

Estudio Histoquímico de la Distribución de las Fibras de Colágeno en Hueso Sesamoideo Distal de Equinos con y sin Síndrome Navicular

Histochemical Study of the Distribution of Collagen Fibers on Distal Sesamoid Bone in Equine
With and Without Navicular Syndrome

Paulo Salinas^{*,***,****}; Saúl A. Figueroa Vergara^{*} & Rodrigo Bañados Fernández^{**}

SALINAS, P.; FIGUEROA, V. S. A. & BAÑADOS, F. R. Estudio histoquímico de la distribución de las fibras de colágeno en hueso sesamoideo distal de equinos con y sin Síndrome Navicular. *Int. J. Morphol.*, 32(4):1266-1270, 2014.

RESUMEN: La significancia funcional de cualquier relación que exista entre la orientación de las fibras de colágeno y la tensión ejercida sobre una estructura ósea dependerá de la influencia de estos parámetros microestructurales sobre las propiedades biomecánicas del hueso y su capacidad de adaptarse. Se estudió la localización del colágeno en el hueso sesamoideo distal (HSD) de la mano en equinos con Síndrome Navicular para observar cómo este refleja las demandas biomecánicas ejercidas por la tensión que ejerce el tendón del músculo flexor digital profundo sobre la articulación interfalángica distal. Se utilizaron las tinciones hematoxilina-eosina-azul alción, y Rojo Picrosirius de Junqueira. La birrefringencia de colágeno óseo fue determinada utilizando microscopía de luz polarizada. La remodelación del HSD resultó en la formación de osteonas secundarias transversales orientados en una dirección lateral a medial y el colágeno óseo se orientó de manera similar. Estos resultados proporcionan evidencia de la existencia de una relación entre la función mecánica de un hueso con su arquitectura, incluso demuestra que esta se extiende hasta el nivel molecular.

PALABRAS CLAVE: Equino; Síndrome navicular; Hueso sesamoideo distal; Colágeno; Rojo picrosirius.

INTRODUCCIÓN

Previamente hemos estudiado los cambios morfológicos cuantitativos tisulares y celulares en el hueso sesamoideo distal (HSD) en manos de equinos (Salinas *et al.*, 2014). El presente trabajo complementa los antecedentes morfométricos, planimétricos y estereológicos estudiados con anterioridad describiendo la localización del colágeno en la matriz ósea del HSD en manos de equinos y con Síndrome Navicular (SN). Esta presentación clínica, Voute (2008) la define como una patología claudicógena bilateral, crónica, degenerativa y progresiva que compromete al HSD, la bolsa podotrocLEAR, ligamentos y las superficies adyacentes al tendón del músculo flexor digital profundo.

La hipótesis de que la orientación y distribución de las fibras de colágeno tienen un significado biomecánico fue propuesta por primera vez por Gebhardt

(1906) y más tarde comprobada por Ascenzi & Bonucci (1964, 1967, 1968) y Simkin & Robin (1974). Estos autores demostraron el efecto de la orientación de las fibras de colágeno sobre el tipo de fuerza (tensión, compresión o cizallamiento) y magnitud de esta que un hueso puede soportar. La orientación de las fibras de colágeno en tejido óseo generalmente ha sido clasificada en tres grupos: transversal, longitudinal y una combinación de ambas. Además, existen antecedentes (*op. cit.*) que demuestran que las fibras de colágeno orientadas de forma transversal y perpendicular al eje largo del hueso tienen mayor capacidad de resistir fuerzas de compresión, mientras que fibras longitudinales orientadas de forma paralela al eje largo del hueso son capaces de resistir fuerzas de tensión. Ascenzi & Benvenuti (1986) describen que las fibras de colágeno orientadas en 45°, longitudinales y transversales, proporcionan una mayor resistencia en el tejido

* Laboratorio de Anatomía Veterinaria, Escuela de Medicina Veterinaria, Sede Temuco, Facultad de Recursos Naturales y Medicina Veterinaria, Universidad Santo Tomás, Temuco, Chile.

** Servicio de Veterinaria, Carabineros de Chile, Región de La Araucanía, Chile.

*** Programa de Doctorado en Ciencias Morfológicas, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

****Becario CONICYT

óseo. Por último, la edad, el sexo, y la actividad del individuo también desempeñan un rol en la orientación de las fibras.

Las fibras de colágeno orientadas de forma diferente entre ellas pueden ser visualizados en la luz polarizada: las orientadas transversalmente se observan brillantes, las orientadas longitudinalmente se observan oscuro, y fibras que tienen orientaciones mixta se observan en diferentes niveles de gris.

Nuestro interés en el estudio de la localización del colágeno en el HSD se centra en cómo este refleja las demandas biomecánicas ejercidas por la tensión del tendón del músculo flexor digital profundo sobre la articulación interfalángica distal en equinos no afectados y con presentación de SN.

MATERIAL Y MÉTODO

Material biológico: Se utilizaron manos izquierdas de 22 equinos (*Equus ferus caballus*) destinados a sacrificio por razones no relacionadas con esta investigación (4–10 años; peso promedio 350 kg), que presentaron características externas sugerentes de SN tales como: baja angulación del dedo, paredes largas y concavidad en la cara solear de la úngula y manos sin despalmes correctivos (Stashak, 2004). Fueron sometidas a procedimientos de desangrado, flushing

de vasos sanguíneos, depilación, desinfección y rotulado. Posteriormente fueron perfundidas con formalina 10% tamponada (PBS 4%) previo al diagnóstico de SN.

Diagnóstico de Síndrome Navicular y grupos: Se realizó mediante una evaluación morfológica y radiográfica de las manos que incluyó al HSD, ligamentos y cavidad articular de la articulación interfalángica distal. Se utilizaron dos vistas radiográficas: latero-medial y palmarproximal-palmarodistal oblicua en 45° (Kinast, 2001). Los hallazgos radiográficos y criterios utilizados para diagnosticar SN en este estudio fueron los utilizados por Salinas *et al.* Se conformaron los siguientes grupos: No Afectadas (n=11) y Síndrome Navicular (n=11). Posterior a la etapa de diagnóstico los HSD fueron obtenidos por simple disección.

Estudios: Se obtuvieron secciones de 4 µm de grosor a nivel de la cresta de la cara flexora los que fueron teñidos con HE como protocolo de rutina y con la tinción histoquímica modificada de Rojo Picrosirius de Junqueira (Sirius red F3B o Rojo directo 80, Aldrich) (Samar *et al.*, 2004). Se analizó 5 campos del tejido óseo compacto y trabecular por cada sección histológica del HSD (Fig. 1). La observación se realizó en un microscopio de polarización Axioskop 40 Carl Zeiss® con aumento 400X mediante el software AxioVision® LE 4.6. La observación de las fibras colágenas con esta técnica permite diferenciar colágeno Tipo I (birrefringencia naranja amarillenta a naranja y rojo).

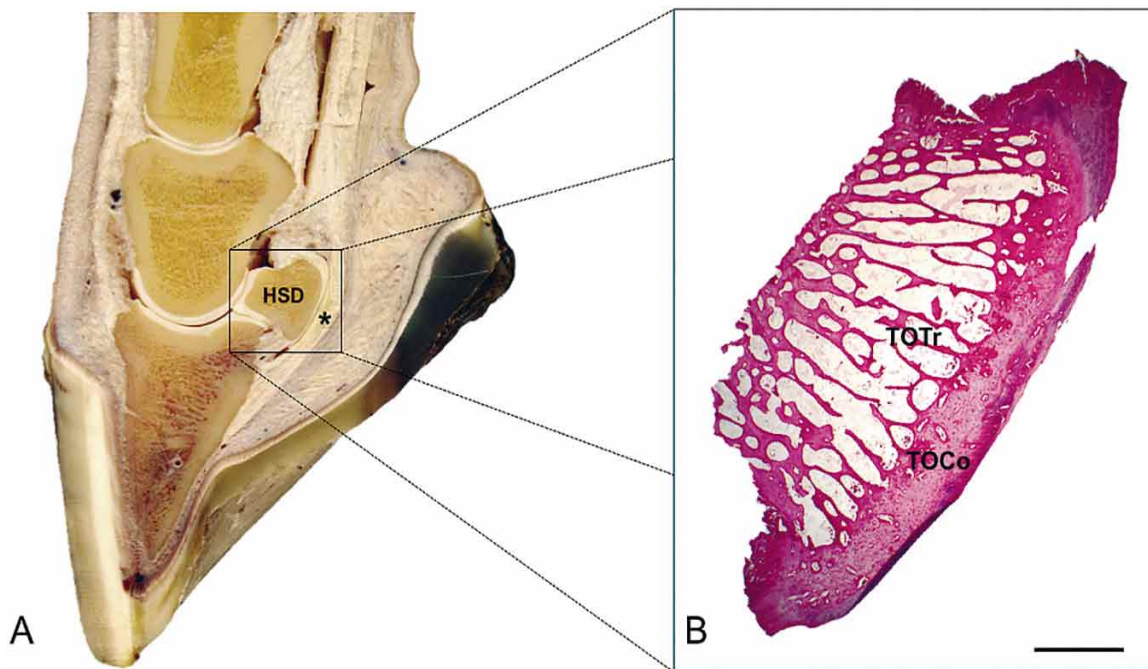


Fig. 1. A. Plano mediano del dedo equino, HSD: hueso sesamoideo distal; *= tendón del músculo flexor digital profundo. B. Sección histológica. TOTr= tejido óseo trabecular; TOCo= tejido óseo compacto. H&E (Barra= 500 µm).

RESULTADOS

Las secciones de HSD de manos de equinos con Síndrome Navicular y No Afectados fueron evaluados y comparadas para observar cómo este refleja - en la disposición de las fibras de colágeno - las demandas mecánicas realizada por la tensión que ejerce el tendón del músculo flexor digital profundo sobre la articulación interfalángica distal. En ambos grupos, el tejido óseo compacto (Fig. 2) presentó osteonas de diferentes diámetros dispuestas en laminillas concéntricas alrededor de un canal central y distribuidas sin presentar un patrón ordenado. En el grupo Síndrome Navicular se observó, además, osteonas secundarias lo que pone de manifiesto la actividad de remodelación ósea en el HSD, estas últimas, se observaron más brillantes que los osteonas primarias y con mayor cantidad de colágeno rodeando el canal central. En el grupo Síndrome Navicular se observó una mayor cantidad de colágeno distribuido de manera heterogénea en las

laminillas de las osteonas e incluso en las laminillas intersticiales. Al contrario, en el grupo No Afectados el colágeno se observó menos brillante, ordenado y dispuesto alrededor del canal central. El tejido óseo trabecular (Fig. 3) en ambos grupos presentó delgadas trabéculas orientadas en una dirección próximo-distal dorso-palmar rodeadas por células de revestimiento óseo, además, no se observó diferencias en la orientación de cada trabécula ósea y tampoco en la disposición de sus laminillas. Respecto a las fibras de colágeno se observaron en disposición paralela entre ellas y en la misma dirección de las trabéculas. Mostraron un aumento de la birrefringencia color naranja en el grupo No Afectados con una diferencia en la intensidad observada en el patrón de birrefringencia en el grupo Síndrome Navicular. Todos los parámetros utilizados para evaluar la orientación y distribución de las fibras de colágeno indican que éstas estaban orientadas entre las direcciones longitudinal y transversa, predominando la orientación transversal rodeando al canal central.

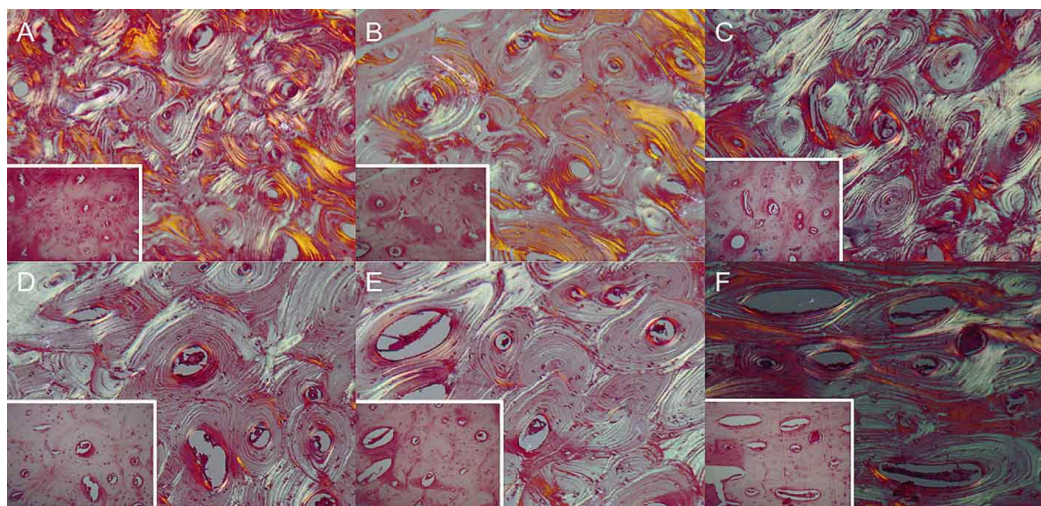


Fig. 2. Tejido óseo compacto de la corteza flexora en hueso sesamoideo distal de equino en grupo Síndrome Navicular (A, B, C) y No Afectados (D, E y F), H&E + Rojo Picosirius de Junqueira.100X.

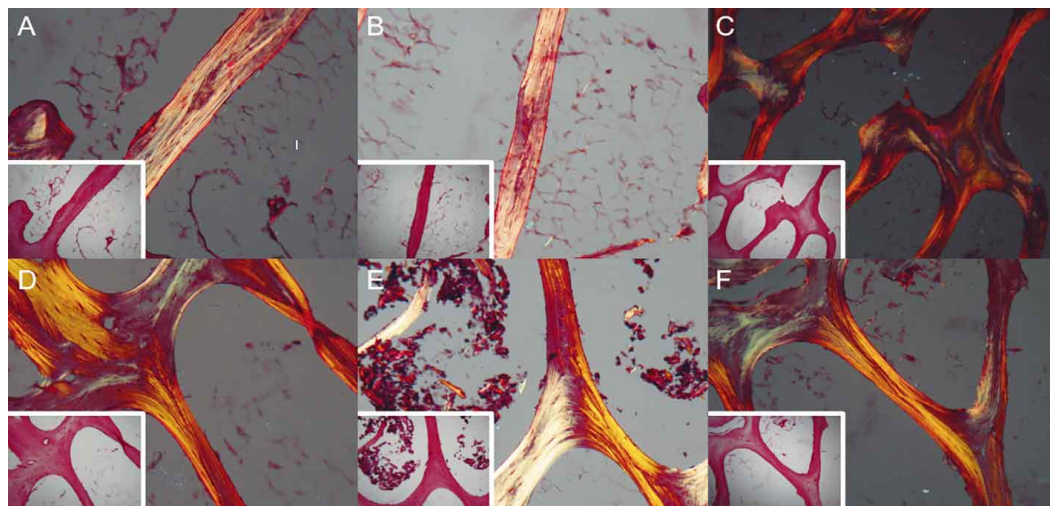


Fig. 3. Tejido óseo trabecular en hueso sesamoideo distal de equino en grupo Síndrome Navicular (A, B, C) y No Afectados (D, E y F), H&E + Rojo Picosirius de Junqueira. 100X.

DISCUSIÓN

La existencia de la relación entre el ambiente mecánico de un hueso, su anatomía y el efecto de la orientación de la fibra de colágeno sobre las propiedades biomecánicas del hueso han sido descritas (Evans & Vincentelli, 1969). Diversos estudios mencionan que el tejido óseo del HSD en manos de equinos debe soportar una gran cantidad de cargas y presiones (Kinast; Bentley *et al.*, 2007; Floyd & Mansmann, 2009; Waguespack & Hanson, 2010; Dyson *et al.*, 2011; Komosa *et al.*, 2013), sin embargo, descripciones respecto al ambiente mecánico al que se expone el HSD han sido poco estudiadas. En nuestro estudio hemos observado osteonas secundarias en el tejido óseo compacto en equinos con SN y además un aumento y disminución de la birrefringencia del colágeno en el tejido óseo compacto y trabecular, respectivamente, lo que pone de manifiesto la actividad de remodelación ósea inducida probablemente por la excesiva tensión que ejerce el tendón del músculo flexor digital profundo sobre la articulación interfalángica distal y principalmente sobre la cara flexora del HSD. Esto sugiere que el HSD podría estar expuesto a éstas cargas durante gran parte de su vida.

La red de colágeno es una importante vía de mecanotransducción de las fuerzas aplicadas en el tejido óseo, por lo que es considerada necesaria una población normal de osteocitos y una red de colágeno abundante y ordenada en el tejido óseo compacto y trabecular para resistir fuerzas de compresión (Vashishth *et al.*, 2002). Sin embargo, el desarrollo de una amplia remodelación como la observada en el grupo Síndrome Navicular en el HSD estaría asociado, con cambios adaptativos regionales del colágeno en la matriz ósea y no necesariamente asociado a un bajo número de osteocitos (Da Costa Gómez *et al.*, 2005; Salinas *et al.*). La ausencia de diferencias significativas en la orientación de las fibras de colágeno que predominan en el tejido óseo y trabecular entre los grupos estudiados sugiere que la tensión habitual sobre los HSD estudiados pudo ser compleja y reflejaría una falla en la adaptación funcional. Respecto a esto último, Bentley *et al.* lo explican afirmando que la falta de diferencias en la organización de las fibras de colágeno en equinos

con SN no es indicativo de las cargas ejercidas sobre el HSD en particular, tal vez debido a la función amortiguadora que ejercerían los ligamentos sesamoideos. Se han descrito enfermedades musculoesqueléticas asociadas a un fracaso en la adaptación funcional (v.g. osteoporosis), sin embargo la etiología de esta deficiencia son poco conocidas. Por ejemplo, una población normal de osteocitos se considera clave para mantener un hueso sano. La pérdida de esta condición ocurre en enfermedades óseas tales como la osteoporosis. De acuerdo a esto, hemos reportado en HSD una disminución en la cantidad de osteocitos en el tejido óseo compacto (Salinas *et al.*). Generalmente, bajas densidades osteocitarias han sido descritas en sitios donde existen altas tensiones en el esqueleto, clínicamente son sitios predilectos para el fracaso adaptativo y a lesiones inducidas por el ejercicio *i.e.* promueven la disminución de la cantidad y volumen osteocitario (Da Costa Gómez *et al.*; Verheyen *et al.*, 2006).

La mayor cantidad de fibras de colágeno y el ordenamiento observado en el tejido óseo compacto del grupo Síndrome Navicular respecto al grupo No Afectados puede ser inducido como respuesta al exceso de tensión. Es conocida que las variaciones en la microestructura del tejido óseo compacto tiene un efecto en las propiedades mecánicas del tejido (Evans & Vincentelli) y que estas propiedades varían significativamente entre huesos, e incluso en el mismo hueso de manera consistente. Riggs *et al.* (1993) observaron en tejido óseo compacto que arreglos longitudinales del colágeno demostraban mayor resistencia a fuerzas de tensión mientras que aquellos dispuestos de forma oblicua o transversa demostraron mayor resistencia a la compresión.

En conclusión, los resultados obtenidos en el estudio proporcionan evidencia de la existencia de una relación entre la función mecánica de un hueso con su arquitectura, incluso demuestra que esta se extiende hasta el nivel molecular. Creemos que estudios de tensión en HSD deben ser llevados a cabo para demostrar sus propiedades biomecánicas, tales como la elasticidad y resistencia e identificar posibles correlaciones con la orientación de las fibras de colágeno.

SALINAS, P.; FIGUEROA, V. S. A. & BAÑADOS, F. R. Histochemical study of the distribution of collagen fibers on distal sesamoid bone in equine with and without Navicular Syndrome. *Int. J. Morphol.*, 32(4):1266-1270, 2014.

SUMMARY: The functional significance of any relationship exists between the orientation of the collagen fibers and the strain on a bone structure depend on the influence of these microstructural parameters on the biomechanical properties of bone and its ability to adapt. Localization of collagen was studied in the distal sesamoid bone (DSB) in in equine foot with Navicular Syndrome to see how this reflects the biomechanical demands by the tension exerted by the tendon of the deep digital flexor muscle on the joint distal interphalangeal. Hematoxylin-eosin-alcian blue staining, and Red Picrosirius of Junqueira were used. The birefringence of bone collagen was determined using polarized light microscopy. The remodeling of DSB resulted in the formation of transverse secondary osteons oriented lateral to medial and bone collagen was oriented in similar direction. These results provide evidence for the existence of a relationship between the mechanical function of a bone with the architecture, and shows further that this extends up to the molecular level.

KEY WORDS: Equine; Navicular syndrome; Distal sesamoid bone; Collagen; Picrosirius red.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ascenzi, A. & Bonucci, E. The ultimate tensile properties of single osteons. *Acta Anat. (Basel)*, 58:160-83, 1964.
- Ascenzi, A. & Bonucci, E. The tensile properties of single osteons. *Anat. Rec.*, 158(4):375-86, 1967.
- Ascenzi, A. & Bonucci, E. The compressive properties of single osteons. *Anat. Rec.*, 161(3):377-91, 1968.
- Ascenzi, A. & Benvenuti, A. Orientation of collagen fibers at the boundary between two successive osteonic lamellae and its mechanical interpretation. *J. Biomech.*, 19(6):455-63, 1986.
- Bentley, V. A.; Sample, S. J.; Livesey, M. A.; Scollay, M. C.; Radtke, C. L.; Frank, J. D.; Kalscheur, V. L. & Muir, P. Morphologic changes associated with functional adaptation of the navicular bone of horses. *J. Anat.*, 211(5):662-72, 2007.
- Da Costa Gómez, T. M.; Barrett, J. G.; Sample, S. J. Radtke, C. L.; Kalscheur, V. L.; Lu, Y.; Markel, M. D.; Santschi, E. M.; Scollay, M. C. & Muir, P. Up-regulation of site-specific remodeling without accumulation of microcracking and loss of osteocytes. *Bone*, 37(1):16-24, 2005.
- Dyson, S.; Murray, R.; Schramme, M. & Blunden, T. Current concepts of navicular disease. *Equine Vet. Educ.*, 23(1):27-39, 2011.
- Evans, F. G. & Vincentelli, R. Relation of collagen fiber orientation to some mechanical properties of human cortical bone. *J. Biomech.*, 2(1):63-71, 1969.
- Floyd, A. E. & Mansmann, R. A. *Podiatría Equina*. Buenos Aires, Intermédica, 2009. pp. 4-9, 30-1.
- Gebhardt, W. Über funktionell wichtige Anordnungsweisen der feineren und gröberen Bauelemente des Wirbeltierknochens II. Spezieller Teil. 1. Der Bau der Haversschen Lamellensysteme und seine funktionelle Bedeutung. *Arch. Entwickl Mech Org.*, 20:187-322, 1906.
- Kinast, C. *Caracterización del hueso navicular del caballo chileno mediante las técnicas de examen radiológico "vía coronaria alta" y la "vista tangencial flexora"*. Tesis pregrado. Valdivia, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, 2001. pp.6-8, 11-2, 25.
- Komosa, M.; Purzyc, H. & Fraackowiak, H. Changes in navicular bone (os sesamoideum distale) shape in horses as a result of pathological alterations. *Folia Biol. (Krakow)*, 61(1-2):1-10, 2013.
- Riggs, C. M.; Lanyon, L. E. & Boyde, A. Functional associations between collagen fibre orientation and locomotor strain direction in cortical bone of the equine radius. *Anat. Embryol. (Berl.)*, 187(3):231-8, 1993.
- Salinas, P.; Figueroa, S.; Carrasco, C. & Bañados, R. Morphometry, Planimetry and Stereology in the Distal Sesamoid Bone in Equine Foot with and without Navicular Syndrome. *Int. J. Morphol.*, 32(1):357-63, 2014.
- Samar, M. E.; Ávila, R. E.; Asis, O. G.; Fonseca, I. & Corball, A. Identification of Type I and III Collagen by Picrosirius Red/Polarization of Tumoral Salivary Stroma. *Int. J. Odontostomat.*, 6(1):59-64, 2012.
- Simkin, A. & Robin, G. Fracture formation in differing collagen fiber pattern of compact bone. *J. Biomech.*, 7(2):183-8, 1974.
- Stashak, T. *Adams' Lameness in horses*. 4th ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 2004. pp.113-7, 706-22.
- Vashishth, D.; Gibson, G.; Kimura, J.; Schaffler, M. B. & Fyhrie, D. P. Determination of bone volume by osteocyte population. *Anat. Rec.*, 267(4):292-5, 2002.
- Voute, L. *What can radiology tell us about palmar foot pain?* Liverpool, Proceedings of the 47th British Equine Veterinary Association Congress, 2008. pp.30-2.
- Waguespack, R. & Hanson, R. R. Navicular syndrome in equine patients anatomy, causes, and diagnosis. *Compend. Contin. Educ. Vet.*, 32(12):E7, 2010.

Dirección para Correspondencia:
Paulo C. Salinas Pérez MV, MSc.
Escuela de Medicina Veterinaria
Laboratorio de Anatomía Veterinaria
Universidad Santo Tomás
Manuel Rodríguez 060
Temuco
CHILE

Email: psalinas@santotomas.cl

Recibido: 04-08-2014

Aceptado: 22-09-2014