UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

BRUNA OLIVEIRA CORREIA AQUINO

ONTOGENIA DA HEMATOPOESE E DA MATRIZ EXTRACELULAR EM FÍGADO FETAL HUMANO

Aracaju-SE

Setembro 2018

BRUNA OLIVEIRA CORREIA AQUINO

ONTOGENIA DA HEMATOPOESE E DA MATRIZ EXTRACELULAR EM FÍGADO FETAL HUMANO

Monografia apresentada ao Colegiado do Curso de Medicina da Universidade Federal de Sergipe, como requisito parcial para conclusão da Graduação em Medicina.

Orientadora: Profª. Drª. Vera Lúcia Corrêa Feitosa

Co-orientadora: Profª. Drª. Andrea Ferreira Soares

Colaborador: Prof. Dr. Francisco Prado Reis

Aracaju-SE

Setembro 2018

É concedido à Universidade Federal de Sergipe permissão para reproduzir cópias desta monografia e emprestar ou vender tais cópias desta monografia para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva outros direitos de publicação e nenhuma parte deste trabalho acadêmico pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Aquino, Bruna Oliveira Correia.

ONTOGENIA DA HEMATOPOESE E DA MATRIZ EXTRACELULAR EM FÍGADO FETAL HUMANO.

Aracaju, 2018.

62 páginas.

Trabalho de Conclusão de Curso. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão.

1. Educação Médica. I. Universidade Federal de Sergipe. CCBS/DME. II. ONTOGENIA DA HEMATOPOESE E DA MATRIZ EXTRACELULAR EM FÍGADO FETAL HUMANO.

BRUNA OLIVEIRA CORREIA AQUINO

ONTOGENIA DA HEMATOPOESE E DA MATRIZ EXTRACELULAR EM FÍGADO FETAL HUMANO

Monografia apresentada ao Colegiado de Medicina da Universidade Federal de Sergipe, como requisito parcial para conclusão da Graduação em Medicina, pela Universidade Federal de Sergipe.

Aprovada em ____/____/____

Autora: _____

BRUNA OLIVEIRA CORREIA AQUINO

Orientadora: _____

Profª. Drª. VERA LÚCIA CORRÊA FEITOSA

BANCA EXAMINADORA:

_____

1º examinador

_____

2º examinador

_____

3º examinador

"Pois em ti está a fonte da vida; graças à tua luz, vemos a luz."

Salmos 36:9

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

A Deus. Àquele que me deu a vida e tudo mais de que posso usufruir por Sua infinita graça e misericórdia. Por permitir a conclusão de uma etapa árdua, a qual este projeto simboliza.

Aos meus pais, Wellington e Solange, pelo amor e carinho incondicionais e por toda minha formação até aqui. Ao meu esposo, Fernando, pelo apoio em diversos momentos para que eu pudesse chegar a esse dia. Ao meu filho, Fernandinho, cuja simples presença já alegrava meus dias e me dava forças. À minha irmã, Thaís, por tornar a vida sempre mais leve com nossas risadas e nossas cantorias. Amo vocês.

À Profª. Drª. Vera Lúcia Corrêa Feitosa, professora orientadora e mestre, pelos ensinamentos, e pela disponibilidade e empenho em todos os momentos no curso deste projeto.

Aos professores Dr. Francisco do Prado Reis, Dr. José Arnaldo Vasconcelos Palmeira (*in memoriam*) e à Profª. Drª. Andrea Ferreira Soares pela contribuição para a construção deste trabalho.

Ao melhor grupo do internato (melhor Balint). Amigos, vocês foram fundamentais para tornar o fardo da caminhada mais leve.

À Universidade Federal de Sergipe e ao CNPq, pelo incentivo e promoção à pesquisa científica.

Ao LBCE (Laboratório de Biologia Celular e Estrutural), pela oportunidade de realizar trabalhos científicos e pela parceria durante vários projetos do PIBIC.

A todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação e para a finalização deste trabalho, muito obrigada.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

	Pg.
1 INTRODUÇÃO	**9**
2 REVISÃO DE LITERATURA	**12**
3 OBJETIVOS	**20**
4 REFERÊNCIAS	**22**
5 NORMAS PARA PUBLICAÇÃO	**28**
6 ARTIGO ORIGINAL	**40**
RESUMO	**42**
ABSTRACT	**43**
INTRODUÇÃO	**44**
MATERIAIS E MÉTODOS	**46**
RESULTADOS	**48**
DISCUSSÃO	**52**
REFERÊNCIAS	**55**
AGRADECIMENTOS	**57**
CONFLITO DE INTERESSE	**57**
CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES	**57**
ANEXO**S**	**58**

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os estudos sobre os momentos de desenvolvimento ou ontogenia de órgãos ou estruturas do corpo humano durante o período gestacional são relevantes por evidenciar as alterações anatômicas, celulares e do substrato morfológico ou estroma, com vistas a prover o entendimento sobre a sua atividade funcional e orientar as abordagens, quanto a diferentes processos patológicos e terapias nos casos de doenças. A hematopoese consiste na renovação das células sanguíneas a partir da divisão mitótica das células localizadas nos órgãos adequados a essa função. Este processo tem início por volta da 3ª semana de gestação, no mesoderma do saco vitelínico e altera os seus sítios de produção de acordo com a idade humana. Em função disto, pode-se dividi-la em três períodos: mesoblástico, hepático e medular (SILVA, 2007; CHOW; FRENETTE, 2014).

O período mesoblástico ocorre no saco vitelínico desde o 19º dia e termina ao final do 3º mês de gestação. O hepático se inicia precocemente, por volta do 1º mês, e torna-se predominante na hematopoiese entre o 3º e o 6º mês gestacional. E o medular começa a partir do 6º ao 8º mês de gestação. Até aos cinco anos de idade a medula de todos os ossos do corpo participa do processo e à medida que os anos avançam, ocorre uma substituição gordurosa na medula dos ossos longos. Na vida adulta somente os ossos da pelve, esterno, ossos do crânio, úmero, fêmur e costelas serão capazes de gerar células sanguíneas (LUNA et al, 2012; CHOW; FRENETTE, 2014).

Na fase mesoblástica, observa-se a síntese de hemácias no interior de vasos sanguíneos que se formam na parede externa do saco vitelino, inicialmente como pequenos aglomerados de células, que se transformam em ilhotas sanguíneas, chamadas ilhotas de Wolff. As células mais externas destas ilhotas irão formar as paredes dos primeiros vasos sanguíneos, já as células mais internas irão se transformar em glóbulos vermelhos primitivos (megaloblastos). Com a involução do saco vitelino por volta da 6ª semana de gestação, inicia-se a síntese de glóbulos vermelhos fora de vasos sanguíneos e, assim permanece durante toda a vida (CHOW; FRENETTE, 2014).

A caracterização das alterações dos componentes da matriz extracelular hepática, durante o desenvolvimento embrionário torna-se relevante para compreender a participação do fígado

durante o processo de hematopoese, nas fases da habitação e da desabitação hematopoética (SILVA, 2007; LUNA et al, 2012). A matriz extracelular é uma rede estrutural complexa, que rodeia e suporta as células do tecido conjuntivo. São as próprias células do tecido conjuntivo que segregam as diferentes moléculas que constituem a matriz extracelular, que possuem características mecânicas e bioquímicas específicas, compatíveis com o desempenho funcional dos órgãos ou estruturas nos quais está presente (MARXEN et al, 2003).

De maneira geral, os vários componentes fibrosos e não fibrosos da matriz extracelular formam um sistema dinâmico e interativo que informam as células sobre as mudanças químicas e bioquímicas do ambiente extracelular. Estes componentes macromoleculares são importantes para entender o comportamento da matriz extracelular em fígado de fetos humanos durante a sua organogênese. Essas macromoléculas são fundamentais na regulação de adesão, migração e sobrevivência de diversos tipos celulares, estando também envolvidos no desenvolvimento embrionário normal, reparo tecidual e processos inflamatórios e neoplásicos (BEDOSSA, 2003).

Este estudo teve por objetivos analisar as alterações estruturais e dos componentes da matriz extracelular durante o desenvolvimento embrionário do fígado, bem como identificar as áreas de hematopoese.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

O fígado, do latim *ficatu*, é o maior e o mais versátil órgão do corpo humano. Assim como o pâncreas, apresenta funções exócrinas e endócrinas, responsável pela produção de bile (secreção exócrina) e pela formação de diversos produtos endócrinos. É um órgão bastante vascularizado, com 70% do seu sangue proveniente da veia porta (circulação funcional) e o restante pela artéria hepática (circulação nutritiva). Os nutrientes absorvidos pelo intestino chegam ao fígado pela via linfática. No fígado são metabolizados e acumulados. Os hepatócitos, absorvem e neutralizam substâncias tóxicas, também fazem a desintoxicação do organismo, convertendo substâncias nocivas em materiais não tóxicos, que são excretados pela bile. Como a medula óssea e o baço, o fígado fetal é também um órgão hematopoiético, pois participa da produção de células sanguíneas. Participa também da hemocarotese, que é a destruição das hemácias. Integração dos mecanismos energéticos. Emulsificação de gorduras da digestão secretando bile como produto final. Armazena e metaboliza vitaminas e glicose. Síntese de proteínas plasmáticas. Produção de precursores de plaquetas. Desintoxicação de toxinas internas e externas. Conversão da amônia e ureia e na filtragem de impurezas (GARTNER; HIATT, 2007; OVALLE; NAHIRNEY, 2007).

O fígado está dividido anatomicamente em lobos: o esquerdo, o caudado e o quadrado, estando à vesícula biliar localizada na face inferior. O fígado está preso anteriormente à parede abdominal pelo ligamento falciforme, que é uma prega que separa os dois lobos. A unidade funcional do fígado é o chamado lóbulo hepático. Trata-se de uma estrutura hexagonal em cuja periferia se encontra espaços porta e, no centro, a veia centrolobular. Esta estrutura possibilita a visualização histopatológica bidimensional do figado. Os compartimentos hexagonais do fígado são chamados lóbulos hepáticos. As células hepáticas são chamadas de hepatócitos, (GARTNER; HIATT, 2007; OVALLE; NAHIRNEY, 2007).

O fígado é o maior órgão interno, fornecendo metabólicos essenciais, exócrino e endócrino. Estes incluem a produção da bile, metabolismo de compostos alimentares, de desintoxicação, a regulação dos níveis de glicose por meio de armazenamento de glicogênio e de controle da homeostase do sangue por secreção de fatores de coagulação e proteínas séricas, tais como a albumina (POUTON; HAYNES, 2005; ZORN, 2008). O processo de formação do fígado

é composto por múltiplos estágios de desenvolvimento, no qual a indução da destinação hepática depende de interações recíprocas entre o endoderma ventral do intestino anterior e o tecido mesenquimal adjacente (ZARET, 2002).

Em ratos, o desenvolvimento embrionário é similar ao dos outros vertebrados, tendo o início da gastrulação no oitavo dia de gestação (E8, 5). A formação dos somitos começa no final de E9,5 e início de E10,5, quando o intestino anterior e posterior tornam-se visíveis e o processo de desenvolvimento hepático se inicia, o que se dá pela conectividade da endoderme do intestino anterior com o desenvolvimento do coração (ELMAOUHOUB, 2006). Por volta de E8, em camundongos, a parede ventral do endoderma do intestino anterior inicia seu desenvolvimento para uma destinação hepática, em resposta às ações indutivas de fatores de crescimento, no qual o FGF (fator de crescimento fibroblástico) é um deles, sendo este liberado pelo mesoderma cardíaco adjacente e pelas BMPs (proteínas morfogenéticas do osso) advindas do mesênquima do septo transverso (DUNCAN, 2003; CAI et al, 2007; ZORN, 2008). Aproximadamente em E9, as células endodérmicas do intestino anterior já iniciaram a proliferação e diferenciação em hepatoblasto, levando a formação do broto hepático neste estágio (ZHAO; DUNCAN, 2005; ZORN, 2008).

Após a formação do broto hepático e a migração dos hepatoblastos do intestino anterior para formar cordões em direção ao septo mesenquimal transverso, as células dentro do ambiente hepático embrionário se organizam para uma segunda diferenciação celular, gerando uma arquitetura hepática complexa (ZHAO; DUNCAN, 2005). Em ratos (*Rattus norvegicus*), o que se tem descrito quanto às características histológicas do desenvolvimento hepático é que o broto hepático começa a se desenvolver com 10,5 dias de gestação. Nesse período, as células hematopoiéticas saem do fígado para suas destinações finais e o fígado inicia a organização de sua estrutura e desenvolve numerosas funções metabólicas, tornando-se maturo (ELMAOUHOUB, 2006). Embora o desenvolvimento embrionário de ratos e camundongos, principalmente o último, seja relativamente bem compreendido atualmente, as características histológicas hepáticas são ainda uma lacuna no conhecimento (LUNA et al, 2012).

As glândulas do sistema digestório incluem as glândulas salivares, fígado, vesícula biliar e pâncreas. O fígado, o pâncreas e a vesícula biliar têm origem no epitélio endodérmico do intestino primitivo anterior (duodeno) e dependem de interações indutoras com o mesênquima

circunjacente que detém propriedades singulares e cruciais para a diferenciação dos brotos endodérmicos destes órgãos. A diferenciação do fígado se inicia precocemente, ao redor do 22º dia de gestação, durante o fechamento do corpo do embrião, por meio da proliferação de células endodérmicas na extremidade distal do intestino primitivo em sua região anterior, formando uma estrutura denominada de placa hepática. Essa placa dá origem ao divertículo ou broto hepático, cuja forma determinará a formação que o órgão terá ao final do seu desenvolvimento (OGIAS et al, 2016).

O mesênquima que participa da formação do fígado e da vesícula biliar e respectivas vias são derivados do mesoderma intermediário (septo transverso) ou do mesoderma lateral (mesoderma cardiogênico), sem qualquer participação do mesoderma paraxial. O divertículo hepático também origina os dutos biliares extra-hepáticos, a vesícula biliar e o pâncreas ventral. Estas estruturas podem ser reconhecidas em embriões, a partir da 5ª semana (OGIAS et al, 2016).

Muito do que se sabe sobre a embriogênese hepática e seus indutores moleculares advêm de estudos com roedores. Estes ensaios mostraram que o epitélio da placa hepática se organiza a partir de um epitélio colunar em um epitélio pseudoestratificado sob a influência da expressão do gene Homeobox Hex (Hhex ou Hex, HOX (Hox genes são fatores de transcrição evolutivamente conservados com ações no estabelecimento de padrões regionais no organismo). Camundongos com o gene Hhex silenciado não apresentam brotamento hepático e, por conseguinte, não formam o fígado, nem outros órgãos que também se constituem por processos de brotamento. Sinais moleculares representados por fatores de crescimento oriundos da mesoderme, ectoderma e notocorda e inúmeros fatores de transcrição participam da hepatogênese, como fatores indutores ou bloqueadores da expressão de genes específicos na endoderme para a formação do fígado (OGIAS et al, 2016).

O HNF-4 (do inglês Hepatocyte Nuclear Factor-4), por exemplo, se mostrou essencial para as modificações bioquímicas e morfológicas que acontecem desde o brotamento hepático até a formação do tecido hepático propriamente dito. As células epiteliais da placa hepática perdem as características adesivas e migram pelo mesênquima em direção ao septo transverso, formando o divertículo hepático e suas ramificações, os cordões hepáticos. As células destes cordões, denominadas de hepatoblastos, darão origem aos hepatócitos que, nessa precoce fase do desenvolvimento, já expressam os genes para a produção de alfa- -fetoproteína e de albumina,

característicos dessas células no adulto. A expressão dessas proteínas peculiares, no entanto, parece depender da expressão dos fatores de transcrição FoxA e HNF-4 (OGIAS et al, 2016).

Outras funções hepáticas, como armazenamento de glicogênio e produção de enzimas associadas à síntese de uréia a partir de metabólitos nitrogenados, também se iniciam precocemente e progridem gradativamente durante o durante o período fetal. Ao nascimento, o fígado é capaz de desempenhar todas as atividades funcionais. O divertículo hepático fica constituído pelos muitos cordões hepáticos que se formam durante a hepatogênese. Estes cordões mantêm estreito contato com o mesoderma esplâncnico do septo transverso (placa mesodérmica entre a cavidade pericárdica e o pedículo do saco vitelino), que oferece suporte para o crescimento e proliferação dos componentes epiteliais. O fator de crescimento hepático, HGF (do inglês Hepatic Growth Factor) produzido pelas células mesodérmicas tem papel fundamental nesse processo; seu receptor c-Met está presente na superfície das células endodérmicas dos cordões hepáticos (OGIAS et al, 2016).

Além de dar origem aos hepatócitos, as células nobres, responsáveis pela fisiologia hepática, os hepatoblastos também se diferenciam em colangiócitos (células epiteliais que formam o revestimento dos ductos biliares intra-hepáticos) por meio da sinalização de HNF-6, da ativação da via de sinalização do fator de crescimento TGF-b e de NOTCH e, da expressão de SOX-9. Neste processo, os hepatoblastos formam uma camada denominada de placa ductal ao redor da veia porta e suas ramificações, a partir da qual se formam alças celulares que constituem o duto biliar. As células do duto biliar são denominadas de colangiócitos; a rede de dutos é componente intra-hepático do sistema de dutos biliares. As células hematopoiéticas, as células de Kupffer e o estroma (estrutura de sustentação do órgão) originam-se do mesoderma do septo transverso e do mesoderma esplâncnico. Até o nascimento, os hepatócitos se mantêm uninucleados (OGIAS et al, 2016).

O fígado está revestido por uma cápsula delgada de tecido conjuntivo, Cápsula de Glisson, que se torna mais espessa no hilo, por onde a veia porta e a artéria hepática penetram no fígado e por onde saem os ductos hepáticos: direito e esquerdo e linfático. Estes vasos e ductos são circundados por tecido conjuntivo ao longo de toda a sua extensão, até o término ou origem, nos espaços porta entre os lóbulos hepáticos. Neste ponto forma-se uma delicada rede de fibras

reticulares que suporta os hepatócitos e células endoteliais dos capilares sinusóides, (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

As fibras reticulares derivam da polimerização do colágeno do tipo III. Cada fibrila tem cerca de 20 nm de diâmetro e exibe o padrão de organização em bandas semelhante ao da fibrila de colágeno do tipo I. As fibras reticulares têm 0,5 a 2µm de diâmetro. Essas fibras estão dispostas em rede, o que justifica o seu nome e são secretadas pelos fibroblastos, pelos adipócitos, pelas células de Schwann (no sistema nervoso periférico) e pelas células musculares. Como os fibroblastos no tecido linfóide e na medula óssea possuem uma morfologia diferenciada, estrelada e ramificada, devido aos longos prolongamentos, foram chamadas células reticulares. Elas circundam a fibra com seu citoplasma, isolando-a de outros componentes teciduais. As fibras reticulares constituem o arcabouço dos órgãos hematopoeiticos e linfóides, como a medula óssea, o baço e os linfonodos. Compõem a lâmina reticular da membrana basal e formam uma delicada rede em torno das células adiposas, dos vasos sanguíneos, das fibras nervosas e das células musculares (USHIKITI, 2002; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

O colágeno do tipo I representa o mais comum dos colágenos, forma fibras grosseiras e está presente no tecido conjuntivo propriamente dito, padrão normal da pele, tendão, osso, dentina e cemento. Já o tipo II de colágeno, forma fibras delgadas e está presente quase exclusivamente nas matrizes da cartilagem hialina e elástica. O colágeno do tipo III, freqüentemente associado ao tipo I, é denominado, também, de fibra reticular mais delgada. O colágeno do tipo IV não constitui fibras, estando presente nas membranas basais, em que forma uma rede de moléculas de pró-colágenos mantidas unidas, e formando uma base de sustentação da lâmina basal. O colágeno do tipo V existe em pequena quantidade e origina fibrilas muito delgadas, sendo encontrado associado com o colágeno do tipo I, presente na maioria do tecido intersticial, assim como o colágeno do tipo VI. O colágeno do tipo VII constitui pequenos agregados conhecidos como fibrilas de ancoragem, onde também dão sustentação à lâmina basal para os feixes subjacentes de fibras colágenas do tipo I e do tipo II. O colágeno tipo XI é encontrado nas cartilagens: hialina e elástica, participando da estrutura das fibrilas de colágenos, juntamente com o colágeno tipo II (USHIKITI, 2002; FEITOSA 2002a; 2002b; 2005; VIDAL; MELLO, 2011).

A presença do colágeno no fígado é marcante. Esta glicoproteína constitui a maior classe de proteínas fibrosas insolúveis da matriz extracelular. Suas fibras apresentam como característica morfológica a presença de periodicidade axial, produzida pela superposição de moléculas de tropocolágeno que formam fibrilas arrumadas em feixes ou fascículos paralelos ao feixe longitudinal do tendão. Entre os feixes de colágeno, ocorrem células do tecido conjuntivo. A maioria destas células corresponde aos fibroblastos cuja função relaciona-se à síntese de fibras, glicoproteínas e proteoglicanos da matriz (MARXEN et al, 2003).

A matriz extracelular também é caracterizada pela presença das anisotropias ópticas, que são fenômenos de ordem espectral conhecido pelo dicroísmo e birrefringência. O dicroísmo ocorre quando apenas um filtro polarizador é colocado no sistema. Ele é expresso pela diferença de absorção do objeto em duas direções de deslocamento do feixe de luz no próprio objeto, um perpendicular ao outro. No entanto, quando os dois filtros, o polarizador e o analisador se cruzam perpendicularmente e dependendo da diferença entre os índices de refração do objeto, então se observa a birrefringência. De maneira prática e objetiva, os componentes macromoleculares birrefringentes anisotrópicos apresentam brilho colorido ou não, sob o efeito do Plano de Luz Polarizada (PPL). Isso promove um realce destes materiais em detrimento a outros não birrefringentes (isotrópicos), que ficam indistintos em um fundo escuro. As células musculares estriadas, espermatozoides de algumas espécies animais, paredes celulares, amido, colágenos e moléculas de DNA e RNA são exemplos de materiais biológicos estudados através da microscopia de polarização (VILARTA; VIDAL, 1989).

Estas propriedades anisotrópicas podem ser visualizadas no microscópio de polarização que é acrescido de dois prismas ou dois discos polaróides. Um desses elementos é colocado no condensador e funciona como polarizador; o outro é colocado na ocular e é chamado de analisador. A função do polarizador é iluminar a célula com um feixe de luz polarizada, enquanto o analisador verifica o efeito das estruturas celulares sob o feixe polarizado (VILARTA; VIDAL, 1989).

O sistema elástico é constituído por 3 tipos de fibras: elaunínicas, oxitalânicas e elásticas típicas, que apresentam uma distribuição diferencial nos tecidos, promovendo diferenças nos graus de elasticidade. A fibra elástica madura é constituída principalmente de elastina. Essas fibras são longas e finas e ao microscópio óptico aparecem como fios homogêneos altamente

birrefringentes. As fibras elásticas normalmente ramificam-se e ligam-se umas às outras formando uma trama de malhas irregulares. A presença de um sistema elástico desenvolvido permite ao tendão sofrer uma grande distensão antes que as fibrilas de colágeno possam exercer qualquer efeito útil de resistência à tensão (USHIKITI, 2002; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012; CARVALHO; RECCO-PIMENTEL, 2013).

Além das fibras reticulares, colágenas e elásticas, a matriz extracelular é constituída pelos proteoglicanos. Os proteoglicanos são moléculas complexas formadas por uma proteína central na qual estão ligadas uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs), (RHOADS; FETTERER, 1997; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; CARVALHO; RECCO-PIMENTEL, 2013). Os GAGs são polissacarídeos carregados negativamente, que apresentam grupamento sulfato e carboxila, exceto o ácido hialurônico que não possui grupamentos sulfatos (WIGHT et al, 1991). Estes polissacarídeos são classificados em ácido hialurônico, condroitim sulfato, dermatam sulfato, heparam sulfato/heparina e o queratam sulfato (HEINEGÅRD; PAULSSON, 1984). Os proteoglicanos da MEC têm a propriedade de criar um ambiente hídrico, pois as suas cargas negativas atraem íons osmoticamente ativos (HARDINGHAM; FOSANG, 1992; FEITOSA et al, 2006; CARVALHO; RECCO-PIMENTEL, 2013).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Geral:

- ✓ Estudar a ontogenia da hematopoese e da matriz extracelular em fígado de fetos humanos.

3.2 Específicos:

- ✓ Identificar áreas de hematopoese no parênquima hepático durante o desenvolvimento embrionário.

- ✓ Caracterizar as alterações estruturais e da matriz extracelular em fígado fetal humano durante o desenvolvimento embrionário.

- ✓ Analisar as anisotropias ópticas através da birrefringência das fibras colágenas da matriz extracelular em fígado fetal humano durante o desenvolvimento embrionário.

REFERÊNCIAS

4 REFERÊNCIAS

BEDOSSA P, PARADIS V. Liver extracellular matrix in health and disease. **Journal of Pathology** 200: 504-515, 2003.

CAI, J. et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. **Hepatology,** v.45, p.1229- 1239, 2007. Disponível em: Acesso em: 13 set. 2012. doi:10.1002/ hep.21582.

CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. **A Célula.** Manole, Campinas, 2013.

CHOW, A; FRENETTE, PS. Origin and development of blood cells. In: **Wintrobe's Clinical Hematology**. 13th ed, Philadelphia: Lippincott Willians&Wilkins, 2014.

DUNCAN, S.A. Mechanisms controlling early development of the liver. **Mechanism of development**, v.120, p.19- 33, 2003. Disponível em:. Acesso em: 05 ago. 2012. doi: 10.1016/ S0925-4773(02)00328-3.

ELMAOUHOUB, L. **Characterization of foetal hepatic cells during the liver development**. 132f, 2006. Dissertation (Mathematisch naturwissenschaftliche Fakultäten) - Georg August Universität zu Göttingen.

FEITOSA, V. L. C.; VIDAL, B. C; PIMENTEL, E. R. Optical anisotropy of a pig tendon under compression. **J. Anat.,** V. 200, p. 105-111, 2002a.

FEITOSA, V. L. C.; ESQUISATTO, M.A.M.; JOAZEIRO, P. P.; GOMES, L.; FELISBINO, S.L. Variations in the glycosaminoglycan content, swelling properties and morphological aspects of different regions of the superficial digital flexor tendon of pigs. **Cell. Mol. Biol.,** v. 48, Online, OL 359-OL 367, 2002b.

FEITOSA, V. L. C.; ESQUISATTO, M.A.M.; JOAZEIRO, P. P.; GOMES, L.; FELISBINO, S.L.; PIMENTEL, E. R. Physicochemical and structural analysis of three regions of the deep digital flexor tendon of pigs. **Braz. J. morphol. Sci.,** v. 22, p. 113-119, 2005.

FEITOSA, V. L. C.; PRADO, F.R.; ESQUISATTO, M.A.M.; JOAZEIRO, P.P.; VIDAL, B.C. & PIMENTEL, E.R. Comparative ultrastructural analysis of different regions of two digital flexor tendons of pigs. **Micron.** JMIC 931, 1-8, 2006.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Sistema Digestivo – Glândulas Digestivas**. In: Tratado De Histologia. 3ª Ed., Rio De Janeiro: Elsevier. P. 419-442, 2007.

JUNQUEIRA, B. C. V.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular.** Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2012.

JUNQUEIRA, L. C. U. Órgãos associados ao trato digestivo. In: **Histologia Básica: texto e atlas**. 13ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

LUNA, ACL; PASSOS, CC; FERREIRA, AO; MIGLINO, MA; GUERRA, RR. Caracterização histológica do desenvolvimento hepático em diferentes estágios embrionários de ratos. *Histological characterization of the liver development at different embryonic stages of rats.* CR-2012-0850.R2. **Ciência Rural,** Santa Maria, 2012.

MARXEN, S.; LACERDA-NETO, J. C. de; MORAES, J. R. E. de; RIBEIRO, G.; QUEIROZ-NETO, A. Efficacy of polysulphated glycosaminoglycan in the intratendinous treatment of experimental equine tendinitis. **Braz. J. Morphol. Sci**., V.20, n.1, p. 43-46, 2003.

OGIAS, D; ORIÁ, R. B; BEVILACQUA, E. **Embriologia do pâncreas e sistema hepatobiliar. Sistema digestório: integração básico-clínica.** p. 179-196. In: São Paulo: Blucher, 2016. ISBN: 9788580391893, DOI 10.5151/9788580391893-07.

OVALLE, W. K.; NAHIRNEY, P. C. Fígado, Vesícula Biliar e Pâncreas Exócrino. In: Netter – **Bases Da Histologia**. Rio De Janeiro: Elsevier. P. 311-32, 2007.

POUTON, C.W.; HAYNES, J.M. Pharmaceutical applications of embryonic stem cells. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57, p.1918-1934, 2005. Acesso em: 13 set. 2012. doi: 10.1016/j. addr.2005.08.003.

RHOADS, M. L.; FETTERER, R. H. Extracellular matrix: a tool for defining the extracorporeal function of parasite protease. **Parasitology Today**, 13: 119-122, 1997.

SILVA, J. P. A. **Dissertação apresentada para obtenção de grau de Mestre em Ciências Morfológicas do Departamento de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz.** FIOCRUZ – RJ, 154p., 2007.

USHIKITI, T. Collagen fibers, reticular fibers anda elastic fibers. A comprehensive understanding for a morphological viewpoint. **Ach. Histol. Cytol.** 65 (2): 109-126, 2002.

VILARTA, R.; VIDAL, B. C. Anisotropic and biomechanical properties of tendons modified by exercise and denervation. Aggregation and macromolecular order in colagen bundles. **Matrix,** V.9, p.55-61, 1989.

VIDAL, B. C.; CARVALHO, H.F. Aggregational state and molecular order of tendons as a function of age. **Matrix**, V.10, p.48-57, 1990.

VIDAL, B. C. Crimp as part of a helicoidal structure. C. R. Acad. Sci. Paris, Science de la vie. **Life Science**, V. 318, p. 173-178, 1995.

VIDAL, B. C.; MELLO, M. L. **Collagen type I amide I band infrared spectroscopy.** 42 (3): 283-289, 2011.

ZARET, K. S. Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis. **Nat Rev Genet**, 3(7):499-512, 2002.

ZHAO, R.; DUNCAN, S. A. Embryonic development of the liver. Hepatology, v.41, p.956-967, 2005. Acesso em: 20 ago. 2012. doi: 10.1002/hep.20691. ZORN, A.M. Liver development: stemBook. Cambridge: **The Stem Cell Research Community**, 2008.

NORMAS PARA A PUBLICAÇÃO

5 NORMAS PARA A PUBLICAÇÃO

JOURNAL OF ANATOMY

Instrução para Autores

1. Princípios Gerais

O texto dos artigos que relatam pesquisa original é geralmente dividido em seções Introdução, Métodos, Resultados e Discussão. Essa assim chamada estrutura "IMRAD" não é um formato de publicação arbitrário, mas um reflexo do processo de descoberta científica. Os artigos frequentemente precisam de subtítulos dentro dessas seções para organizar ainda mais seu conteúdo. Outros tipos de artigos, como metanálises, podem exigir formatos diferentes, enquanto relatos de casos, revisões narrativas e editoriais podem ter formatos menos estruturados ou não estruturados.

Os formatos eletrônicos criaram oportunidades para adicionar detalhes ou seções, informações em camadas, interligação ou extração de partes de artigos em versões eletrônicas. O material somente eletrônico suplementar deve ser submetido e enviado para revisão por pares simultaneamente com o manuscrito primário.

2. Diretrizes para relatórios

As diretrizes de relatórios foram desenvolvidas para diferentes desenhos de estudo; exemplos incluem CONSORT para estudos randomizados, STROBE para estudos observacionais, PRISMA para revisões sistemáticas e meta-análises e STARD para estudos de acurácia diagnóstica. Os periódicos são encorajados a pedir aos autores que sigam estas diretrizes porque eles ajudam os autores a descrever o estudo com detalhes suficientes para que sejam avaliados por editores, revisores, leitores e outros pesquisadores que avaliam a literatura médica. Os autores de manuscritos de revisão são encorajados a descrever os métodos usados para localizar, selecionar, extrair e sintetizar dados; isso é obrigatório para revisões sistemáticas. Boas fontes de diretrizes para relatórios são a Rede EQUATOR e as Diretrizes e Iniciativas de Relatórios de Pesquisa do NLM .

3. Seções do Manuscrito

A seguir estão os requisitos gerais para relatar dentro de seções de todos os desenhos de estudo e formatos de manuscrito.

a. Folha de rosto

Informações gerais sobre um artigo e seus autores são apresentadas em uma página de título do manuscrito e geralmente incluem o título do artigo, informações do autor, quaisquer renúncias, fontes de suporte, contagem de palavras e, às vezes, o número de tabelas e figuras.

Título do artigo. O título fornece uma descrição destilada do artigo completo e deve incluir informações que, juntamente com o resumo, tornem a recuperação eletrônica do artigo sensível e específica. Recomendações de relatórios recomendam e algumas revistas exigem que as informações sobre o desenho do estudo sejam uma parte do título (particularmente importante para estudos randomizados e revisões sistemáticas e metanálises). Alguns periódicos exigem um título curto, geralmente com no máximo 40 caracteres (incluindo letras e espaços) na página de título ou como uma entrada separada em um sistema de submissão eletrônica. Os sistemas de envio eletrônico podem restringir o número de caracteres no título.

Informações do autor. Os mais altos graus acadêmicos de cada autor devem ser listados, embora alguns periódicos não os publiquem. O nome do (s) departamento (s) e instituição (ões) ou organizações onde o trabalho deve ser atribuído deve ser especificado. A maioria dos sistemas de submissão eletrônica exige que os autores forneçam informações completas de contato, incluindo correio terrestre e endereços de e-mail, mas a página de título deve listar os números de telefone e fax e o endereço de e-mail dos autores correspondentes. O ICMJE incentiva a listagem de Pesquisador Aberto e Identificação de Contribuinte (ORCID) dos autores.

Renúncias. Um exemplo de uma declaração é uma afirmação do autor de que as opiniões expressas no artigo submetido são dele e não uma posição oficial da instituição ou do financiador.

Fonte(s) de apoio. Estes incluem subsídios, equipamentos, medicamentos e / ou outro suporte que facilitou a condução do trabalho descrito no artigo ou a redação do artigo em si.

A contagem da palavra. Uma contagem de palavras para o texto do artigo, excluindo seu resumo, agradecimentos, tabelas, legendas de figuras e referências, permite que editores e revisores avaliem se as informações contidas no documento garantem a extensão do artigo e se o manuscrito apresentado se encaixa nos formatos da revista e limites de palavras. Uma contagem de palavras separada para o resumo é útil pelo mesmo motivo.

Número de figuras e tabelas. Alguns sistemas de envio exigem a especificação do número de figuras e tabelas antes de fazer o upload dos arquivos relevantes. Esses números permitem que a equipe editorial e revisores confirmem que todas as figuras e tabelas foram realmente incluídas no manuscrito e, porque as Tabelas e Figuras ocupam espaço, para avaliar se as informações fornecidas pelas figuras e tabelas justificam a duração do trabalho e se o manuscrito se encaixa limites de espaço da revista.

Declaração de Conflito de Interesse. Conflito de informações de interesse para cada autor precisa fazer parte do manuscrito. Cada revista deve desenvolver padrões com relação à forma que a informação deve tomar e onde ela será postada. O ICMJE desenvolveu um formulário de divulgação uniforme de conflito de interesse para ser usado pelos periódicos membros do ICMJE e o ICMJE incentiva outros periódicos a adotá-lo. Apesar da disponibilidade do formulário, os editores podem exigir declarações de conflito de interesses na página de título do manuscrito para salvar o trabalho de coletar formulários de cada autor antes de tomar uma decisão editorial ou para salvar revisores e leitores o trabalho de ler o formulário de cada autor.

b. Abstrato

Pesquisas originais, revisões sistemáticas e metanálises exigem resumos estruturados. O resumo deve fornecer o contexto ou antecedentes para o estudo e deve indicar a finalidade do estudo, procedimentos básicos (seleção dos participantes do estudo, configurações, medidas, métodos analíticos), principais resultados (dando tamanhos de efeito específicos e sua significância estatística e clínica, se possível) e principais conclusões. Deve enfatizar aspectos novos e importantes do estudo ou das observações, observar limitações importantes e não interpretar de maneira excessiva os resultados. Os resumos dos ensaios clínicos devem incluir itens que o grupo CONSORT tenha identificado como essenciais. As fontes de financiamento devem ser listadas separadamente após o Resumo para facilitar a exibição e indexação adequadas para recuperação de pesquisa pelo MEDLINE.

Como os resumos são a única parte substantiva do artigo indexado em muitos bancos de dados eletrônicos e a única parte que muitos leitores lêem, os autores precisam garantir que reflitam com precisão o conteúdo do artigo. Infelizmente, as informações em resumos geralmente diferem daquelas no texto. Autores e editores devem trabalhar no processo de revisão e revisão para garantir que as informações sejam consistentes nos dois locais. O formato exigido para resumos estruturados difere de periódico para periódico, e alguns periódicos usam mais de um formato; os autores precisam preparar seus resumos no formato especificado pelo periódico que escolheram.

O ICMJE recomenda que os periódicos publiquem o número de registro do estudo clínico no final do resumo. O ICMJE também recomenda que, quando um número de registro estiver disponível, os autores listem esse número na primeira vez em que usarem um acrônimo de teste para se referir ao ensaio que estão relatando ou a outros ensaios mencionados no manuscrito. Se os dados foram depositados em um repositório público e / ou estão sendo usados em uma análise secundária, os autores devem declarar no final do resumo o identificador único e persistente do conjunto de dados, o nome e o número do repositório.

c. Introdução

Forneça um contexto ou antecedentes para o estudo (isto é, a natureza do problema e sua importância). Declare o objetivo específico ou objetivo de pesquisa, ou hipótese testada pelo estudo ou observação. Cite apenas referências diretamente pertinentes e não inclua dados ou conclusões do trabalho que está sendo relatado.

d. Métodos

O princípio orientador da seção de Métodos deve ser claro sobre como e por que um estudo foi feito de uma maneira particular. A seção de métodos deve ser suficientemente detalhada para que outros com acesso aos dados possam reproduzir os resultados. Em geral, a seção deve incluir apenas as informações que estavam disponíveis no momento em que o plano ou protocolo para o estudo estava sendo escrito; todas as informações obtidas durante o estudo pertencem à seção Resultados. Se uma organização foi paga ou contratada para ajudar a conduzir a pesquisa (exemplos incluem coleta e gerenciamento de dados), isso deve ser detalhado nos métodos.

A seção de Métodos deve incluir uma declaração indicando que a pesquisa foi aprovada por um órgão de revisão local, regional ou nacional independente (por exemplo, comitê de ética, conselho de revisão institucional). Se houver dúvida se a pesquisa foi conduzida de acordo com a Declaração de Helsinque, os autores devem explicar a justificativa para sua abordagem e demonstrar que o órgão de revisão local, regional ou nacional aprovou explicitamente os aspectos duvidosos do estudo. (Ver seção II.D).

i. Seleção e Descrição dos Participantes

Descreva claramente a seleção de participantes observacionais ou experimentais (indivíduos ou pacientes saudáveis, incluindo controles), incluindo critérios de elegibilidade e exclusão e uma descrição da população-fonte. Como a relevância de variáveis como idade, sexo ou etnia nem sempre é conhecida no momento do desenho do estudo, os pesquisadores devem buscar a inclusão de populações representativas em todos os tipos de estudos e fornecer dados descritivos para essas e outras variáveis demográficas relevantes. Garantir o uso correto dos termos sexo (ao relatar fatores biológicos) e gênero (identidade, fatores psicossociais ou culturais) e, a menos que inapropriado, relatar o sexo e / ou gênero dos participantes do estudo, o sexo de animais ou células e descrever os métodos usados para determinar sexo e gênero.

ii. Informação técnica

Especifique os objetivos principais e secundários do estudo - normalmente identificados como resultados primários e secundários. Identifique métodos, equipamentos (forneça o nome e o endereço do fabricante entre parênteses) e procedimentos com detalhes suficientes para permitir que outros reproduzam os resultados. Dar referências a métodos estabelecidos, incluindo métodos estatísticos (veja abaixo); fornecer referências e descrições breves para métodos que foram publicados, mas não são bem conhecidos; descreva métodos novos ou substancialmente modificados, dê as razões para usá-los e avalie suas limitações. Identifique precisamente todos os medicamentos e produtos químicos usados, incluindo nome (s) genérico (s), dose (s) e via (s) de administração. Identifique nomes científicos apropriados e nomes de genes.

iii. Estatísticas

Descreva os métodos estatísticos com detalhes suficientes para permitir que um leitor experiente tenha acesso aos dados originais para julgar sua adequação ao estudo e para verificar os resultados relatados. Quando possível, quantifique os achados e apresente-os com indicadores apropriados de erro de mensuração ou incerteza (como intervalos de confiança). Evite confiar apenas no teste de hipóteses estatísticas, como valores de P, que não transmitem informações importantes sobre o tamanho do efeito e a precisão das estimativas. As referências para o desenho do estudo e os métodos estatísticos devem ser para trabalhos padrão quando possível (com as páginas indicadas). Definir termos estatísticos, abreviaturas e a maioria dos símbolos. Especifique o (s) pacote (s) de software estatístico e versões utilizados. Distinguir pré-especificado de análises exploratórias, incluindo análises de subgrupos.

e. Resultados

Apresente seus resultados em seqüência lógica no texto, tabelas e figuras, dando as descobertas principais ou mais importantes primeiro. Não repita todos os dados nas tabelas ou figuras no texto; enfatize ou resuma apenas as observações mais importantes. Forneça dados sobre todos os desfechos primários e secundários identificados na Seção de Métodos. Materiais extras ou complementares e detalhes técnicos podem ser colocados em um apêndice, onde estarão acessíveis, mas não interromperão o fluxo do texto, ou poderão ser publicados somente na versão eletrônica da revista.

Forneça resultados numéricos não apenas como derivados (por exemplo, porcentagens), mas também como os números absolutos a partir dos quais os derivativos foram calculados, e especifique a significância estatística a eles associada, se houver. Restringir tabelas e figuras àquelas necessárias para explicar o argumento do artigo e para avaliar os dados de apoio. Use gráficos como uma alternativa aos tamanhos com muitas entradas; não duplique dados em gráficos e tabelas. Evite o uso não técnico de termos técnicos nas estatísticas, como “aleatório” (o que implica um dispositivo aleatório), “normal”, “significativo”, “correlações” e “amostra”.

O relato separado de dados por variáveis demográficas, como idade e sexo, facilita o agrupamento de dados para subgrupos entre os estudos e deve ser rotineiro, a menos que haja razões convincentes para não estratificar a notificação, o que deve ser explicado.

f. Discussão

É útil começar a discussão resumindo brevemente os principais resultados e explorar possíveis mecanismos ou explicações para esses achados. Enfatize os aspectos novos e importantes do seu estudo e coloque suas estimativas no contexto da totalidade das evidências relevantes. Indique as limitações do seu estudo e explore as implicações de suas descobertas para pesquisas futuras e para a prática clínica ou política. Discuta a influência ou associação de variáveis, como sexo e / ou gênero, sobre suas descobertas, quando apropriado, e as limitações dos dados. Não repita dados detalhados ou outras informações fornecidas em outras partes do manuscrito, como na seção Introdução ou Resultados.

Relacione as conclusões com os objetivos do estudo, mas evite declarações e conclusões não qualificadas não adequadamente apoiadas pelos dados. Em particular, faça uma distinção entre significância clínica e estatística e evite fazer declarações sobre benefícios e custos econômicos, a menos que o manuscrito inclua os dados e análises econômicos apropriados. Evite reivindicar prioridade ou aludir ao trabalho que não foi concluído. Indique novas hipóteses quando for wared, mas rotule-as claramente.

g. Referências

i. Considerações gerais relacionadas a referências

Os autores devem fornecer referências diretas a fontes de pesquisa originais sempre que possível. As referências não devem ser usadas por autores, editores ou revisores para promover interesses próprios. Embora as referências a artigos de revisão possam ser uma maneira eficiente de orientar os leitores para um corpo de literatura, os artigos de revisão nem sempre refletem o trabalho original com precisão. Por outro lado, listas extensas de referências ao trabalho original em um tópico podem usar espaço excessivo. Poucas referências a artigos originais importantes muitas vezes servem como listas mais exaustivas, particularmente porque as referências podem agora ser adicionadas à versão eletrônica de artigos publicados, e uma vez que a pesquisa de literatura eletrônica permite que os leitores recuperem a literatura publicada com eficiência.

Não use resumos de conferências como referências: eles podem ser citados no texto, entre parênteses, mas não como notas de rodapé da página. Referências a artigos aceitos, mas ainda não publicados, devem ser designados como “no prelo” ou “próximo”. Informações de manuscritos submetidos, mas não aceitos devem ser citadas no texto como “observações não publicadas” com permissão por escrito da fonte.

Os artigos publicados devem referenciar os identificadores únicos e persistentes dos conjuntos de dados utilizados.

Evite citar uma “comunicação pessoal”, a menos que ela forneça informações essenciais não disponíveis em uma fonte pública; nesse caso, o nome da pessoa e a data da comunicação devem ser citadas entre parênteses no texto. Para artigos científicos, obtenha permissão por escrito e confirmação de precisão da fonte de uma comunicação pessoal.

Alguns, mas nem todos os periódicos, verificam a exatidão de todas as citações de referência; Assim, por vezes, os erros de citação aparecem na versão publicada dos artigos. Para minimizar esses erros, as referências devem ser verificadas usando uma fonte bibliográfica eletrônica, como o PubMed, ou cópias impressas de fontes originais. Os autores são responsáveis por verificar que nenhuma das referências cita artigos retratados, exceto no contexto de se referir à retratação. Para artigos publicados em periódicos indexados na MEDLINE, o ICMJE considera o PubMed a fonte autorizada de informações sobre retratações. Autores podem identificar artigos retratados no MEDLINE pesquisando PubMed por "Publicação retratada [pt]", onde o termo "pt" entre colchetes significa tipo de publicação, ou indo diretamente para o PubMed's.lista de publicações recolhidas.

As referências devem ser numeradas consecutivamente na ordem em que são mencionadas pela primeira vez no texto. Identifique referências em texto, tabelas e legendas por algarismos arábicos entre parênteses.

As referências citadas apenas em tabelas ou legendas de figuras devem ser numeradas de acordo com a sequência estabelecida pela primeira identificação no texto da tabela ou figura específica. Os títulos dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no MEDLINE (www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals). Os periódicos variam se pedem aos

autores que citem referências eletrônicas entre parênteses no texto ou em referências numeradas seguindo o texto. Os autores devem consultar a revista para a qual planejam enviar seu trabalho.

ii. Estilo de referência e formato

As referências devem seguir os padrões resumidos nas Recomendações do Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas do NLM (ICMJE) para a página de Conduta, Notificação, Edição e Publicação de Trabalho Acadêmico em Revistas Médicas: Referências de Amostra e detalhadas em Citing Medicine, 2a edição . Esses recursos são atualizados regularmente à medida que novos meios de comunicação se desenvolvem e, atualmente, incluem orientação para documentos impressos; material não publicado; mídia audiovisual; material em CD-ROM, DVD ou disco; e material na Internet.

h. Tabelas

As tabelas capturam informações de forma concisa e exibem-nas com eficiência; eles também fornecem informações em qualquer nível desejado de detalhes e precisão. Incluir dados em tabelas, em vez de texto, freqüentemente permite reduzir o tamanho do texto.

Preparar tabelas de acordo com os requisitos da revista específica; Para evitar erros, é melhor que as tabelas possam ser importadas diretamente para o software de publicação da revista. Numere as tabelas consecutivamente na ordem de sua primeira citação no texto e forneça um título para cada uma delas. Os títulos nas tabelas devem ser curtos, mas autoexplicativos, contendo informações que permitam aos leitores entender o conteúdo da tabela sem precisar voltar ao texto. Certifique-se de que cada tabela seja citada no texto.

Dê a cada coluna um cabeçalho curto ou abreviado. Os autores devem colocar questões explicativas em notas de rodapé, não no cabeçalho. Explique todas as abreviaturas não padrão em notas de rodapé e use símbolos para explicar as informações, se necessário. Os símbolos podem variar de periódico para periódico (letra do alfabeto ou símbolos como *, †, ‡, §), portanto, verifique as instruções de cada periódico para autores sobre a prática exigida. Identifique medidas estatísticas de variações, como desvio padrão e erro padrão da média.

Se você usar dados de outra fonte publicada ou não publicada, obtenha permissão e reconheça essa fonte completamente.

Tabelas adicionais contendo dados de backup muito extensos para publicar na impressão podem ser apropriadas para publicação na versão eletrônica da revista, depositadas em um serviço de arquivamento ou disponibilizadas diretamente aos leitores pelos autores. Uma declaração apropriada deve ser adicionada ao texto para informar os leitores que essas informações adicionais estão disponíveis e onde estão localizadas. Envie essas tabelas para consideração com o artigo, de modo que elas estejam disponíveis para os revisores.

i. Ilustrações (figuras)

Imagens digitais de ilustrações de manuscritos devem ser submetidas em um formato adequado para publicação impressa. A maioria dos sistemas de submissão possui instruções detalhadas sobre a qualidade das imagens e as verifica após o upload do manuscrito. Para envios de impressão, os números devem ser profissionalmente desenhados e fotografados, ou enviados como impressões digitais de qualidade fotográfica.

Para imagens radiológicas e outras imagens clínicas e diagnósticas, bem como fotos de espécimes de patologia ou fotomicrografias, envie arquivos de imagem fotográfica de alta resolução. Antes e depois, as imagens devem ser tiradas com a mesma intensidade, direção e cor da luz. Como os borrões são usados como evidência primária em muitos artigos científicos, os editores podem exigir a deposição das fotografias originais dos borrões no site da revista.

Embora algumas revistas redesquem figuras, muitas não. Letras, números e símbolos nas figuras devem, portanto, ser claros e consistentes, e grandes o suficiente para permanecerem legíveis quando a figura for reduzida para publicação. As figuras devem ser tão auto-explicativas quanto possível, uma vez que muitas serão usadas diretamente em apresentações de slides. Títulos e explicações detalhadas pertencem às lendas - não às próprias ilustrações.

As fotomicrografias devem ter marcadores de escala internos. Símbolos, setas ou letras usadas em fotomicrografias devem contrastar com o fundo. Explique a escala interna e identifique o método de coloração em fotomicrografias.

As figuras devem ser numeradas consecutivamente de acordo com a ordem em que foram citadas no texto. Se uma figura tiver sido publicada anteriormente, confirme a fonte original e envie permissão por escrito do detentor dos direitos autorais para reproduzi-la. A permissão é exigida independentemente de autoria ou editor, exceto para documentos de domínio público.

No manuscrito, as legendas para ilustrações devem estar em página separada, com algarismos arábicos correspondentes às ilustrações. Quando símbolos, setas, números ou letras são usados para identificar partes das ilustrações, identifique e explique cada uma claramente na legenda.

j. Unidades de medida

As medições de comprimento, altura, peso e volume devem ser relatadas em unidades métricas (metro, quilograma ou litro) ou seus múltiplos decimais.

As temperaturas devem estar em graus Celsius. As pressões sangüíneas devem estar em milímetros de mercúrio, a menos que outras unidades sejam especificamente solicitadas pelo periódico.

Os periódicos variam nas unidades que eles usam para relatar hematologia, química clínica e outras medições. Os autores devem consultar as Informações para os Autores do periódico em particular e devem reportar informações laboratoriais no Sistema de Unidades (SI) local e internacional.

Os editores podem solicitar que os autores adicionem unidades alternativas ou não-SI, uma vez que as unidades do SI não são usadas universalmente. As concentrações da droga podem ser relatadas em SI ou unidades de massa, mas a alternativa deve ser fornecida entre parênteses, quando apropriado.

k. Abreviaturas e Símbolos

Use apenas abreviaturas padrão; O uso de abreviaturas não padronizadas pode ser confuso para os leitores. Evite abreviações no título do manuscrito. A abreviação soletrada seguida da abreviação entre parênteses deve ser usada na primeira menção, a menos que a abreviação seja uma unidade padrão de medida.

ARTIGO ORIGINAL

Ontogenia da hematopoese e da matriz extracelular em fígado fetal humano

Bruna O. C. Aquino[1], Francisco P. Reis[3], Andrea F. Soares[2], José A. Aragão[2] C. V. de Santana[2], Carolina da S. Pereira[1], Vinícius A. S. Aragão[1], Denisson S. Nascimento[2], Vera L. C. Feitosa[2,4].

[1]Departamento de Medicina da Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, Brasil.

[2]Laboratório de Biologia Celular e Estrutural da Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, Brasil.

[3]Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente e Instituto Tecnológico de Pesquisa da Universidade Tiradentes, Sergipe, Brasil.

[4]Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, Brasil.

Autor para correspondência

Vera Lúcia Corrêa Feitosa

Rua Eduardo Cruz, 252

Bairro Industrial

CEP: 49065-330

Aracaju/Sergipe, Brasil

Email: vera_feitosa@uol.com.br

Resumo

O fígado durante o período embrionário atua como um órgão da hematopoese e a composição e organização estrutural de suas células e de seus componentes de matriz extracelular são decisivos para o desenvolvimento do tecido hematopoético e a consequente maturidade funcional hepática. Os objetivos deste trabalho foram analisar as alterações estruturais dos componentes da matriz extracelular durante o desenvolvimento embrionário do fígado, bem como, identificar as áreas de hematopoese. A amostra constou de quinze fígados de fetos humanos do sexo masculino nos períodos gestacionais de 3, 6 e 9 meses. Na análise microscópica, foram evidenciadas áreas de hematopoese próximas à cápsula conjuntiva e nos espaços sinusoidais, como também, uma organização estrutural tipo alveolar ou lacunar, nos três períodos gestacionais em estudo. Maior concentração de espaços-porta foi visualizada na região central do órgão. Na matriz extracelular foi observada maior concentração de fibras colágenas em torno dos vasos dos espaços-porta, em arranjo concêntrico. A deposição de fibras colágenas e a intensidade de birrefringência variaram de maneira crescente e de acordo com a idade gestacional dos fetos. Desse modo, as alterações estruturais das células e dos componentes da matriz extracelular do fígado fetal, pareceram compatíveis com a progressão de sua maturação funcional.

Palavras-chave: ontogenia, hematopoese, fígado, matriz extracelular, histologia.

Abstract

The liver acts as the host organ for hematopoiesis during embryogenesis. The composition and structural organization of cells and extracellular matrix are decisive for the development of hematopoietic tissue and consequent functional maturity of the liver. The objectives of this work were to analyze the structural changes and extracellular matrix components during the embryonic development of the liver, as well as to identify areas of hematopoiesis. The sample consisted of fifteen livers of male human fetuses in gestational periods of 3, 6 and 9 months. In the microscopic analysis, areas of hematopoiesis were evidenced near the connective capsule and in the sinusoidal spaces in all samples. Additionally, the structural organization type alveolar or lacunar was observed in the three gestational periods analyzed. Greater concentration of door-spaces was visualized in the central region of the organ. In the extracellular matrix was observed a higher concentration of collagen fibers around the vessels of the portal spaces, in a concentric arrangement. The collagen fiber deposition and birefringence varied in intensity between the three gestation periods, on an ascending scale. Therefore, the structural changes of cells and extracellular matrix found in the fetal hepatic parenchyma are compatible with the progression of its functional maturation.

Keywords: ontogeny, hematopoese, liver, extracellular matrix, histology.

Introdução

Os estudos sobre os momentos de desenvolvimento ou ontogenia de órgãos ou estruturas do corpo humano durante o período gestacional são relevantes por evidenciar as alterações anatômicas, celulares e do substrato morfológico ou estroma, com vistas a prover o entendimento sobre a sua atividade funcional e orientar as abordagens, quanto a diferentes processos patológicoa e terapias nos casos de doenças. A hematopoese consiste na renovação das células sangüíneas a partir da divisão mitótica das células localizadas nos órgãos adequados a essa função. Este processo tem inicio por volta da 3ª semana de gestação, no mesoderma do saco vitelínico e altera os seus sítios de produção de acordo com a idade humana. Em função disto, pode-se dividí-la em três períodos: mesoblástico, hepático e medular (Silva, 2007; Chow & Frenette, 2014).

O período mesoblástico ocorre no saco vitelínico desde o 19º dia e termina ao final do 3º mês de gestação. O hepático se inicia precocemente, por volta do 1º mês, e torna-se predominante na hematopoiese entre o 3º e o 6º mês gestacional. E o medular começa a partir do 6º ao 8º mês de gestação. Até aos cinco anos de idade a medula de todos os ossos do corpo participa do processo e à medida que os anos avançam, ocorre uma substituição gordurosa na medula dos ossos longos. Na vida adulta somente os ossos da pelve, esterno, ossos do crânio, úmero, fêmur e costelas serão capazes de gerar células sanguíneas (Luna et al. 2012; Chow & Frenette, 2014).

Na fase mesoblástica, observa-se a síntese de hemácias no interior de vasos sanguíneos que se formam na parede externa do saco vitelino, inicialmente como pequenos aglomerados de células, que se transformam em ilhotas sanguíneas, chamadas ilhotas de Wolff. As células mais externas destas ilhotas irão formar as paredes dos primeiros vasos sanguíneos, já as células mais internas irão se transformar em glóbulos vermelhos primitivos (megaloblastos). Com a involução do saco vitelino por volta da 6ª semana de gestação, inicia-se a síntese de glóbulos vermelhos fora de vasos sanguíneos e, assim permanece durante toda a vida (Chow & Frenette, 2014).

A caracterização do substrato morfológico hepático, ou seja, as alterações dos seus componentes da matriz extracelular durante o desenvolvimento embrionário tornam-se relevantes para compreender a participação do fígado durante o processo de hematopoese, nas fases da habitação e da desabitação hematopoética (Silva, 2007; Luna et al. 2012). A matriz extracelular é uma rede estrutural complexa, que rodeia e suporta as células do tecido conjuntivo. São as

próprias células do tecido conjuntivo que segregam as diferentes moléculas que constituem a matriz extracelular, que possui características mecânicas e bioquímicas específicas compatíveis com o desempenho funcional dos órgãos ou estruturas nos quais está presente (Marxen et al. 2003).

De maneira geral, os vários componentes fibrosos e não fibrosos da matriz extracelular formam um sistema dinâmico e interativo que informam as células sobre as mudanças químicas e bioquímicas do ambiente extracelular. Estes componentes macromoleculares são importantes para entender o comportamento da matriz extracelular em fígado de fetos humanos durante a sua organogênese. Essas macromoléculas são fundamentais na regulação de adesão, migração e sobrevivência de diversos tipos celulares, estando também envolvidos no desenvolvimento embrionário normal, reparo tecidual e processos inflamatórios e neoplásicos (Bedossa, 2003).

Este estudo teve por objetivos analisar as alterações estruturais e dos componentes da matriz extracelular durante o desenvolvimento embrionário do fígado e identificar as áreas de hematopoese.

Materiais e Métodos

Obtenção dos fetos

Foram utilizados quinze fetos humanos do sexo masculino, procedentes do Laboratório de Anatomia da Universidade Tiradentes, obtidos de acordo com a Lei 8.501 de 30 de novembro de 1992 que trata do uso de cadáveres não reclamados utilizados para estudos e pesquisas. Foram incluídos todos os fetos humanos que apresentaram integridade anatômica dos fígados.

Procedimento Experimental

Quinze fetos do sexo masculino foram dissecados. As dissecações ocorreram com fetos no 3º, 6° e 9° mês de gestação. Os fígados dissecados foram fixados em paraformaldeído a 10% em tampão Milloning (Fosfato 0,1M, em pH 7,4) durante 24 horas, à temperatura ambiente, e posteriormente lavados rapidamente em água corrente. Desidratados em uma série crescente de alcoóis de 70, 80, 90 e 100%, diafanizados em dois banhos de xilol e embebidos em parafina.

Histologia

Coloração pela hematoxilina-eosina (HE)

Os cortes de 5 µm foram desparafinizados, hidratados e corados pela hematoxilina de Harris durante 4 minutos, lavados rapidamente em água destilada e diferenciados em etanol 70% durante 1 minuto. Posteriormente foram contra-corados em solução de eosina durante 1 minuto, lavados rapidamente em água destilada, secados ao ar, clarificados em xilol e montados em Entelan (Merck), (Behmer et al. 1976).

Coloração pelo tricromo de Masson

As lâminas obtidas da microtomia foram refixadas em Bouin por cerca de 12 horas em temperatura ambiente. O material será desparafinado, lavado em água, corado em hematoxilina de Harris por 5 minutos e novamente lavado. Corado pela fucsina ácida- escarlate de Biebrich por 5 minutos e lavado em água por 10 minutos. Em seguida, será corado pelo azul de anilina acética por 10 minutos, lavado em água, desidratado e montado em Entelan (Merck), (Behmer et al., 1976).

Coloração pelo método do picrosírius-hematoxilina

Após a desparafinização e hidratação, os cortes de fígado foram corados pela solução de picrosírius (Sírius-Red f 3B 200 a 0,1% em solução saturada de ácido pícrico), contra corados pela hematoxilina de Harris durante 10 minutos e submetidos a 3 banhos rápidos em água destilada. Em seguida, foram desidratados em uma série etanólica crescente, clarificados em xilol e montados em Entelan (Merck) (Junqueira et al. 1979, 2012, 2017).

Análise e Documentação Fotográfica

A análise das alterações estruturais e dos componentes da matriz extracelular do parênquima hepático de fetos humanos nos períodos de 3, 6 e 9 meses de gestação foi realizada de forma descritiva, através de imagens capturadas por câmera de vídeo da marca NIKON acoplada a um microscópio de luz da mesma marca. Para análise das anisotropias ópticas, as lâminas foram analisadas e documentadas em fotomicroscópio digital marca NIKON empregando-se luz polarizada.

Resultados

Na análise macroscópica dos fígados fetais humanos com 3, 6 e 9 meses de gestação, foi observada a integridade anatômica dos mesmos, sendo possível identificar os lobos hepáticos em suas vistas visceral (Fig. 1A) e diafragmática (Fig. 1B). Além disto, ao toque verificou-se uma consistência mais esponjosa nas amostras de 3 meses de gestação.

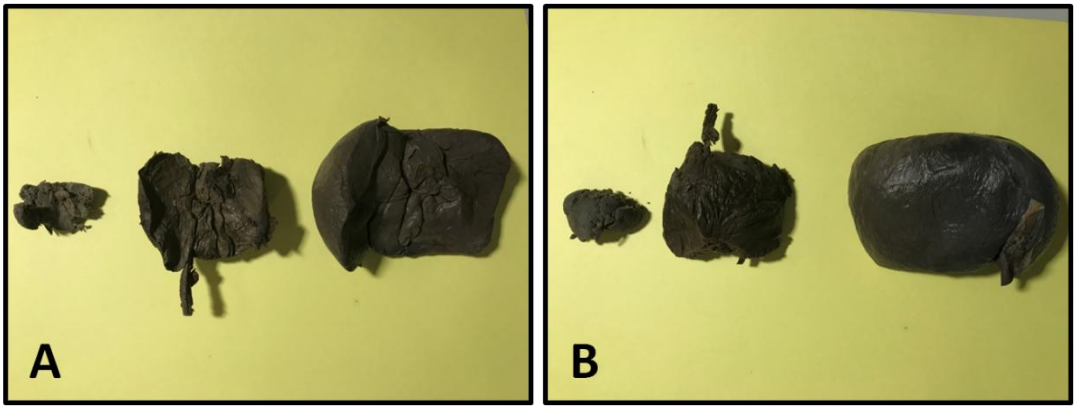

Fig. 1. Vistas visceral (1A) e diafragmática (1B) dos fígados fetais humanos com 3, 6 e 9 meses de gestação, respectivamente, da esquerda para a direita.

Através do exame das lâminas histológicas coradas com HE, foi observado que nos três períodos gestacionais o parênquima hepático era de aspecto alveolar, com inúmeras lacunas, compatíveis com áreas de substância fundamental e entre os espaços sinusoidais, a presença de cordões entrelaçados de células hepáticas. A veia centrolobular e os espaços-porta foram bem visualizados em todo o material examinado. A maior densidade celular e de deposição de fibras colágenas foi observada nas amostras de 6° e 9° meses de gestação (Figs. 2C, 2D, 2E, 2F, 2G e 2H). Adicionalmente, foram realizados cortes de fígado humano adulto para efeito de comparação quanto à organização estrutural do parênquima hepático, no qual se observou apresentação mais compacta dos cordões celulares de hepatócitos nos lóbulos hepáticos (Figs. 2A e 2B).

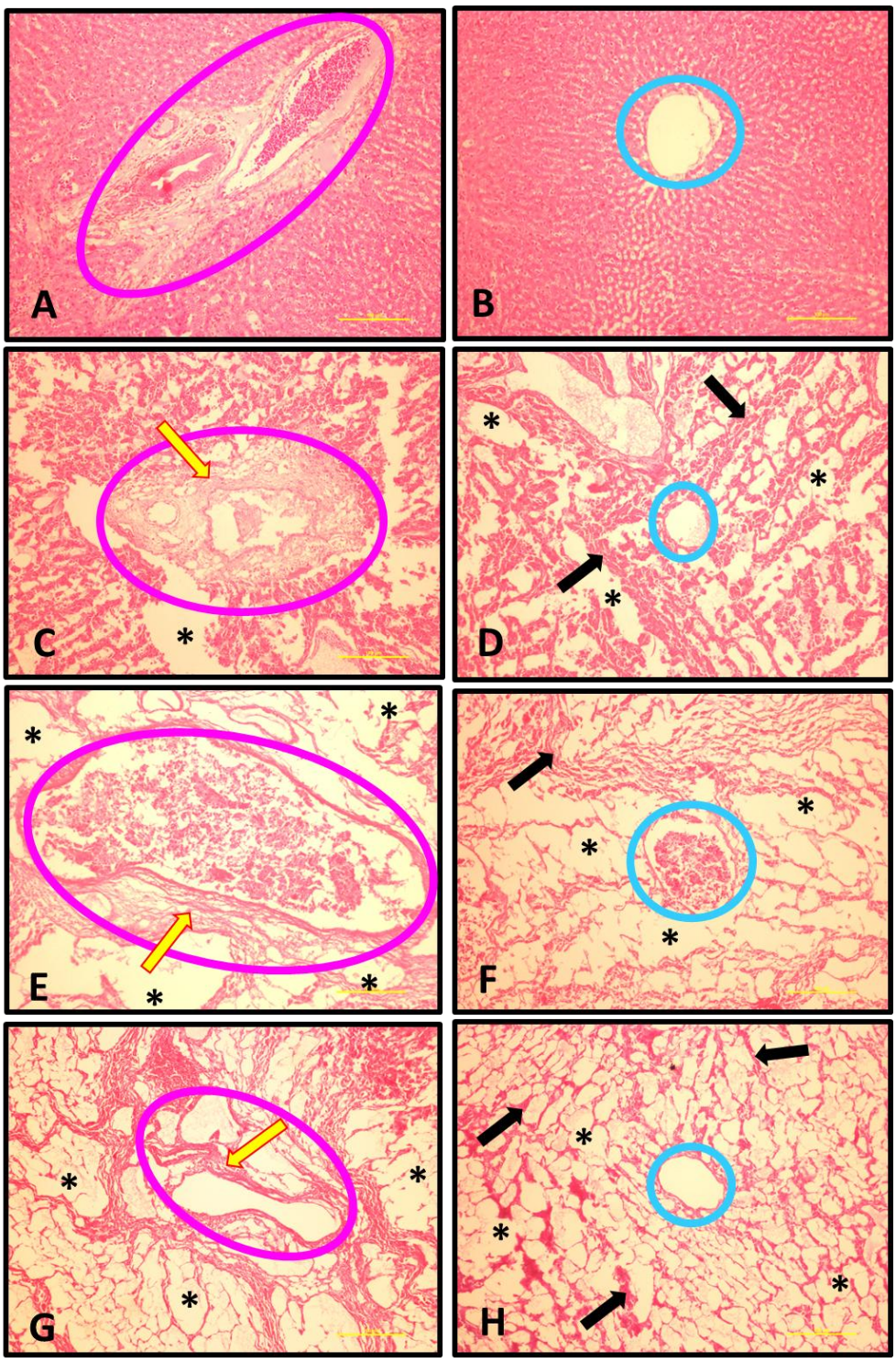

Fig. 2. Cortes histológicos transversais do parênquima hepático adulto (2A e 2B) e fetal humano com 3 (2C e 2D), 6 (2E e 2F) e 9 meses de gestação (2G e 2H) corados com HE. Visualizaram-se os cordões hepáticos (seta preta), as lacunas compatíveis com os espaços sinusoidais e áreas de substância fundamental (asterisco preto), os vasos dos espaços-porta (círculo rosa) e as veias centrolobulares dos lóbulos hepáticos (círculo azul), no aumento de 100x. Escala da barra 10µm.

Nas amostras de 3, 6 e 9 meses de gestação, coradas em HE, foi visualizado quantidade significativa de tecido hematopoiético de diferentes linhagens na periferia do órgão, próximo à cápsula conjuntiva, assim como, nas lacunas compatíveis com os espaços sinusoidais. Nas amostras de 3 meses de gestação, foi encontrada maior quantidade de células do referido tecido (Fig. 3).

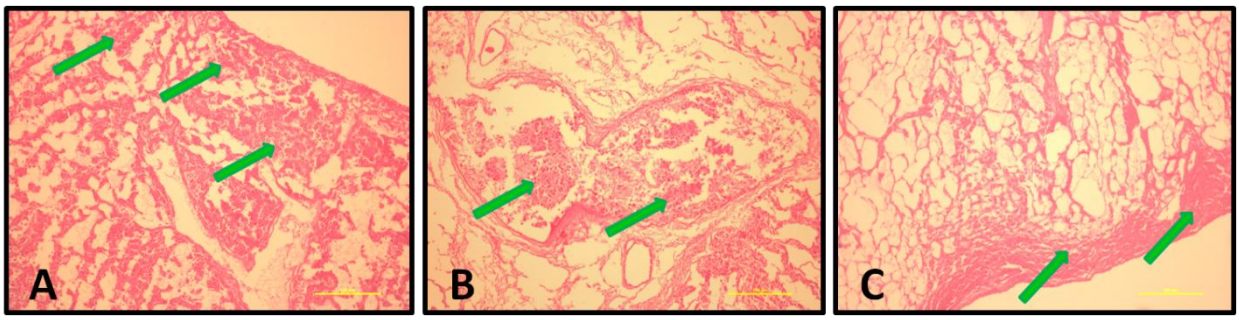

Fig. 3. Cortes histológicos do parênquima hepático de feto humano com 3, 6 e 9 meses de gestação corados com HE. Em 3A, 3B e 3C, foram verificadas áreas de hematopoese (seta verde) próximo à capsula conjuntiva e nas lacunas compatíveis com os espaços sinusoidais. Aumento de 100X. Escala da barra 10µm.

Nas amostras coradas pelo tricromo de Masson, foram visualizados feixes de fibras colágenas do tipo I, em tom de azul, com organização concêntrica em torno dos vasos que compõem os espaços-porta em todas as amostras dos três períodos de gestação analisados (Fig.4).

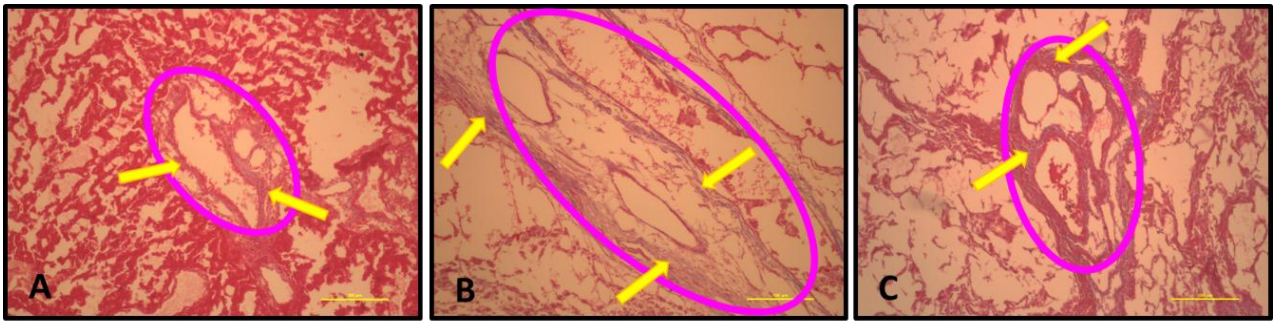

Fig. 4. Cortes histológicos do parênquima hepático de feto humano com três, seis e nove meses de gestação, respectivamente, corados pela técnica do tricromo de Masson. Em 4A, 4B e 4C, foi visualizado marcação em azul das fibras colágenas em torno dos vasos dos espaços-porta, no aumento de 100x. Escala da barra 10µm.

Nos cortes histológicos corados pelo picrosírius, foi detectada a presença de fibras colágenas birrefringentes em torno dos vasos que compõem os espaços-porta, de forma que a intensidade da birrefringência variou de acordo com o período gestacional: fraca nos fetos de 3 meses, média nos de 6 meses e forte nos de 9 meses de idade gestacional (Fig. 5).

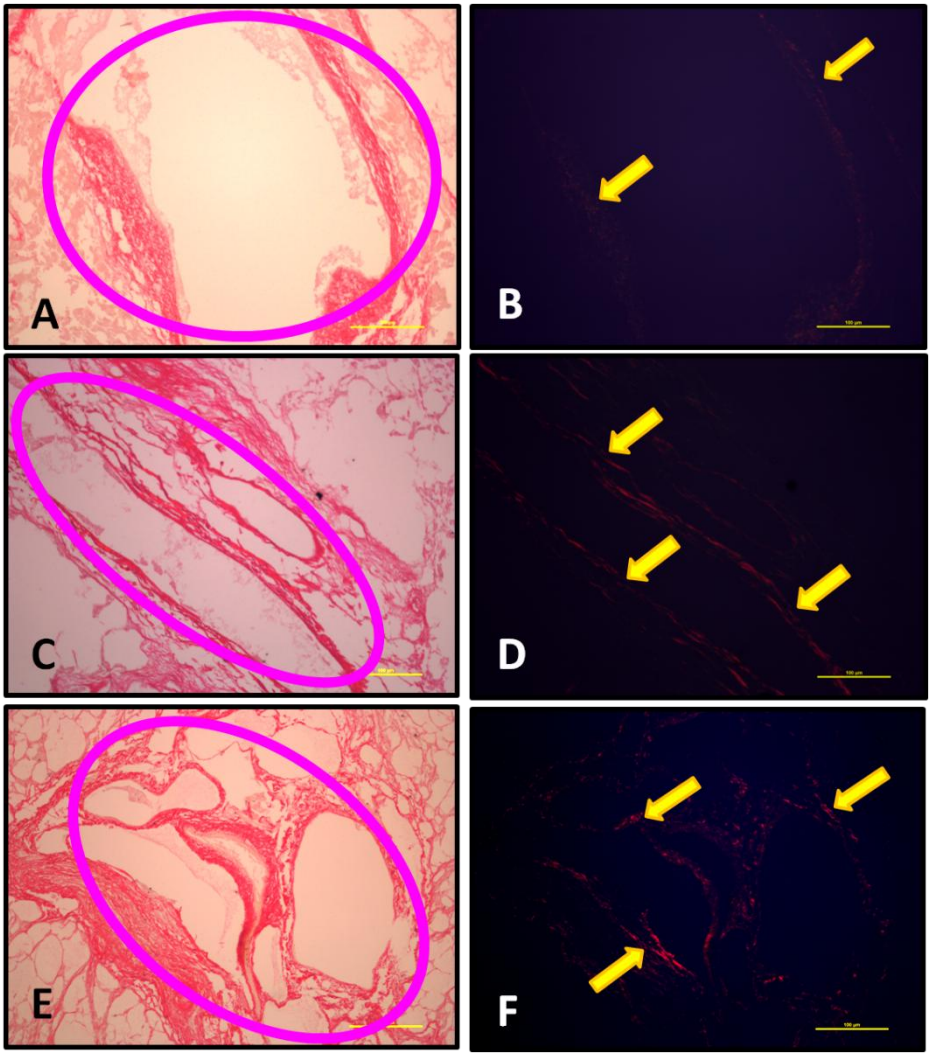

Fig. 5. Cortes histológicos do parênquima hepático de feto humano com 3 (5A e 5B), 6 (5C e 5D) e 9 meses (5E e 5F) de gestação corados com picrosírius. Em 5A, 5C e 5E (sem polarizador) e em 5B, 5D e 5F (com polarizador), observou-se a presença de feixes de colágeno com níveis variados de birrefringência (seta amarela) em torno de vasos que compõem os espaços-porta (círculo rosa). Aumento de 100x. Escala da barra 10µm.

Discussão

A hematopoese tem início por volta da 3ª semana de gestação. O fígado representa o segundo grande sítio da hematopoese, durante o período embrionário, que ocorre por volta do 1º mês de gestação e alcança o pico máximo entre o 3º e o 6º mês, declinando logo após, com o estabelecimento da vascularização dos ossos longos, quando então as célilas hematopoéticas migram para a medula óssea, via circulação sanguínea, estabelecendo a janela ontogenética definitiva do processo, que é o período medular (Cumano & Godin, 2008; Dierzak & Speck, 2008).

O tecido hematopoético foi visualizado próximo à cápsula conjuntiva, área com maior concentração de fibras colágenas, provavelmente composta pela linhagem granulocítica. O achado está em conformidade com Chagraoui et al. (2003) e Silva (2007), ao relatarem que estas células têm predileção por áreas mais densas da matriz extracelular. Também foi encontrado tecido hematopoético em outras áreas, como nos espaços sinusoidais e na parede dos vasos dos espaços-porta, especialmente, da linhagem eritroide, que tem preferência pelas áreas mais lacunares e de menor densidade de matiz extracelular. Estes achados corroboram também com Chagraoui et al. (2003) e Silva (2007), ao observarem que nestas regiões os macrófagos criam nichos favoráveis à diferenciação das células eritroides, as chamadas ilhas eritroblásticas, que podem abrigar até 19 eritroblastos.

Para Arias e Sterwart (2002), a hematopoese hepática coincide com o período de imaturidade funcional do fígado, durante o qual os hepatócitos atuariam como células estromais favoráveis ao desenvolvimento deste processo, capazes de atuar como agentes indutores da determinação do destino celular de diversas linhagens.

Egawa et al. (2001) sugeriram que a migração de células hematopoéticas para o fígado fetal é guiada por quimiocinas produzidas pelos hepatócitos, destacando dentre elas o fator CXCL-12 ou SDF-1, denominado de fator derivado de estroma-1, que tem a capacidade de atrair e reter estas células no microambiente hepático em sua fase imatura. Nas amostras analisadas, foi observada uma maior concentração de tecido hematopoético no 3º mês de gestação em diversos sítios: próximo à capsula conjuntiva, nos espaços sinusoidais e nos vasos dos espaços-porta, o que parece estar de acordo com estes autores.

Em trabalho experimental, com cultivo de células isoladas de fígados fetais de murinos em diferentes estágios de desenvolvimento embrionário, e utilização de marcadores imunoistoquímicos mesenquimais e epiteliais, Chagraoui et al. (2003), concluíram que os hepatócitos imaturos tendem a expressar os marcadores mesenquimais e quando alcançam a maturidade funcional expressam somente os marcadores epiteliais e, por isso estas células passariam por uma transição "mesênquima-epitelial". A morfologia da célula também alternaria entre o aspecto fusiforme e o poligonal conforme avança para a maturidade funcional.

Quanto à organização estrutural hepática, encontramos nos três períodos gestacionais analisados um padrão alveolar, bastante esponjoso, com inúmeras lacunas compatíveis com os espaços sinusoidais delimitados por cordões de hepatócitos e por uma matriz extracelular de baixa densidade e pouco colagênica, criando um ambiente de baixa resistência propício para a proliferação e diferenciação das células hematopoéticas. Shiojiri e Sugiyama (2004) descreveram padrão estrutural semelhante, tanto em camundongos a partir do 12,5 dpc (dia pós-coito), quanto em humanos a partir da 5ª semana de gestação.

Na amostra analisada, os locais de maior concentração de fibras colágenas foram encontrados na região capsular e subcapsular, bem como, em torno da parede dos vasos dos espaços-porta em arranjo concêntrico. A quantidade de fibras colágenas aumentou progressivamente com avanço da idade gestacional, de forma que nas amostras do 9º mês observou-se maior concentração destas fibras, fato justificado pela maior birrefringência das mesmas quando coradas pelo picrosírius e visualizadas com auxílio de microscopia de luz polarizada. Tal achado foi também confirmado pela coloração com tricromo de Masson, pela qual se observou a marcação em tom de azul em torno das fibras colágenas tipo I na parede dos vasos dos espaços-porta, exibindo maior intensidade nas amostras do 6º e 9º mês de gestação. Estes achados são indicativos de aumento da maturidade funcional dos hepatócitos e ganho de resistência do estroma hepático.

Ao final do período gestacional foi verificada uma diminuição do tecido hematopoético. De acordo com este fato, segundo Kinoshita e Miyajima (2002), isso pode ser atribuído à síntese de uma glicoproteína pertencente à família da IL-6, chamada de oncostatina M (OSM), produzida por células hematopoéticas $CD45^{+}$, que promove a maturação funcional do hepatócitos e a

alteração da composição da matriz extracelular, que se torna mais colagênica e rica em proteoglicanos, quando então se instala um novo microambiente hepático com uma trama colagênica mais exuberante, devido à necessidade de um estroma de sustentação mais resistente para suportar o crescimento gradativo do fígado. Para Sánchez et al. (2000) e Silva (2007), adicionalmente, os hepatócitos em maturação produzem fibronectina, a qual é encontrada nos componentes vasculares, como na parede das veias e dos sinusoides, assim como é responsável pela maturidade trabecular dos hepatócitos, ou seja, pela maior densidade dos cordões hepáticos e seu arranjo radial em relação à veia centrolobular.

Pode-se concluir que ocorreu uma maior concentração de fibras colágenas em torno dos vasos dos espaços-porta, em arranjo concêntrico. O grau de colageinização e de birrefringência das fibras colágenas variou de intensidade, com o aumento da idade gestacional. Assim, dessa maneira, os achados microscópicos parecem indicativos de que a hematopoese hepática, para se desenvolver, necessita de um microambiente com uma matriz extracelular mais escassa e menos colagênica.

Referências

Arias MA, Stewart A (2002) Molecular principles of animal development. Oxford University press, Oxford. p410.

Bedossa P, Paradis V (2003) Liver extracellular matrix in health and disease. Journal of Pathology 200: 504-51.

Behmer OA, Tolosa EMC, Freitas Neto AG (1976) Manual de técnicas para microscopia normal e patológica. São Paulo: Edusp, p. 239.

Chagraoui J, Lepage-Noll A, Anjo A, Uzan G, Charbord P (2003) Fetal liver stroma consists of cells in epithelial-to-mesenchymal transition. Blood, 101(8):2973-82.

Chow A, Frenette PS (2014) Origin and development of blood cells. In: Wintrobe's Clinical Hematology. 13th ed, Philadelphia: Lippincott Willians&Wilkins.

Cumano A, Godin I (2007) Ontogeny of the hematopoietic system. Annu Rev Immunol; 25:745-785.

Dierzak E, Speck NA (2008) Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells. Nat Immunol; 9(2):129-136.

Egawa T, Kawabata K, Kawamoto H, Amada K, Okamoto R et al. (2001) The earliest stages of B cell development require a chemokine stromal cell-derived factor/pre-B cell growth-stimulating factor. Immunity. 15(2):323-34.

Junqueira LCU, Bignolas G, Bretani R (1979) Picrossirius staining plus polarization microscopy, specific methods of collagen detection in tissue section. Histochem. J., v. 11:447-55.

Junqueira BCV, Carneiro J (2012) Biologia Celular e Molecular. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

Junqueira LCU (2017) Órgãos associados ao trato digestivo. In: Histologia Básica: texto e atlas. 13ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Kinoshita T, Miyajima A (2002) Cytokine regulation of liver development. Biochim. Biophys. Acta, 1592(3):303-12.

Luna ACL, Passos CC, Ferreira AO, Miglino MA, Guerra RR (2012) Caracterização histológica do desenvolvimento hepático em diferentes estágios embrionários de ratos. *Histological characterization of the liver development at different embryonic stages of rats.* CR-2012-0850.R2. Ciência Rural, Santa Maria.

Marxen S, Lacerda-Neto JC de, Moraes JRE de, Ribeiro G, Queiroz-Neto A (2003) Efficacy of polysulphated glycosaminoglycan in the intratendinous treatment of experimental equine tendinitis. Braz. J. morphol. Sci., V.20, n.1, p. 43-46.

Sánchez A, Alvarez AM, Pagan R, Roncero C, Vilaro S et al. (2000) Fibronectin regulates morphology, cell organization and gene expression of rat fetal hepatocytes in primary culture. J. Hepatol., 32(2):242-50.

Shiojiri N, Sugiyama Y (2004) Immuno localization of extracellular matrix components and integrins during mouse l iver development. Hepatology, 40(2):346-55.

Silva JPA (2007) Dissertação apresentada para obtenção de grau de Mestre em Ciências Morfológicas do Departamento de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz. FIOCRUZ – RJ, 154p.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia – **CNPq** e à Universidade Federal de Sergipe pelo apoio à Iniciação Científica. Bruna Oliveira Correia Aquino foi bolsista voluntária pelo Programa Institucional de Iniciação Científica – **PIBIC/PICVOL/UFS.**

Conflito de Interesse

Os autores declaram não existir nenhum conflito de interesse.

Contribuições dos autores

O desenho da pesquisa, todos os experimentos e observações foram conduzidos por VLCF e AFS. As dissecações foram relizadas por JAA. Todas as colorações foram realizadas por BOCA, CSP, VASA e DSN. O manuscrito foi escrito por VLCF, ASF, FPR e BOCA e todos os autores forneceram revisões críticas do manuscrito.

ANEXOS

LEI N° 8.501, DE 30 DE NOVEMBRO DE 1992

Dispõe sobre a utilização de cadáver não reclamado, para fins de estudos ou pesquisas científicas e dá outras providências.

O VICE-PRESIDENTE DA REPÚBLICA, no exercício do cargo de **PRESIDENTE DA REPÚBLICA** faço saber que o Congresso Nacional decreta e eu sanciono a seguinte Lei:

Art. 1° Esta Lei visa disciplinar a destinação de cadáver não reclamado junto às autoridades públicas, para fins de ensino e pesquisa.

Art. 2° O cadáver não reclamado junto às autoridades públicas, no prazo de trinta dias, poderá ser destinado às escolas de medicina, para fins de ensino e de pesquisa de caráter científico.

Art. 3° Será destinado para estudo, na forma do artigo anterior, o cadáver:

I -- sem qualquer documentação;

II -- identificado, sobre o qual inexistem informações relativas a endereços de parentes ou responsáveis legais.

§ 1° Na hipótese do inciso II deste artigo, a autoridade competente fará publicar, nos principais jornais da cidade, a título de utilidade pública, pelo menos dez dias, a notícia do falecimento.

§ 2° Se a morte resultar de causa não natural, o corpo será, obrigatoriamente, submetido à necropsia no órgão competente.

§ 3° É defeso encaminhar o cadáver para fins de estudo, quando houver indício de que a morte tenha resultado de ação criminosa.

§ 4° Para fins de reconhecimento, a autoridade ou instituição responsável manterá, sobre o falecido:

a) os dados relativos às características gerais;

b) a identificação;

c) as fotos do corpo;

d) a ficha datiloscópica;

e) o resultado da necropsia, se efetuada; e

f) outros dados e documentos julgados pertinentes.

Art. 4° Cumpridas as exigências estabelecidas nos artigos anteriores, o cadáver poderá ser liberado para fins de estudo.

Art. 5° A qualquer tempo, os familiares ou representantes legais terão acesso aos elementos de que trata o § 4° do art. 3° desta Lei.

Art. 6° Esta Lei entra em vigor na data de sua publicação.

Art. 7° Revogam-se as disposições em contrário.

Brasília, 30 de novembro de 1992; 171° da Independência e 104° da República.

ITAMAR FRANCO

Maurício Corrêa

Unit
UNIVERSIDADE TIRADENTES

Aracaju, 12 de junho de 2018.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins, que os Projetos: "**Análise morfológica e morfométricamente da matriz extracelular do ligamento suspensor da glândula tireóide (ligamento de Berry) em fetos humanos" e " Análise dos proteoglicanos e das fibras elásticas e reticulares da matriz extracelular do ligamento superior da glândula tireóide (ligamento de Berry) em fetos humanos"** , foram desenvolvidos com o uso de cadáveres pertencentes ao Laboratório de Anatomia da Universidade Tiradentes – UNIT, que foram adquiridos de acordo com a Lei nº. 8.501, de 30/11/1992, que dispõe sobre utilização de cadáver não reclamado, para fins de Estudos ou Pesquisas Cientificas.

Universidade Tiradentes – UNIT
Hesmoney Ramos de Sta. Rosa
Diretor da Área da Saúde

Prof. Dr. Hesmoney Ramos de Santa Rosa
Diretor da Área da Saúde da Universidade Tiradentes - Unit

Campus Aracaju Centro - Rua Lagarto, 264 - Bairro Centro - Fone: (79) 3218-2100 - Fax: (79) 3218-2200 - CEP 49010-390 - Aracaju - SE - Brasil.
Campus Aracaju Farolândia - Av. Murilo Dantas, 300 - Farolândia - Fone: (79) 3218-2100 - Fax: (79) 3218-2200 - CEP 49030-270 - Aracaju - SE - Brasil. - Home Page: www.unit.br E-mail: drh@unit.br