

COLORAÇÃO DE PICROSIRIUS PARA IDENTIFICAÇÃO QUALITATIVA DE FIBRAS COLÁGENAS TIPO I NO COXIM DIGITAL EQUINO

**GINO LUIGI BONILLA LEMOS PIZZI¹; ANA LUISA SCHIFINO VALENTE²;
SANDRA MARA DA ENCARNAÇÃO FIALA RECHSTEINER²; PAULA MOREIRA
DA SILVA²; PRISCILA FONSECA RIBEIRO²; CHARLES FERREIRA MARTINS³**

¹Universidade Federal de Pelotas – gino_lemos@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – schifinoval@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – sandrafiala@yahoo.com.br

² Universidade Federal de Pelotas – paulamoreiras@bol.com.br

² Universidade Federal de Pelotas – priscilafri@hotmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – martinscf68@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O coxim digital é uma das importantes estruturas presentes no interior do casco equino, sendo responsável pela absorção do impacto quando o animal apoia o membro sobre o solo, bem como pelo bombeamento de sangue dando estímulo ao retorno venoso do dígito (BOWKER *et al.*, 1998). Esta estrutura está localizada entre as cartilagens laterais da falange distal, dorsal à rãnilha e tecido epidérmico do casco (GUNKELMAN & HAMMER, 2017). Quando delgada, constitui-se da associação de tecido adiposo e elástico e, quando espessa, de tecido fibroso ou fibrocartilaginoso e elástico (BOWKER *et al.*, 1998). Por estar no interior do casco, o coxim tem íntima relação com o aparelho podotrocLEAR, que é um conjunto de estruturas ósseas, articulares, ligamentosas e tendíneas, capazes de permitir o funcionamento biomecânico da porção mais distal dos membros (RIBEIRO, 2013).

A estruturação histológica do coxim digital equino é semelhante à de outras espécies (RÄBER *et al.*, 2006), sendo composto de células adiposas, fibras elásticas e fibras colágenas que se organizam em um tecido conjuntivo denso não modelado, associado a tecido cartilaginoso, vasos e nervos (WILHELM *et al.*, 2005). Além da descrição anatômica, BOWKER *et al.* (1998) também descreveram os tecidos microscópicos constituintes do coxim na espécie equina, sendo uma das principais referências sobre a histologia dessa estrutura.

São escassos e recentes os estudos científicos envolvendo o coxim digital equino em termos de composição tecidual e sua correlação com características fenotípicas dos animais. FARAMARZI *et al.* (2017) investigaram as regiões axial (dividindo esta em proximal – mais localizada em região de talões e rãnilha – e distal – mais próxima à terceira falange e à sola do casco) e abaxial (medial e lateral). A região axial distal destaca-se pela grande quantidade de fibras colágenas em relação às demais, que, por sua vez, possuem moderada quantidade de tecido fibroelástico junto com ampla rede vascular, reforçando a hipótese do auxílio no bombeamento venoso, visto que vênulas são os vasos sanguíneos mais abundantes e com maior diâmetro no coxim digital. Em ambas as regiões abaxiais não há diferenças teciduais significativas entre si, sendo mais encontrados adipócitos e grandes quantidades de condrócitos, diferente das regiões axiais. Essa arquitetura tecidual não difere entre membros torácicos e pélvicos contralaterais (FARAMARZI *et al.*, 2017). Os autores citam que há necessidade de ampliar as investigações com propósito de identificar as transformações teciduais do coxim digital em animais de diferentes grupos genéticos, categorias, atividades esportivas, entre outras características.

Apesar de ser uma estrutura já estudada histologicamente através das técnicas de H&E, Van Gieson, Tricrômico de Masson e Weigert para identificação principalmente dos tecidos adiposo, fibroelástico, cartilaginoso e de fibras colágenas (BOWKER et al., 1998; FARAMARZI et al., 2017), incluindo avaliações quantitativas de feixes de fibras, nenhuma técnica de coloração foi realizada para diferenciação qualitativa dos tipos de fibras colágenas, visto que o colágeno tipo I organiza-se em bandas nos sentidos longitudinal e transversal e possui grande força tênsil. Suas fibras apenas têm capacidade de se deformarem cerca de 5% de seu comprimento, conferindo assim a essas fibras – e, consequentemente, ao coxim digital - maior absorção de impactos (EURELL & VAN SICKLE, 2006). Desta forma, o objetivo do presente estudo é descrever e definir se a técnica da coloração de Picrosirius na análise histológica qualitativa do coxim digital de equinos é determinante na identificação das fibras colágenas tipo I.

2. METODOLOGIA

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEa) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), sob número de aprovação 137/2019. O estudo foi realizado em duas etapas. A etapa inicial foi destinada à coleta das amostras e foi realizada em frigorífico dedicado exclusivamente ao abate de equinos, localizado no município de São Gabriel, no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. A segunda etapa foi dedicada ao processamento e análise das amostras, sendo realizada no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia, ambos pertencentes ao Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas.

As amostras foram obtidas de 60 equinos adultos (*Equus caballus*), sendo 21 machos e 39 fêmeas, com peso médio de $374,73 \pm 56,64$ kg. Todos os animais foram abatidos no frigorífico por concussão cerebral, seguida por secção da veia jugular, de acordo com método de insensibilização autorizado pelo MAPA. De cada indivíduo foram coletados um membro torácico e um pélvico após desarticulação em nível das articulações intercárpicas e intertársicas, sendo identificados e acondicionados em sacos plásticos e refrigerados em isopor com gelo para o transporte imediato até a cidade de Pelotas, RS.

Cada peça foi seccionada com uma serra elétrica de fita, em nível da coroa do casco, preservando as estruturas internas do mesmo, com o intuito de padronização proporcional das amostras. Posteriormente, cada casco foi submetido a uma secção sagital central, exatamente na linha mediana do casco, aqui denominada como eixo de apoio, para a obtenção de dois antímeros simétricos por peça. Por fim, esta estrutura foi removida por completo dos dois antímeros de cada casco (Figura 1).



Figura 1 – Vista abaxial de coxim digital equino de um antímero de casco de membro torácico esquerdo após sua remoção completa através de dissecação anatômica.

As amostras de coxim digital foram aparadas para padronizar as dimensões das peças histológicas em 5x5x5 mm, resultando em blocos de 5 mm³. As peças foram identificadas e acondicionadas individualmente em frasco de boca larga com tampa de rosca e capacidade para 12 ml de volume, adequada fixação em formol 10% durante 24 horas e processamento histológico para inclusão em parafina.

Para os cortes histológicos, foi utilizado micrótomo Leica® RM225. Os cortes foram seriados (três cortes por bloco) e posicionados um corte por lâmina. Cada lâmina foi submetida a coloração de Picrosirius. O protocolo de coloração das lâminas seguiu o descrito por RITTIÉ (2017). As imagens histológicas foram realizadas utilizando lente objetiva de 4x e ocular de 10x, totalizando um aumento de 40x. As imagens foram capturadas com microscópio da marca Nikon®, modelo Eclipse E200, acoplado à câmera digital Moticam, com resolução de cinco megapixels e software de captura Motic Image Plus 2.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As fibras colágenas do tipo I foram coradas em vermelho intenso, diferenciando-se de outros tecidos (como fibras elásticas e adipócitos). Na maior parte das lâminas, os feixes de fibras colágenas se encontravam unidos, dispostos transversalmente. As fibras colágenas tipo III foram encontradas na parede interior dos vasos, corando-se com tonalidade amarelo clara (Figura 2), que ficam esverdeadas quando na microscopia polarizada.

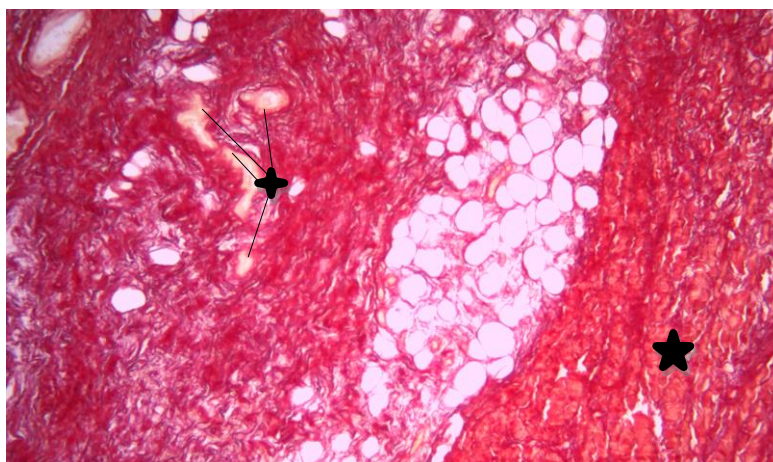


Figura 2 - Fibras colágenas tipo I coradas em vermelho intenso (*) e tipo III em amarelo-esverdeado no interior dos vasos (+). Aumento de 40x.

Para identificação das fibras colágenas, o método de coloração de Picrosirius permitiu avaliação qualitativa da área e diferenciação do colágeno tipo I (proteína esta com capacidade de resistência de força tênsil) das fibras tipo III (BEDOYA et al., 2016). O uso da técnica de coloração de Picrosirius para o estudo histológico de amostras de coxim digital dos equinos é inédito, visto que apenas a coloração do Tricrômio de Masson já fora utilizado de forma quantitativa, técnica esta, que apenas quantifica proporção de feixes de fibras colágenas sem diferenciação do tipo de proteína instituída nas amostras de tecidos de coxim digital desta espécie (FARAMARZI et al., 2017).

A descrição da técnica é de grande importância, visto que recentemente estudos vêm sendo realizados associando a área e a composição dos tecidos do

coxim digital equino com teor de gordura subcutânea (PIZZI et al., 2020) e grau dos escores de condição corporal.

4. CONCLUSÕES

A coloração de Picrosirius é uma técnica alternativa para mensurações qualitativas de fibras colágenas tipo I no coxim digital equino.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEDOYA, S. A. O.; CONCEIÇÃO, L. G.; VILORIA, M. I. V.; LOURES, F. H.; VALENTE, F. L.; AMORIM, R. L.; SILVA, F. F. **Caracterização de colágenos tipos I e III no estroma do carcinoma de células escamosas cutâneo em cães.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 68(1), 147-154, 2016.

BOWKER, R.M.; VAN WULFEN, K. K.; SPRINGER, S.E. et al. **Functional anatomy of the cartilage of the distal phalanx and digital cushion in the equine foot and a hemodynamic flow hypothesis of energy dissipation.** Am J Vet Res; 59:961–968, 1998.

EURELL J. A.; VAN SICKLE D. C. **Connective and supportive tissues.** In: **Eurell J, Frappier B, eds. Dellmann's Textbook of Veterinary Histology.** 6th ed. Ames: Blackwell Publishing, 31–60, 2006.

FARAMARZI, B. *et al.* **Histological and functional characterizations of the digital cushion in Quarter horses.** The Canadian Journal of Veterinary Research, 285-291(7), out, 2017.

GUNKELMAN, M. A.; HAMMER, C. J. **A preliminary study examining the digital cushion in horses,** Journal of Equine Veterinary Science, 2017.

PIZZI, G.; VALENTE, A. L.; RECHSTEINER, S.; BRUHN, F.; CRUZ, L.; SILVA, P.; BARBOSA, A. A.; RIBEIRO, P.; MARTINS, C. F. **Macroscopic and Histological Morphology of the Equine Digital Cushion and Its Association with Subcutaneous Fat Thickness.** Journal of Equine Veterinary Science, 2020

RÄBER, M.; LISCHER, C. J.; GEYER, H.; OSSENT, P. **The bovine digital cushion – a descriptive anatomical study.** The Veterinary Journal, 167(3), 258–264, 2004.

RIBEIRO, G. H. C. **Anatomia, biomecânica e principais patologias do membro distal de equinos: quartela e casco.** In: Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

RITTIÉ, L. **Method for Picrosirius Red-Polarization Detection of Collagen Fibers in Tissue Sections.** Methods in Molecular Biology, 395–407. 2017.

WILHELM, J.; PROBST, A.; WITTER, K.; *et al.* **Das Hufkissen des Pferdes: Eine federnd-elastische Struktur im Zehenendorgan.** Pferdeheilkunde. 21:531–537, 2005.