

DESENVOLVIMENTO EMBRIOLÓGICO ÓSSEO E CARTILAGÍNEO EM BOVINOS*

Hugo Andrés Gutiérrez Trujillo¹, Miryan Lanca Vilia Alberto², Sonia Elisabete Alves de Lima Will²⁺, Maria Letícia Baptista Salvadori¹, José Roberto Kfoury Jr.³, Carlos Eduardo Ambrósio⁴ e Maria Angélica Miglino³

ABSTRACT. Trujillo H.A.G., Alberto M.L.V., Will S.E.A.de L., Salvadori M.L.B., Kfoury Jr. J.R., Ambrósio C.E. & Miglino M.A. [**Embryological development of bone and cartilage in cattle**]. Desenvolvimento embriológico ósseo e cartilágneo em bovinos. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 34(4):361-367, 2012. Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Avenida Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº 87, Cidade Universitária, São Paulo, SP 05508-270, Brasil. E-mail: soniawill@usp.br.

The skeletal system comes from cells of mesoderm and neural crest. Bone is formed from two types of connective tissue, cartilage and mesenchyme. The endochondral ossification begins on a mold of hyaline cartilage, with a format similar to the bone that will arise, being responsible for the formation of short and long bones. So we feel will be of great value to a study based in the normal development of the members of bovine embryos and fetuses from cows raised on natural environment, through studies on light microscopy and transmission electron microscopy. The results obtained in this study, we found that the mesenchymal cells differentiate into chondroblasts to form embryos with CR of 20.0 mm, which appear in primary cartilaginous molds embryos with CR of 25.0 mm and forelimb presents in format and small plate of hind limb bud embryo with CR of 28.0 mm. There is also the presence of mold hyaline cartilage, perichondrial tissue chondroblasts and around the fetus with CR 30.0 mm, and fetuses CR 76.0 mm chondrocyte death occurs in the largest area of calcification and cytoplasmic matrix.

KEY WORDS. Endochondral ossification, hyaline cartilage, bovine embryo, fetal bovine.

RESUMO. O sistema esquelético origina-se de células do mesoderma e da crista neural. O osso se forma a partir de dois tipos de tecido conjuntivo, o mesênquima e a cartilagem. A ossificação endocondral tem início sobre um molde de cartilagem hialina, com formato semelhante ao osso que irá se originar, sendo o principal responsável pela formação dos ossos curtos e longos. Assim, julgamos ser

de grande valia um estudo embasado no desenvolvimento normal dos membros de embriões e fetos bovinos provenientes de vacas criadas em ambiente natural, através de estudos em microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão. Através dos resultados obtidos no presente estudo, foi visto que as células mesenquimais diferenciam-se para formação de condroblastos em embriões com CR

*Recebido em 29 de julho de 2012.

Aceito para publicação em 31 de agosto de 2012.

¹ Médico-veterinário, *M.Cienc.Anat.* Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres (PPGADS), FMVZ, USP, Avenida Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº 87, Cidade Universitária, São Paulo, SP 05508-270, Brasil. E-mails: ml.salvadori@usp.br, trujillo@usp.br, - bolsistas CAPES e FAPESP.

² Biólogo, *M.Cienc.Anat.* Programa Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP). Avenida Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº 87, Cidade Universitária, São Paulo, SP 05508-270. *Autor para correspondência, E-mail: soniawill@usp.br. E-mail: miryan.bio@ig.com.br - bolsistas CAPES e FAPESP.

³ Médico-veterinário, *DSc.* PPGADS, FMVZ, USP, Avenida Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº 87, Cidade Universitária, São Paulo, SP 05508-270. E-mails: jrobertok@usp.br, miglino@usp.br

⁴ Médico-veterinário, *DSc.* Departamento de Ciências Básicas, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, USP, Av. Duque de Caxias Norte, 225, Pirassununga, SP 13635-900, Brasil. Email: ceambrosio@usp.br

de 20,0 mm, que moldes cartilagosos primordiais aparecem em embriões com CR de 25,0 mm e o membro torácico apresenta-se em formato de placa e pequeno brotamento do membro pélvico em embriões com CR de 28,0 mm. Existe também a presença de molde cartilaginoso hialino, condroblastos e tecido pericondral ao redor do feto com CR de 30,0 mm e, em fetos com CR de 76,0 mm ocorre a morte de condrócitos na maior área de calcificação e matriz citoplasmática.

PALAVRAS-CHAVE. Ossificação endocondral, cartilagem hialina, embrião bovino, feto bovino.

INTRODUÇÃO

O sistema esquelético origina-se de células do mesoderma e da crista neural. Na formação da notocorda e do tubo neural, o mesoderma intra-embriônico lateral a estas estruturas se espessa, formando duas colunas de mesoderma paraxial. Ao final da terceira semana, estas colunas tornam-se segmentadas em blocos de tecido mesodérmico, os somitos. Externamente, os somitos aparecem como elevações arredondadas ao longo da superfície dorsolateral do embrião (Danilova 1963, Moore & Persaud 2004, Noden & De Lahunta 1990). Os primeiros somitos formam-se por volta do 19º dia de gestação nos bovinos (Evans & Sack 1973, Hafez & Hafez 2004) e sua porção medial se desorganiza e invade as células esclerotomais, migrando medialmente para circundar a notocorda (Gasser 1979).

O broto dos membros é formado quando o mesoderma somático induz a proliferação da placa mesodérmica lateral, originando as primeiras condensações de células mesenquimais que constituíram o modelo dos futuros ossos (Larsen 1997).

O osso se forma a partir de dois tipos de tecido conjuntivo, o mesênquima e a cartilagem. Do mesmo modo que a cartilagem, o osso é constituído por células e uma substância intercelular orgânica: a matriz óssea, a qual é constituída por fibrilas de colágeno contidas em um componente amorfo (Moore & Persaud 2004).

Larsen (1997) sugere ainda que o processo de ossificação inicia-se numa região do osso denominada centro de ossificação primária. Inicialmente células mesenquimais do pericôndrio diferenciam-se em osteoblastos, em resposta a um fator de crescimento ósseo. Estas células secretam matriz de sais de cálcio e formam um colar ósseo primário.

A ossificação dos ossos dos membros começa ao final do período embrionário e, daí em diante, ne-

cessita do suprimento materno de cálcio e fósforo. A região de formação óssea no centro da diáfise de um osso longo constitui o centro primário de ossificação, diferentemente das epífises que ossificam mais tarde (Fletcher & Weber 2004, Moore & Persaud 2004, Sadler 2004).

A cartilagem cresce devido à diferenciação de fibroblastos. Daniels & Solursh (1991) estudaram a modulação da condrogênese pelo citoesqueleto e da matriz extracelular e acrescentam que durante os eventos iniciais *in vivo*, o mesênquima precursor forma condensações celulares adquirindo um formato arredondado. Daí surgem os condrócitos alinhados dentro de lacunas, formados pela secreção da matriz extracelular da cartilagem, incluindo secreção de moléculas de proteoglicanas, colágeno tipo II e glicoproteínas como a condroitina. (Daniels & Solursh 1991, Junqueira & Carneiro 2004, Montenegro et al. 2004).

Na zona de calcificação, os condrócitos sofrem degeneração, ocorrendo depósitos de fósforo no interior das vesículas (que surgem por brotamento das superfícies laterais dos condrócitos) e, posteriormente se extravasam infiltrando nos interstícios das colunas de célula adjacentes (Pizauro Jr. et al. 2004).

A cartilagem é fragmentada pela invasão de tecido conjuntivo vascular proveniente do perioste. Algumas células invasoras se diferenciam em células hemopoéticas, responsáveis pela formação das células do sangue e da medula óssea. Outras células invasoras se diferenciam em osteoblastos, que depositam matriz óssea sobre as espículas de cartilagem calcificada. Este processo avança em direção às epífises ou extremidades do osso. As espículas ósseas são remodeladas pela ação dos osteoclastos e osteoblastos (Moore & Persaud 2004, Sadler 2004).

Assim sendo, é de grande importância um estudo embasado no desenvolvimento normal dos membros de embriões e fetos bovinos provenientes de vacas criadas em ambiente natural, gerando assim um comparativo para o entendimento das inúmeras deformidades e anomalias mais frequentes, ocorridas em animais nascidos de vacas submetidas às variadas condições climáticas, pastagem, manejo; ou genéticas, como fertilização *in vitro* e transferência nuclear.

MATERIAL E MÉTODO

As coletas de úteros bovinos gestantes foram realizadas em frigoríficos e abatedouros da região de Poços de Caldas-MG. Obteve-se uma coleta de 10

embriões e 8 fetos, com até 10 semanas gestacional. Bioética n.1105/2007. Os úteros foram abertos, os embriões e fetos fixados em solução de formol tamponado a 10% e líquido de Bouin. O material coletado foi transportado para Laboratório de Anatomia e Histologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/FMVZ – USP.

Os períodos gestacionais foram estimados conforme metodologia preconizada por Evans & Sack (1973), Noden & De Lahunta (1990) e Winters et al. (1942), com mensurações de distância occípito-sacral da cabeça, tomando como referência a crista nugal numa extremidade e a última vértebra sacral na extremidade oposta (Crow-Rump/CR).

Foram realizados cortes consecutivos de 5 a 6mm de espessura, corados por métodos de rotina: Hematoxilina e Eosina e Von Kossa.

Para a microscopia eletrônica de transmissão (MET), as amostras foram previamente fixados em glutaraldeído 2,5%. Ao término da fixação o material foi lavado em tampão fosfato de sódio a 0,1M, PH 7,4 por três vezes durante 10 minutos e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%⁵ por 1 hora. Após novas lavagens em tampão fosfato os fragmentos de embriões foram desidratados em álcool etílico a

50%, 70%, 90%, 100% e lavados em óxido de propileno. De 12 a 16 horas os fragmentos permaneceram sob-rotação a 1:1 de óxido de propileno e resina. Na sequência, essa mistura foi substituída por resina pura por 4 a 5 horas. Após este período foram embebidas com resina pura em moldes. Uma vez incluídos, permaneceram em estufa a 69°C por 72 horas para consolidar a polimerização da resina. Os blocos foram cortados em ultra-micrótomo. Cortes de 1mm foram corando à quente com solução de borato de sódio a 1% em água destilada, contendo 0,25% de azul de Toluidina para observação ao microscópio de luz. Os cortes de cerca de 60nm de espessura foram colhidos em telas de cobre e contrastados pelo acetato de uranila 2% em água destilada por 5 minutos e pelo citrato de chumbo 0,5% em água destilada durante 10 minutos.

RESULTADOS

Nos resultados obtidos com a microscopia de luz foi verificado que os embriões bovino com CR de 25 mm, estes apresentam condensações de células mesenquimais nos brotos pélvicos e membros torácicos (Figura 1A). Já nos fetos com CR de 30 mm, ambos apresentavam moldes cartilagosos (Figura 1D).

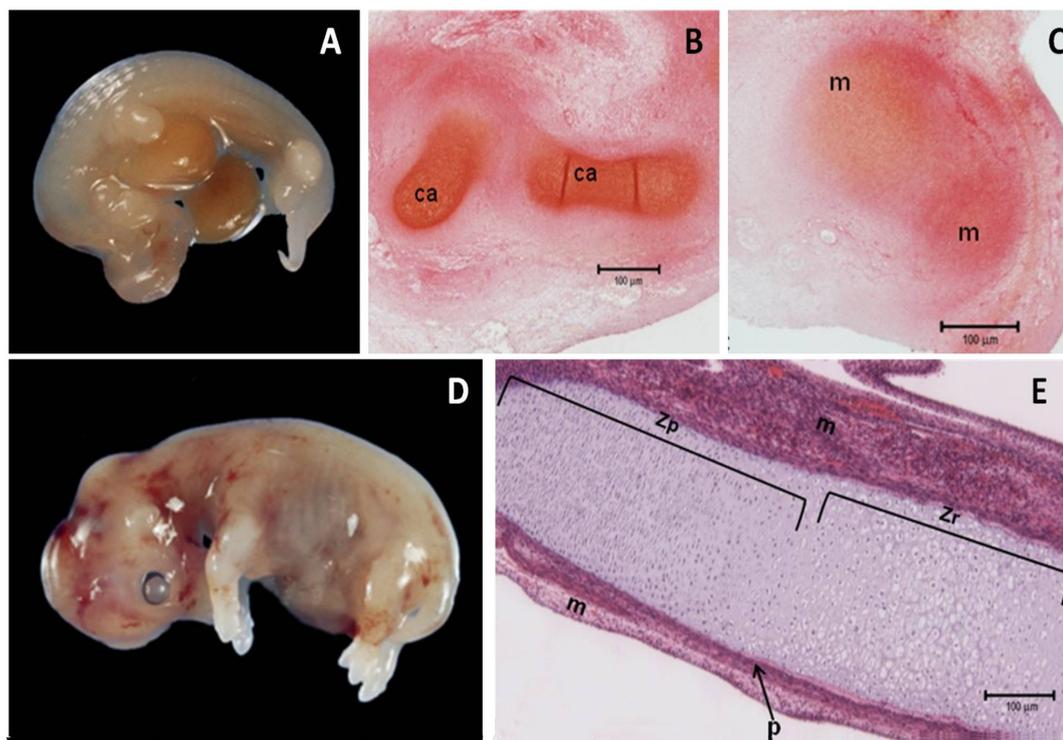


Figura 1. (A) Fotografia de embrião bovino (CR= 25 mm), (B) moldes cartilagosos (ca) para formação do membro torácico, circundado por mesênquima condensado (mc), (C) mesênquima (m) precursor para formação de molde cartilaginoso de membro pélvico. Coloração: Von Kossa, (D) feto bovino (CR= 30 mm) (E) molde cartilaginoso para formação do membro, circundado por mesênquima (m). Notar pericôndrio (p) e molde de cartilagem dividido em duas áreas diferentes: Zona de repouso (Zr) e Zona de proliferação (Zp). Coloração: HE.

Na fotomicrografia do feto com CR de 50 mm, foram observados membros em desenvolvimento, com depósitos de cálcio e potássio que aparecem primeiro no centro (diáfise) do osso longo se espalhando para as extremidades (epífises) (Figura 2A). No feto com CR de 76 mm, viu-se o aumento da área de depósito de cálcio e fósforo, tornando-se mais próximas das epífises dos ossos longos (Figura 2B).

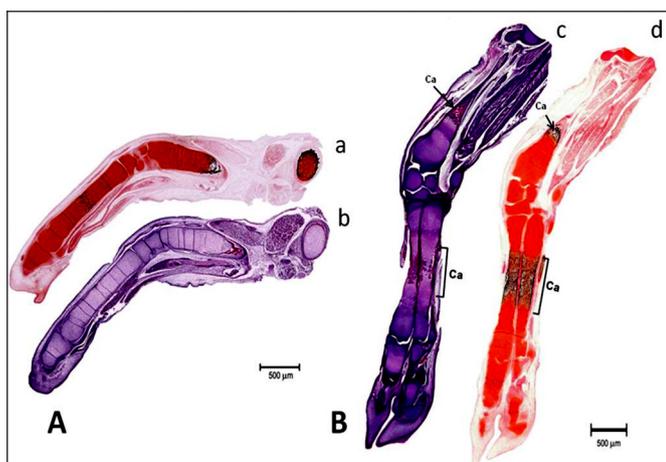


Figura 2. (A) Fotomicrografia de molde cartilaginosa em ossificação endocondral de feto bovino (CR = 51 mm), observar nos membros em desenvolvimento com depósitos de cálcio e Potássio. Coloração preta mostra área em início de calcificação dos moldes. (B) (CR = 76 mm), observar maior área em calcificação (Ca) na diáfise dos moldes cartilaginosa de osso longo, estando mais próximas da epífise. Coloração (a, d) Von Kossa e (b, c) HE.

Microscopia eletrônica de transmissão

Condensações de células mesenquimais formam centros cartilagosos que vão se diferenciando até o início da ossificação. Embriões com CR de 9 mm e idade gestacional estimada de três semanas apresentam células organizadas uniformemente, próximas umas as outras constituindo tecido mesenquimal condensado. Observamos pequena área de matriz extracelular, células com núcleo alongado, nucléolo e grânulos de cromatina dispersos por todo o núcleo (eucromatina) e pequenas condensações (heterocromatina). Dentre as organelas citoplasmáticas evidenciamos retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias (Figura 3A).

Por volta da quarta semana gestacional (CR de 20 mm) as células mesenquimais estão diferenciadas em condroblastos passando a apresentar formato mais globoso em alguns pontos e maior área de matriz extracelular. Notamos ainda que o núcleo acompanha o formato da célula e o nucléolo localiza-se próximo ao envoltório nuclear, contendo também

grânulos de cromatina, já no citoplasma observamos retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e estruturas eletrodensas (Figura 3B).

As células mesenquimais tornam-se mais globosas e se agrupam de maneira que constituem dois moldes cartilagosos primordiais, circundados por células mais alongadas e com pequena área de matriz extracelular em embriões com CR de 25 mm, próximo à sexta semana gestacional. Observamos retículo endoplasmático rugoso mais extenso e projeções de membrana plasmática conferindo a comunicação entre células. Na matriz extracelular estavam presentes fibras colágenas (Figuras 3D, 3F).

Fetos com CR de 30 mm (sétima semana gestacional) apresentam molde cartilaginosa hialino precursor na formação de osso longo. Pudemos observar condroblastos com aspecto globoso e espaço entre eles, sem apresentarem interdigitações de membrana. Os núcleos possuem formato estrelado, o citoplasma contém retículo endoplasmático rugoso em maior quantidade quando comparado à célula mesenquimal. Ao redor da matriz cartilaginosa visualizamos pericôndrio, com células alongadas e pequena área de matriz extracelular (Figura 3C).

Cartilagem hipertrófica foi observada em fetos com CR de 76 mm (décima semana gestacional). Os condrocitos apresentaram formato alongado, com projeções de membrana proporcionando aspecto estrelado. Extensos retículos endoplasmáticos rugosos foram encontrados no citoplasma em grande quantidade, quando comparados aos condroblastos e presença de estruturas eletrodensas (Figura 3E).

DISCUSSÃO

As primeiras condensações de células mesenquimais surgem quando o mesênquima somático induz a proliferação da placa mesodérmica lateral (Larsen 1997).

A cartilagem se desenvolve a partir do mesênquima e aparece pela primeira vez nos embriões durante a quinta semana gestacional (Fletcher & Weber 2004, Moore & Persaud 2004). Em nossos estudos, ao redor da quarta semana gestacional (CR de 20 mm), as células mesenquimais passam a apresentar um formato mais globoso em algumas áreas, o núcleo acompanha o formato da célula e o nucléolo localiza-se próximo ao envoltório nuclear, no citoplasma observamos retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e estruturas eletrodensas. Provavelmente, estas células mesenquimais estão diferenciando-se para formação de condroblastos.

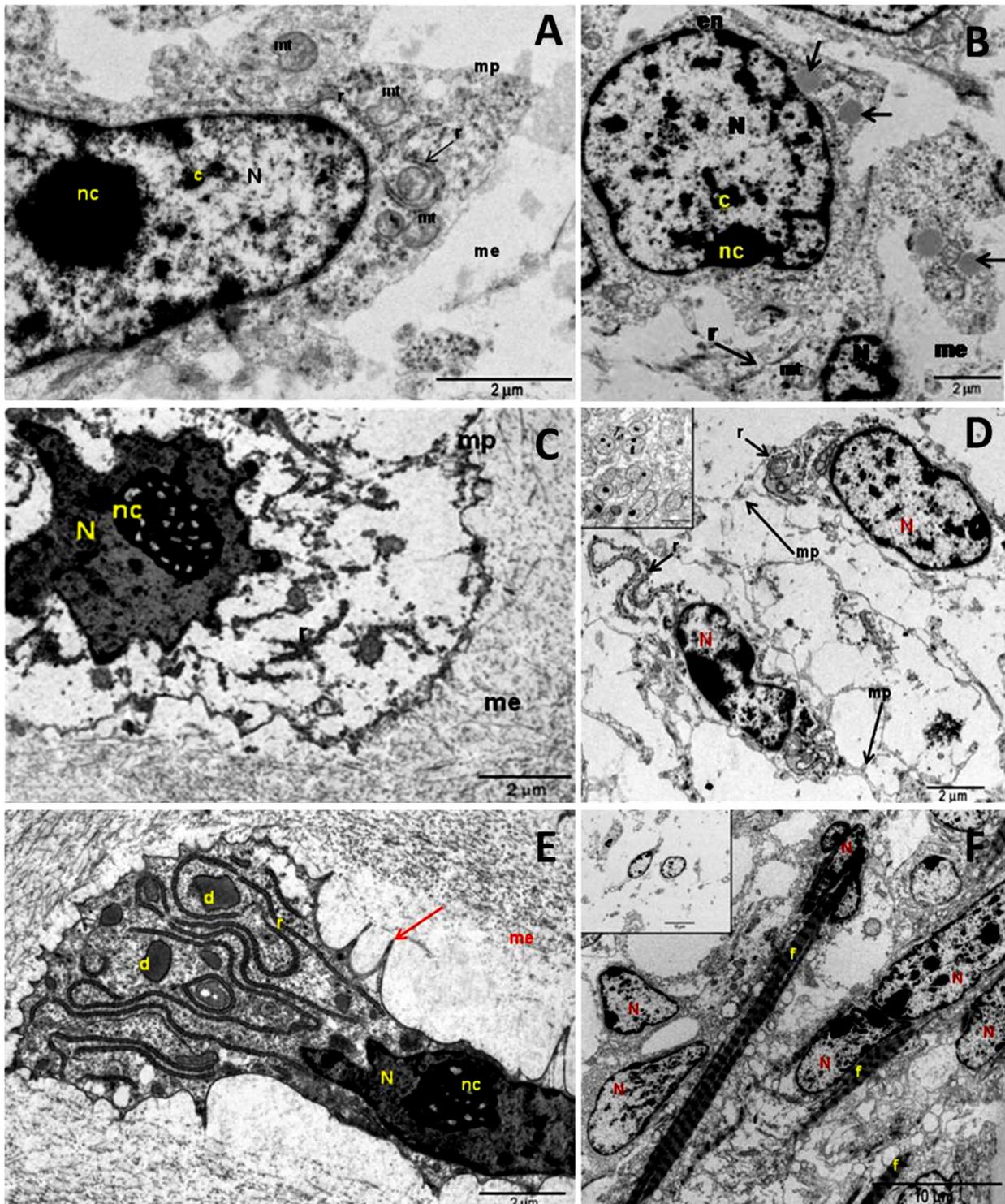


Figura 3. (A) Eletromicrografia de mesênquima precursor de tecido cartilágneo em embrião bovino (CR = 12,0 mm), notamos a presença de um núcleo (N) alongado, acompanhando o formato da célula, nucléolo (nc) e grânulos cromatina (c) dispersos por todo o núcleo (eucromatina) contendo pequenas condensações (heterocromatina). No citoplasma verificamos a presença de retículo endoplasmático rugoso (r), mitocôndrias (mt), membrana plasmática (mp) delimitando meio interno da matriz extracelular (me). (B) (CR = 20 mm), (nc) próximo ao envoltório nuclear (en), estrutura eletrodensa (seta) e matriz extracelular (me). (C) (CR = 30,0 mm), Condroblasto em maior aumento. Notar (N) estrelado e (nc). No citoplasma da célula apresenta (r), estando delimitado da (me) pela (mp) contendo pequenas projeções. (D) (CR = 25,0 mm). (E) (CR = 76,0 mm), Eletromicrografia de condrocito. Observar: retículo endoplasmático rugoso, estruturas eletrodensas (d). Membrana plasmática apresenta projeções dando aspecto estrelado a célula (seta), separando-a do meio extracelular (F) (CR = 25,0 mm). Observar a presença de fibras colágenas (f).

Em embriões com CR de 25 mm (sexta semana gestacional) as células estão ainda mais arredondadas, e se agrupam para constituir dois moldes cartilagosos primordiais, circundados por células mais alongadas e pequena área de matriz extracelular; vindo a confirmar os achados de Fletcher & Weber (2004) e Moore & Persaud (2004) ao descreverem que o mesênquima se condensa para constituir os centros de formação de cartilagem, as células mesenquimais proliferam-se e tornam-se arredondadas.

Acrescentam ainda que as células formadoras de cartilagem (condroblastos) secretam fibras de colágeno e substância fundamental da matriz, subsequentemente fibras colágenas são depositadas na substância intercelular, e o modelo cartilaginoso é cercado por tecido fibroso pericondral (Fletcher & Weber 2004, Moore & Persaud 2004). Nossos resultados revelam presença de fibras colágenas na matriz extracelular juntamente aos condroblastos, vindo confirmar os achados dos autores citados acima, acrescentando ainda que a membrana plasmática da célula apresentava projeções, conferindo comunicação celular.

Células com formato alongado e pequena área de matriz extracelular circundam os moldes cartilagosos primordiais, o tecido fibroso pericondral, e de acordo com Junqueira & Carneiro (2004) eles são responsáveis pela diferenciação de célula mesenquimal em condroblasto, promovendo o crescimento da cartilagem. Isso ocorre quando as células periféricas do pericôndrio transformam-se gradualmente em células arredondadas, os condroblastos.

A partir da sétima semana gestacional, fetos com CR de 30 mm já apresentam molde cartilaginoso hialino, precursor na formação de osso longo. Nossos achados mostram condroblastos com aspecto globoso e ausência de interdigitação de membrana. O núcleo possui formato em estrela e matriz citoplasmática contendo retículo endoplasmático rugoso em maior quantidade quando comparado à célula mesenquimal precursora, o que talvez indique que a célula aumente sua atividade para originar células alongadas, os condrócitos.

Circundando a matriz cartilaginosa encontramos pericôndrio, formados pelo mesênquima superficial. Sua função é nutrição, oxigenação e eliminação de metabólitos da cartilagem, porque neles estão localizados os vasos sanguíneos inexistentes no tecido cartilaginoso, além de ser uma fonte de

novos condrócitos para o crescimento da cartilagem (Junqueira 2005).

Cartilagem hipertrófica que marca o início da ossificação endocondral foi observada em fetos com CR de 76 mm, décima semana gestacional. Os condrócitos apresentaram forma alongada, com projeções de membrana proporcionando aspecto estrelado, o que provavelmente se deve a uma retração durante o processamento da técnica. No entanto, acredita-se que as saliências aumentem a superfície de contato, facilitando trocas com meio extracelular, sendo importante para nutrição da célula (Junqueira 2005). Daniels & Solursh (1991), Montenegro et al. (2004) e Junqueira e Carneiro (2004), acrescentam ainda que os condrócitos são formados pela secreção da matriz extra celular da cartilagem, sendo responsáveis pela secreção de colágeno tipo II principalmente, proteoglicanas e glicoproteínas.

A matriz citoplasmática dos condrócitos apresentou extensos retículos endoplasmáticos rugosos e presença de estruturas eletrodensas. Brighton & Fetter (1995) confirmam nossos achados e acrescentam a presença de mitocôndrias na matriz citoplasmática.

Macroscopicamente, evidenciamos um pequeno broto do membro pélvico ao passo que o broto do membro torácico apresentava-se em formato de “placa” em embriões com CR de 25 mm (quarta semana gestacional). Histologicamente encontramos condensações de células mesenquimais nos brotos dos membros pélvicos, e tecido cartilaginoso nos brotos do membro torácico. Nossos achados confirmam os estudos de Winters et al. (1942) & Evans & Sack (1973) ao afirmarem que o broto do membro torácico aparece no 24º dia de gestação nos bovinos e pélvicos tornam-se visíveis no 27º dia. Aos 30 dias, as extremidades dos membros apresentaram em forma de placa, se especializando para o período fetal.

Com os dados obtidos, acreditamos que este trabalho poderá contribuir para o aumento do conhecimento morfológico de inúmeras deformidades e anomalias que acometem os bovinos.

CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos no presente estudo, julgamos poder concluir que as células mesenquimais diferenciam-se para formação de condroblastos em embriões com CR de 20 mm, que moldes cartilagosos primordiais aparecem em embriões com CR de 25 mm, o membro torácico

apresenta-se em formato de placa e há um pequeno brotamento do membro pélvico em embriões com CR de 30 mm.

Existe também, a presença de molde cartilaginoso hialino, condroblastos e tecido pericondral ao redor do feto com CR de 30 mm, e em fetos com CR de 76 mm ocorre a morte de condrocitos na maior área de calcificação e matriz citoplasmática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brighton T.C. & Fetter A.W. Normal bone function. IVIS, 1985. Disponível em: <http://jdfguhgvj>. Acesso em: 9 fev 2007.
- Daniels K. & Solursh M. Modulation of condrogenesis by the cytoskeleton and extracellular matrix. *J. Cell. Sci.*, 100:249-252, 1991.
- Danilova L.V. Somite differentiation in the Karakul sheep embryo. *Fed. Proc.*, 22:T677-T689, 1963.
- Evans H.E. & Sack W.O. Prenatal Development of Domestic and Laboratory Mammals: Growth Curves, External Features and Selected References. *Anat. Histol. Embryol.* 2:11-45, 1973.
- Fletcher T.F. & Weber A.F. *Veterinary developmental anatomy*. 1ª ed. Minnesota: [s. n.], 2004, 76p.
- Gasser R.F. Evidence that sclerotomal cells do not migrate medially during normal embryonic development of the rat. *Am. J. Anat.*, 154:509-524, 1979.
- Hafez E.S.E. & Hafez B. *Reprodução animal*. 7ª ed. Manole, Rio de Janeiro, 2004, 513p.
- Junqueira L.C., Carneiro J. *Histologia básica*. 10ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004, 388p.
- Junqueira L.C.U. *Biologia estrutural dos tecidos histologia*. 1ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2005, 225p.
- Larsen W.J. *Human embryology*. 2ª ed. Churchill Livingstone, Hong Kong, 1997, 512p.
- Montenegro M.A., Rojas M. & Domínguez S. Osteogénesis comparativa de los cartílagos secundários de la clavícula y placas epifisarias de los huesos largos. *Int. J. Morphol.*, 22:201-206, 2004.
- Moore K.L. & Persaud T.V.N. *Embriologia clínica*. 6ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004, 609p.
- Noden D.M. & De Lahunta A. *Embriología de los animales domésticos* 1ª ed. Acribia, Zaragoza, 1990, 399p.
- Pizauro Jr. J.M., Ciancaglioni P. & Macari M. Discondroplasia tibial: mecanismos de lesão e controle. *Rev. Bras. Cienc. Avic.*, 4:125-128, 2004.
- Sadler T.W. *Langman embriologia médica*. 9. ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004, 347p.
- Winters L.M., Green W.W. & Comstock R.E. Prenatal development of the bovine. *Ag. Expt. Tech. Bull.*, 151:1-50, 1942.