasion of the epiphyseal growth plate: analysis of metaphyseal capillary ultrastructure and growth dynamics. *Anat. Rec.* **227**, 223-231.

HUNTER WL, ARSENAULT AL, HODSMAN AB (1991) Rearrangement of the metaphyseal vasculature of the growth plate in rickets and rachitic reserval: a model of vascular arrest and angiogenesis renewed. *Anat. Rec.* **229**, 453-461.

HUNZIKER EB, HERRMANN W, SCHENK RK (1982) Improved cartilage fixation by ruthenium hexamine trichloride (RHT): A prerequisite for morphometry in growth cartilage. *J. Ultrastruct. Res.* **81**, 1-12.

HUNZIKER EB, SCHENK RK (1989) Physiological mechanisms adopted by chondrocytes in regulating longitudinal bone growth in rats. *J. Physiol.* **414**, 55-71.

HUYSSEUNE A, SIRE JY (1990) Ultrastructural observations on chondroid bone in the teleost fish *Hemichromis bimaculatus. Tis. Cell.* **22**, 371-383.

IWAMOTO M, SHAPIRO IM, YAGAMI K, BOSKEY AL, LEBOY PS, ADAMS SL, PACIFICI M (1993) Retinoic acid induces rapid mineralization and expression of mineralization-related genes in chondrocytes. *Exper. Cell Res.* **207**, 413-420.

JOYCE ME, ROBERTS AB, SPORN MB, BOLANDER ME (1990) transforming growth factor-β and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat fêmur . *J. Cell Biol.* **110**, 2195-2207.

JUNQUEIRA LCU, BIGNOLAS G, BRENTANI R (1979) Picrossirius staining plus polarization microscopy, specific methods of collagen detection in tissue section. *J. Histochemistry.* **2**, 447-455.

KASTCHENKO N (1981) Über die genese und kalkskelet der batrachierknochem. *Arch. Mikr. Anat.* **19**, I. Citado em HAINES (1942).

KATCHBURIAN E (1973) Membrane-bound bodies as initiators of mineralization of dentine. *J. Anat.* **116**, 285-302.

KEMP NE, HOYT JA (1969) Ossification of the fêmur in thyroxine-treated tadpoles of *Rana pipens. Develop. Biol.* **20**, 387-410.

KIM KM (1995) Apoptosis and calcification. *Scan. Microsc.* **9**, 1137-1178.

KIRSCH T, PFÄFFLE M (1992) Selective binding of anchorin CII (annexin V) to type II and X collagen and to chondrocalcin (C-propeptide of type II collagen). *FEBS.* **310**, 143-147.

KUGLER JH, TOMLINSON A, WAGSTAFF A, WARD SM (1979) Thee role of cartilage canals in the formation of secondary centres of ossification. *J. Anat.* **129**, 493-506.

LANGENSKIÖLD A, VIDEMAN T, NEVALAINEN T (1993) Vital staining indicating cell migration towards the periphery in the growth plate. *Acta Orthop. Scand.* **64**, 683-687.

LEE ER, LAMPLUGH L, SHERPARD NL, MORT JS (1995) The Septoclast, a cathepsin B-rich cell involved in the resorption of growth plate cartilage. *J. Histochem. Cytochem.* **43**, 525-536.

LEWINSON D, SILBERMANN M (1992) Chondroclast and endothelial cells collaborate in the process of cartilage repsortion. *Anat. Rec.* **233**, 504-514.

LIU C, SANGHVI R, BURNELL JM, HOWARD GA (1987) Simultaneous demonstration of bone alkaline and acid phosphatase activities in plastic-embedded sections and differential inhibition of the activities. *Histochemistry.* **86**, 559-565.

LOHMANDER LS (1994) Articular cartilage and osteoarthrosis. The role of molecular markers to monitor breakdown, repair and disease. *J. Anat.* **184**, 477-492.

LUBOSCH W (1927) Das perinnierende kalkskelet der wirbeltiere und der fibrilläre bau der knorpeligen skeletteile. *Z. Mikr, Anat. Forsch* **11**, 67. Citado em HAINES (1942).

LUDER HU (1994) Perichondrial and endochondral components of mandibular condylar growth: morphometric and autoradiographic quantitation in rats. *J. Anat.* **185**, 587-598.

LUFTI AM (1970) Mode of growth, fate and functions of cartilage canals. *J. Anat.* **106**, 135-145.

MACIEWICZ RA, WOTTON SF, ETHERINGTON DJ, DUANCE VC (1990) Susceptibility of the cartilage collagens type II, IX and XI to degradation by the cysteine proteinases, cathepsin B and L. *FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) letter.* **269,** 189-193.

MARKS Jr. SC, POPOFF SN (1988) Bone cell biology: The regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am. J. Anat.* **183**, 1-44.

McEVEN RS (1957) *Vertebrate Embryology.* 4th ed., pp. 254, Holt, New York.

MELLO MLS, VIDAL BC (1980) *Práticas em Biologia Celular.* Edgard Blucher, 71p. RJ.

MILLONIG G (1962) Further observations on a phosphate buffer for osmium solutions in fixation. In: *Electron microscopy.* (ed. S. S. Breser, Jr.) p. 8. Academic Press, New York.

MITCHELL NS, SHEPARD NL (1990) Electron microscopic evaluation of the ocurrence of matrix vesicles in cartilage. *Anat. Rec.* **227**, 397-404.

MORTY SM, CIMAROSTI LO (1979) Estudio comparativo de la estrutura histologica del fermur de algunos anfibios. *Acta Zoologica Lilloana* **35**, 263-268.

MÜHLHAUSER J (1986) Repsortion of the unmineralized proximal part of Mekel's cartilage in the rat. A light and electron microscopic study. *J. Submicrosc. Cytol.* **18**, 717-724.

MULLINK H, HENZEN-LOGMANS SC, TADEMA TM, MOL JJ, MEIJER CJLM (1985) Influence of fixation and decalcification on the immunohistochemical staining of cell-specific markers in paraffin-embedded human bone biopsies. *J. Histochem. Cytochem.* **33**, 1103-1109.

NOLLIE GJ, SANDHU HS, CERNOVSKY ZZ, CANHAM PB (1996) Regional differences in molecular cross-linking of periodontal ligament collagen of rat incisor, by polarizing microscopy. *Conn. Tissue. Res.* **33**, 283-289.

OLOYEDE A, FLACHSMANN R, BROOM ND (1992) The dramatic influence of loading velocity on the compressive response of articular cartilage. *Conn. Tissue Res.* **27**, 211-224.

PACIFICI M, IWAMOTO M, GOLDEN EB, LEATHERMAN JL, LEE Y-S, CHUONG C-M (1993) Tenascin is associated with articular cartilage development. *Dev. Dyn.* **198**, 123-134.

PATT D (1969) Connective and supporting tissues. In *Comparative Vertebrate Histology* (ed Patt D.), pp. 44-71. New York: Raven Press.

PAULSEN DF (1994) Retinoic acid in limb-bud out growth: review and hypothesis. *Anat. Embryol.* **190**, 399-415.

PLATE U, TKOTZ T, WIESMANN HP, STRATMANN U, JOOS U, HÖHLING HJ (1996) Early mineralizaation of matrix vesicles in the epiphyseal growth plate. *J. Microscopy.* **183**, 102-107.

POOLE AR, PIDOUX I, REINER A, CHOI H, ROSENBERG LC (1984) Association of an extracellular protein (Chondrocalcin) with the calcification of cartilage in endochondral bon formation. *J. Cell Biol.* **98**, 54-65.

POOLE AR, PIDOUX I (1986) Proteoglycans in health and disease: structure and functions. *Biochem. J.* **236**, 1-14.

PRITZKER KPH (1994) Animals models for osteoarthritis: processes, problems and prospects. *Ann. Rheum. Dis.* **53**, 406-420.

QUACCI D, DELL'ORBO C, PAZZAGLIA UE (1990) Morphological aspects of rat metaphyseal cartilage pericelular matrix. *J. Anat.* **171**, 193-205.

RAJPUROHT R, KOCH CJ, TAO Z, TEIXEIRA CM, SHAPIRO IM (1996) Adaptation of chondrocytes to low oxygen tension: relationship between hypoxia and cellular metabolism. *J. Cell. Physiol.* **168**, 424-432.

REDII AH (1995) Cartilage morphogenesis: role of bone and cartilage morphogenetic proteins, homeobox genes and extacellular matrix. *Matrix Biology.* **14**, 599-606.

REYNOLDS ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* **17**, 208-209.

RHODIN AG (1985) Comparative chondro-osseous development and growth of marine turtles. *Copeia.* **3**, 752-771.

RIVA A (1974) A simple and rapid staining method for enhancing the contrast of tissues previously treated with uranyl acetate. *J. de Microscopie.* **19**, 105-108.

ROACH HI, ERENPREISA J, AIGNER T (1995) Osteogenic differentiation of hypertrophic chondrocytes involves asymmetric cell divisions and apoptosis. *J. Cell Biol.* **131**, 483-494.

RODRÍGUEZ JI, DELGADO E, PANIAGUA R (1985) Multivacuolated cells in human cartilage canals. *Acta Anat.* **124**, 54-57.

ROONEY P, ARCHER C, WOLPERT L (1984) Morphogenesis of cartilaginous long bone rudiments. In *The Role of Extracellular Matrix in* Development. (ed. Alan R.L.), p. 305-322. New York.

SASANO Y, MIZOGUCHI I, FURUSAWA M, AIBA N, OHTANI E, IWAMATSU Y KAGAYAMA M (1993) The process of calcification during development of the tracheal cartilage characterized by distribution of alkaline phosphatase activity and immunolocalization of types I and II collagens and glycosaminoglycans of proteoglycans. *Anat. Embryol.* **188**, 31-39.

SCHENK RK, SPIRO D, WIENER J (1967) Cartilage resorption in the tibial epiphyseal plate of growing rats. *J. Cell Biol.* **34**, 275-291.

SHEPARD N, MITCHELL N (1985) Ultrastructural modifications of proteoglycans coincident with mineralization in local regions of rat growth plate. *J. Bone Joint Surg.* **67**, 455-464.

SHIBATA S, BABA O, NIIKURA M, SUZUKI S, YAMASHITA Y, ICHIJO T (1993) An ultrastructural study of mitotic chondrocytes in the proliferative zone of the rat tibial growth plate. *Ann. Anat.* **175**, 41-45.

SHINOMURA T, KIMATA K (1990) Precartilage condensation during skeletal pattern formation. *Dev. Growth Differ.* **32**,243-248.

SILVESTRINI G, RICORDI ME, BONUCCI E (1979) Resorption of uncalcified cartilage in the diaphysis of the chick embryo tibia. *Cell Tis. Res.***196**, 221-235.

SKAWINA A, LITWIN JA, GORCZYCA J, MIODONSKI AJ (1994) Blood vessels in epiphyseal cartilage of human fetal femoral bone: a scanning electron microscopic study of corrosion casts. *Anat. Embryol.* **189**, 457-462.

SORRELL JM, WEISS L (1980) A light and electron microscopic study of the region of cartilage resorpition in the embryonic chick. *Anat. Rec.* **198**, 513-530.

SORRELL JM, WEISS L (1982) The cellular organization of fibroblastic cells and macrophages at regions uncalcified cartilage resorption in the embryonic chick femur as revealed by alkaline acid phosphatase histochemistry. *Anat. Rec.* **202**, 491-499.

STAMBAUGH JE, BRIGHTON CT (1980) Diffusion in the various zones of the normal and rachitic growth plate. *J. Bone Joint Surg. (Am).*, **62**, 740-749.

SUMMERBELL D, LEWIS J, WOLPERT L (1973) Positional information in chick limb morphogenesis. *Nature* **244**, 492-496.

SUNDARRAJ N, FITE D, LEDBETTER S, CHAKRAVARTI S, HASSELL JR (1995) Perlecan is a component of cartilage matrix and promotes chondrocytes attachment. *J. Cell Sci.* **108**, 2663-2672.

TAKAHASHI I, MIZOGUCHI I, SASANO Y, SAITOH S (1996) Age-related changes in the localization of glycosaminoglycans in condylar cartilage of the mandible in rats. *Anat. Embryol.* **194**, 489-500.

TAKECHI M, ITAKURA C (1995) Ultrastructure and histochemical studies of the epiphyseal plate in normal chicks. *Anat. Rec.* **242**, 29-39.

TAYLOR, WR, VAN DIKE, GC (1985) Revised procedure for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybium.* **9**, 107-119.

TICKLE C, SUMMERBELL O WOLPERT L (1975) Positional signaling and specification of digits in chick limb morphogenesis. *Nature* **254**, 199-202.

THONSON DAR (1986) Meckel's cartilage in *Xenopus laevis* during metamorphosis: a light and electron microscope study. *J. Anat.* **149**, 77-87.

THORP BH (1988) Relationship between the rate of longitudinal bone growth and physeal thicknees in the growing fowl. *Res. Vet. Sci.* **45**, 83-85.

URBAN JPG (1994) The chondrocyte: a cell under pressure. *Brit. J. Rheum.* **33**, 901-908.

ÜSTÜNEL I, DEMIR R (1995) A histochemical study on the enzymatic activity in the proximal epiphysis of the humerus during the prenatal and postnatal periods in rat. *Ann. Anat.* **177**, 73-83.

VAN DE WIJNGAERT FP, BURGER EH (1986) Demonstration of tartrate-resistant acid phosphatase in un-decalcified, glycolmethacrylate-embedded mouse bone: a possible marker for (pre)osteoclast identification. *J. Histochem. Cytochem.* **34**, 1317-1323.

VIDAL BC (1977) Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. *Cell. Molec. Biol.* **22**, 45-64.

VOGEL KG, KOOB TJ (1989) Structural especializations in tendons under compression. *Int. Rev. Cytol.* **115**, 267-293.

WENDELARR BONGA SE, LAMMERS PI (1982) Effects of calcitonin on ultrastructure and mineral content of bone and scales of the cichlid teleost *Sarotherodon mossambicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **48**, 60-70.

WILSMAN NJ, VAN SICKLE DC (1970) The relationship of cartilage canals to the initial osteogenesis of secondary centers of ossification. *Anat. Rec.* **168**, 381-392.

WILSMAN NJ, VAN SICKLE DC (1971) Cartilage canals, their morphology and distribution. *Anat. Rec.* **173**, 79-94.

WINTERBOTTOM N, TONDRAVI MM, HARRINGTON TL, KLIER FG, VERTEL BM, GOENTICK PF (1992) Cartilage Matrix Protein is a component of the collagen fibril of cartilage. *Dev. Dyn.* **193**, 266-276.

YAMAGUCHI Y, MANN DM, RUOSLAHTI E (1990) Negative regulation of transforming growth factor-β by the proteoglycan decorin. *Nature* **346**, 281-284.