

Comparação fotomicrográfica das fibras colágenas equinas da inserção proximal do músculo interósseo III

Photomicrographic comparison of equine collagen fibers from the proximal insertion of the third interosseous muscle

Comparación fotomicrográfica de fibras de colágeno equino de la inserción proximal del músculo interóseo III

Recebido: 30/01/2023 | Revisado: 23/02/2023 | Aceitado: 24/02/2023 | Publicado: 01/03/2023

Grasiela de Bastiani

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4748-7560>
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil
E-mail: grasiela.bastiani@ufrgs.br

Aline de Moraes Muhlbauer

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1014-1328>
Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil
E-mail: aline.muhlbauer@gmail.com

Tainã Kuwer Jacobsen

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3497-4175>
Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil
E-mail: tainajacobsen@gmail.com

Flávio Desessards de La Côte

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4958-5428>
Universidade Federal de Santa Maria, Brasil
E-mail: delacorte2005@yahoo.com.br

Adriano Tony Ramos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8744-5309>
Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil
E-mail: adriano.ramos@ufsc.br

André Fontana Goetten

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6276-2882>
Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil
E-mail: andre.goetten@ufsc.br

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi comparar quantitativamente as fibras colágenas tipo I e tipo III pela avaliação histológica da inserção proximal de músculo interósseo terceiro (I.P.M.I III) de equinos das raças Crioulo (n=26) e Puro Sangue de Corrida (n=6), hígdidos com idade média de 5,7 anos. As lâminas foram coradas pelo método picrosirius red e examinadas em microscópio óptico sob luz polarizada. De cada lâmina foram capturadas imagens de 5 campos em aumento de 10 vezes. A porcentagem da área ocupada por cada tipo de colágeno foi determinada pelo plugin threshold colour do software Image J, por meio de análise da segmentação de cor. Pela análise da variância, a proporção de colágenos tipo I e tipo III na I.P.M.I III não diferiu significativamente entre as amostras das raças avaliadas. Entretanto, houve diferença significativa entre os dois tipos de colágeno numa mesma raça, de forma que o colágeno tipo I prevaleceu em relação ao tipo III. Ainda que possuam predisposições distintas, não houve diferença significativa na quantidade de colágeno entre a raça Crioulo e Puro Sangue de Corrida, por se tratar da mesma espécie em questão. Contudo a diferença significativa entre os colágenos tipo I e III era prevista, uma vez que a quantidade do colágeno original do tecido, tipo I deve ser maior que o colágeno de remodelação, tipo III nos casos em que se tratam de animais hígdidos.

Palavras-chave: Colágeno tipo I; Colágeno tipo III; Histologia; Picrosirius red.

Abstract

The aim of this study was to quantitatively compare type I and type III collagen fibers in histological evaluation of the proximal insertion of the third interosseous muscle (P.I.I.M III) of healthy Crioulo (n=26) and Thoroughbred (n=6) horses, with a mean age of 5.7 years. The histological sections were stained with picrosirius red and examined under an optical microscope under polarized light. Images of 5 fields were captured from each slide at 10x magnification. The percentage of the area occupied by each type of collagen was determined by the threshold color plugin of the Image J software, through analysis of the color segmentation. Nevertheless, the analysis of variance is not

demonstrating the significantly variations of the proportion of type I and type III collagen in I.P.M.I III of the evaluated breeds. However, there was a significant difference between the two types of collagens in the same breed, because that type I collagen prevailed over the type III.

Keywords: Type I collagen; Type III collagen; Histology; Picrosirius red.

Resumen

El objetivo de este estudio fue comparar cuantitativamente las fibras de colágeno tipo I y tipo III a través de la evaluación histológica de la inserción proximal del tercer músculo interóseo (I.P.M.I III) de caballos Criollos (n=26) y Pura Sangre de Carrera (n=6) sanos. con edad media de 5,7 años. Las coloraciones de las secciones histológicas se hicieron con picrosirius red y se examinaron al microscopio óptico con luz polarizada. Se capturaron imágenes de 5 campos de cada sección con un aumento de 10x. El porcentaje del área ocupada por cada tipo de colágeno se determinó mediante el complemento threshold colour del software Image J, mediante el análisis de la segmentación del color. Por análisis de varianza, la proporción de colágeno tipo I y tipo III en I.P.M.I III no difirió significativamente entre las muestras de las razas evaluadas. Sin embargo, hubo una diferencia significativa entre los dos tipos de colágeno en la misma raza, por lo que prevaleció el colágeno tipo I sobre el tipo III. Aunque, tienen distintas predisposiciones raciales, no hubo diferencia significativa en la cantidad de colágeno entre las razas Criolla y Pura Sangre de Carrera, ya que se trata de la misma especie. Se predijo la diferencia significativa entre el colágeno tipo I y III, ya que la cantidad de colágeno tisular original, tipo I, debe ser mayor que el colágeno remodelador, tipo III en los casos en que los animales están sanos.

Palabras clave: Colágeno tipo I; Colágeno tipo III; Histología; Picrosirius red.

1. Introdução

O músculo interóseo III (MI III) também conhecido como ligamento suspensor do boleto, apresenta sua origem na face palmar/plantar proximal do terceiro metatarso/metacarpo (Denoix & Bertoni, 2015; Werypy & Denoix, 2012). Através do sulco metatarsiano/metacarpiano, apresenta um trajeto distalmente entre o segundo e quarto osso metatarsiano/metacarpiano (Gibson & Steel, 2010; Nagy & Dyson, 2009), onde irá se ramificar no terço médio do metatarso/metacarpo em ramo lateral e medial, que seguem até sua inserção na superfície abaxial dos ossos sesamóides proximais (Dyson & Genovese, 2011).

O MI III age como um importante armazenador de energia durante a locomoção, assim como contribui para o suporte da articulação metacarpofalangeana limitando a sua hiperextensão (Biewener, 1998; Birch et al., 2008; Brown et al., 2003).

Histologicamente a inserção proximal do MI III em cavalos da raça Crioulo e Puro Sangue de Corrida (PSC) apresentam uma organização tecidual fascicular muito semelhante ao observado nos tendões. O tecido conjuntivo denso é delimitado por tecido conjuntivo frouxo e intercalado com fibras musculares e adipócitos (De Bastiani et al., 2018).

Sabe-se que as lesões de MI III são uma importante causa de claudicação e que tais alterações aumentam as proporções de colágeno tipo III em tecidos danificados em comparação a tecidos normais. Alterações essas que podem ser responsáveis pela diminuição na qualidade do tecido e nas propriedades mecânicas do ligamento (Shikh Alsook et al., 2015). As claudicações são umas das principais causas de diminuição do desempenho atlético em equinos, envolvendo na maioria dos casos estruturas distais dos membros. Logo, observa-se uma alta incidência de lesões no ligamento suspensor do boleto, como desmites e entesopatias (Gibson & Steel, 2010; Dyson & Genovese, 2011; Denoix, 1994).

A caracterização das fibras colágenas que compõem o MI III de equinos hípidos e de diferentes espécies, pode contribuir no diagnóstico de lesões e alterações da estrutura. O presente trabalho visa comparar quantitativamente as fibras colágenas tipo I e tipo III do MI III das raças Crioulo e Puro Sangue de Corrida (PSC), por meio de seções histológica coradas pelo método de picrosirius red e quantificadas pelo plugin threshold colour do software Image J.

2. Metodologia

Foram selecionadas 32 amostras histológicas dos lobos medial e lateral da inserção proximal do MI III e dissecadas na região palmar/plantar proximal do metacarpo e metatarso. As amostras foram divididas em cavalos Crioulos (n=26) e PSC (n=6), que vieram a óbito por diferentes causas e com idade média de 5,7 anos. As amostras teciduais foram fixadas em

solução formol tamponada a 10% durante 14 dias e em seguida, processadas segundo protocolo histológico de rotina. Foram obtidas secções de 3µm de espessura, corados com o kit comercial Picosirius red (Erviagas Instrumental Cirúrgico Ltda., São Paulo, SP, Brasil) no Laboratório de Patologia Veterinária (LABOPAVE) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

As secções histológicas foram avaliadas em microscópio óptico sob luz polarizada (Leica® ICC50 HD), do qual foram capturadas imagens de cinco campos através do sistema de câmera Leica (Leica LAS EZ), no aumento de 10 vezes, perfazendo um total de 129 fotos de I.P.M.I III Crioulo e 30 fotos de I.P.M.I III de PSI, totalizando 159 imagens.

As fotomicrografias dos campos foram realizadas, visando sempre um fundo escuro e birrefringência máxima das cores vermelha e verde. Além disso, os campos capturados eram compostos principalmente por fibras musculares e ligamentares, evitando-se a captura de vasos, nervos e outras estruturas teciduais que pudessem prejudicar a posterior avaliação do colágeno na imagem.

A análise do colágeno foi realizada utilizando o software Image J, por meio do método de análise por segmentação de cor. Considerou-se a tonalidade vermelho-amarelada se referindo ao colágeno do tipo I, enquanto a amarelo-esverdeada ao tipo III, segundo Junqueira et al. (1978). Além dos valores obtidos mediante análise da tonalidade, o brilho também foi avaliado utilizando-se o plugins threshold colour, com um histograma de 255 cores para imagens de oito bits. Sendo utilizado a matiz de 0-20 para a tonalidade vermelho-amarelada (colágeno tipo I) e de 30-120 para a tonalidade amarelo-esverdeada (colágeno tipo III). Foram usadas as configurações 100-255 para o brilho e 0-255 para saturação. Tais configurações foram selecionadas por se adaptarem melhor às imagens, reproduzindo de forma significativa as diferentes análises de cores.

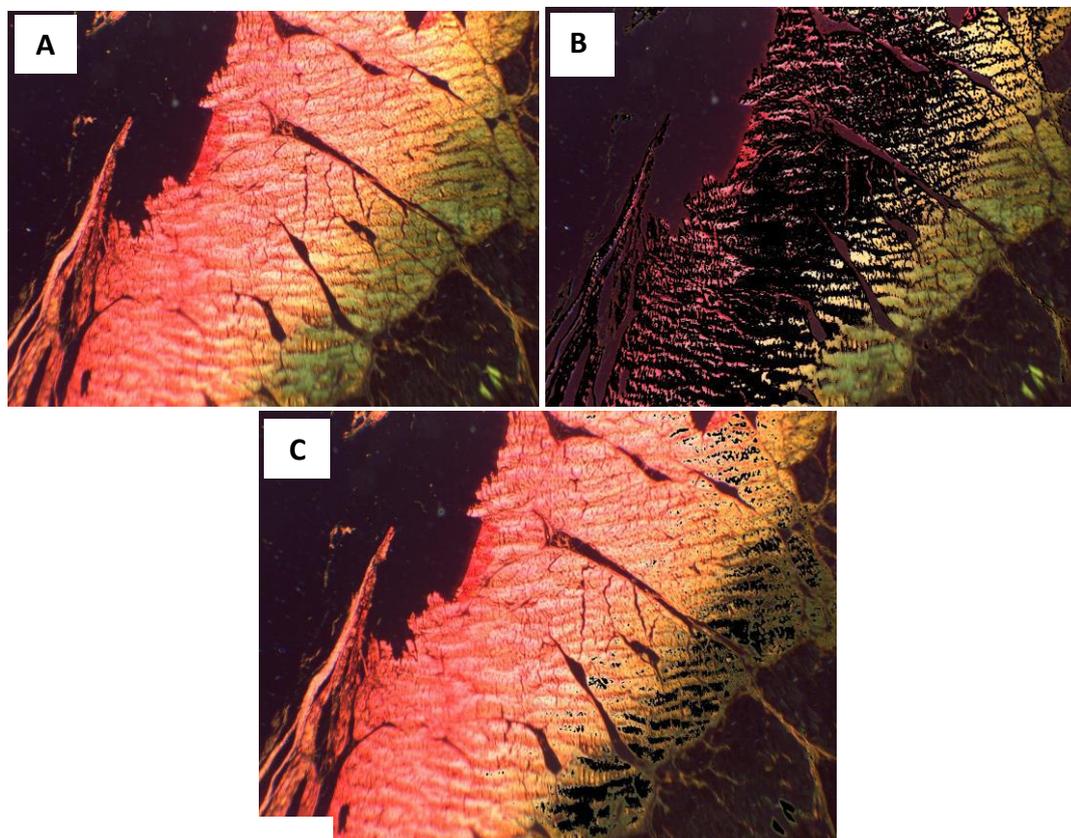
Os valores encontrados pelo software ImageJ correspondentes a área de colágenos ocupada em cortes de I.P.M.I III dos animais, foram submetidos ao teste de Análise de Variância (ANOVA) através do programa RStudio® para identificar o tipo de relação entre os colágenos tipo I e III e as raças Crioulo e PSC. Utilizou-se o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

3. Resultados

O colágeno tipo I ocupou, nas amostras histológicas de equinos Crioulos e PSC, respectivamente, 58,7% ($EPM \pm 2,19$) e 57,6% ($EPM \pm 3,96$) da área dos cortes de I.P.M.I III. Em contrapartida, o colágeno tipo III preencheu uma área em equinos Crioulos de 16,3% ($EPM \pm 1,71$) e respectivamente nos equinos PSC de 18,1% ($EPM \pm 3,30$) da I.P.M.I III (Figuras 1 e 2). Pela análise da variância, a proporção de colágenos tipo I e tipo III na inserção proximal de músculo interósseo III não diferiu significativamente entre as amostras das raças avaliadas.

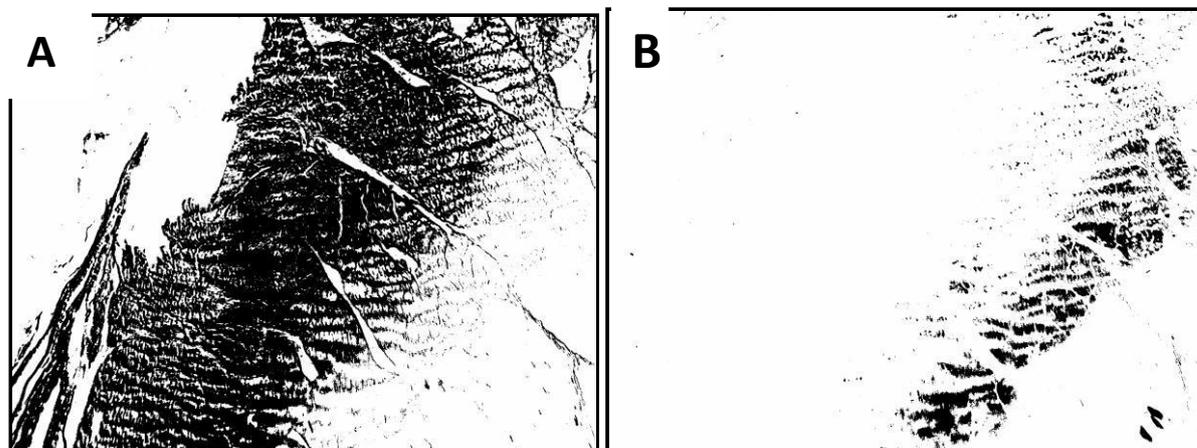
Histoquimicamente a inserção proximal do MI III em cavalos da raça Crioulo e PSC apresentaram o tecido conjuntivo denso modelado organizado em fascículos ligamentares, que apresentou uma birrefringência que variou do amarelo avermelhado (colágeno tipo I) ao amarelo esverdeado (colágeno tipo III), sendo este envolto por tecido conjuntivo frouxo e intercalado com fibras musculares e adipócitos (Figura 1A).

Figura 1 - Equino, Inserção Proximal Músculo Interósseo III. Análise morfométrica de IPMI III por segmentação de cor usando os softwares ImageJ, Plugins Threshold Colour. Micrografia obtida sob luz polarizada do corte de MI III no aumento do 10x (A). Segmentação para a tonalidade vermelha a amarela (representando o colágeno tipo I) (B). Segmentação para a tonalidade amarelo a verde (representando o colágeno tipo III) (C).



Fonte: Autores (2022).

Figura 2 - Equino, Inserção Proximal Músculo Interósseo III. Análise morfométrica de IPMI III por segmentação de cor usando os softwares ImageJ, Plugins Threshold Colour. Aplicação de máscara evidenciando a área contabilizada referente ao colágeno tipo I (A). Aplicação de máscara evidenciando a área contabilizada referente ao colágeno tipo III (B).

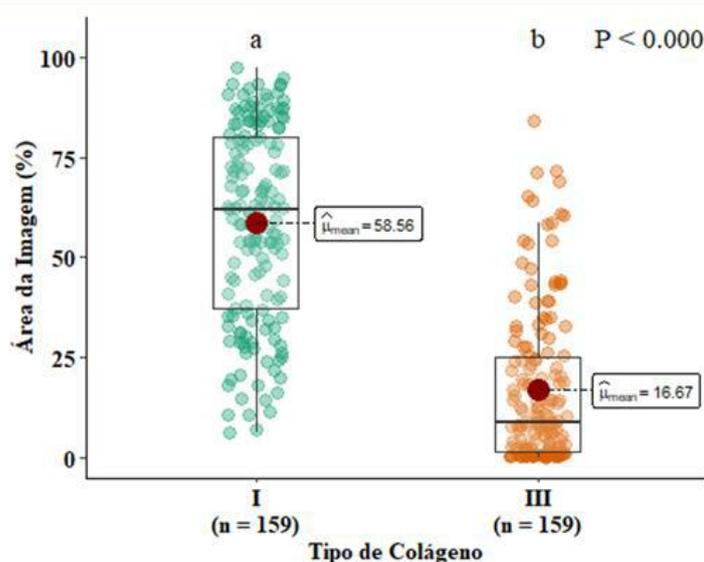


Fonte: Autores (2022).

Se evidencia diferença significativa ($p < 0,05$) na área de colágenos tipo I comparado ao tipo III numa mesma raça,

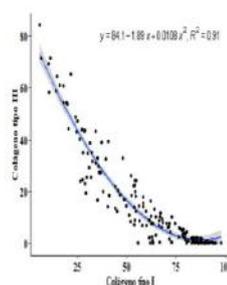
uma vez que o colágeno tipo I apresenta maior média em relação ao colágeno tipo III (Gráfico 1). Nos parâmetros da curva do modelo de regressão polinomial de 2º grau foram obtidos intercepto de 84,1, coeficiente b1 de -1,89 e coeficiente de b2 de 0,0108. O coeficiente de determinação (R^2) de 0,9085 e por consequência o coeficiente de correlação @ de -0,953. Se observa a existência de uma forte correlação negativa entre o teor de colágeno tipo I e o teor de colágeno tipo III (Gráfico 2).

Gráfico 1 - Distribuição das observações de colágenos tipo I (a) e tipo III (b) nas duas raças. observa-se o colágeno tipo I apresentando maior média (58,56%) em relação ao colágeno tipo III (16,67%). Ponto vermelho representando a média e a caixa os quartis de cada distribuição.



Fonte: Autores (2022).

Gráfico 2 - Polinomial de 2º grau. Indicando que existe forte correlação negativa entre o teor de Colágeno tipo I e o teor de Colágeno tipo III. O histograma de distribuição dos resíduos demonstra que existe simetria na distribuição dos resíduos.



Fonte: Autores (2022).

4. Discussão

Segundo Gibson e Steel (2010), a quantidade do colágeno original do tecido tipo I deve ser maior que o colágeno de remodelação tipo III, tratando-se de animais hígidos. Durante o processo inflamatório as metaloproteinases aumentam sua concentração, de forma que, lisam as fibras de colágeno tipo I originais substituindo-as por colágeno tipo III, em arranjos desorganizados de fibras (McIlwraight, 1996). Tal processo resulta em um novo tecido, o qual é considerado inferior ao original, pela diminuição da resistência e elasticidade, predispondo a lesões recidivantes (Schwarzbach et al, 2008). No presente estudo observou-se diferença significativa entre a quantidade de colágenos, uma vez que, o colágeno tipo I foi

prevalente em relação ao tipo III ($p < 0,05$).

Nos casos em que o colágeno tipo III é prevalente, observa-se uma imaturidade tecidual, já que este é mais proeminente em estágios iniciais da cicatrização, onde fornece resistência mecânica precoce para a matriz recentemente sintetizada (Culav et al., 1999). Foram obtidas apenas informações sobre raça e idade dos equinos selecionados para o estudo, sem histórico prévio de claudicações. Entretanto, não se observou-se a prevalência da quantidade de colágeno tipo III sob o tipo I, confirmando que os equinos eram hígdos.

É relatado uma variação anatômica no MI III entre as raças Crioulo, Campeira e Mangalarga Marchador, observando-se diferença nas áreas do ligamento e ramos medial e lateral (Aristizábal et al., 2005; Schade, 2018; Pasin et al., 2001). Por meio de avaliações ultrassonográficas, macroscópicas e histológicas do ligamento suspensório, é descrito diferença na quantidade de tecido adiposo e de fibras musculares entre as raças Crioulo e PSC (De Bastiani et al., 2019). Em contrapartida, após mensuração da área dos colágenos tipo I e III das raças Crioulo e PSC selecionados para o presente estudo, não se observou diferença significativa entre as quantidades. Mesmo tratando-se de raças que possuem predisposições distintas, não houve variação histológica na quantificação dos colágenos.

5. Conclusão

O conhecimento das proporções e particularidades das fibras colágenas do MI III é de fundamental importância para o diagnóstico de entesopatias e reconhecimento de processos cicatriciais. Por meio das fotomicrografias, observou-se que em animais hígdos o colágeno tipo I prevalece em relação ao tipo III, e que não há evidências de diferença histológica entre as raças Crioulo e PSC.

Aprovação ética: Este trabalho envolveu apenas o uso de animais não experimentais. A aprovação ética de um comitê não foi necessária.

Declaração de interesse: Os autores relatam não haver conflitos de interesse.

Referências

- Aristizábal, M. F. A., Souza, M. V., Aranzales, J. R. M. & Junior, J. I. R. (2005). Valores biométricos obtidos por ultra-sonografia dos tendões flexores e ligamentos acessório inferior e suspensório da região metacárpica palmar de cavalos Mangalarga Marchador. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 57(2):156–162.
- De Bastiani, G., De La Corte, F. D., Brass, K. E., Cantarelli, C., Malfestio, L. M. M., Schwingel, D., Silva, T. M. & Kommers, G. D. (2019). Ultrasonographic, macroscopic and histological characterization of the proximal insertion of the suspensory ligament in crioulo horses. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 39(5): 353-363.
- De Bastiani, G., De La Corte, F. D., Brass, K.E., Cantarelli, C., Dau, S., Kommers, G. D., Silva, T. M. & Azevedo, M. S. (2018). Histochemistry of Equine Damaged Tendons, Ligaments and Articular Cartilage. *Acta Scientiae Veterinariae*. 46(1): 8.
- Biewener, A. A. (1998). Muscle-tendon stresses and elastic energy storage during locomotion in the horse. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 120(1): 73–87.
- Birch, H. L., Wilson, A. M., & Goodship, A. E. (2008). Physical activity: does long-term, high-intensity exercise in horses result in tendon degeneration? *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. 1985), 105(6): 1927–1933.
- Brown, N. A., Pandy, M. G., Kawcak, C. E., & McIlwraith, C. W. (2003). Force- and moment-generating capacities of muscles in the distal forelimb of the horse. *Journal of anatomy*, 203(1): 101–113.
- Culav, E. M., Clark, C. H. & Merrilees, M. J. (1999). Connective Tissues: Matrix Composition and Its Relevance to Physical Therapy. *Physical Therapy*. 73(3):308-319.
- Denox J. M. (1994). Functional anatomy of tendons and ligaments in the distal limbs (manus and pes). *The Veterinary clinics of North America*. Equine practice. 10(2): 273–322.
- Denox, J. M & Bertoni, L. (2015). The angle contrast ultrasound technique in the flexed limb improves assessment of proximal suspensory ligament injuries in the equine pelvic limb. *Equine Veterinary Education*. 27(4): 209-217.

- Dyson, S. J. & Genovese, R. L. (2011). The suspensory apparatus. In: Ross, M.W. & Dyson, S.J. (Org.). *Diagnosis and management of lameness in the horse*. 738-764.
- Gibson, K. T. & Steel, C. M. (2010). Conditions of the suspensory ligament causing lameness in horses. *Equine Veterinary Education*. 14: 39-50.
- Junqueira, L. C. U., Cossermelli, W. & Brentani, R. R. (1978). Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Archivum Histologicum Japonicum*. 41:267-274.
- McIlwraith, C. W. (1996). *Joint disease in the horse*. Philadelphia: Saunders. p.490.
- Nagy, A., & Dyson, S. (2009). Magnetic resonance anatomy of the proximal metacarpal region of the horse described from images acquired from low- and high-field magnets. *Veterinary radiology & ultrasound: the official journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association*, 50(6): 595–605.
- Pasin, M., Brass, K. E., Rosauero, A. C., Oliveira, F. G., Figueiró, G. M., Fialho, S. S. & Silva, C. A. M. (2001). Caracterização ultrassonográfica dos tendões flexores em equinos: região metacarpiana. *Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS*. 29(2):131–138.
- Schade, J. (2018). Características clínicas e ultrassonográficas dos tendões flexores digitais e ligamentos do metacarpo/metatarso em equinos marchadores. Lages, 143f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - *Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade do Estado de Santa Catarina*.
- Schwarzbach, S. V., Pagliosa, G. M., Roscoe, M. P., Alves, G. E. S. (2008). Ligamento suspensório da articulação metacarpo/metatarso falangianas nos equinos: aspectos evolutivos, anatômicos, histofisiológicos e das afecções. *Ciência Rural*. 38: 1193–1198.
- Shikh Alsook, M. K., Gabriel, A., Salouci, M., Piret, J., Alzamel, N., Moula, N., Denoix, J-M., Antoine, N. & Baise, E. (2015). Characterization of collagen fibrils after equine suspensory ligament injury: an ultrastructural and biochemical approach. *Veterinary Journal*. 204(1):117-122.
- Werpy, N. M. & Denoix, J. M. (2012). Imaging of the equine proximal suspensory ligament. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice*, 28(3): 507–525.