

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DOS TECIDOS DÉRMICO E
EPIDÉRMICO DO CASCO DE EQUINOS COLHIDOS PELO
ACESSO TRANS-MURAL DORSAL

Kamila Gravena
Medica Veterinária

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL
2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DOS TECIDOS DÉRMICO E
EPIDÉRMICO DO CASCO DE EQUINOS COLHIDOS PELO
ACESSO TRANS-MURAL DORSAL

Kamila Gravena

Orientador: Prof. Dr. José Corrêa de Lacerda Neto

Co-Orientadora: Dra. Rita de Cássia de Lima Sampaio

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em Cirurgia Veterinária.

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

2010

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

KAMILA GRAVENA – nascida em Londrina/PR, em 01 de Julho de 1984, graduada em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual de Maringá (UEM) em dezembro de 2007. Ingressou no curso de pós-graduação em Cirurgia Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária – Universidade Estadual Paulista – Campus de Jaboticabal em agosto de 2008.

"Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante."

Albert Schweitzer

Dedico este trabalho ao meu pai, minha mãe e
minha irmã, pelo apoio incondicional em todos os
momentos da minha vida, a quem devo tudo que
sou, pelo amor, incentivo e confiança.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha saúde, por me proteger e me dar forças;

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, UNESP – Campus de Jaboticabal, pela oportunidade, por me acolher e se tornar a minha segunda casa;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo concedida durante todo o período do mestrado;

Ao Prof. José Correa de Lacerda Neto (Juca), meu orientador, pela oportunidade de realizar este estudo, apoio, ensinamentos, confiança, atenção, e também, pelo amor e dedicação aos cavalos;

Ao Prof. Júlio Carlos Canola, pela doação de material, pela disponibilidade, boa vontade, ensinamentos, contribuindo com sua opinião e experiência;

Ao Prof. Delphim da Graca Macoris, pela disponibilidade, boa vontade, ensinamentos, contribuindo com sua opinião e experiência;

Ao Prof. José Wanderley Cattelan, pela disponibilidade, boa vontade, ensinamentos, contribuindo com sua opinião e experiência;

À Prof^a. Silvana Martinez Baraldi Artoni, pela convivência sempre amigável, por disponibilizar o laboratório e o microscópio, tornando possível a realização deste estudo;

Ao Alan Rodrigo Panosso pela orientação estatística;

Aos componentes da banca examinadora da qualificação e de defesa, Prof. Antonio Carlos Alessi, Prof. José Wanderley Cattelan, Profa. Juliana Regina Peiró e Profa. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos pelas sugestões e contribuição para o melhoramento do trabalho;

Aos amigos Deborah Penteado Martins Dias, Rita de Cássia de Lima Sampaio e Paulo Alécio Canola pela grande colaboração prestada no decorrer deste experimento;

Às técnicas Claudia e Claudinha do Laboratório de Microscopia Eletrônica e a Francisca (Chica) do Laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia Veterinária, pela ajuda e paciência no decorrer deste experimento;

À Tereza, técnica do Laboratório de Microscopia Eletrônica – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, pela contribuição e pela disponibilidade;

À amiga Carla Braga Martins pelo apoio, amizade, confiança e atenção mesmo estando distante.

À amiga Samira, pelos momentos divertidos e de descontração;

Ao funcionário Odair Oian (Deco) pela convivência e colaboração neste experimento;

Aos estagiários que participaram no decorrer deste experimento;

À grande amiga Adriana de Oliveira Silva pela confiança de deixar o Pena em meus cuidados, pela grande ajuda nas fotos e por todo apoio;

À minha família, que me suportou ... em todos os sentidos ...

À Luma (Lhú), minha fiel e amada labrador, grande companheira, que me diverte, me distrai, e que junto vamos crescendo e aprendendo cada dia mais;

Ao Quick-Field, meu Puro Sangue Inglês, que conviveu comigo, me ensinou muito e me trouxe muitas alegrias;

A todos os cavalos que participaram desse experimento;

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho...

MEU SINCERO AGRADECIMENTO!!!

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABELAS	VII
RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 ESTRUTURA DO DÍGITO EQUINO	3
2.2 CRESCIMENTO DA PAREDE DO CASCO	4
2.3 SUPRIMENTO SANGUÍNEO DIGITAL	6
2.4 HISTOLOGIA PODAL	8
2.5 BIÓPSIA DO TECIDO LAMINAR	10
III. OBJETIVOS.....	12
3.1 GERAIS	12
3.2 ESPECÍFICOS.....	12
IV. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1 ANIMAIS	13
4.2 EXAME CLÍNICO	13
4.2.1 Exame Físico Geral	13
4.2.2 Avaliação das estruturas musculoesqueléticas e da locomoção	14
4.3 EXAME RADIOGRÁFICO.....	15
4.4 COLHEITA DE MATERIAL	15
4.4.1 Procedimento de sedação	15
4.4.2 Biópsia do casco.....	16
4.5 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA	21
4.6 MEDIDAS DO CASCO	22
4.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA	22
4.7.1 Microscopia Óptica	22
4.7.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão	22
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
V. RESULTADOS	24
5.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA.....	24

5.2 AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA	24
5.3 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA.....	25
5.4 AVALIAÇÕES MICROSCÓPICAS	28
5.4.1 <i>Histopatologia</i>	28
5.4.1.1 Coloração de Hematoxilina-Eosina (HE)	28
5.4.1.2 Coloração com Ácido Periódico-Schiff (PAS)	33
5.4.1.3 Coloração com Picrossírius Red (PS)	34
5.4.2 <i>Microscopia eletrônica de transmissão</i>	36
5.5 DEFORMIDADES DOS EXTRATOS EXTERNO E MÉDIO.....	39
VI. DISCUSSÃO.....	40
VII. CONCLUSÕES.....	46
VIII. REFERÊNCIAS	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Fotografia de equino em tronco de contenção (A) na qual observa-se cavalo já sedado, com garrote aplicado na altura do osso rádio (antebraço). Em (B) observa-se detalhadamente a aplicação do garrote no antebraço.....	16
Figura 2.	Sequência de procedimentos para colheita de amostra dérmica e epidérmica podal de equino (A) abertura do orifício nos estratos externo e médio da parede do casco, utilizando pedra de esmerilar à base de óxido de alumínio; (B) orifício após anti-sepsia com tintura de iodo a 5%; (C) incisão do estrato lamelar com lâmina de bisturi até a face dorsal da falange distal; (D) uso do esculpador Frahn para separação do tecido laminar; (E) retirada da amostra com auxílio de pinça hemostática Halsted; (F) bandagem realizada ao final do procedimento.....	18
Figura 3.	Sequência de procedimentos para a segunda colheita e preenchimento do orifício na face dorsal da parede do casco. (A) abertura do segundo orifício nos estratos externo e médio da parede do casco com o auxílio de uma pedra de esmerilar à base de óxido de alumínio acoplada em uma micro-retífica, sem a retirada da compressa de gaze do primeiro curativo; (B) limpeza do orifício da primeira biópsia com água oxigenada 10 vol. ao fim da segunda colheita, aonde é possível observar a janela previamente realizada; (C) secagem dos dois orifícios vinte e quatro horas após a segunda biópsia; (D) orifícios prontos para aplicação da resina; (E) preenchimento do primeiro orifício com resina acrílica associado à metronidazole; (F) detalhamento do revestimento do primeiro orifício com resina acrílica pura e o segundo orifício apenas com a camada de resina associada ao metronidazole.....	20
Figura 4.	Imagem do tecido laminar do casco equino sendo lavado com solução fisiológica para a remoção do excesso de sangue (A) e da amostra destinada à análise das microscopias óptica e de luz polarizada e microscopia eletrônica de transmissão (B).....	21
Figura 5.	Imagens radiográficas em projeção látero-medial da falange distal de equinos. A; realizada antes da biópsia. B; 10 dias após o procedimento, onde se observa a presença de região radioluscente (seta) na parede do casco, mostrando a profundidade da biópsia (linha	

	branca).....	25
Figura 6.	Imagens de secções transversais da porção interna da muralha (região tubular), das lâminas epidérmicas (seta) e dérmicas (►) primárias e do tecido conjuntivo que se ligará a falange distal.....	26
Figura 7.	Imagens de secções transversais e horizontais do casco de equino necropsiado 25 dias após as biópsias. (A) corte horizontal da falange distal (região hígida, 2,0 cm da borda coronária), parede do casco (PC), lâminas epidérmicas e dérmicas (Lam), derme (De); (B) corte transversal do casco onde observa-se o orifício deixado pela primeira biópsia (seta branca - contaminação por terra; seta preta - reação cicatricial); (C) corte transversal do orifício da segunda biópsia (seta - reação cicatricial); (D) corte horizontal entre os dois orifícios (seta branca - primeira biópsia; seta preta - segunda biópsia; * - reação cicatricial).....	27
Figura 8.	Fotomicrografia ilustrando as lâminas epidérmicas e dérmicas do casco de equinos hígidos após realização da primeira biópsia, na qual se observa a integridade da amostra e a disposição das lâminas epidérmicas primárias (LEP) e lâminas dérmicas primárias (LDP). Hematoxilina-Eosina, obj 4x.....	29
Figura 9.	Fotomicrografia das lâminas epidérmicas e dérmicas do casco de equinos hígidos após realização da primeira biópsia, visualizando-se a diferença de largura entre lâmina epidérmica secundária (LES) e lâmina dérmica secundária (LDS), o formato oval do ápice das LES, a camada de células epidérmicas basais (*) e a presença de queratinócitos (Q) nas LES. Também podem ser observados os núcleos ovais no ápice das células basais (seta). Hematoxilina-Eosina, obj 40x.....	29
Figura 10.	Fotomicrografia ilustrando a presença de hemácias (*) em regiões localizadas das lâminas epidérmicas e dérmicas do casco de equino hígido após realização da segunda biópsia. Observa-se também a degradação decorrente do trauma causado pelo procedimento de biópsia das lâminas epidérmicas secundárias (LES) e lâminas dérmicas secundárias (LDS) (seta amarela) e lâmina dérmica primária (LDP) (seta preta). Hematoxilina-Eosina, obj 20x.....	30
Figura 11.	Fotomicrografia ilustrando as lâminas epidérmicas e dérmicas do casco do equino necropsiado 25 dias após realização das biópsias, visualizando-se grande deformidade da região queratinizada (*), e lâminas epidérmicas primárias (LEP) com distribuição assimétrica. Hematoxilina-Eosina, obj 4x.....	31

- Figura 12.** Fotomicrografia ilustrando as lâminas epidérmicas e dérmicas do casco do equino necropsiado 25 dias após a realização das biópsias, visualizando-se a divisão das lâminas epidérmicas primárias (seta) e o englobamento de tecido conjuntivo pelas células epidérmicas basais (*) Hematoxilina-Eosina, obj 10x. No detalhe o englobamento na obj 40x..... 32
- Figura 13.** Fotomicrografia ilustrando grande quantidade de queratinócitos não maduros no interior da lâmina epidérmica primária (LEP) e a presença de queratinócitos apoptóticos (setas) presentes na LEP e lâminas epidérmicas secundárias (LES). Hematoxilina-Eosina, obj 40x. Observa-se no detalhe queratinócito apoptótico na obj 100x..... 33
- Figura 14.** Fotomicrografia ilustrando as lâminas epidérmicas e dérmicas do casco de equino hígido após realização da segunda biópsia, visualizando-se a membrana basal corada de carmim, contornando nitidamente as lâmina epidérmicas secundárias (LES) (setas). Ácido Periódico-Schiff, obj 100x..... 34
- Figura 15.** Fotomicrografia ilustrando as lâminas epidérmicas e dérmicas do casco de equino hígido, visualizando-se o colágeno migrando da base da lâmina epidérmica primária (LEP), e se agrupando com maior quantidade de fibras colágenas em sentido à falange distal (setas). Picrossírius Red, obj 40x em microscópio com luz polarizada plana..... 35
- Figura 16.** Fotomicrografia ilustrando as lâminas epidérmicas e dérmicas do casco de equino hígido, visualizando-se as fibras de colágeno se agrupando no interior da lâmina dérmica primária (LDP), em direção à falange distal (seta). Picrossírius Red, obj 40x em microscópio com luz polarizada plana..... 35
- Figura 17.** Fotomicrografia ilustrando as lâminas epidérmicas e dérmicas do casco de equino hígido, visualizando-se as fibras colágenas iniciando na base da lâmina epidérmica secundária (LES), se agrupando no interior da lâmina dérmica primária (LDP) e formando grandes feixes de colágenos, em direção à falange distal (setas). Picrossírius Red, obj 60x em microscópio com luz polarizada plana..... 36
- Figura 18.** Fotomicrografia eletrônica de transmissão ilustrando a união dermoepidérmica, a qual apresenta o material extra-celular da derme (D), as células basais da epiderme (Ep) e, entre elas, a membrana basal (setas), determinando o contorno das lâminas epidérmicas secundárias (LESS). Aumento de 5000x..... 37
- Figura 19.** Fotomicrografia eletrônica de transmissão demonstrando a rara presença de grande número de hemácias (*) presente em região dérmica (D). Aumento de 4000x..... 38
- Figura 20.** Fotomicrografia eletrônica de transmissão demonstrando a união da

célula epidérmica basal (Ep) na membrana basal (seta preta) por meio de hemidesmosmos (seta amarela) com a presença de filamentos de ancoragem (seta branca pequena). Observa-se as duas zonas presentes na MB, a densa, corada de negra (◄), e a lúcida, de cor clara (*). Aumento de 20000x..... 38

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.	Médias $\pm$ erro padrão da média (EPM) das variáveis clínicas de equinos submetidos à biópsia podal e acompanhamento durante quatro dias de recuperação.....	24
------------------	---	----

AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DOS TECIDOS DÉRMICO E EPIDÉRMICO DO CASCO DE EQUINOS COLHIDOS PELO ACESSO TRANS-MURAL DORSAL.

RESUMO - Objetivou-se avaliar a integridade dos tecidos dérmico e epidérmico do casco colhidos pelo acesso trans-mural dorsal. Oito equinos adultos hígidos foram submetidos a duas biópsias no casco do membro torácico direito, com intervalo de 24 horas. Previamente, como controle de higidez, realizou-se exame radiográfico da porção distal do membro nas posições dorsopalmar e lateromedial. Os animais foram sedados e o tecido podal foi colhido em dois sítios, 2,5 cm distais à borda coronária. A perfuração da parede do casco foi realizada com pedra de esmerilar de óxido de alumínio de 4,8 mm de diâmetro, acoplada à micro retífica. Ao atingir o extrato médio, a perfuração foi mais lenta até detectar-se o amolecimento da parede mediante pressão aplicada com uma pinça hemostática Halsted, deixando-se um milímetro de extrato médio. Obteve-se então uma superfície lisa com aproximadamente um centímetro de diâmetro. Cortes laterais profundos das lâminas até alcançar a falange distal foram realizados com uso de lâmina de bisturi nº 11. Posteriormente, a amostra de tecido laminar foi removida com o auxílio de um esculpidor Frahm. O fragmento de tecido podal obtido apresentava a forma cubóide com a base medindo aproximadamente cinco milímetros e os lados sete milímetros. A técnica de biópsia desenvolvida neste trabalho permitiu a obtenção de amostras de tecidos laminares, os quais permitiram a realização de análises histológicas e de microscopia eletrônica de transmissão, que revelou integridade das estruturas e ultra-estruturas analisadas.

Palavras chave: Biópsia podal, casco, histologia, podologia equina

EVALUATION OF THE INTEGRITY OF DERMAL AND EPIDERMAL TISSUES FROM EQUINE HOOF WALL COLLECTED BY DORSAL TRANS-MURAL ACCESS.

ABSTRACT - The purpose of this study was to evaluate the integrity of dermal and epidermal tissues collected by dorsal trans-mural access. Eight healthy horses were submitted to two biopsies of the right hoof wall within 24 hours interval. To ensure hoof integrity, radiographic evaluation of dorsopalmar and lateromedial positions was performed. After sedation, laminar tissue was collected at five centimeters distal to the coronary band. The hoof wall was perforated using a 4.8 mm diameter aluminum oxide drill connected to a drilling machine. The perforation was performed slowly in the stratum medium, leaving 1 mm of stratum medium remained, as determined by evaluation of movement in response to pressure applied with a Halstead forceps. A 1 cm diameter flat surface was obtained. Laminar deep incisions until reaching the distal phalanx were performed with a scalpel blade and the laminar tissue was removed by use of a Frahm scaler. The samples collected by this biopsy technique showed a cuboidal shape with the base measuring approximately five millimeters by seven millimeters. The biopsy technique developed in this work resulted in laminar tissue samples which, due to their quality, allowed the histological analysis and transmission electron microscopy, showing the integrity of the analysed structures and ultra-structures of hoof laminae.

Key words: Hoof, podal biopsy, histology, equine podology.

I. INTRODUÇÃO

Os cascos dos equinos constituem uma estrutura complexa e peculiar desenvolvida tanto para a sustentação do peso do indivíduo, que se multiplica quando este atinge velocidades elevadas, como para a sobrevivência em ambientes hostis, nestes a abrasividade do solo pode causar desgaste excessivo do tecido córneo enquanto por outro lado, a grande variabilidade de temperaturas pode congelar ou cauterizar os tecidos internos. A natureza dotou os cascos dos equinos de grande capacidade termorregulatória, permitindo-lhes viver em ambientes cujas temperaturas podem variar de -50°C a $+50^{\circ}\text{C}$.

Outro aspecto interessante dos cascos dos equinos é a grande capacidade de amortecimento e antivibração que lhe confere o conjunto constituído pela ranilha, o tecido fibrocartilaginoso e os vasos sanguíneos. Durante o galope, o peso exercido pela coluna de ossos do membro sobre o casco pode chegar a uma tonelada. Nesta condição, o sangue presente na porção dorsal é desviado para as fibrocartilagens dilatando os vasos ali presentes, os quais passam a atuar como amortecedores, semelhante ao que ocorre nos amortecedores de tênis modernos.

Em que pese estas características morfológicas e funcionais ímpares, os cascos dos cavalos estão sujeitos a inúmeras afecções entre as quais se destaca a degeneração do tecido laminar, conhecida como laminite. Esta afecção tem motivado a realização de trabalhos científicos na busca de explicações que esclareçam a sua patogenia. Embora inúmeras hipóteses tenham sido propostas, nenhuma foi suficientemente adequada para esclarecer a causa real desta afecção. Entretanto, muito se avançou neste caminho, reconhecendo-se que, independentemente do fator causal, as alterações possuem aspecto temporal, ou seja, os achados histopatológicos estão estreitamente relacionados ao tempo de evolução do processo. Constituindo um grande empecilho a estes estudos, a dificuldade de se abordar os tecidos dérmico e epidérmico à medida que o processo evolui e impedindo a caracterização das alterações tanto na fase prodrômica ou de desenvolvimento como na fase clínica.

Diante disto passou-se a considerar a alternativa de realização de biópsias do casco pelo acesso trans-mural. Algumas poucas tentativas de realização desta técnica foram efetuadas, porém a aceitação destas técnicas ainda são questionadas.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estrutura do dígito equino

Dentre as inúmeras peculiaridades que caracterizam a evolução da família dos equídeos se destaca a evolução dos dígitos. Estes animais apresentam o dígito, envolto em casco queratinizado extremamente resistente na extremidade distal de membros relativamente leves. Tais características contribuíram para a velocidade e versatilidade dos equídeos (POLLITT, 2004a), e estão diretamente associadas a sua utilização pela espécie humana, tanto que, mesmo após milhares de anos de domesticação, uma frase de efeito diz “Sem casco, sem cavalo” (“No foot, no horse”), devido aos muitos mecanismos reguladores que controlam o crescimento e a função desta importante estrutura (MISHRA & LEACH, 1983).

Um estojo córneo resistente protege as estruturas mais vulneráveis e sensíveis presentes em seu interior, o que permite ao cavalo galopar em terreno seco e rochoso, porém, essa movimentação pode falhar caso ocorra imobilidade e incapacitação das conexões do casco com o osso (os tecidos lamelares de fixação da falange distal) (POLLITT, 2004a).

A parede do casco ou muralha é composta de três camadas dispostas de fora para dentro, a saber, estrato externo, estrato médio e estrato interno. O estrato externo é a espessa camada córnea superficial que se estende na direção distal do perioplo (STASHAK, 2006). O estrato médio é a camada mais espessa das três e se caracteriza pela sua estrutura tubular. É o principal suporte de carga e serve para transferência da força de reação do solo para o esqueleto equino. O desenho anatômico lhe confere resistência durante a locomoção normal, apenas um décimo da força de compressão para causar sua falha é exercida. A queratina presente no estojo córneo é a principal proteína estrutural da epiderme e também está presente na pele, pelos, chifres e garras. Esta queratina pode ser agrupada de duas formas: dura, rica em pontes

dissulfeto apresentando grande força física; e a mole, rica em grupos sulfidríla e pobre em pontes dissulfeto, possuindo menor resistência. O perioplo, a ranilha e a linha branca do casco, são formados pela queratina de menor resistência, ao contrário do que ocorre na parede e sola do casco (POLLITT, 2004a).

O estrato interno é formado por lâminas epidérmicas que se interdigitam com as lâminas dérmicas constituindo o cório laminar. Na região mais interna está localizado o tecido conjuntivo denso e colagenoso, altamente vascularizado e inervado, denominado cório coronário (derme) (STASHAK, 2006), que recobre o periósteo da falange distal e está fortemente interligado com as lâminas epidérmicas (CÉLESTE & SZÖKE, 2005)

Os ossos presentes no casco equino são as falanges media e distal e o sesamóide distal (navicular), formando a articulação interfalangeana distal. A estabilidade desta articulação é mantida por dois ligamentos colaterais curtos, o ligamento sesamóide colateral, o ligamento sesamóide distal ímpar e a cápsula articular. Bolsas sinoviais da cápsula articular estão presentes no aspecto palmar e/ou plantar da articulação dorsal e abaxial ao tendão flexor digital profundo e axial as cartilagens colaterais da falange distal (CÉLESTE & SZÖKE, 2005). Estas cartilagens ungueais possuem a forma de um losango e são constituídas de cartilagem hialina (PARKS, 2006). Segundo BOWKER (2003), estas cartilagens contêm principalmente cartilagem hialina, mas em muitos cavalos de quatro a cinco anos de idade, a borda medial da cartilagem desenvolve fibrocartilagem. Esses feixes brancos de tecido fibroso e fibrocartilaginoso das cartilagens ungueais são facilmente discerníveis em torno do tecido elástico amarelado, de tecido adiposo e de fibras colágenas que formam o coxim digital.

2.2 Crescimento da parede do casco

Os cascos dos equinos se desgastam naturalmente na superfície do solo. Para compensar este desgaste, a parede do casco cresce continuamente ao longo da vida (POLLITT, 2004a). O processo regenerativo se dá no estrato médio, composto de túbulos que crescem a partir do estrato germinativo presente na epiderme coronária.

Nestes túbulos as células das lâminas epidérmicas primárias se queratinizam progressivamente a medida que se movem no sentido distal. O lento crescimento distal da parede do casco (10 mm/mês) é resultado da diferença entre as lâminas epidérmicas primárias e secundárias do estrato interno, pois ao contrário das células das lâminas epidérmicas primárias que se queratinizam enquanto se movem nos túbulos, as células basais das lamelas secundárias são mais aderentes às lâminas dérmicas e não se queratinizam (CÉLESTE & SZÖKE, 2005).

O crescimento do casco também ocorre da mesma forma (mitose) nas lâminas epidérmicas primárias da região proximal do casco, porém, não há evidências convincentes de que o crescimento ocorra na porção mais distal (POLLITT, 2004a). Segundo DARADKA & POLLITT (2004) os movimentos da região lamelar podem ocorrer seja pela proliferação das células seja por processos enzimáticos baseados na remodelação. Estes autores visualizaram que a proliferação na região proximal é 20 vezes maior que a da porção distal, e que a remodelação dentro da parede do casco após o término da fixação a falange distal, não exige a proliferação das células epidérmicas.

Segundo WOESSNER (1991), a remodelação da epiderme e da matriz extracelular se deve à liberação controlada promovida pela ativação de metaloproteinases (MMPs). Estas enzimas são responsáveis pela degradação de componentes da matriz extracelular formada de colágeno e proteoglicanos, e sendo inibidas subsequentemente por inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). As MMPs são secretadas na forma inativa de pró-enzimas, e que ao serem ativadas, possuem como substratos conhecidos os colágenos do tipo IV e VII e a glicoproteína laminina-1 (POLLITT, 2004a). Adicionalmente, a laminina-5 (principal componente de ancoragem da membrana basal [MB]) também é clivada pelas MMPs. Além de possuir os componentes moleculares da MB como substratos, as MMPs também atuam sobre componentes moleculares de desmossomos e hemidesmossomos, o que permite as células epidérmicas e a membrana basal estarem constantemente respondendo ao estresse e às tensões de crescimento e de locomoção (WOESSNER, 1991).

2.3 Suprimento sanguíneo digital

As características das artérias extrínsecas e intrínsecas do casco foram descritas por muitos investigadores, mas Gurlt foi o primeiro a descrever a drenagem venosa extrínseca do casco do cavalo (MISHRA & LEACH, 1983).

As artérias medial e lateral digital surgem por divisão da artéria palmar medial (artéria digital comum) entre o ligamento suspensório e o tendão flexor digital profundo e se introduzem no dígito na altura da superfície abaxial dos ossos sesamóides proximais do boleto. Na falange proximal cada artéria digital dá origem a um ramo circunflexo que se une com o ramo da artéria do lado oposto, formando um círculo arterial ao redor do osso. Ao nível da articulação interfalangeana proximal, as artérias digitais enviam grandes ramos para os talões, que abastecem o coxim digital, a ranilha, o cório lamelar dos talões e das barras e o perióplo e o cório coronário palmar. Na metade da falange medial, cada artéria digital se ramifica novamente e forma outra artéria que é mais profunda que as cartilagens e os tendões extensores, e se conecta com a artéria do lado oposto, para formar uma artéria circular ao redor da falange media e da borda coronária. Esta artéria coronária circunflexa irriga o tendão extensor digital, a articulação interfalangiana distal e fornece vários ramos ao cório coronário e lamelar do dedo (POLLITT, 2004a).

Próximo ao osso navicular cada artéria digital emite um ramo dorsal que atravessa o forame no processo palmar da falange distal e, desloca-se no sulco parietal na superfície dorsal da falange distal, suprimindo o cório lamelar dos talões e anastomoses com a parte palmar da artéria circunflexa da sola (POLLITT, 2004a).

Tanto o ramo medial como o lateral da artéria digital surgem nas bordas proximal e distal do osso sesamóide distal (navicular). Os ramos se anastomosam com os outros e formam ligações diretas entre artérias digitais medial e lateral acima e abaixo do osso sesamóide distal. A artéria proximal se desloca no ligamento suspensor do osso sesamóide distal e seus ramos entram na borda proximal do osso através do forame vascular. Ao longo da extremidade distal de uma rede anastomótica arterial desloca-se

no ligamento distal interósseo e seus ramos bifurcam e entram no osso sesamóide distal através de finos forames vasculares (POLLITT, 2004a).

A porção terminal da artéria digital entra no canal solear da falange distal através do único forame pareado e une-se com a artéria do lado oposto para formar o arco terminal disposto profundamente, dentro do osso. Ramos do arco terminal irradiam para o exterior através de forames na superfície dorsal da falange distal e fornecem suprimento de sangue ao cório lamelar e, ainda, formam a artéria circunflexa, responsável pelo suprimento sanguíneo do cório solear (POLLITT, 2004a).

A disposição anatômica de muitos vasos facilita a troca de calor, melhorando a eficiência termorregulatória e possibilitando aos equinos sobreviver por meses ou anos tanto na neve quanto nos desertos tórridos (POLLITT, 2004a).

No dígito do equino há três plexos venosos, o plexo venoso dorsal situa-se na região profunda da derme lamelar, o plexo venoso palmar ou plantar que se localiza na porção mais profunda da derme e superfície interna axial das cartilagens da falange distal e o plexo coronário, que se encontra no coxim coronário e abrange o tendão extensor digital e a superfície externa abaxial da cartilagem da falange distal. Estes três plexos são drenados pelas veias digitais lateral e medial (POLLITT, 2004a).

As anastomoses arteriovenosas (AVAs) são componentes importantes da microcirculação da derme do dígito equino. As AVAs foram encontradas em toda a circulação laminar, mas as maiores e mais longas (40µm de diâmetro) foram agrupadas próximo da origem das artérias axiais. A densidade destas anastomoses laminares foi estimada em 500 AVAs/cm² (POLLITT & MOLYNEUX, 1990). Estudos de MOLYNEUX et al. (1994) utilizando a microscopia eletrônica de transmissão mostraram que as AVAs são ricamente inervadas pelos nervos vasomotores autônomos e seus nervos peptidérgicos associados, apresentam paredes espessas de músculo liso e especializado.

De acordo com POLLITT (1995), o papel normalmente realizado pelo conjunto de AVAs está relacionado a termorregulação e modulação da pressão. A adaptação dos cavalos ao rigoroso inverno sem que os seus cascos sofram congelamento, demonstra que estes dispõem de uma circulação protetora especializada, de característica similar

à da fauna típica de regiões polares. Quando o pé alcança temperatura crítica, a lenta circulação de manutenção da derme aumenta rapidamente, aumentando o aporte de nutrientes, aquecendo o casco, mediante abertura reflexa das múltiplas AVAs. Esta dilatação das AVAs traz o sangue arterial quente para o interior da parede do casco. As AVAs são igualmente numerosas em torno das bases do cório coronário e do cório lamelar. De fato, a arquitetura vascular da papila dérmica é basicamente a mesma independentemente da sua origem, seja da derme papilar do perioplo, da borda coronária, da sola ou da ranilha (POLLITT, 2004a).

2.4 Histologia podal

A porção interna da parede do casco está revestida por aproximadamente 600 lâminas epidérmicas primárias (LEPs) (POLLITT, 1995), dispostas verticalmente em fileiras paralelas e com formato de longos e finos retângulos (POLLITT, 2004c). O papel das lâminas epidérmicas é suspensivo, uma especialização anatômica que aumenta a área de superfície para a fixação do tecido conjuntivo denso entre a falange distal e o casco. A especialização ocorre na forma de projeções, estando presentes entre 150 e 200 lâminas epidérmicas secundárias (LESSs) sobre a superfície de cada LEP.

De acordo com POLLITT (2004c), as LES hígdas apresentam aparência histológica constante, assumindo a forma arredondada. As células que integram a primeira camada celular, situada no lado epidérmico da MB, são chamadas de células epidérmicas basais. Elas se dividem continuamente ao longo da vida do animal e suas células filhas maduras formam células queratinizadas não nucleadas, as quais formam o eixo central de cada lâmina secundária. A produção contínua dessas células empurra as células queratinizadas contribuindo para a resistência das lâminas epidérmicas tanto primárias como secundárias (POLLITT, 1995). Os núcleos das células basais epidérmicas possuem formato oval e estão posicionados na porção apical de cada célula, em posição distal à membrana basal. O longo eixo de cada núcleo da célula basal é perpendicular ao eixo longitudinal da LES. As lâminas dérmicas secundárias (LDSs) são preenchidas por tecido conjuntivo, que se distribui entre as bases das LESS

(POLLITT, 2004c). A epiderme carece de vascularização, e depende dos capilares adjacentes presentes na derme para satisfazer suas necessidades de oxigênio e substratos energéticos e protéicos. Os nutrientes devem difundir-se através da MB para alcançar as células dispostas nas LESS (POLLITT, 1995).

Na interface entre as lâminas dérmicas e epidérmicas encontra-se uma matriz protéica de grande importância para a manutenção da estrutura laminar, denominada membrana basal (MB). A ultra-estrutura da membrana basal do casco equino é de constituição essencialmente igual a de outros animais (POLLITT, 1994). Como peculiaridade, apresenta no tecido conjuntivo adjacente a epiderme, grande quantidade de fibrilas de ancoragem e uma lâmina densa responsáveis pela transmissão de força extra à região. Na face dérmica da MB se situam as fibras colágenas do tecido conjuntivo ancorados firmemente na ampla superfície da MB que se une entre cada uma das lâminas secundárias, para formar uma base contínua até a superfície dorsal da falange distal onde se fixa fortemente (POLLITT, 1995).

A MB tem participação chave nas células basais epidérmicas e nas lâminas dérmicas. Esta é uma estrutura tridimensional, composta por filamentos de colágeno IV, entrelaçados com glicoproteínas, em particular a laminina-1, que juntos formam a lâmina densa. A laminina-1 é uma das principais proteínas da membrana basal, formando com esta sítios receptores e ligantes a fatores de crescimento, citocinas, moléculas de adesão e integrinas. Sem uma membrana basal intacta e funcional, a epiderme ao qual está ligada perde sua conformação natural (POLLITT, 2004a).

Quando a MB é observada à microscopia de transmissão, há o domínio da lâmina densa, que aparece como uma linha escura seguindo os contornos das células epidérmicas. Na base de cada célula basal pode ser visualizado numerosas placas densas de adesão chamadas hemidesmosomos. Estas estruturas são formadas de várias proteínas, as quais ocorrem de ambos os lados da célula basal formando assim uma ponte que liga o interior da célula com o exterior formado de tecido conjuntivo. As proteínas que preenchem a lacuna entre os hemidesmosomos e a lâmina densa são as lamininas do tipo cinco (laminina-5), e a ancoragem dos inúmeros filamentos de espessura fina dessa laminina é que dão origem à lâmina lúcida (POLLITT, 2004a).

2.5 Biópsia do tecido laminar

Biópsias laminares foram realizadas por SINGH et al. (1994) e MORGAN et al. (2003) em animais em posição quadrupedal. As colheitas realizadas por SINGH et al. (1993) e SINGH et al. (1994) foram de tecidos provenientes de bovinos na junção da sola com a porção caudal do casco. Estudos com equinos foram realizados por MORGAN et al. (2003), CROSER & POLLITT (2006), HANLY et al. (2009) e WATTLE & HANSSON (2010).

MORGAN et al. (2003) realizaram uma única biópsia laminar no casco de cavalos que receberam sobrecarga de carboidratos. A técnica utilizada para a retirada da parede do casco empregou uma broca, da qual não especificam o modelo, e o tecido foi obtido pelo corte de um quadrado mediante incisão com uma lâmina de bisturi. Estas coletas foram realizadas quatro a oito horas após o início da claudicação, ou 72 horas após a administração da sobrecarga de carboidratos, nos equinos que não tiveram o desenvolvimento de claudicação.

No estudo realizado por CROSER & POLLITT (2006), os equinos foram submetidos à indução de laminite pela administração de oligofrutose. Seis biópsias de casco foram feitas em intervalos de seis horas (uma amostra controle antes da indução e 12, 18, 24, 30 e 36 horas após a indução da laminite). Foram realizadas três biópsias em cada um dos membros torácicos. O local da biópsia foi a porção dorsal do casco, localizada a cinco centímetros distal a borda coronária. As amostras subseqüentes, em cada casco, foram efetuadas em posições medial e lateral, a quatro centímetros de cada lado da amostra central. Um orifício de aproximadamente 15 mm de diâmetro foi criado no estrato córneo com uma broca rotativa até as lâminas ficarem visíveis. Um torniquete foi aplicado no boleto para prevenir hemorragia excessiva. Uma lâmina de bisturi estéril número 11 foi usada para cortar um cubo de lados medindo 10 mm através da epiderme laminar e derme sublaminar, chegando à profundidade da falange distal. Uma lâmina de bisturi de ponta curva número 15 (feita pelo aquecimento da lâmina e com pinça curva) foi usada para liberar a biópsia da superfície da falange distal. O orifício efetuado na parede do casco foi, então, limpo com um chumaço de

algodão estéril fixado à extremidade de uma haste estéril e preenchido com resina metilmetacrilato e recoberto com resina utilizada em artefato de fibra de vidro. Após a polimerização da resina, o torniquete foi retirado.

HANLY et al. (2009) também realizaram biópsias seriadas em cascos de equinos hígidos. Estes autores promoveram oito biópsias no mesmo casco do membro torácico, em quatro momentos (zero, seis, 12 e 24 horas). As amostras foram colhidas na região dorsal, três e cinco centímetros distais a borda coronária, com aproximadamente três centímetros de intervalo. Os orifícios foram abertos com broca de baixa rotação com um centímetro de diâmetro, deixando um milímetro de estrato médio. Posteriormente, as lâminas foram cortadas com “punch” de seis milímetros de diâmetro. As amostras eram elevadas e removidas com um bisturi oftálmico. Após o início da cicatrização, o orifício era preenchido com polímero de epóxi (Equi-Thane “Super-fast” Instant Shoe).

WATTLE & HANSSON (2010) realizaram biópsias de pele, casco e da castanha de 10 cavalos com laminite aguda espontânea, no intervalo de 48 horas após os primeiros sinais de claudicação e também de nove animais hígidos, utilizados como controle.

Nos equinos submetidos a indução de laminite, quando avaliados sem claudicação detectável, foram encontrados lesões dérmicas e epidérmicas evidentes, apesar de não haver separação da membrana basal, também pode ser visto que a severidade e a localização das lesões foram associados com a severidade e a duração da claudicação (MORGAN et al. (2003) na histologia, foram observadas células basais com uma forma cuboidal e com núcleos arredondados (WATTLE & HANSSON, 2010).

Nas técnicas realizadas em animais hígidos, não houve alterações, a não ser em amostras de difícil remoção, as quais apresentavam diferentes graus de inflamação ou danos estruturais (HANLY et al., 2009).

III. OBJETIVOS

3.1 Gerais

Este trabalho teve por objetivo a obtenção de tecidos dérmicos e epidérmicos do casco de equinos mediante o desenvolvimento de técnica modificada de biópsia utilizando a face dorsal da muralha da extremidade ungueal dos membros torácicos. A técnica visou colher amostras dos tecidos em condições de serem submetidas a exames histológicos e de microscopia eletrônica de transmissão.

3.2 Específicos

Avaliar a viabilidade de realização de biopsias no casco de equinos, pela modificação da técnica de HANLY et al. (2009);

Avaliar se o procedimento de biópsia causa alterações nas funções vitais e locomotores dos animais submetidos ao experimento;

Descrever características morfológicas do tecido dérmico e epidérmico do casco por meio de microscopia óptica com coloração de Hematoxilina-Eosina e da membrana basal com coloração de Ácido Periódico-Schiff;

Descrever a disposição das fibras de colágeno presentes no tecido dérmico do casco por meio de microscopia de luz polarizada com coloração de Picrossírius Red;

Descrever características morfológicas ultraestruturais do tecido dérmico e epidérmico do casco por meio de microscopia de transmissão;

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados oito equinos adultos, quatro machos e quatro fêmeas, sem raça definida, entre 14 e 18 anos de idade. Antes de iniciar o período experimental, os animais foram examinados clinicamente para avaliação de parâmetros fisiológicos. Os equinos foram mantidos em baias individuais, no Setor de Experimentação do Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV/UNESP, e receberam como alimentação diária: 1% do peso vivo de ração à base de milho, farelo de trigo e farelo de soja com aproximadamente 11% de proteína, além de feno, sal mineral e água “ad libitum”. Os animais utilizados não apresentavam alterações clínicas. Estudo aprovado na Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA) – Protocolo nº 027914/09.

Esses equinos foram alocados em um único grupo, o qual passou por três fases (F) experimentais. Na F I (controle), foi realizado exame radiográfico da porção distal do membro torácico direito (falanges média e distal) dos animais para verificação da higidez podal. Na F II (coleta inicial) os animais foram sedados e submetidos à primeira biópsia localizada na porção mediana da face dorsal da parede do casco. Já na F III (coleta final), 24 horas após a primeira coleta, os animais foram sedados novamente e realizou-se a segunda biópsia à aproximadamente 1,5 centímetros à direita da primeira.

4.2 Exame Clínico

4.2.1 Exame Físico Geral

Os equinos foram submetidos a exames clínicos em todas as fases deste estudo e diariamente durante cinco dias após a realização das biópsias, observando-se, mediante auscultação torácica, as frequências cardíaca (determinada em batimentos por minuto, bpm) e respiratória (medida em movimentos por minuto, mpm); avaliando-

se a perfusão das mucosas, classificadas de acordo com a coloração (em rósea, pálida, azulada, vermelho vivo ou vermelho-tijolo) e de acordo com a determinação do tempo de preenchimento capilar (TPC) por meio de compressão digital da mucosa gengival e determinação do tempo, em segundos, de retorno à coloração anterior; apreciação da atividade intestinal mediante auscultação abdominal, determinando-se ausência de borboríngos, atividade intestinal diminuída, normal ou aumentada; avaliação do turgor cutâneo por meio da determinação do tempo de retorno a posição normal após realização de pregueamento da pele na região lateral do pescoço (classificação em normal [+], pouco diminuído [++] e muito diminuído [+++]); determinação da temperatura corporal mediante utilização de termômetro de bulbo de mercúrio (em graus Celsius). A temperatura da parede externa dos cascos (muralha) foi avaliada por meio de termômetro infravermelho à laser¹.

4.2.2 Avaliação das estruturas musculoesqueléticas e da locomoção

As estruturas musculoesqueléticas foram avaliadas antes da realização das biópsias e durante todo o experimento. Primeiramente foi realizada a inspeção dos animais em repouso, com a finalidade de identificar aumentos de volume, cicatrizes ou lesões musculares. Em seguida, os animais foram trotados, sendo puxados a mão pelo cabresto para avaliação da movimentação dos membros, pescoço e cabeça, a fim de detectar possíveis claudicações (MARXEN, 2001).

As claudicações eventualmente detectadas foram classificadas em seis graus, a saber: claudicação inexistente sob quaisquer circunstâncias (0); claudicação difícil de observar e de manifestação inconsistente, independentemente da circunstância (1); claudicação difícil de observar ao passo ou quando trotando em linha reta, mas que se manifesta de forma consistente sob certas condições como carregando peso (sob sela), andando em círculos, em inclinações, superfícies duras, etc. (2); claudicação observada claramente ao trote em todo tipo de condição (3); claudicação de manifestação óbvia ao trote (4) e claudicação que produz mínimo apoio do membro em movimento e ou ao repouso ou completa impossibilidade de movimentação (5) (ROSS & DYSON, 2003).

¹ Termômetro infravermelho, SK-8700, Sato Keiryoki MFG CO LTD, Japão.

4.3 Exame Radiográfico

Após limpeza do casco com escovação utilizando água e sabão, os animais foram submetidos a exames radiográficos (nas posições dorso-palmar e látero-medial) da porção distal do membro torácico direito (falanges média e distal). Ambas realizadas para verificação da higidez podal. Após 10 dias da realização da biópsia, realizou-se novo exame radiográfico para avaliação da falange distal.

4.4 Colheita de Material

4.4.1 Procedimento de sedação

Após jejum alimentar sólido e hídrico de 12 e seis horas, respectivamente, os equinos foram sedados com cloridrato de detomidina² (0,01 mg/kg) por via intravenosa. Os cavalos foram mantidos em troncos de contenção para equinos, durante os procedimentos de biópsia. Realizou-se a tricotomia e a anti-sepsia cutânea da região da articulação metacarpofalangeana na qual se efetuou o bloqueio dos nervos digitais palmares medial e lateral, sobre a face abaxial do osso sesamóide proximal. Para o bloqueio perineural foram utilizados cinco mililitros de cloridrato de lidocaína³, antes de cada coleta. No intuito de diminuir a circulação sanguínea na região da biópsia, foi aplicado garrote no antebraço, evitando sangramento excessivo durante o procedimento (Figura 1). Para diminuir a excitação do animal, colocou-se algodão no ouvido deste, uma vez que a micro retífica utilizada na abertura do orifício do casco, pelo qual se realizou a biópsia, produzia ruídos.

² Dormium V[®], Agener União Saúde Animal, Embu-Guaçu, SP, Brasil.

³ Xylestesin[®], Cristália Prod. Quim. Farm. LTDA, Itapira, SP, Brasil.



Figura 1. Fotografia de equino em tronco de contenção (A) na qual observa-se cavalo já sedado, com garrote aplicado na altura do osso rádio (antebraço). Em (B) observa-se detalhadamente a aplicação do garrote no antebraço.

4.4.2 Biópsia do casco

As amostras do tecido laminar foram colhidas em dois momentos, com intervalo de 24 horas, no membro torácico direito, por meio da técnica descrita por HANLY et al. (2009) com modificações. A primeira biópsia foi efetuada na região central da face dorsal do casco (pinça), a aproximadamente 2,5 cm distal da borda coronária e a 1,2 cm do plano sagital da parede do casco. A segunda coleta realizou-se paralelamente à primeira, equidistante da borda coronária e à distância de aproximadamente 1,5 cm da primeira.

Inicialmente, o casco foi limpo com água e sabão, depois realizou-se a anti-sepsia da sola, com povidona-iodo degermante e água oxigenada 10 Vol.. Em seguida, com o auxílio de uma pedra de esmerilar à base de óxido de alumínio, medindo 4,8 mm de diâmetro, removeram-se os estratos externo e médio da muralha do casco, sempre

umedecendo o casco com solução fisiológica para evitar o aquecimento excessivo resultante do atrito. O ponto de aprofundamento máximo foi determinado mediante pesquisa da rigidez da parede utilizando uma pinça hemostática (Halsted). Quando se detectou o amolecimento da parede do casco, o desgaste dos estratos foi interrompido. Neste momento, realizou-se a anti-sepsia do orifício, com povidona-iodo degermante e tintura de iodo a 5%. O local foi seco com gaze estéril e, utilizando-se uma lâmina de bisturi nº 11 descartável, foram efetuados cortes laterais profundos das lâminas até alcançar a falange distal. No total, foram quatro incisões com bisturi, formando um quadrado. O núcleo do material foi então elevado com uma pinça de dissecação e desprendido da falange distal com um esculpador Frahm 02. Após a retirada do material, os locais de biópsia foram secos e recobertos com gaze estéril, enfaixados e protegidos com fita adesiva de polietileno reforçado com tecido de algodão⁴ (Figura 2).

⁴ Silver Tape[®], 3M, Sumaré, SP, Brasil.



Figura 2. Sequência de procedimentos para colheita de amostra dérmica e epidérmica podal de equino
(A) abertura do orifício nos estratos externo e médio da parede do casco, utilizando pedra de esmerilar à base de óxido de alumínio;
(B) orifício após anti-sepsia com tintura de iodo a 5%;
(C) incisão do estrato lamelar com lâmina de bisturi até a face dorsal da falange distal;
(D) uso do esculpador Frahn para separação do tecido laminar;
(E) retirada da amostra com auxílio de pinça hemostática Halsted;
(F) bandagem realizada ao final do procedimento.

Para a realização da segunda biópsia, retirou-se a fita adesiva de polietileno reforçado com tecido de algodão e a atadura, mas não a gaze do curativo da primeira coleta que permaneceu introduzida no orifício. Nova anti-sepsia foi realizada, mediante o uso de povidona-iodo degermante e tintura de iodo a 5%. O procedimento de biópsia foi realizado de forma semelhante à anterior. Ao término da segunda coleta, a gaze do primeiro orifício foi retirada e este foi limpo com água oxigenada 10 Vol.. Em seguida, colocou-se uma compressa de gaze no orifício e o membro foi novamente enfaixado e protegido com a fita adesiva de polietileno reforçado com tecido de algodão.

Após 24 horas da segunda biópsia, retirou-se a fita adesiva, a atadura e as gazes para realizar o preenchimento dos orifícios com resina acrílica autopolimerizável⁵. Primeiramente, os orifícios foram secos com gaze estéril e, em seguida, foram recobertos parcialmente com resina acrílica associada a 800 mg de metronidazole⁶. Após a secagem da primeira camada, o restante do orifício foi preenchido com resina, na sua forma pura, para evitar a entrada de água ou impurezas (Figura 3).

⁵ JET Acrílico Auto Polimerizante®, Artigos Odontológicos Clássicos LTDA. São Paulo, SP, Brasil.

⁶ Flagimax®, Belfar LTDA, Belo Horizonte, MG, Brasil.

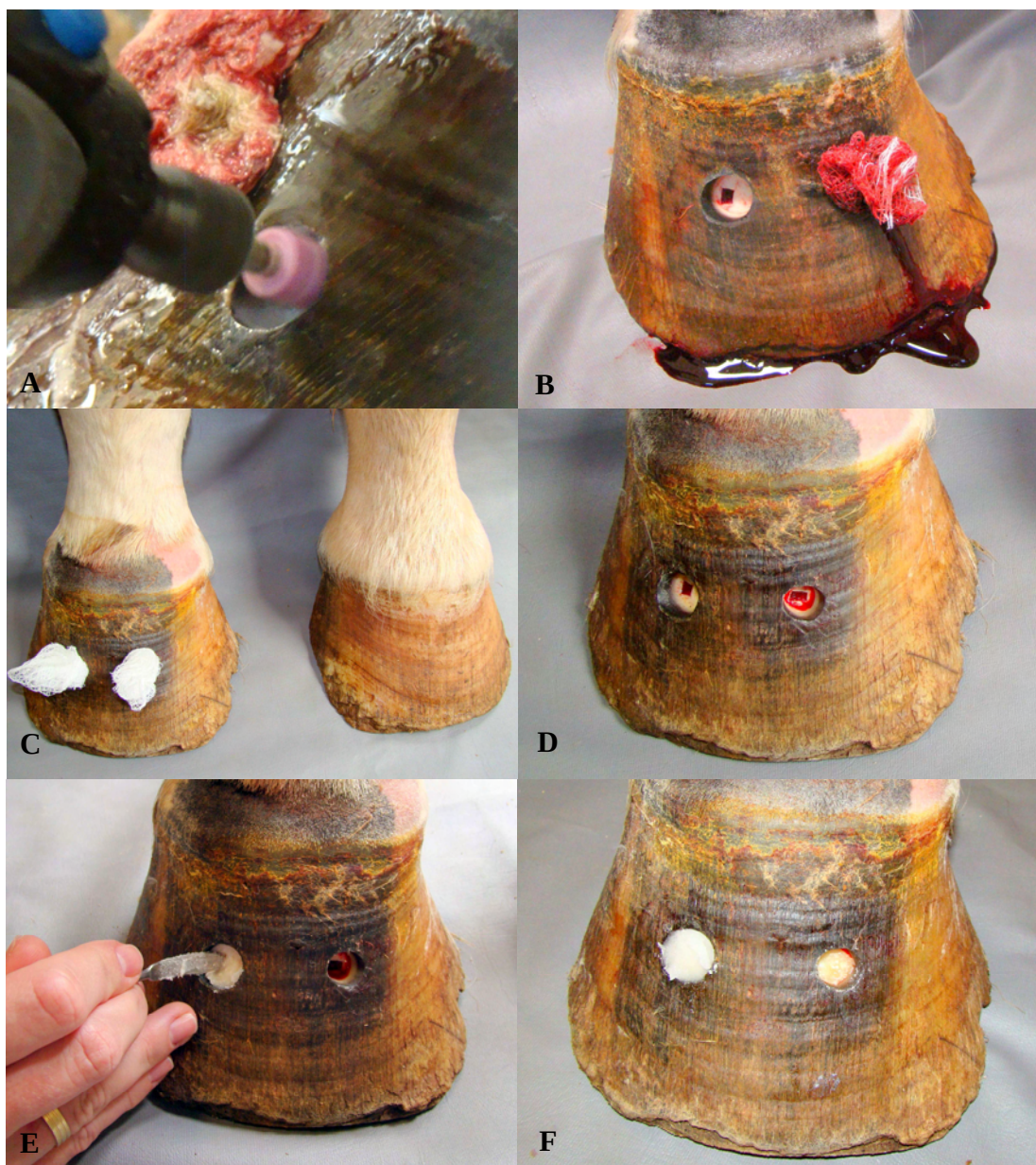


Figura 3. Sequência de procedimentos para a segunda colheita e preenchimento do orifício na face dorsal da parede do casco.

- (A) abertura do segundo orifício nos estratos externo e médio da parede do casco com o auxílio de uma pedra de esmerilar à base de óxido de alumínio acoplada em uma micro-retífica, sem a retirada da compressa de gaze do primeiro curativo;
- (B) limpeza do orifício da primeira biópsia com água oxigenada 10 Vol. ao fim da segunda colheita, aonde é possível observar a janela previamente realizada;
- (C) secagem dos dois orifícios vinte e quatro horas após a segunda biópsia;
- (D) orifícios prontos para aplicação da resina;
- (E) preenchimento do primeiro orifício com resina acrílica associado à metronidazole;
- (F) detalhamento do revestimento do primeiro orifício com resina acrílica pura e o segundo orifício apenas com a camada de resina associada ao metronidazole.

O material obtido era lavado com solução fisiológica, para a retirada de sangue, e posteriormente cortado em dois fragmentos. O primeiro foi imerso em solução de formol tamponado com fosfato (pH 7,4), para fixação e posterior processamento histológico de rotina para inclusão em parafina. O segundo foi fixado em solução de glutaraldeído a 2% em tampão de fosfato de sódio 0,1M e armazenado em geladeira até o momento do processamento para microscopia eletrônica de transmissão (Figura 4).

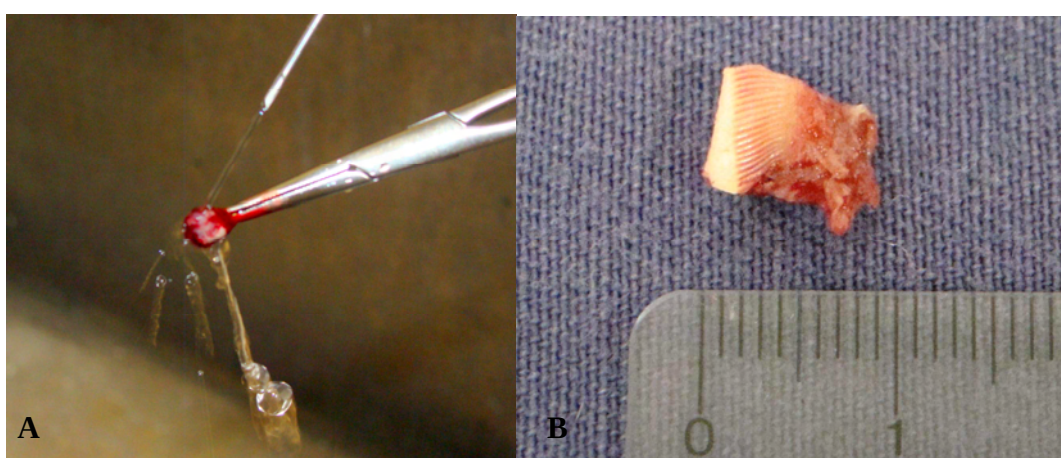


Figura 4. Imagem do tecido laminar do casco equino sendo lavado com solução fisiológica para a remoção do excesso de sangue (A) e da amostra destinada à análise das microscopias óptica e de luz polarizada e microscopia eletrônica de transmissão (B).

4.5 Avaliação Macroscópica

Os fragmentos laminares obtidos na biópsia foram fotografados com câmara Canon EOS7D digital, lente EF 100mmf/2.8L Macro IS USM e Flash circular Vivitar para posterior avaliação quanto à integridade das lâminas primárias dérmicas e epidérmicas podais.

4.6 Medidas do Casco

As medições dos cascos foram realizadas no momento de colocação das resinas nos orifícios das biópsias e após setenta dias da primeira medição. As medidas foram efetuadas com o auxílio de um paquímetro de precisão, e avaliou-se o diâmetro total dos cascos pela sola, a largura e a profundidade dos orifícios das biópsias e a distância dos orifícios à borda coronária.

4.7 Análise Histológica

4.7.1 Microscopia Óptica

As amostras dérmicas e epidérmicas foram processadas para inclusão em parafina, e realizou-se secções transversais seriadas em micrótomo. Os cortes de aproximadamente cinco a sete micrometros de espessura foram dispostos em lâminas de vidro lapidada, os quais foram, em seguida, corados com hematoxilina-eosina (HE) com o objetivo de visualizar a integridade das lâminas dérmicas e epidérmicas e das células basais; com ácido periódico-Schiff (PAS) para observação da integridade da MB; e com Picrossírius Red (PS) para a visualização da distribuição das fibras colágenas. Todo esse processamento das amostras foram realizados no laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia Animal da FCAV – UNESP, câmpus de Jaboticabal, São Paulo. Posteriormente, efetuou-se documentação fotográfica e análise histológica descritiva das lâminas. Foi utilizado microscópio óptico binocular Nikon Eclipse E200 e sistema fotográfico digital Nikon 5400.

4.7.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

As amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio, e preparadas para inclusão em resina de Araldite®. Em seguida foram realizados cortes transversais em

ultramicrotomo. Os cortes foram dispostos em grades de cobre nas quais se realizou a contrastação do material com acetato de uranila e citrato de chumbo. Estes procedimentos foram efetuados no laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - USP, câmpus de Ribeirão Preto, São Paulo. Posteriormente as amostras foram analisadas no laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade Estadual Paulista – UNESP, câmpus de Jaboticabal, São Paulo. Utilizando-se microscópio JEOL 5010.

4.8 Análise Estatística

As variáveis estudadas foram analisadas mediante o procedimento GLM (General Linear Models) do programa computacional SAS – Statistical Analysis System⁷ (2002). Realizou-se a Análise de Variância (ANOVA) para avaliar os efeitos clínicos no decorrer dos procedimentos estudados. Utilizou-se o teste Tukey para a comparação das médias das medidas do crescimento dos cascos e para a comparação das médias dos sinais clínicos avaliados. Para todas as análises realizadas estabeleceu-se o nível de significância igual a $p < 0,05$ (SAMPAIO, 1998). Os resultados foram apresentados como valores médios $\pm$ erro-padrão da média (EPM), na forma de tabelas e figuras.

⁷ SAS, SAS Institute, CARY, NJ, EUA.

V. RESULTADOS

5.1 Avaliação clínica

Mediante análise das variáveis clínicas é possível observar que o procedimento de biópsia não promoveu alterações nas frequências cardíaca (FC) e respiratória (FR), tempo de preenchimento capilar (TPC), coloração de mucosa (CM), temperatura retal (T_R), temperatura cutânea (T_{CUT}), temperatura do casco da realização da biópsia (T_{BIO}), temperatura do casco contralateral (T_{CO}), atividades intestinais, turgor cutâneo e na locomoção no decorrer deste estudo (Tabela 1).

Tabela 1. Médias $\pm$ erro padrão da média (EPM) das variáveis clínicas de equinos submetidos à biópsia podal e acompanhamento durante quatro dias de recuperação.

Fases	Variáveis fisiológicas							
	FC (bpm)	FR (mpm)	TPC (seg)	CM	T_R (°C)	T_{CUT} (°C)	T_{BIO} (°C)	T_{CO} (°C)
Controle	41,25 $\pm$ 1,35	15,25 $\pm$ 0,75	2,75 $\pm$ 0,16	rósea	37,78 $\pm$ 0,09	29,12 $\pm$ 0,47	29,12 $\pm$ 0,29	29,25 $\pm$ 0,52
1ª Biópsia	40,00 $\pm$ 0,75	15,75 $\pm$ 1,43	2,87 $\pm$ 0,12	rósea	37,86 $\pm$ 0,09	29,75 $\pm$ 0,16	29,37 $\pm$ 0,26	29,37 $\pm$ 0,26
2ª Biópsia	41,00 $\pm$ 0,65	13,50 $\pm$ 0,73	2,75 $\pm$ 0,16	rósea	37,83 $\pm$ 0,05	30,12 $\pm$ 0,39	29,87 $\pm$ 0,35	29,50 $\pm$ 0,37
dia 1	43,42 $\pm$ 0,57	16,28 $\pm$ 0,28	2,85 $\pm$ 0,14	rósea	37,92 $\pm$ 0,06	29,71 $\pm$ 0,18	29,42 $\pm$ 0,20	30,14 $\pm$ 0,26
dia 2	40,57 $\pm$ 1,04	13,14 $\pm$ 0,70	2,85 $\pm$ 0,14	rósea	37,87 $\pm$ 0,04	29,71 $\pm$ 0,18	29,28 $\pm$ 0,18	29,85 $\pm$ 0,34
dia 3	43,14 $\pm$ 1,22	15,71 $\pm$ 0,68	2,85 $\pm$ 0,14	rósea	37,90 $\pm$ 0,05	29,57 $\pm$ 0,29	29,57 $\pm$ 0,20	29,57 $\pm$ 0,29
dia 4	42,85 $\pm$ 1,14	12,14 $\pm$ 2,00	2,85 $\pm$ 0,14	rósea	37,84 $\pm$ 0,05	29,57 $\pm$ 0,20	29,42 $\pm$ 0,29	29,71 $\pm$ 0,18

FC (frequência cardíaca); FR (frequência respiratória); TPC (tempo de preenchimento capilar); CM (coloração de mucosa); T_R (temperatura retal); T_{cut} (temperatura cutânea); T_{bio} (temperatura do casco com a biópsia); T_{co} (temperatura do casco contralateral). Não foram observadas diferenças significativas pelo teste Tukey ($p > 0,05$).

5.2 Avaliação radiográfica

A análise radiográfica teve-se à avaliação da face dorsal da falange distal antes e após a realização dos procedimentos de biópsia. Ao avaliar as projeções radiográficas látero-medial e dorso-palmar, realizadas nos dois períodos, observou-se a manutenção

da integridade desta superfície falangeana onde se realizou a biópsia, visualizando-se a regularidade e o alinhamento da falange com a muralha do casco. Também pode ser vista a presença de região radioluscente nos locais de biópsia, na projeção látero-medial (Figura 5).

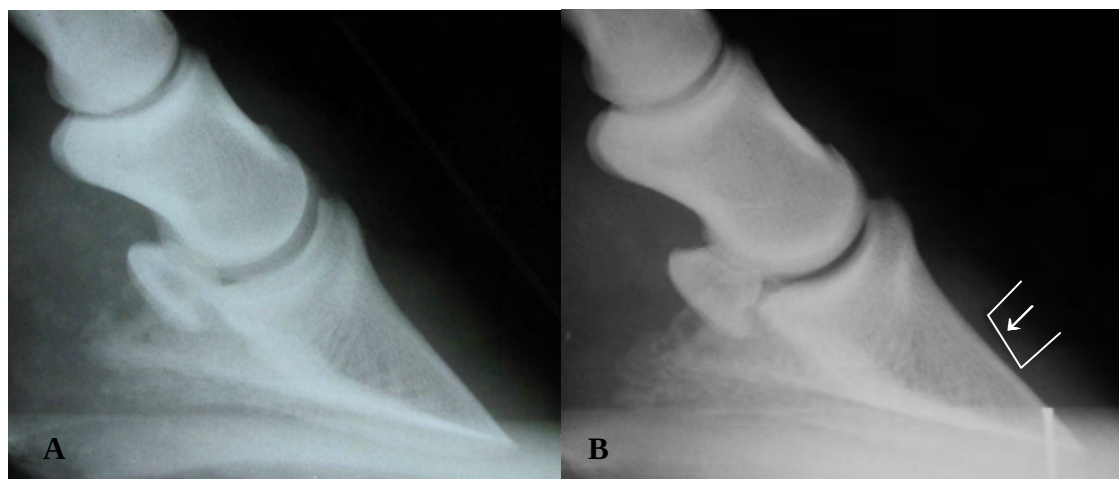


Figura 5. Imagens radiográficas em projeção látero-medial da falange distal de equinos. A; realizada antes da biópsia. B; 10 dias após o procedimento, onde se observa a presença de região radioluscente (seta) na parede do casco, mostrando a profundidade da biópsia (linha branca).

5.3 Avaliação macroscópica

Os fragmentos de tecido laminar obtidos apresentavam forma cuboide, com a base medindo aproximadamente cinco milímetros e os lados sete milímetros.

Após lavagem com solução fisiológica e fixação em formol tamponado com fosfato (pH 7,4), foi possível observar parte significativa do extrato médio, do qual emergiam as lâminas epidérmicas primárias, de coloração esbranquiçada. As LEPs mediam aproximadamente três a quatro milímetros de comprimento, com o tecido dérmico distribuindo-se entre estas. Entre oito e doze LEPs foram obtidas em cada amostras. A derme mostrava-se ligeiramente rosada estendendo-se para além das LEPs. A borda do tecido dérmico separado da falange distal apresentava-se irregular. A

arquitetura natural das LEPs e LDPs foi preservada, possibilitando a realização de análises histológicas e ultra-estruturais (Figura 6).

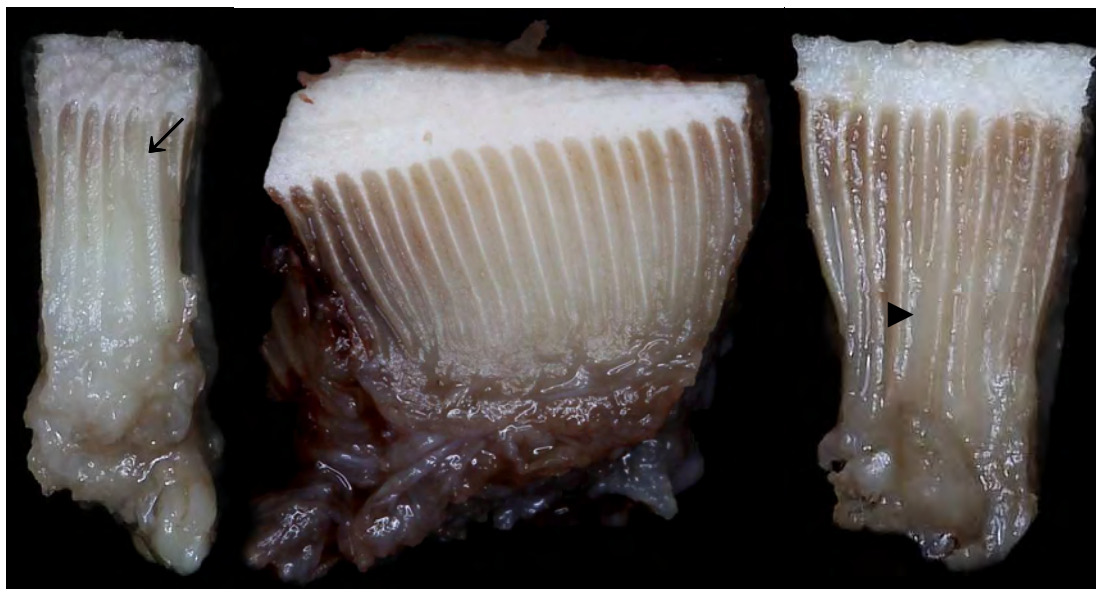


Figura 6. Imagens de secções transversais da porção interna da muralha (região tubular), das lâminas epidérmicas (seta) e dérmicas (►) primárias e do tecido conjuntivo que se ligará a falange distal.

Decorrido 25 dias da primeira biópsia, um dos equinos veio a óbito por causas naturais. Neste animal, realizou-se o corte transversal do casco, nas regiões dos orifícios de retirada das amostras. No orifício da primeira biópsia a resina acrílica manteve-se, porém no da segunda biópsia a resina não resistiu e se desprendeu, permitindo a penetração de terra. Também efetuaram-se cortes horizontais na região da falange distal, para averiguação da integridade das lâminas dérmicas e epidérmicas primárias (Figura 7). Na análise macroscópica pode ser observada reação cicatricial nas regiões das biópsias e nas regiões circunvizinhas observou-se o tecido laminar preservado e íntegro.

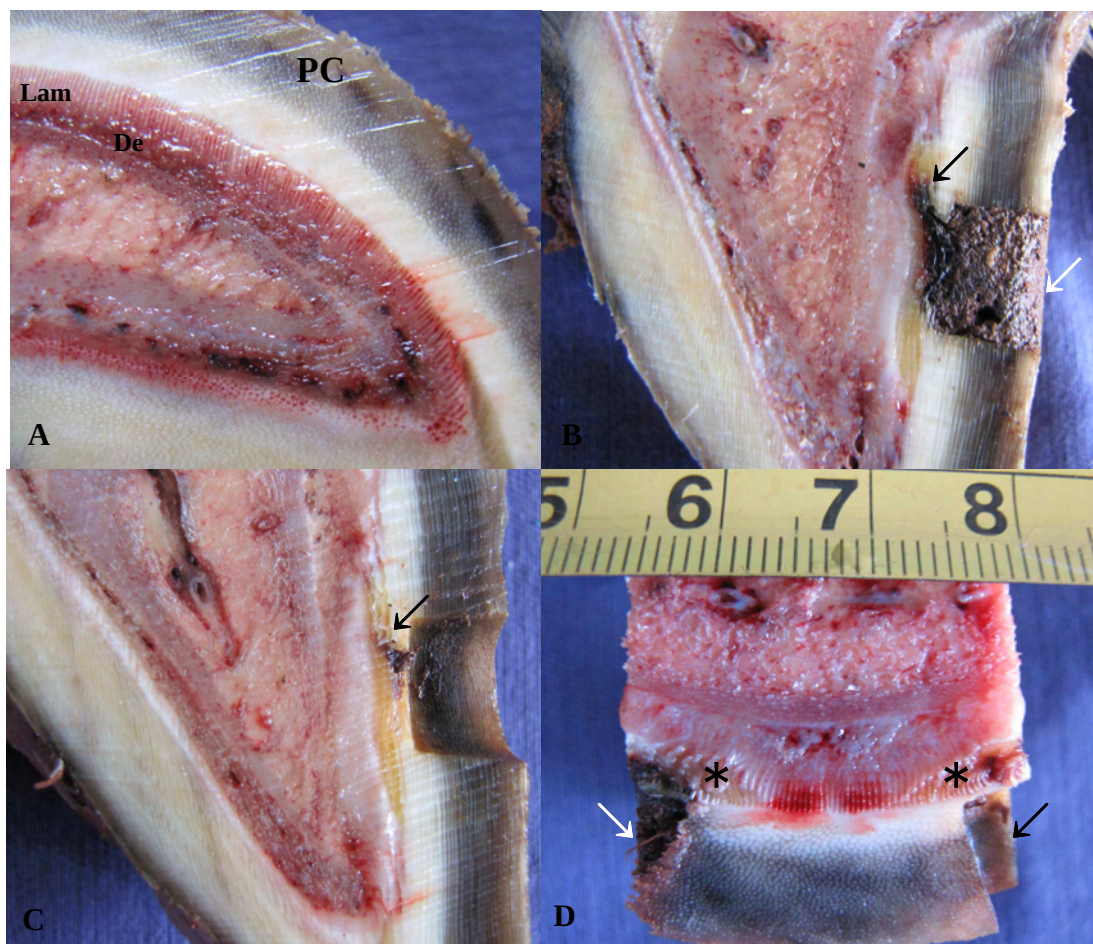


Figura 7. Imagens de secções transversais e horizontais do casco de equino necropsiado 25 dias após as biópsias.

(A) corte horizontal da falange distal (região hígida, 2,0 cm da borda coronária), parede do casco (PC), lâminas epidérmicas e dérmicas (Lam), derme (De);

(B) corte transversal do casco onde observa-se o orifício deixado pela primeira biópsia (seta branca - contaminação por terra; seta preta - reação cicatricial);

(C) corte transversal do orifício da segunda biópsia (seta - reação cicatricial);

(D) corte horizontal entre os dois orifícios (seta branca - primeira biópsia; seta preta - segunda biópsia; * - reação cicatricial).

5.4 Avaliações microscópicas

5.4.1 Histopatologia

A análise histológica foi efetuada na área que abrange os tecidos epidérmicos e dérmicos do casco com destaque à morfologia normal do tecido, assim como à presença de alterações entre os tempos das biópsias.

5.4.1.1 Coloração de Hematoxilina-Eosina (HE)

As análises histológicas das amostras das duas biópsias apresentaram as lâminas epidérmicas primárias (LEPs) e lâminas dérmicas primárias (LDPs) intactas (Figura 8). Também se observou que as extremidades das lâminas epidérmicas secundárias (LES) apresentaram a forma arredondada e o seu eixo longitudinal se posicionou, em geral, em direção a falange distal e em ângulo reto com o eixo queratinizado da LEP. A largura exibida pelas LESs foi maior visualmente que a apresentada pelas lâminas dérmicas secundárias (LDS), apresentando harmonia e paralelismo entre si, com o tecido conectivo bem visível (Figura 9).

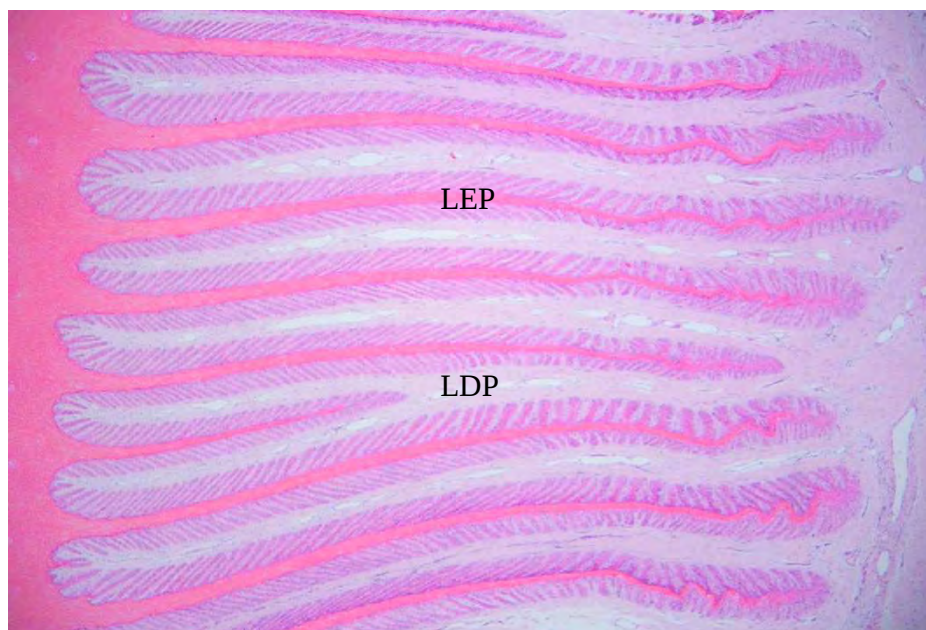


Figura 8. Fotomicrografia ilustrando as lâminas epidérmicas e dérmicas do casco de equinos hígidos após realização da primeira biópsia, na qual se observa a integridade da amostra e a disposição das lâminas epidérmicas primárias (LEP) e lâminas dérmicas primárias (LDP). Hematoxilina-Eosina, obj 4x.

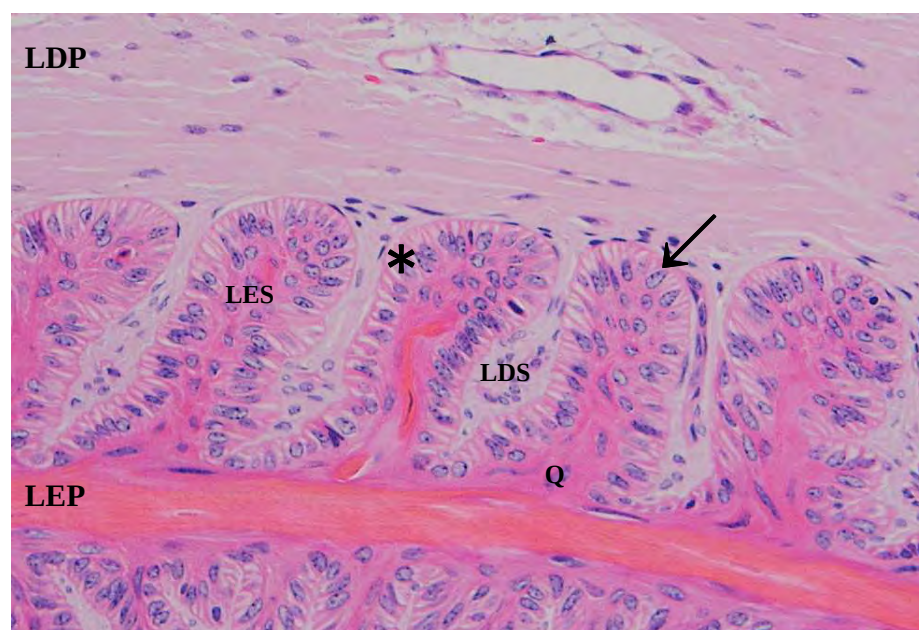


Figura 9. Fotomicrografia das lâminas epidérmicas e dérmicas do casco de equinos hígidos após realização da primeira biópsia, visualizando-se a diferença de largura entre lâmina epidérmica secundária (LES) e lâmina dérmica secundária (LDS), o formato oval do ápice das LES, a camada de células epidérmicas basais (*) e a presença de queratinócitos (Q) nas LES. Também podem ser observados os núcleos ovais no ápice das células basais (seta). Hematoxilina-Eosina, obj 40x.

Também puderam ser observadas algumas áreas com presença de hemácias, em ambas as biópsias (Figura 10).

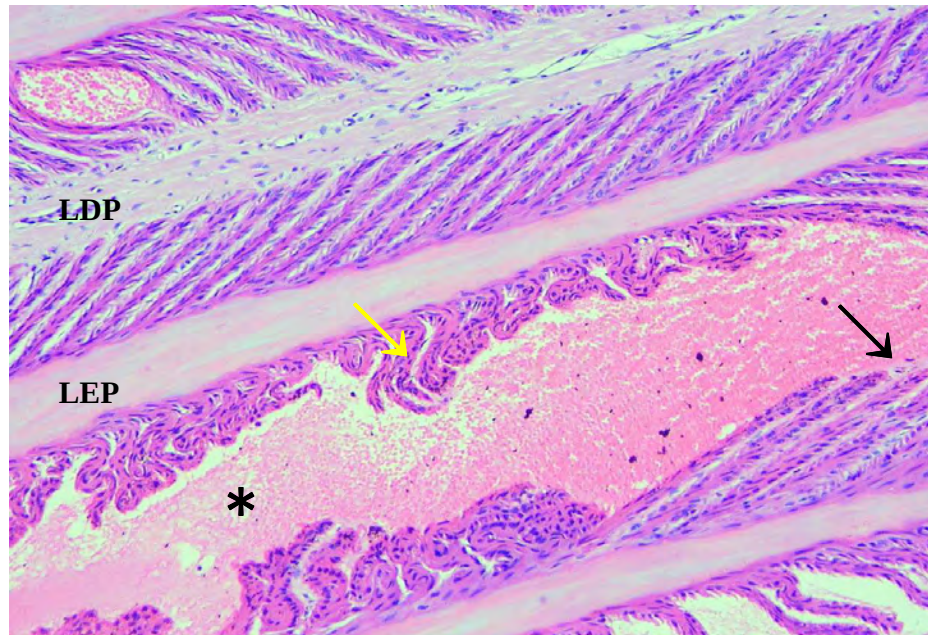


Figura 10. Fotomicrografia ilustrando a presença de hemácias (*) em regiões localizadas das lâminas epidérmicas e dérmicas do casco de equino hígido após realização da segunda biópsia. Observa-se também a degradação decorrente do trauma causado pelo procedimento de biópsia das lâminas epidérmicas secundárias (LES) e lâminas dérmicas secundárias (LDS) (seta amarela) e lâmina dérmica primária (LDP) (seta preta). Hematoxilina-Eosina, obj 20x.

Nos cortes das regiões lamelares do casco do equino que foi necropsiado 25 dias após as biópsias, puderam ser observadas deformidades crônicas das lâminas epidérmicas e dérmicas primárias. As LEPs apresentaram irregularidades simétricas na sua morfologia, e também na base da LEP presenciou-se o englobamento do tecido dérmico por células epidérmicas basais. No ápice das LEPs notou-se desigualdade no tamanho das LES e disposição irregular, caracterizado pelos ápices apontando em várias direções. Na coloração de PAS, pode ser observado que a integridade da MB se manteve.

No interior da LES se encontravam as CBs, com seus formatos e núcleos ovais, aderidas à MB, porém, a proximidade das LDSs ao eixo queratinizado da LEP

apresentava visualmente uma distância elevada, devido à grande proliferação das CBs. A região queratinizada da LEP só foi encontrada próximo à base das LEPs (Figuras 11 e 12).

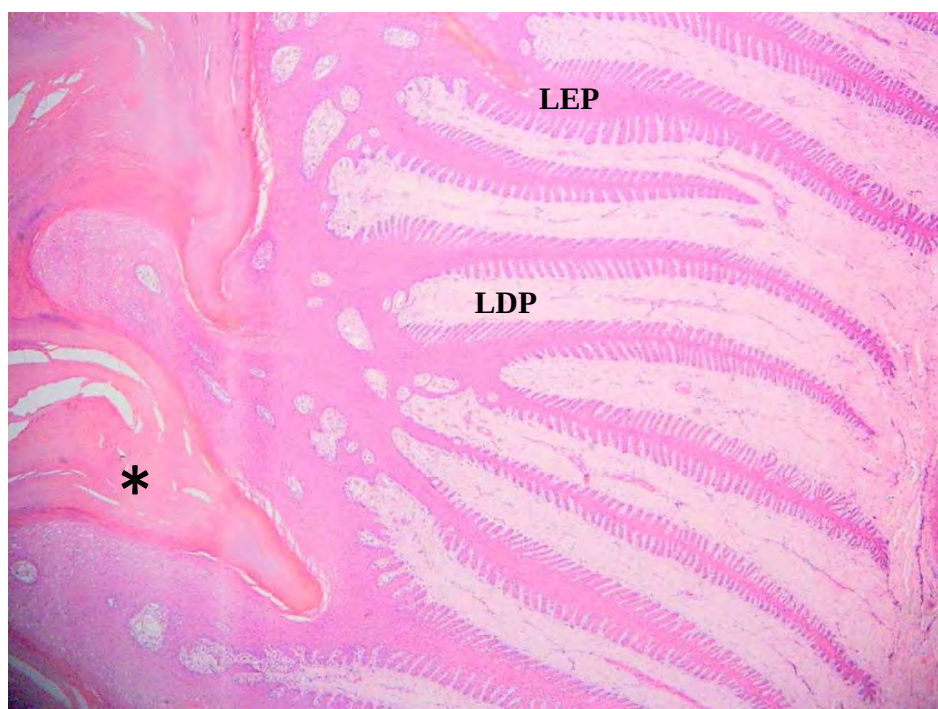


Figura 11. Fotomicrografia ilustrando as lâminas epidérmicas e dérmicas do casco do equino necropsiado 25 dias após realização das biópsias, visualizando-se grande deformidade da região queratinizada (*), e lâminas epidérmicas primárias (LEP) com distribuição assimétrica. Hematoxilina-Eosina, obj 4x.

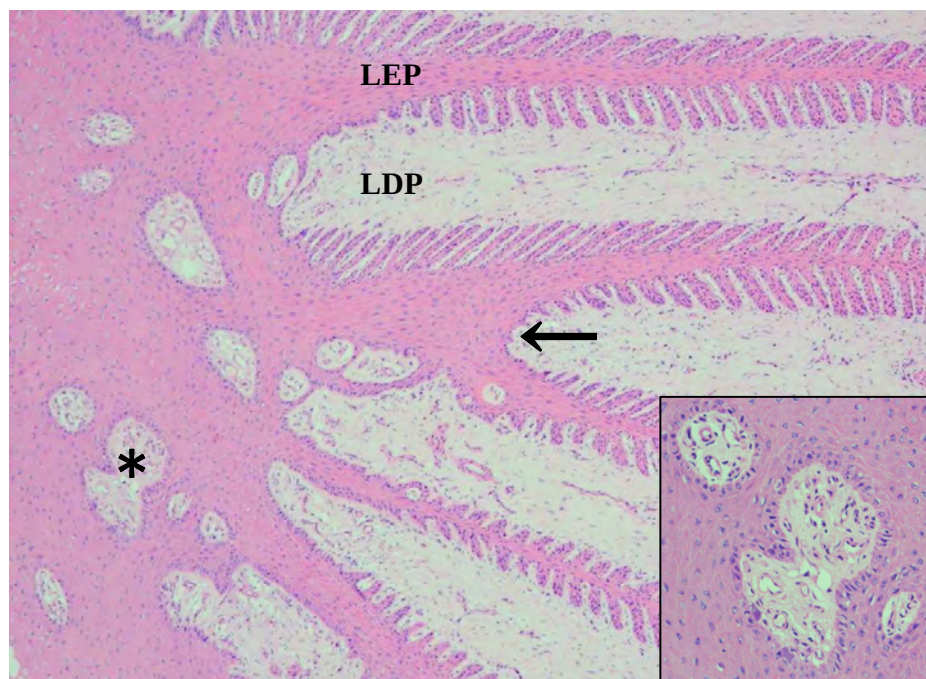


Figura 12. Fotomicrografia ilustrando as lâminas epidérmicas e dérmicas do casco do equino necropsiado 25 dias após a realização das biópsias, visualizando-se a divisão das lâminas epidérmicas primárias (seta) e o englobamento de tecido conjuntivo pelas células epidérmicas basais (*) Hematoxilina-Eosina, obj 10x. No detalhe o englobamento na obj 40x.

Também pode ser observada grande quantidade de queratinócitos não maduros no interior das LEPs, decorrentes da proliferação excessiva de células basais. Constatou-se a presença de queratinócitos apoptóticos nas LEPs e LESs. A coloração eosinofílica citoplasmática observada se deve à condensação de organelas citoplasmáticas (Figura 13).

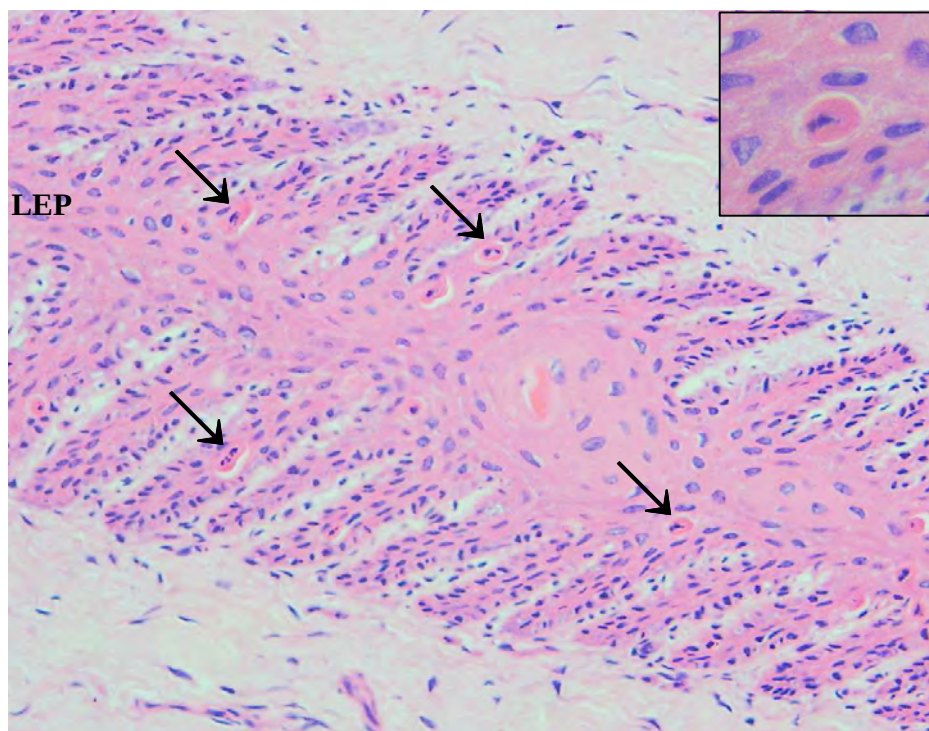


Figura 13. Fotomicrografia ilustrando grande quantidade de queratinócitos não maduros no interior da lâmina epidérmica primária (LEP) e a presença de queratinócitos apoptóticos (setas) presentes na LEP e lâminas epidérmicas secundárias (LES). Hematoxilina-Eosina, obj 40x. Observa-se no detalhe queratinócito apoptótico na obj 100x.

5.4.1.2 Coloração com Ácido Periódico-Schiff (PAS)

Na coloração com PAS, foi possível visualizar claramente a membrana basal (MB), localizada na interface entre as LESS e LDSs, a qual mostrou-se de coloração carmim. Disposta no entorno da LES, a MB penetrava profundamente nas criptas existentes entre estas e as LDSs. A MB apresentava-se intacta e claramente delineada, sem qualquer interrupção. Próximo ao eixo queratinizado da LEP, a distância entre a MB e o depósito de queratina apresentava visualmente distância equivalente a uma ou duas células basais epidérmicas. No ápice das LES, a MB acompanhou sempre o contorno arredondado desta (Figura 14).

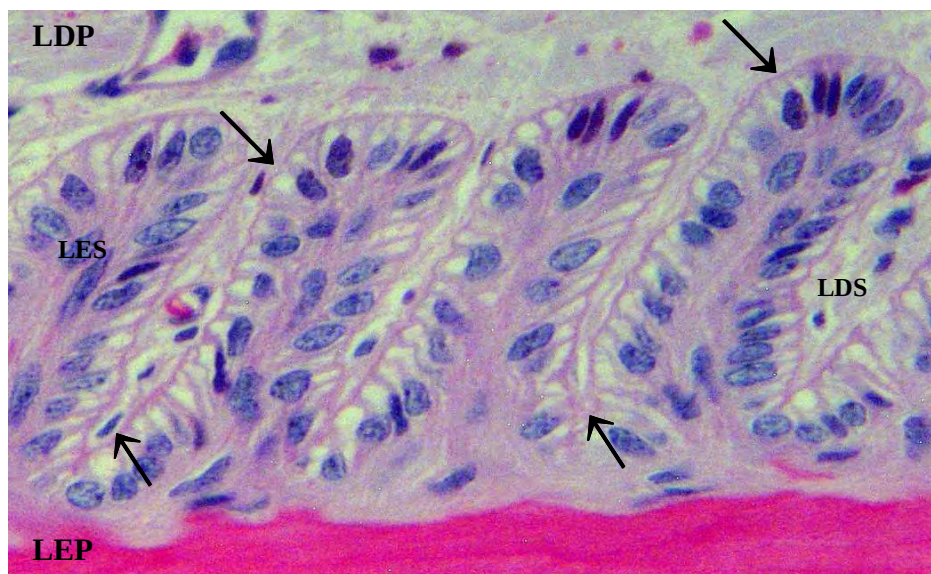


Figura 14. Fotomicrografia ilustrando as lâminas epidérmicas e dérmicas do casco de equino hígido após realização da segunda biópsia, visualizando-se a membrana basal corada de carmim, contornando nitidamente as lâmina epidérmicas secundárias (LES) (setas). Ácido Periódico-Schiff, obj 100x.

5.4.1.3 Coloração com Picrossírius Red (PS)

Por meio da coloração com PS foi possível identificar as fibras de colágeno presentes no tecido dérmico. Estas fibras apresentaram-se espessas, birrefringentes e variaram de coloração alaranjado a vermelho vivo quando observadas em microscópio de luz polarizada plana (fibras colágenas maduras). Observou-se feixes de colágeno emergindo das CBs em direção a falange distal, percorrendo neste percurso, o tecido conectivo presente nas LDSs e LDPs (Figuras 15, 16 e 17).

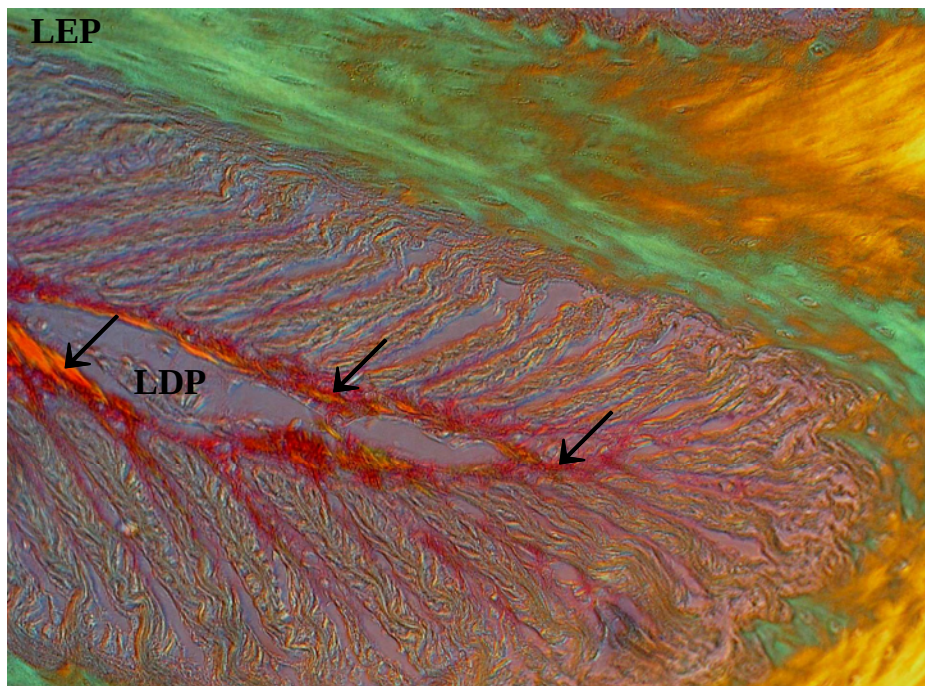


Figura 15. Fotomicrografia ilustrando as lâminas epidérmicas e dérmicas do casco de equino hígido, visualizando-se o colágeno migrando da base da lâmina epidérmica primária (LEP), e se agrupando com maior quantidade de fibras colágenas em sentido à falange distal (setas). Picrossírius Red, obj 40x em microscópio com luz polarizada plana.

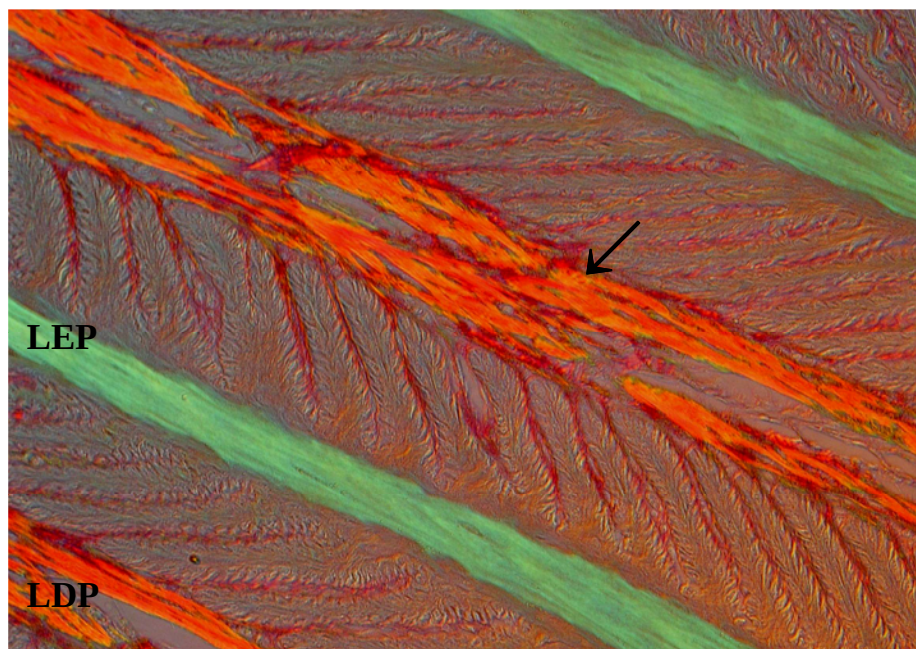


Figura 16. Fotomicrografia ilustrando as lâminas epidérmicas e dérmicas do casco de equino hígido, visualizando-se as fibras de colágeno se agrupando no interior da lâmina dérmica primária (LDP), em direção à falange distal (seta). Picrossírius Red, obj 40x em microscópio com luz polarizada plana.

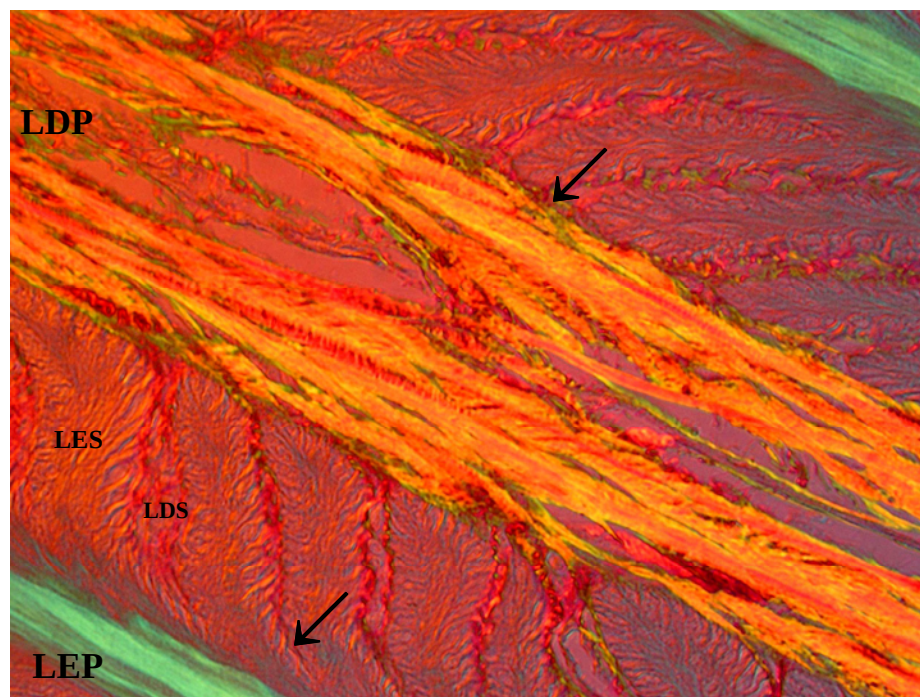


Figura 17. Fotomicrografia ilustrando as lâminas epidérmicas e dérmicas do casco de equino hígado, visualizando-se as fibras colágenas iniciando na base da lâmina epidérmica secundária (LES), se agrupando no interior da lâmina dérmica primária (LDP) e formando grandes feixes de colágenos, em direção à falange distal (setas). Picrossíus Red, obj 60x em microscópio com luz polarizada plana.

5.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão

A análise ultra-estrutural de células presentes na derme e epiderme podal de equinos hígados, por meio de microscopia eletrônica de transmissão, revelou, em ambas as biópsias, a integridade das estruturas. Puderam ser observadas as junções entre o tecido conjuntivo (derme) e as células epidérmicas basais (epiderme). Também foi possível a identificação da MB, disposta na interface entre as células basais e o tecido conjuntivo, assim como revelou-se a presença de pequenos capilares na região dérmica, responsáveis pela nutrição da epiderme (Figura 18). Ademais, observou-se a presença de hemácias no tecido dérmico (Figura 19).

Os detalhes da MB podem ser observados na Figura 20. É possível notar em aumento maior (20000x) a disposição da MB entre as células basais e a derme, com as

zonas lúcidas e densa bem definidas. Na base das células basais observa-se a presença de hemidesmosmos (HD) e, em alguns pontos, é possível observar a presença de filamentos de ancoragem (glicoproteínas) entre os HDs e a MB.

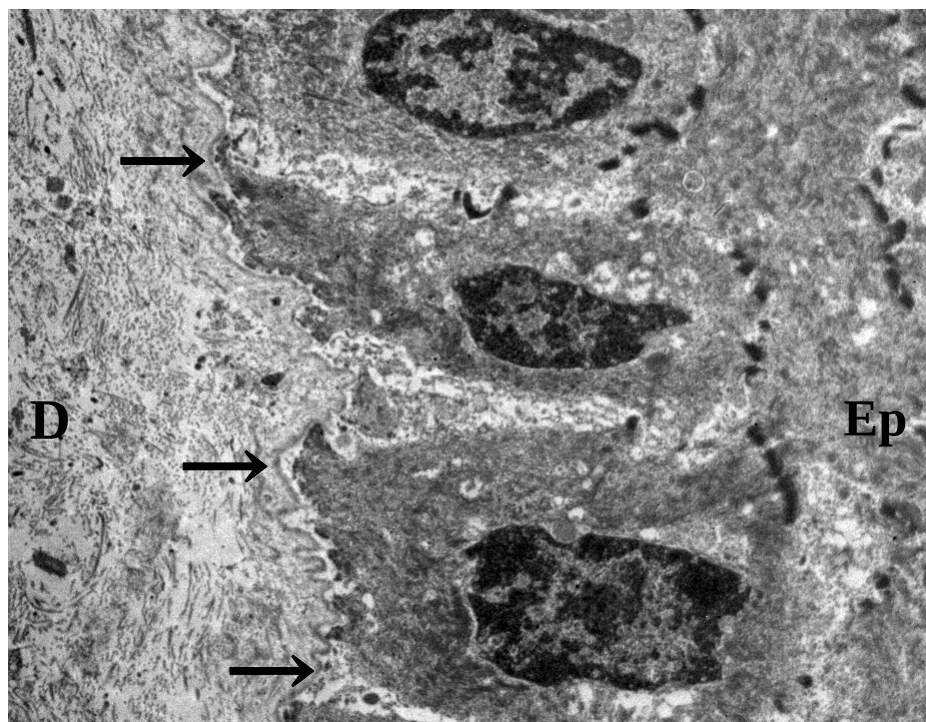


Figura 18. Fotomicrografia eletrônica de transmissão ilustrando a união dermoepidérmica, a qual apresenta o material extra-celular da derme (D), as células basais da epiderme (Ep) e, entre elas, a membrana basal (setas), determinando o contorno das lâminas epidérmicas secundárias (LESS). Aumento de 5000x.

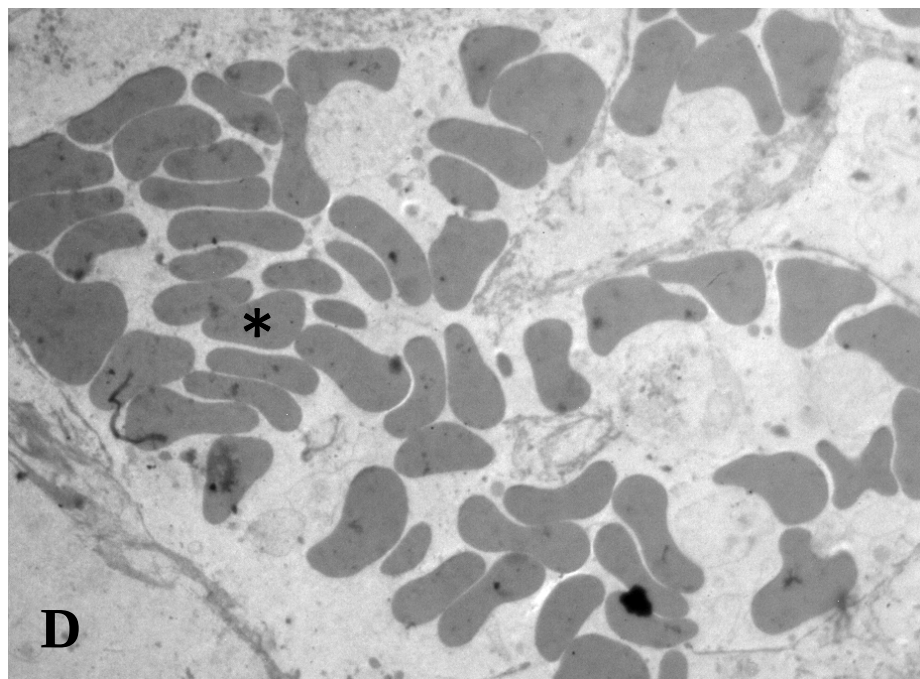


Figura 19. Fotomicrografia eletrônica de transmissão demonstrando a rara presença de grande número de hemácias (*) presente em região dérmica (D). Aumento de 4000x.

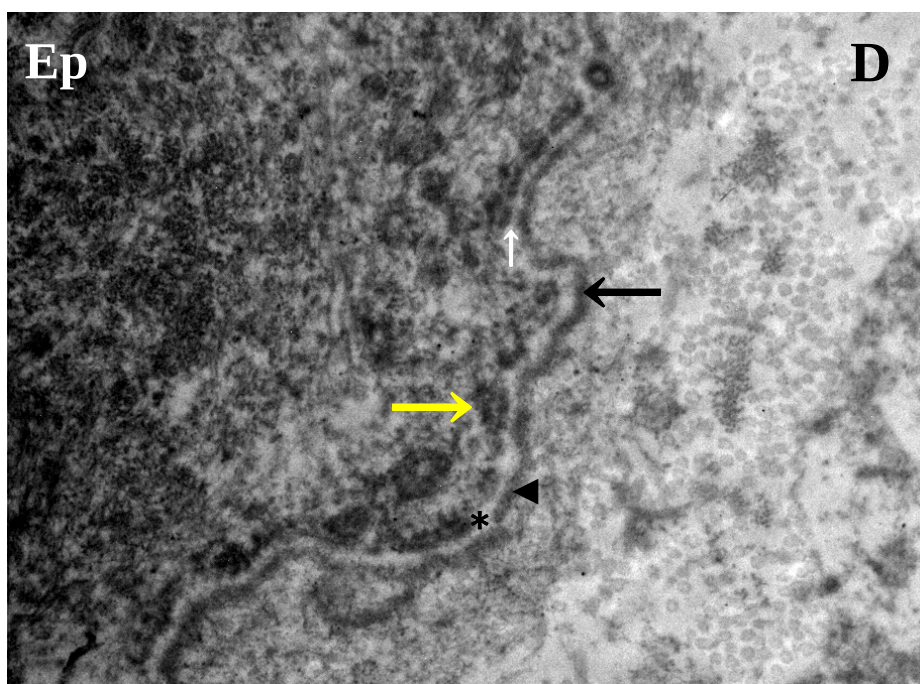


Figura 20. Fotomicrografia eletrônica de transmissão demonstrando a união da célula epidérmica basal (Ep) na membrana basal (seta preta) por meio de hemidesmossomos (seta amarela) com a presença de filamentos de ancoragem (seta branca pequena). Observa-se as duas zonas presentes na MB, a densa, corada de negra (◄), e a lúcida, de cor clara (*). Aumento de 20000x.

5.5 Deformidades dos extratos externo e médio

Nas avaliações realizadas com o auxílio de um paquímetro de precisão, não foram encontradas diferenças significativas no diâmetro dos cascos, na largura e na profundidade dos orifícios das biópsias, em um intervalo de 70 dias. Porém, foi visualizado que a distância entre os orifícios e a coroa do casco aumentou dois centímetros.

VI. DISCUSSÃO

A técnica de biópsia desenvolvida neste estudo mostrou-se de fácil e rápida execução e, adicionalmente, possibilitou a colheita de tecido dérmico e epidérmico apropriado para a realização de análises estruturais e ultra-estruturais.

Em que pese à biópsia do casco possibilitar avaliação do tecido laminar, foram encontrados apenas seis relatos sobre o procedimento, dos quais, cinco realizados em equinos (HONNAS et al., 2003; ALVES et al., 2004; CROSER & POLLITT, 2006; HANLY et al., 2009; PAES LEME et al., 2010) e apenas um, em bovinos (SINGH et al., 1993).

O primeiro passo na obtenção das amostras de tecido laminar utilizadas neste estudo se deu mediante a realização de um orifício de forma cônica na muralha do casco do qual foram removidos integralmente o extrato externo e a parte rígida do extrato médio com o auxílio de uma pedra de esmerilhar acoplada a uma micro-retífica. A abertura de um canal na parede do casco para o acesso ao extrato lamelar também foi empregado por HONNAS et al. (2003), CROSER & POLLITT (2006) e HANLY et al. (2009) utilizando micro-retífica, enquanto PAES LEME et al. (2010) obtiveram êxito ao adelgaçarem a face dorsal da muralha do casco de equinos utilizando grossa e rineta.

O ponto de aprofundamento máximo do orifício no extrato médio foi determinado mediante pesquisa da rigidez da parede utilizando uma pinça hemostática, o que também foi realizado por HANLY et al. (2009). A eficácia deste procedimento está no fato de preservar a integridade do tecido laminar o que também foi evidenciado por outros autores que cessaram o aprofundamento ao se evidenciar a camada branca e macia à palpação (CROSER & POLLITT, 2006; PAES LEME et al., 2010). Entretanto, SINGH et al. (1993) só pararam a perfuração quando tornou-se possível a visualização da coloração rosada no fundo do orifício, a qual está associada a presença de vasos sanguíneos e demonstra o término do extrato médio e a penetração no extrato interno. Sob nosso ponto de vista, o emprego deste método aumenta a possibilidade de ruptura

da integridade do tecido epidérmico e dérmico do casco, não sendo portanto, recomendado.

No atual estudo, os cortes das lâminas até a falange distal, foram obtidas com o auxílio de uma lâmina de bisturi nº 11 descartável estéril, formando um quadrado, de forma semelhante ao que foi realizado por CROSER & POLLITT (2006). Outra maneira de alcançar a falange distal, é efetuar cortes utilizando-se de “*punch*” assim como descrito por ALVES et al. (2004), PAES LEME et al (2010), HANLY et al. (2009) e SINGH et al (1993). O emprego deste instrumento, embora facilite a confecção de sulcos no tecido podofiloso, torna o seccionamento do tecido dérmico e, conseqüentemente, o descolamento da falange, mais difícil.

O ponto crítico na realização da biópsia do tecido laminar do casco é o desprendimento deste da superfície dorsal da falange distal à qual está fortemente unida por meio de fibras de colágeno (PELLMAN et al., 1996). Neste caso, a secção do tecido rente a falange distal foi realizada com o auxílio de um esculpador Frahm 02, utilizado como alternativa ao bisturi oftálmico preconizado por HANLY et al. (2009). Por sua vez, CROSER & POLLITT (2006) realizaram este desprendimento com o auxílio de lâminas de bisturi numero 15 cuja ponta foi aquecida e recurvada com auxílio de pinças. Durante estudos preliminares, as tentativas de aquecimento para recurvar o aço e obtenção de lâmina de bisturi de ponta curva foram infrutíferas. O uso deste instrumental cirúrgico nos parece adequado para secção da derme e interrupção da ligação com a falange distal, entretanto, a confecção do instrumento cirúrgico de acordo com as recomendações dos autores mencionados acima, se mostrou inviável. Todavia, SINGH et al. (1993) e PAES LEMES et al. (2010) afirmam a obtenção das amostras, apenas com movimentos rotativos do “*punch*”. Tentativas de realização deste procedimento efetuados previamente, se mostraram infrutíferas uma vez que a remoção do tecido com o emprego de “*punch*”, somente pode ser efetuado por tração do extrato interno, o qual está firmemente ligado a falange distal. Neste caso, o risco de arrancamento e perda de material dérmico é grande.

Após a retirada do material, foram realizados curativos e posteriormente o preenchimento dos orifícios com resina acrílica autopolimerizável. Reparação do casco

semelhante ao utilizado neste trabalho foi relatada por TURNER (1998), para casos de pododermatite infecciosa. No entanto, o excesso de chuva na época do ano que realizou o experimento e a pouca infra-estrutura do piquete, impediram a aderência eficaz da resina, o que resultou na queda desta. Porém, mesmo com os orifícios abertos, não houve contaminação, e nem tão pouco claudicação. Por sua vez, HANLY et al. (2009) realizaram o preenchimento com polímero de epóxi (*Equi-Thane "Super-fast" Instant Shoe*), enquanto SINGH et al. (1993) o preencheram com resina metilmetacrilato na sua forma pura⁸. Por sua vez, CROSER & POLLITT (2006) recobriram com resina metilmetacrilato e esparadrapo associado à fibra de vidro e PAES LEME et al. (2010) e HONNAS et al. (2003) apenas recobriram com gazes estéreis sob pressão presos ao casco com fita adesiva. A falta de relato destes autores sobre a evolução da ferida é forte indício de que os tratamentos preconizados foram efetivos (TURNER, 1998; SINGH et al., 1993; HONNAS et al., 2003; CROSER & POLLITT, 2006; HANLY et al., 2009; PAES LEME et al., 2010) assim como o nosso.

A realização de biópsias na parede do casco não compromete sua integridade ou sua capacidade de sustentação, porém, dependendo do número de orifícios realizados os animais podem vir a claudicar. Neste estudo, após a realização de dois orifícios no membro anterior direito, os animais não apresentaram alterações nos exames clínicos e nem do sistema locomotor durante o período de cinco dias após a realização da biópsia, diferentemente do relatado por HANLY et al. (2009), em trabalho realizado com seis animais, os quais, após a realização de oito orifícios no casco, observaram claudicações intermitentes, de grau um, em cinco animais, durante o período de cinco dias. Apenas um, dos seis equinos utilizados por HANLY et al. (2009), manteve a claudicação de grau um por três semanas, porém os autores atribuíram estes sinais a má qualidade do casco que este animal já apresentava antes do início do experimento. SINGH et al. (1993) ao realizarem duas biópsias em casco de bovinos, sendo uma delas na sola, também obtiveram claudicação nos dois ou três dias iniciais.

Em estudos sobre laminite nos quais realizaram-se biópsias podais, o número de orifícios realizado na parede do casco não foram associados aos sinais de claudicação

⁸ Technovit®, Kulzer, Germany.

encontrados. ALVES et al. (2004) e PAES LEME et al. (2010) realizaram apenas uma biópsia, enquanto CROSER & POLLITT (2006) efetuaram seis orifícios, e todos registraram discreta alteração na locomoção do membro correspondente, porém atribuíram o déficit locomotor a laminite.

Na avaliação radiográfica dos cavalos estudados, não foram observadas alterações ósseas na região dorsal da falange distal. Outros estudos, nos quais foram efetuados avaliações radiográficas das estruturas do casco de equinos submetidos à biópsia trans-mural e a indução de laminite por sobrecarga de carboidrato, também não se observaram alterações significativas (PAES LEME et al., 2010; ALVES et al., 2004).

Dentre os 16 procedimentos de biópsias realizados neste estudo, em todos foi possível a obtenção de amostras com a qualidade necessária para histologia e a microscopia eletrônica. Em que pese à eficácia do método empregado, há relatos de outros autores sobre dificuldades encontradas na obtenção de espécimes laminares (HANLY et al., 2009). Estas dificuldades podem estar correlacionadas ao instrumento cirúrgico utilizado para o desprendimento do tecido dérmico da face dorsal da falange distal.

Nas análises histológicas, realizadas neste estudo das amostras obtidas por biópsia apresentaram-se intactas, com a arquitetura histológica mantendo as características próprias de equinos hígidos, a semelhança das descrições relatadas por POLLITT (2004c) e PAES LEME et al. (2010). CROSER & POLLITT (2006) também obtiveram amostras controle que preservaram as características histológicas lamelares normais. Porém HANLY et al. (2009) relataram que as amostras nas quais ocorreram dificuldade no momento da remoção, apresentavam alterações histológicas nas quais se observou diferentes graus de inflamação ou danos estruturais. Estes autores relatam ainda que, as lâminas do material cuja remoção foi difícil, se apresentavam rompidas, com edema leve e presença de células inflamatórias.

Neste estudo, a membrana basal que se encontra disposta no entorno da LES, penetrava profundamente nas criptas existentes entre as LES e as LDS, apresentando-se intacta e claramente delineada, sem qualquer interrupção, assim como descrito por POLLITT (2004a). Da mesma forma, em equinos hígidos, HANLY et al. (2009) não

identificaram aumento de lesões na MB durante as 24 horas de realização das biópsias, nas amostras facilmente colhidas, ao contrário do que ocorreu nas amostras de difícil remoção.

Também no atual estudo, foi possível visualizar as fibras de colágeno, possivelmente do tipo VII, presentes no tecido dérmico, as quais são responsáveis pela união entre as LES e a falange distal como descrito por POLLITT (1995). Este achado é aparentemente inédito, uma vez que não se encontrou outros relatos referentes a utilização de picrossírius red para coloração de lâminas podais.

À microscopia de transmissão foi possível determinar a presença de duas porções distintas na constituição da MB. Em contato com a superfície da célula basal encontra-se uma linha de coloração clara, denominada lâmina lúcida (POLLITT, 2004a). Aparentemente, a lâmina lúcida é o reflexo de um espaço por onde, esculturalmente, correm os filamentos protéicos de adesão. Em contato com o tecido dérmico observa-se uma porção linear da MB de coloração escura, denominada lâmina densa. Neste estudo, foi possível observar a preservação da integridade da MB, assim como a presença de pequenos amontoados protéicos, chamados hemidesmossomos, dispostos na superfície basal da CB. Em alguns pontos foi possível observar a presença de pequenos filamentos protéicos, unindo os HD a MB. Estes filamentos, denominados filamentos de ancoragem são responsáveis, segundo POLLITT (2004a) pela adesão da epiderme à derme.

Quanto ao equino necropsiado 25 dias após a biópsia, os cortes histológicos das regiões lamelares, apresentaram deformidades crônicas das lâminas epidérmicas e dérmicas primárias. Tais achados diferem das lesões encontradas na fase inicial da laminite, na qual, as células basais epidérmicas apresentam formato anormal, tornando-se alongadas e dispendo-se umas sobre as outras (POLLITT, 2004b). No mesmo tempo de desenvolvimento, a membrana basal perde a sua integridade, desligando-se das células basais.

Quanto aos queratinócitos, a coloração citoplasmática eosinofílica, demonstra a ocorrência de apoptose. Esta coloração é decorrente da condensação de organelas citoplasmáticas conforme mencionado por HARGIS & GINN (2007). Estes também

afirmam que as células apoptóticas são fagocitadas pelos queratinócitos adjacentes, antes da desintegração celular, impedindo o desenvolvimento de uma resposta inflamatória aguda que seria provocada pelos constituintes celulares liberados. Este mecanismo é o que difere da necrose, em que ocorre a lise das células, liberando o conteúdo celular no espaço extracelular, provocando uma resposta inflamatória.

VII. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, concluímos que a biópsia do tecido laminar digital de equinos possibilita a coleta em série de material para estudos histológicos e de microscopia eletrônica. Neste procedimento os animais não demonstraram alterações clínicas e tampouco locomotoras, sendo o seu uso viável em equinos hígidos. As amostras obtidas não apresentaram prejuízos estruturais das lâminas dérmicas e epidérmicas nas análises histológicas e de microscopia eletrônica. Portanto, a técnica de biópsia adaptada neste estudo pode ser considerada um excelente método de obtenção de tecido epidérmico e dérmico, a ser utilizada em estudos de doenças do casco, como é o caso da laminite. Porém, estudos complementares do uso deste método na avaliação da evolução da laminite, devam ser realizados para comprovação destas afirmações.

VIII. REFERÊNCIAS

ALVES, G. E. S.; PAES LEME, F. O.; MARVAL, C. A. et al. Biópsia digital em equinos com laminite induzida por sobrecarga de carboidratos. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.41, suppl., p.264, 2004.

BOWKER, R. Functional anatomy of the palmar aspect of the foot. In: ROSS, M. W.; DYSON, S. J. **Diagnosis and management of lameness in the horse**. St. Louis: Saunders, 2003, p. 282-286.

CÉLESTE, C. J.; SZÖKE, M. O. Management of Equine Hoof Injuries. **Veterinary Clinical Equine**, v.21, p.167-190, 2005.

CROSER, E. L., POLLITT, C. C. Acute laminitis: descriptive evaluation of serial hoof biopsies. In **52nd Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, San Antonio, v.52, p.542-546, 2006.

DARADKA, M.; POLLITT, C. C. Epidermal cell proliferation in the equine hoof wall. **Equine Veterinary Journal**, London, v.36, p.210-216, 2004.

EADES, S. C. Overview of what we know about the pathophysiology of laminitis. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.30, n.2, p.83-86, 2010.

HANLY, B. K.; STOKES, A. M.; BELL, A. M. et al. Use of serial laminar tissue collection via biopsy in conscious healthy horses. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.70 p.697-702, 2009.

HARGIS, A. M.; GINN, P. E. The integument. In: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007, p.1107-1261.

HONNAS, C. M.; DABAREINER, R. M.; MCCAULEY, B.H. Hoof wall surgery in the horse: approaches to and underlying disorders. **Veterinary Clinical Equine**, Texas, v.19, p.479-499, 2003.

JOHNSON, P. J.; GANJAM, V. K.; SLIGHT, S. H. et al. Tissue-specific dysregulation of cortisol metabolism in equine laminitis. **Equine Veterinary Journal**, London, v.36, p.41-45, 2004.

LOFTUS, J. P.; BELKNAP, J. K.; STANKIEWICZ, K. M. et al. Laminar xanthine oxidase, superoxide dismutase and catalase activities in the prodromal stage of black-walnut induced equine laminitis. **Equine Veterinary Journal**, London, v.39, p.48-53, 2007.

MARXEN, S. **Análise da eficácia do polissulfato de glicosaminoglicanas no tratamento intratendíneo de tendinite induzida enzimaticamente pela collagenase em eqüinos**. 2001. 76f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

MISHRA, P. C.; LEACH, D. H. Extrinsic and intrinsic veins of the equine hoof wall. **Journal of Anatomy**, Grã-Bretanha, v.136, n.3, p.543-560, 1983.

MORGAN, S. J.; HOOD, D. M.; WAGNER, I. P. et al. Submural histopathologic changes attributable to peracute laminitis in horses. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.64, p.829–834, 2003.

MOORE, J. N.; ALLEN, D.; Jr CLARK, E. S. Pathophysiology of acute laminitis. **The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice**, v.5, p.67-72, 1989.

MOLYNEUX, G. S.; HALLER, C. J.; MOGG, K. C.; POLLITT, C. C. The structure, innervation and location of arteriovenous anastomoses in the equine foot. **Equine Veterinary Journal**, London, v.26, p.305-312, 1994.

PAES LEME, O. F.; BONNA, F. A. B.; DE MARVAL C. A. et al. Histopatologia das lâminas do casco de equinos com laminite aguda induzida e tratados com ketoprofeno, fenilbutazona e flunixin meglumine. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.62, n.2, 2010.

PARKS, A. Structure and function of the equine digit in relation to palmar foot pain. In: AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 52, 2006, San Antonio, **Proceeding...** p.188-197.

PELLMAN, R.; BUDRAS, K. D.; BRAGUILLA, H. Struktur und function des hufbeinträgens beim pferd und seine bedeutung bei der hufrehe. **Pferdeheilkunde**, v.13, n.1, p.53-64, 1996.

POLLITT, C. C. The basement membrane at the equine hoof dermal epidermal junction. **Equine Veterinary Journal**, London, v.26, p.399-407, 1994.

POLLITT, C. C. Anatomy and physiology of the inner hoof wall. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v.3, p.3-21, 2004a.

POLLITT, C. C. Equine laminitis. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v.3, p. 34-44, 2004b.

POLLITT, C. C. Microscopic Anatomy and Physiology of the Hoof. **Equine Podiatry** p.90-101, 2004c.

POLLITT, C. C.; MOLYNEUX, G. S. A scanning electron microscopical study of the dermal microcirculation of the equine foot. **Equine Veterinary Journal**, London, v.22, p.79-87, 1990.

POLLITT, C. C. **Color atlas of the horse's foot**. Barcelona: Mosby-Wolfe, 1995.

ROSS, M.W.; DYSON, S.J. **Diagnosis and Management of Lameness in the Horse**. London: Saunders. 2003. 1095p.

SINGH, S. S.; WARD, W. R.; MURRAY, R. D. Technique of hoof biopsy in cattle. **Veterinary Record**, v.133, p.190-191, 1993.

SINGH, S. S.; MURRAY, R. D.; WARD, W. R. Gross and histopathological study of endotoxin-induced hoof lesions in cattle. **Journal of Comparative Pathology**, v.110, p.103-115, 1994.

STASHAK, T. S. **Claudicação em equinos segundo Adams**. 2. ed. São Paulo: Roca, p. 378-383, 2006.

TURNER, T. A. White line disease. **The Equine Hoof**, Newmarket, v.4, p.73-76, 1998.

WATTLE, O. S. Cytokeratins of the matrices of the chestnut (torus carpeus) and periople in horses with acute laminitis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.62, p.425-432, 2001.

WATTLE, O.; HANSSON, E. Histopathology of equine hoof wall, skin and chestnut in acute spontaneous laminitis. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.30, p.116, 2010.

WOESSNER, F. J. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. **FASEB J.**, v.5, p.2145-2154, 1991.