

**Universidade Federal de Pelotas  
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**



**Dissertação**

**Morfologia macroscópica e histológica do coxim digital de equinos e sua  
associação com a espessura de gordura subcutânea**

**Gino Luigi Bonilla Lemos Pizzi**

Pelotas, 2020

**Gino Luigi Bonilla Lemos Pizzi**

**Morfologia macroscópica e histológica do coxim digital de equinos e sua  
associação com a espessura de gordura subcutânea**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências, na área de concentração: Produção Animal.

Orientador: Charles Ferreira Martins

Coorientadores: Ana Luisa Schifino Valente

Sandra Mara da Encarnação Fiala Rechsteiner

Pelotas, 2019



Gino Luigi Bonilla Lemos Pizzi

**Morfologia macroscópica e histológica do coxim digital de equinos e sua associação com a espessura de gordura subcutânea**

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 18/02/2020

Banca examinadora:

Prof. Dr. Charles Ferreira Martins (Orientador)

Médico Veterinário pela Universidade Federal de Pelotas. Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESPSP, Brasil.

M.V. Dr. Leandro Américo Rafael

Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Brasil. Médico Veterinário da Universidade Federal de Pelotas, Brasil.

Prof<sup>a</sup> Dra. Rosangela Ferreira Rodrigues

Doutora em Zootecnia pela Universidade Federal de Pelotas, Brasil. Professora Adjunta da Universidade Federal de Pelotas, Brasil

Dr. Luis Augusto Xavier Cruz

Doutor em Ciências da Saúde pela Universidade Federal do Rio Grande, Brasil. Técnico em Laboratório da Universidade Federal de Pelotas, Brasil

## **Agradecimentos**

Inicialmente, gostaria de agradecer os dois principais pilares da minha criação e da minha educação: Minha mãe e exemplo de médica veterinária, Dr<sup>a</sup> Miriam Rejane Bonilla Lemos, e minha tia e exemplo de professora Dr<sup>a</sup> Mara Sirlei Lemos Peres. Se sou capaz de sonhar e de buscar meus objetivos na vida, foi pelos esforços inenarráveis de serem mãe, tia e pai ao mesmo tempo.

Aos maiores expoentes que tenho como exemplo na minha vida acadêmica, meus professores orientadores Dr. Charles Ferreira Martins e a Dr<sup>a</sup> Ana Luisa Schifino Valente, não há palavras para dissertar sobre meu crescimento como estudante, profissional e ser humano. Se sou apaixonado por anatomia animal e sonho em ser professor, esta etapa que se conclui carrega muito dos ensinamentos que obtive de ambos na graduação e no mestrado.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sandra Mara da Encarnação Fiala Rechsteiner por abrir as portas do Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia da UFPel, além de ceder seus conhecimentos e sua experiência no ramo da histologia. Também estendo meus mais profundos agradecimentos aos técnicos deste laboratório, em especial à figura do Dr. Luis Augusto Xavier Cruz. A confecção das lâminas histológicas só foi possível graças ao compartilhamento da estrutura e dos conhecimentos destes profissionais exemplares.

Ao Grupo de Pesquisa Cavalo Crioulo e ao Grupo de estudos em Ortopedia Equina. Não apenas cresci muito com nossas práticas e encontros de discussão, como anseio em continuar nossas atividades nos próximos passos da minha vida acadêmica.

Ao Frigorífico Foresta, nas pessoas da Dr<sup>a</sup> Nedimara Severo, demais veterinários e funcionários, por abrirem as portas de seu estabelecimento, recebendo muito bem nossa equipe e permitindo que fossem realizadas as coletas que viabilizaram o presente estudo.

Aos meus amigos e futuros colegas de profissão, Daniel, Cynthia, Heloísa, Guilherme, Eduardo e Marcello, pelo auxílio incansável nos passos dados em nossa pesquisa. Esta obra não é minha apenas. É dividida pelo trabalho dedicado de alunos que realmente fazem pesquisa. O futuro da medicina veterinária e da pesquisa veterinária está garantido se depender dessas pessoas. Estendo também meus agradecimentos às também orientandas do Prof. Dr. Charles, Priscila e Paula, pela parceria definida desde o primeiro momento. Todos crescemos juntos com a ajuda mútua.

Aos doutores Leandro Américo Rafael, Luis Augusto Xavier Cruz e Rosangela Ferreira Rodrigues que aceitaram o convite para fazer parte da banca examinadora.

À Universidade Federal de Pelotas, ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa e oportunidade de desenvolver esta pesquisa.

Aos meus cachorros Pandora, Dourado, Linda e Alemão, e à minha finada Campeã. O laço que tenho com estes seres me fez ser médico veterinário. São os exemplos de pureza e amor que uso para nortear minha vida.

Aos amigos que ficaram pelo caminho e aos que continuam essa caminhada comigo. Em especial, às irmãs que a vida me deu e que continuam ao meu lado, Adriana e Vitória, por estarem sempre presentes nos momentos de dificuldade. A amizade de vocês tornou esse processo mais leve e capaz de ser concluído.

E a todas as demais pessoas que ajudaram na realização desse trabalho, e que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal que não foram citadas.

*“Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocarmos nela, corre por nossa conta.”*

**Chico Xavier**

## Resumo

PIZZI, Gino Luigi Bonilla Lemos. **Morfologia macroscópica e histológica do coxim digital de equinos e sua associação com a espessura de gordura subcutânea.** 2019. 47f. Dissertação (Mestrado em Ciências). – Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

O coxim digital é uma estrutura presente no interior do casco, responsável pela absorção do impacto quando o animal apoia o membro ao solo, além do bombeamento de sangue como estímulo ao retorno venoso do dígito. Essa estrutura é amplamente estudada na espécie bovina, visto sua direta relação com as alterações de escore corporal e tendo papel na fisiopatologia de claudicações causadas na região podal desses animais. Apesar da importância na biomecânica do casco, não se conhece a influência da condição corporal no coxim digital em equinos. Este estudo, portanto, avaliou a influência do Escore de Condição Corporal (ECC) e, conseqüentemente, da espessura de gordura subcutânea na composição tecidual do coxim digital em equinos. Foram utilizados 60 equinos adultos sem raça definida, sendo 21 machos e 39 fêmeas, encaminhados ao abate, onde todos os animais foram submetidos à análise do ECC, através de avaliação visual *ante mortem*, sendo posteriormente realizada avaliação ultrassonográfica de cada indivíduo para a medição da espessura de gordura subcutânea da garupa, com transdutor linear na frequência entre 6.0 e 7.0 MHz. Subseqüentemente, foram coletados um membro torácico e um pélvico, após desarticulação em nível das articulações intercárpicas e intertársicas. Foram feitas análises macroscópicas das peças coletadas (peso, volume e densidade dos cascos e dos coxins digitais), além da medição da área das estruturas internas no eixo axial do casco, e análises histológicas para a medição das áreas de tecido adiposo, fibroelástico e de fibras colágenas do coxim digital. Foram verificadas as relações entre as variáveis em membros torácicos e pélvicos e entre machos e fêmeas ( $p < 0,05$ ), através de teste t ou do teste de Wilcoxon de acordo com suas distribuições de normalidade. Para determinar a correlação entre espessura de gordura subcutânea e as variáveis testadas, foi utilizado o teste de correlação de Pearson ( $p < 0,05$ ). Não houve diferenças macro e microscópicas do coxim digital entre membros torácicos e pélvicos e nem entre sexos. Não houve correlação das variáveis peso, volume e densidade do coxim digital com o ECC ( $p > 0,05$ ), porém foi observada correlação positiva com a área de tecido adiposo ( $p = 0,038$ ;  $R = 0,28$ ) e negativa com a área de tecido fibroelástico ( $p = 0,005$ ;  $R = -0,37$ ) e área de fibras colágenas ( $p = 0,003$ ;  $R = -0,39$ ). Portanto, a espessura de gordura subcutânea tem influência na composição tecidual do coxim digital de equinos, fato evidenciado histologicamente com correlação positiva desta com a área de tecido adiposo e negativa com as áreas de tecido fibroelástico e de fibras colágenas, mesmo não havendo diferenças macroscópicas observadas em termos de forma e volume.

**Palavras-chave:** adipócitos, fibras elásticas, fibras colágenas, escore de condição corporal, anatomia, histologia.



## Abstract

PIZZI, Gino Luigi Bonilla Lemos. **Macroscopic and histological morphology of equine digital cushion and its association with subcutaneous fat thickness**. 2019. 47p. Dissertation (Master degree in Sciences). – Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

The digital pad is a structure present inside the hoof, responsible for absorbing the impact when the animal supports the limb on the ground, in addition to pumping blood as a stimulus to the venous return of the digit. This structure is widely studied in the bovine species, given its direct relationship with changes in body score and having a role in the pathophysiology of lameness caused in the foot region of these animals. Despite the importance in hoof biomechanics, the influence of body condition on the digital pad in horses is not known. This study, therefore, evaluated the influence of the Body Condition Score (ECC) and, consequently, of the subcutaneous fat thickness on the tissue composition of the digital pad in horses. Sixty mixed-breed adult horses were used, 21 males and 39 females, sent for slaughter, where all animals were submitted to ECC analysis, through visual ante mortem assessment, and then an ultrasound assessment of each individual was performed to estimate the subcutaneous fat thickness, with linear transducer in the frequency between 6.0 and 7.0 MHz. Subsequently, a thoracic and a pelvic limb were collected, after disarticulation at the level of the intercarpal and intertarsal joints. Macroscopic analyzes were performed on the collected parts (weight, volume and density of the hulls and digital cushions), in addition to the measurement of the area of internal structures on the axial axis of the hull, and histological analyzes to measure the areas of adipose, fibroelastic and collagen fibers of the digital pad. The relationships between variables in thoracic and pelvic limbs and between males and females ( $p < 0.05$ ) were verified using the t-test or the Wilcoxon test according to their normal distributions. To determine the correlation between subcutaneous fat thickness and the variables tested, Pearson's correlation test ( $p < 0.05$ ) was used. There were no macro and microscopic differences in the digital pad between thoracic and pelvic limbs and neither between sexes. There was no correlation between the variables weight, volume and density of the digital pad with the ECC ( $p > 0.05$ ), but a positive correlation was observed with the area of adipose tissue ( $p = 0.038$ ;  $R = 0.28$ ) and a negative one with the area of fibroelastic tissue ( $p = 0.005$ ;  $R = -0.37$ ) and area of collagen fibers ( $p = 0.003$ ;  $R = -0.39$ ). Therefore, the thickness of subcutaneous fat has an influence on the tissue composition of the digital pad of horses, a fact evidenced histologically with a positive correlation of this with the area of adipose tissue and a negative one with the areas of fibroelastic tissue and collagen fibers, even with no macroscopic differences observed in terms of shape and volume.

**Keywords:** adipocytes, elastic fibers, collagen fibers, body condition score, anatomy, histology.

## Lista de figuras

- Figura 1 - Ponto de aferição de gordura subcutânea via ultrassonografia (A) e imagem ultrassonográfica da medição de gordura subcutânea (B) ..... 23
- Figura 2. Membros pareados e divididos por identificação do animal antes do processamento..... 24
- Figura 3 - Vistas dorsal (A) e lateral (B) do membro torácico equino, após secção de padronização. .... 25
- Figura 4 - Estruturas internas ao casco delineadas para cálculo de área (azul), vistas após corte sagital no eixo de apoio (branco)..... 26
- Figura 5 – Vista abaxial de coxim digital equino de um antímero de casco de membro torácico esquerdo após sua remoção completa através de dissecação anatômica..... 26
- Figura 6 - Tecidos corados pela técnica de H&E (A), Resorcina-Fucsina (B) e Picrosirius (C), para morfometria das áreas de tecido adiposo, tecido fibroelástico e de fibras colágenas. Aumento de 40x. .... 28
- Figura 7 - Tecidos histológicos utilizados para a medição das áreas de tecido adiposo, fibroelástico e de fibras colágenas no eixo axial do coxim digital equino.. .... 31
- Figura 8 - Dispersão de regressão linear simples, indicando a associação positiva da espessura de gordura subcutânea com a área de tecido adiposo do coxim digital de equinos ( $R = 0,28$ ). .... 32
- Figura 9 - Dispersão de regressão linear simples, indicando a associação negativa da espessura de gordura subcutânea com a área de tecido fibroelástico do coxim digital de equinos ( $R = -0,37$ ). .... 32
- Figura 10 - Dispersão de regressão linear simples, indicando a associação negativa da espessura de gordura subcutânea com a área de fibras colágenas do coxim digital de equinos ( $R = -0,39$ ). .... 33

## Lista de tabelas

Tabela 1 - Frequência de distribuição de médias e desvio padrão do peso, volume e densidade do coxim digital e da espessura de gordura subcutânea de equinos para cada grau de ECC..... 29

Tabela 2 - Peso, volume e densidade médios e desvio padrão dos cascos e do coxim digital de membros torácicos e pélvicos de equinos.....30

## Lista de Abreviaturas e Siglas

Art.	Artigo
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
cm	centímetro
cm <sup>2</sup>	centímetros quadrados
ECC	Escore de Condição Corporal
f	fêmeas
g	grama
H&E	Hematoxilina & Eosina
IB	Instituto de Biologia
kg	quilograma
m	machos
mHz	mega-hertz
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mm	milímetro
mm <sup>3</sup>	milímetros cúbicos
mL	mililitro
µm	micrômetro
µm <sup>2</sup>	micrômetros quadrados
M.	músculo
nº	número
p	pélvico
RS	Rio Grande do Sul
RIISPOA	Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal
S	Sul
SDA	Sistema de Defesa Agropecuária
SME	Síndrome Metabólica Equina
t	torácico
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
UFPeL	Universidade Federal de Pelotas
W	Oeste

## Sumário

1. Introdução.....	1
2. Objetivos .....	4
2.1. Objetivo Geral.....	4
2.2. Objetivos específicos.....	4
3. Hipótese .....	5
4. Revisão bibliográfica .....	6
4.1. Anatomia do dígito equino .....	6
4.2. Anatomia do coxim digital equino .....	9
4.3. Histologia do coxim digital equino .....	11
4.4. Biomecânica dos membros.....	12
4.6. Escore de Condição Corporal .....	14
5. CAPÍTULO I - Morfologia macroscópica e histológica do coxim digital de equinos e sua associação com a espessura de gordura subcutânea .....	17
5.1. Introdução.....	20
5.2. Material e métodos .....	21
5.2.1. Animais e delineamento experimental .....	21
5.2.2. Avaliação clínica .....	22
5.2.3. Obtenção de amostras <i>post mortem</i> .....	23
5.2.4. Avaliação macroscópica.....	23
5.2.5. Avaliação histológica e morfometria tecidual .....	27
5.2.6. Análise estatística .....	28
5.3. Resultados .....	29
5.4. Discussão .....	33
5.5. Conclusões .....	37
6. Considerações finais .....	38
7. Referências .....	39

## 1. Introdução

Em equinos, as enfermidades do sistema músculo esquelético são as principais causas de afastamentos temporários ou definitivos das atividades esportivas e decorrem principalmente como consequência de lesões ortopédicas (VAN WEEREN, 2016). Com o incremento das modalidades esportivas utilizando equinos, observa-se um aumento no nível de exigência atlética e consequente sobrecarga das estruturas morfofuncionais destes animais. Somado a isso, inúmeras vezes, os equinos são iniciados em treinamentos quando ainda não atingiram a completa maturidade física e desenvolvimento estrutural (MCILWRAITH, 2004). Por outro lado, é comum o excessivo fornecimento de dietas hipercalóricas ricas em grãos e a limitação de atividade física adequada, principalmente em animais de lazer, o que culmina com sobrepeso e deposição de gordura em excesso, ao longo do corpo (FREEMAN, 2005).

A clínica ortopédica visa, portanto, além de métodos diagnósticos e correção de afecções que geram queda de desempenho nas pistas, métodos preventivos a fim de manter a higidez dos animais e assim, melhor performance atlética ou mesmo sua condição de vida. Para tanto, o conhecimento anatômico e biomecânico minucioso do aparato musculoesquelético é fundamental, considerando particularidades e disposições anatômicas, as quais podem ter variabilidade racial (MERLIN & DE ALCANTARA, 2016).

O casco equino é uma região com estruturas ósseas, tendíneas, articulares e de tecidos conectivos, formando um complexo aparato capaz de receber o impacto do membro no solo e amortecer a energia cinética gerada durante o deslocamento do corpo (LEACH & ZOERB, 1983). Toda a biomecânica de um indivíduo da espécie equina depende do impacto nos cascos, visto que são estruturas que frequentemente tocam o solo, suportando as forças geradas a partir da descarga do peso do corpo (DYHRE-POULSEN *et al.*, 1994). Em estação, o ponto de ação de forças é aplicado no centro do casco (eixo de apoio), medialmente dorsal à ranilha e, dissipa-se em sentido vertical, mediolateral e craniocaudal. Inicialmente, há o apoio dos talões e,

posteriormente da sola do casco. Subsequentemente, inicia o período de impacto, causado por oscilações de forças do solo sobre os membros. Estas forças são reduzidas em nível falangeano, já que as estruturas moles, articulares e plexos venosos absorvem a energia impactante (PARK, 2003), a fim de distribuir as forças geradas, estabilizar e proteger as estruturas durante o movimento.

O coxim digital é uma estrutura presente no interior do casco, responsável pela absorção do choque biomecânico quando o animal apoia o membro sobre o solo, além do bombeamento de sangue como estímulo ao retorno venoso do dígito. Este se localiza entre as cartilagens laterais, dorsal à ranilha e do tecido epidérmico do casco (GUNKELMAN & HAMMER, 2017). Por estar no interior do casco, o coxim tem íntima relação com o aparelho podotroclear, que é composto pelo osso navicular, ligamentos colaterais da articulação interfalangeana distal, ligamentos falangosesamoideos proximais e distal, tendão do músculo flexor digital profundo e a bursa do navicular (SOUZA *et al.*, 2017), capazes de, em conjunto com o coxim, permitir o funcionamento biomecânico da porção mais distal dos membros (RIBEIRO, 2013).

São escassos os estudos científicos envolvendo o coxim digital equino em termos de composição tecidual e sua correlação com características fenotípicas dos animais, sendo recentes as investigações aprofundadas acerca dessa estrutura na espécie. GUNKELMAN & HAMMER (2017) descreveram o padrão ultrassonográfico dessa estrutura e determinaram sua espessura através desse exame em animais sadios, não havendo diferença entre cavalos com ou sem ferrageamento. Já FARAMARZI *et al.* (2017) avaliaram histologicamente o coxim digital de 12 equinos adultos da raça Quarto de Milha, não identificando diferenças na composição entre as regiões de pinça e talões. Os autores citam que há inconsistências no estudo dessa estrutura para a espécie, sendo necessário mais investigações para se conhecer o padrão de crescimento e conformação em animais de diferentes categorias. Dessa forma, acredita-se que os equinos podem apresentar variabilidade genética entre raças, interferindo na constituição do coxim digital, somados a outros fatores como faixa etária, peso corporal, gordura subcutânea, aptidão esportiva e estímulos externos ambientais conforme o tipo de solo em que vivem.

Em contraste, o coxim digital bovino tem sido amplamente estudado e, pode servir de referência para o desenvolvimento de investigações científicas em equinos (GARD *et al.*, 2015). Em bovinos de leite, encontrou-se associação positiva entre escore de condição corporal (ECC) e espessura desta estrutura e negativa entre espessura do coxim digital e claudicação, ressaltando assim, a sua importância na prevenção de enfermidades ortopédicas (BICALHO *et al.*, 2009; NEWSOME *et al.*, 2017). Através de ultrassonografia dos cascos bovinos, BICALHO *et al.* (2009) verificaram em 501 vacas lactantes que quanto mais delgada era a espessura de coxim digital, maior era o risco de claudicação (principalmente por úlcera de sola ou doença da linha branca), além de haver associação do escore corporal com a composição de coxim digital. RÄBER *et al.* (2004) avaliaram anatômica e histologicamente as porções distais de membros torácicos e pélvicos de 54 bovinos abatidos em frigorífico, encontrando associação negativa entre a espessura de coxim digital e a ausência de lesões em região de casco. Segundo OIKONOMOU *et al.* (2014), há influência genética sobre a constituição do coxim digital em vacas leiteiras, influenciando na incidência de doenças de cascos.

A avaliação macroscópica e histológica de coxins digitais de equinos pode auxiliar no conhecimento da composição e espessura deste tecido, bem como dos fatores que o influenciam. Desta forma, o presente estudo teve por objetivo investigar características anatômicas macroscópicas e histológicas do coxim digital de equinos e verificar sua associação com a espessura de gordura subcutânea.



## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar as características anatômicas macroscópicas e histológicas do coxim digital de equinos e verificar sua associação com a espessura de gordura subcutânea.

### 2.2. Objetivos específicos

- Considerando o eixo de apoio, medir macroscopicamente a área das principais estruturas internas do casco equino, com destaque ao coxim digital;
- Verificar, através de cálculo percentual, a representatividade de cada estrutura interna no interior do casco equino;
- Verificar peso, volume e densidade dos coxins dos membros torácicos e pélvicos;
- Comparar peso, volume e densidade dos coxins dos membros torácicos e pélvicos;
- Comparar peso, volume e densidade do coxim entre machos e fêmeas;
- No plano de corte definido pelo eixo de apoio do casco equino, verificar histologicamente a proporção de distribuição por área de adipócitos, de fibras elásticas e de fibras colágenas;
- Comparar a proporção de distribuição de adipócitos, fibras elásticas e fibras colágenas nos coxins digitais de membros torácicos e pélvicos;
- Comparar a proporção de distribuição de adipócitos, fibras elásticas e fibras colágenas nos coxins digitais de equinos machos e fêmeas.

### **3. Hipótese**

A condição corporal e, conseqüentemente, a espessura de gordura subcutânea tem influência direta na composição tecidual do coxim digital em equinos, podendo (como ocorre com bovinos) aumentar as grandezas físicas desta estrutura.

## 4. Revisão bibliográfica

### 4.1. Anatomia do dígito equino

O aparelho locomotor é constituído principalmente de estruturas ósseas, articulares, ligamentares, musculares e tendíneas, capacitando o animal a locomover-se. Quem promove o movimento é a musculatura estriada esquelética, que consome energia para produzir a contração muscular, mobilizando segmentos ósseos através da movimentação de uma ou mais articulações (HUXLEY, 1974). Os membros fazem parte do esqueleto apendicular, promovendo a propulsão do tronco à frente com os membros pélvicos e sustentando cerca de 60% do peso do animal através dos membros torácicos (STASHAK, 2006).

Embora um estudo mais recente tenha levantado nova hipótese sobre a evolução da mão equina (SOLOUNIAS *et al.*, 2018), de um modo geral sabe-se que as porções distais dos membros torácicos e pélvicos dos equinos passaram por evoluções genéticas com perdas de dedos e desenvolvimento do terceiro dígito, o qual é o único remanescente nesses animais (JANIS, 2007; MCHORSE *et al.*, 2017). A sustentação óssea e articular das extremidades da mão e pé se dá a partir das regiões do carpo e do tarso, respectivamente, onde há a presença de pequenos ossos curtos articulados entre si (organizados em forma de fileiras) seguidos por três ossos metacárpicos (e metatársicos) e três falanges de um único dígito III, que sustenta o apoio do membro (GROSSMAN & SISSON, 1982). Adicionalmente há ocorrência de ossos sesamoides que são importantes coadjuvantes na perfeita cinética destes segmentos.

Os terceiros ossos metacárpicos/metatársicos articulam-se medialmente e lateralmente em sua superfície palmar/plantar com os ossos rudimentares (segundo e quarto metacárpicos/metatársicos respectivamente), que são resquícios ósseos de outros dedos que os ancestrais dos cavalos possuíam. Na epífise distal dos terceiros metacárpicos/metatársicos, existe um par de côndilos que se articulam com a falange proximal de cada dedo (FLOYD & MANSMANN, 2007). Na face palmar/plantar dessa região, também há um par de ossos sesamoides, importantes para a estabilização da articulação da

região do boleto e como ponto de fixação de músculos e ligamentos. Os equinos possuem três falanges em cada membro, tendo sua denominação determinada no sentido proximal-distal: falange proximal, média e distal (GROSSMAN & SISSON, 1982). A falange distal possui formato semelhante a um casco e fica alojada inteiramente interna a essa estrutura córnea, além de possuir cartilagens ungueais, aumentando a área de contato com o casco nas superfícies abaxiais. Na sua face palmar/plantar, há um pequeno osso sesamoide distal denominado osso navicular, importante na composição do aparelho podotrocLEAR, um grupo de estruturas que auxilia na absorção do impacto recebido pelo membro no momento do contato com o solo quando em movimento (BUDRAS *et al.*, 2012).

. No dígito do equino, a articulação mais proximal é na região do boleto, chamada de metacarpo/metatarso-falangeana, onde o terceiro metacárpico/metatársico tem ponto de união móvel com a falange proximal. Um grande número de ligamentos estabiliza essa região, não só entre os dois ossos supracitados como também com o par de ossos sesamoides presentes na região. Dentre esses ligamentos, o mais importante é o que se forma a partir de um músculo interósseo, chamado de ligamento suspensório do boleto (FLOYD & MANSMANN, 2007). Sua origem é na região palmar/plantar da epífise proximal do terceiro metacárpico/metatársico, entre os dois ossos rudimentares, e na porção final desse osso este se divide em dois ramos extensores que passam lateral e medialmente à região do boleto, onde percorrem para a face dorsal do dedo e voltam a se unir, se inserindo no tendão do M. Extensor digital comum/longo que, por sua vez, insere-se na apófise extensora da terceira falange (DENOIX, 1994).

Entre as três falanges, há duas articulações interfalângicas: proximal e distal. Todas as junções na região do dedo são sinoviais do tipo gínglimo, com movimentos articulares de extensão e flexão do dedo. Internamente ao casco, na região da articulação interfalângica distal, além de ser localizada a sua cápsula articular situa-se palmar/plantar a esta o aparelho podotrocLEAR que compreende a região onde o osso navicular se articula. Essa região recebe impacto quando o membro volta ao solo durante o movimento. Uma estrutura de ligamentos protege essa região que possui a bursa sinovial do navicular,

que são os ligamentos falango-sesamoides proximais (suspensórios do navicular), localizados lateral e medialmente e o ligamento ímpar do navicular, unindo este osso à superfície palmar/plantar da falange distal (DENOIX, 1999).

Os equinos são ungulados que possuem a extremidade do dedo revestida por um estojo córneo denominado de casco (DURO, 2010), que confere proteção e sustentação à extremidade distal do membro (SAMPAIO *et al.*, 2013), com responsabilidade de manutenção do equilíbrio e distribuição de forças durante a locomoção, absorvendo o impacto e auxiliando na propulsão, além de suportar o peso do animal (ARGENTINO *et al.*, 2017).

Tridimensionalmente, sua superfície mais próxima ao plano longitudinal é medial, enquanto a oposta é lateral. No plano horizontal, temos a orientação dorsal-palmar para membros torácicos e dorsal-plantar para membros pélvicos. A porção mais proximal é o periópio (ou coroa), por onde ocorre o crescimento do casco (10 mm/mês) através de túbulos sendo queratinizados em sentido distal pela pinça e paredes (quartos) do casco (CÉLESTE & SZÖKE, 2005; DO CANTO, 2004). Unindo a parede e a sola existe a linha branca, a qual demarca a junção entre as porções sensitivas e não sensitivas do casco. Por fim, na região dos talões, situa-se a ranilha, sendo a estrutura mais sensitiva do casco. Seu eixo mais central ao plano sagital é axial, enquanto que os eixos mais laterais são abaxiais. A porção externa do casco é altamente queratinizada e é formada por lâminas epidérmicas primárias e secundárias onde há a presença de queratinócitos, responsáveis pelo processo de queratogênese, inerente ao casco para o crescimento desta estrutura.

O estrato interno é constituído por lâminas epidérmicas que se interdigitam com as lâminas dérmicas constituindo o cório laminar. Para cada região anatômica do casco, existe uma derme correspondente constituindo a junção derme-epidérmica que sustenta a união do casco com as estruturas internas (WAGNER *et al.*, 2001). Na região mais interna do casco localiza-se o tecido conjuntivo denso e colagenoso, altamente vascularizado e innervado, denominado cório coronário (derme) (STASHAK, 2006), que cobre a falange distal e está fortemente ligado com as lâminas epidérmicas.

Como já citado anteriormente, internamente a essa cápsula de tecido córneo estão alocadas importantes estruturas, que são as falanges média

(parcialmente) e distal, o osso sesamóide distal (navicular) e sua bursa, as cartilagens ungueais, a articulação interfalangeana distal, o tendão do músculo flexor digital profundo, ligamentos colaterais da articulação Interfalangeana distal, ligamentos falango-sesamoides proximais (suspensórios do navicular) e ligamento ímpar do navicular, além de vasos sanguíneos e nervos digitais (GRAVENA *et al.*, 2017). O coxim digital equino também faz parte das estruturas internas ao casco equino, tendo importante função na biomecânica dessa região.

#### **4.2. Anatomia do coxim digital equino**

O coxim digital equino é a estrutura que amortece o impacto internamente ao casco (DYHRE-POULSEN *et al.*, 1994) e se localiza entre as cartilagens ungueais, dorsal à ranilha e do tecido epidérmico do casco (GUNKELMAN & HAMMER, 2017), preenchendo o espaço entre a ranilha e a terceira falange, o tendão flexor digital profundo e o osso navicular (BOWKER *et al.*, 1998). Das diversas estruturas no interior do casco, o coxim tem íntima relação principalmente com a falange distal e com o aparelho podotroclear, além do tendão do M. flexor digital profundo (KAINER, 2006).

Esta importante estrutura constitui-se da associação de tecido adiposo e elástico quando se apresentam delgadas e tecido fibroso ou fibrocartilaginoso e elástico quando espessas (BOWKER, 1998). Sua vascularização é oriunda de ramificações das artérias e veias digitais palmares (membros torácicos) e plantares (membros pélvicos), assim como sua enervação recebe ramos dos nervos de mesmo nome e posição anatômica (PARKS, 2003)

Sua composição e sua posição anatômica justificam a função de amortecimento e de auxílio na hemodinâmica da porção mais distal dos membros. Também auxilia no retorno venoso da vascularização que nutre as estruturas adjacentes no interior do estojo córneo, bem como acontece na espécie bovina (BORGES *et al.*, 2015). Não há descrição de afecções que ocorram especificamente no coxim digital equino, porém essa estrutura está intrinsecamente relacionada com a prevenção de lesões ósseas e articulares

internamente ao casco. Quando a ranilha do casco atinge o chão, é comprimida e se expande lateralmente, pressionando o coxim digital que, por sua vez, imprime força nas cartilagens ungueais abaxialmente, auxiliando na expansão das paredes do casco (PILLINER *et al.*, 2002).

Há três forças gravitacionais entre o animal e solo que agem sobre o casco durante a andadura: (1) no centro do casco perpendicular ao solo, representando a massa corpórea; (2) no mesmo sentido do eixo podofalângico em direção ao solo; (3) contrário ao anterior, representando a força de tração do tendão flexor digital profundo em direção palmar/plantar. Quando o cavalo sai da fase de estação e começa a se locomover, a área de pressão se desloca do centro do casco para a porção distal da pinça, ao longo do eixo podofalângico (VAN HEEL *et al.*, 2005). O coxim digital abrange área relevante no interior do casco, agindo em seu interior como principal estrutura amortecedora e distribuidora da energia cinética dessas três forças em seu eixo axial (PARKS, 2003). Quando há desequilíbrio morfométrico do casco do animal, essas forças têm sua energia mal distribuída, sobrecarregando as estruturas ósseas e articulares internas ao casco não preparadas para essas forças do impacto.

BOWKER *et al.* (1998) encontraram diferenças teciduais das cartilagens ungueais e do coxim digital de equinos, principalmente em termos de espessura, em cavalos de diferentes idades e raças. Inicialmente, também observaram diferenças anatômicas na composição do coxim entre membros torácicos e pélvicos – este contendo mais tecido adiposo e fibroelástico. Porém, concluíram que os estímulos externos como ferrageamento, casqueamento e exercícios aos quais o animal é submetido modificam a estrutura morfológica do coxim digital na espécie. Além disso, há uma substituição dos tecidos adiposo, fibroelástico e composição de fibras colágenas por tecidos conjuntivos fibrosos e fibrocartilagosos em animais mais idosos.

### 4.3. Histologia do coxim digital equino

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

A presença de tecido adiposo no coxim digital não serve como agente termorregulador, e sim para auxílio no amortecimento de choques e impactos mecânicos, além de fornecer uma consistência mais macia e menos densa para essa estrutura (RÄBER *et al.*, 2006). Basicamente, o tipo de tecido adiposo encontrado no coxim digital, independentemente da idade do animal, é o unilocular. Não foram encontrados estudos discorrendo sobre a função de deposição de gordura e reserva de energia pelo tecido adiposo do coxim digital em equinos, bem como as alterações que esse tecido pode sofrer frente aos diferentes escores corporais nos animais.

No coxim digital equino, as fibras colágenas se entrelaçam por entre os tecidos conectivos adjacentes, organizando-se em bandas nos sentidos longitudinal e transversal e possuem grande força tênsil. Elas apenas têm capacidade de se deformarem cerca de 5% de seu comprimento, conferindo assim a essas fibras – e, conseqüentemente, ao coxim digital - maior absorção de impactos (EURELL & VAN SICKLE, 2006).

Já o tecido fibroelástico possui a característica de se deformar quando uma força é submetida, armazenando essa energia cinética durante a fase de apoio e soltando-a logo após, facilitando a movimentação das articulações interfalângicas e da região do boleto para o retorno das estruturas podais às suas posições iniciais (KIELTY *et al.*, 2002; GOSLINE *et al.*, 2002). Portanto, a capacidade de deformação das fibras elásticas auxilia as fibras colágenas a suportar as forças que atuam durante o movimento. Concomitantemente, há o



tecido adiposo que atua em conjunto com a estrutura córnea mais rígida do casco na dissipação da energia gerada durante o movimento evitando sobrecarga das estruturas internas ao casco.

O coxim digital equino possui diferenças teciduais em suas porções axiais e abaxiais. FARAMARZI *et al.* (2017) investigaram as regiões axial (dividindo esta em proximal – mais localizada em região de talões e ranilha – e distal – mais próxima à terceira falange e à sola do casco) e abaxial (medial e lateral). A região axial distal destaca-se pela grande quantidade de fibras colágenas em relação às demais, que, por sua vez, possuem moderada quantidade de tecido fibroelástico junto com ampla rede vascular, reforçando a tese do auxílio no bombeamento venoso, visto que vênulas são os vasos sanguíneos mais abundantes e com maior diâmetro no coxim digital. Em ambas regiões abaxiais não há diferenças teciduais significativas entre si, sendo mais encontrados adipócitos e grandes quantidades de condrócitos, diferente das regiões axiais. Essa arquitetura tecidual não difere entre membros torácicos e pélvicos contralaterais.

#### **4.4. Biomecânica dos membros**

Os equinos sofreram transformações em sua constituição musculoesquelética ao longo dos tempos, que proporcionaram uma dinâmica de locomoção mais eficiente (VERKADE *et al.*, 2019). Dentre as inúmeras raças e linhagens existentes na espécie, todas são frutos dessas modificações anatômicas, que tornaram esses animais apreciados, por sua força e agilidade ao movimentarem-se com eficiência (SELF DAVIES *et al.*, 2019).

A locomoção é o ato do animal movimentar o centro de massa do seu corpo de um lugar a outro, independente da velocidade, incluindo assim a interação de seus membros com as forças provenientes do solo (HOBBS & CLAYTON, 2019). A locomoção é de extrema importância para os animais, visto que estes precisam se deslocar para se alimentarem ou fugirem de seus predadores. Para os equinos, pelo seu aparelho musculoesquelético adaptado ao exercício, a troca de energias entre o corpo e o solo é constante,

principalmente ao tranco, trote e galope, visto que modifica a energia gerada pelo centro de massa do corpo (CAVAGNA *et al.*, 1977).

Denoix (2014) descreve que, em ambos os membros, existem duas alavancas de movimento de acordo com grupos musculares específicos. A alavanca de 2ª classe é composta pela musculatura que promove a extensão em nível caudal das articulações do esqueleto apendicular, propulsionando o tronco cranialmente durante a fase de apoio. Já a alavanca de 3ª classe compreende a musculatura que faz a passagem desses membros para o ponto mais cranial, havendo assim flexão máxima dessas articulações na fase de suspensão, para que esse membro retorne ao solo e inicie uma nova onda de propulsão, mantendo assim a continuidade do movimento. O impacto sofrido pelos membros, proveniente tanto do corpo quanto do contato com o solo, é direcionado aos cascos, visto que essas estruturas estão em contato com o ambiente. Contudo, internamente ao casco, o coxim digital auxilia na dissipação dessas energias cinéticas provenientes do impacto do movimento.

Nas extremidades distais dos membros torácicos e pélvicos do equino, há um constante estresse mecânico resultado da contração muscular. As estruturas musculares dessa região limitam-se apenas a porções tendinosas dos músculos extensores e flexores dos dígitos. O momento de maior impacto é quando o membro chega ao solo, onde há extensão do segmento cranialmente. O ligamento suspensório do boleto promove ação de frear a hiperextensão do dígito, atuando como uma rédea nas articulações metacarpo/metatarso-falangeanas e interfalangeanas proximal e distal (BUKOWIECKI *et al.*, 1987). Além disso, nesse momento de impacto, ele auxilia a reservar e dissipar a energia cinética produzida pelo movimento. Internamente ao casco, essa função é exercida pelo coxim digital, que graças às suas fibras colágenas e elásticas, também absorve e redistribui essas forças biomecânicas através do membro (EGERBACHER *et al.*, 2005). Ambas as estruturas atuam evitando a compressão do aparelho podotroclear na região da ranilha do casco. Esse aparelho, composto principalmente pelo osso navicular, tem como função ampliar a área de inserção do tendão do músculo flexor digital profundo na falange distal (WILSON *et al.*, 2010).

Não obstante, além da dissipação de energia cinética, a região distal dos membros necessita ter o retorno venoso facilitado pela ação dos movimentos das articulações internas ao casco, bem como o aparelho de estruturas que auxiliam o estojo córneo na dissipação das forças mecânicas (BOWKER *et al.*, 1998). O impacto com o solo estimula a deformação das fibras elásticas do coxim digital, o qual funciona com uma ação de bombeamento no auxílio do retorno venoso pela compressão dos vasos dessa região. Esse mecanismo além de auxiliar no fluxo sanguíneo, ajuda a prevenir estase sanguínea no interior do casco, reduzindo a possibilidade de insultos sistêmicos as lâminas do casco equino (POLLITT, 2004).

O tecido adiposo unilocular também faz parte da composição morfológica do coxim digital. De uma forma geral este tipo de tecido funciona como reserva de energia, porém sua principal função destacada é auxiliar na proteção contra choques mecânicos (DO NASCIMENTO *et al.*, 2009). Porém, acredita-se que animais mais obesos aparentemente tendem a ter mais tecido gorduroso na composição dessa estrutura, além de vascularização menos abundante e com pouco calibre em sua luz, fato contrário observado em animais atletas. Em bovinos, essa relação já é bem conhecida e serve como base teórica para investigações científicas, visto que há correlação positiva entre o escore de condição corporal e a espessura do coxim digital, ao passo que a correlação entre esta e o grau de claudicações é negativa (RABER *et al.*, 2006; BICALHO *et al.*, 2009; OIKONOMOU *et al.*, 2014).

#### **4.5. Escore de Condição Corporal**

A alimentação é de importância vital para a saúde do animal. No ato de se alimentar, o indivíduo supre suas necessidades nutricionais ao ingerir macro e micronutrientes para que o corpo busque manter a homeostase, além de reservar energia para as funções celulares, crescimento, metabolismo hormonal e para a produção e manutenção de calor. O que sobra nesse processo de alimentação é armazenado em forma de gordura, através da lipogênese efetuada pelos adipócitos (COSTA & DUARTE, 2006).

Em animais de produção, esse processo é de extrema importância para se ter a maximização dos recursos gerados a partir da aptidão de cada espécie. A principal função produtiva dos animais da espécie equina é a atlética, visto que necessitam de um aporte energético maior que outros indivíduos. Além disso, o fator nutricional influencia diretamente na função reprodutiva tanto para machos, em caracteres seminais como velocidade, motilidade e morfologia, quanto para fêmeas, como no ciclo estral, atividade ovariana e lactação (CONTRI *et al.*, 2011; VECCHI *et al.*, 2010).

A nutrição dos equinos é basicamente composta por alimentos volumosos, que são estruturados principalmente por células vegetais, e a oferta de concentrado para suprir as necessidades nutricionais para cada categoria animal (MARQUES *et al.*, 2019). O sistema de criação dos animais (extensivo, semiextensivo ou intensivo) influencia diretamente no tipo de dieta que o animal vai ingerir. Animais com acesso à sistema de confinamento recebem mais oferta do alimento concentrado. Todos esses fatores se refletem no corpo do animal, visto que durante o processo de anabolização o corpo armazena gordura em pontos específicos e conhecidos. Além disso, quando há excesso alimentar ou má nutrição, o animal pode apresentar problemas digestivos, reprodutivos e locomotores (CASEY, 2002).

O Escore de Condição Corporal (ECC) é um método desenvolvido por HENNEKE *et al.* (1983) e utilizado até hoje para determinar os efeitos da nutrição nos equinos. Consiste em exame de inspeção visual e palpação da gordura no pescoço, acima das escápulas, região costal, atrás do ombro, região lombar e na base da cauda. Este método é subjetivo, dependendo do critério do examinador para encaixar cada animal nos diferentes escores determinados pela técnica, que variam entre 1 (referente ao animal raquítico) e 9 (onde o animal encontra-se na obesidade extrema). A quantificação exata da espessura de gordura subcutânea é feita através de ultrassonografia dos pontos supracitados, determinada por WESTERVELT *et al.* (1976). Porém, o ponto de acúmulo de gordura que mais se correlaciona com o ECC em equinos é na região da base da cauda, sendo este o mais influenciado visivelmente pelas variações nutricionais dos animais dessa espécie (GOBESSO *et al.*, 2014).

Aliados à dieta animal, outros fatores intrínsecos dos indivíduos também influenciam na condição corporal dos equinos. Nas diferentes raças, há diferenças em termos de quantidade de deposição de gordura subcutânea, como por exemplo entre animais da raça Quarto de Milha, Puro-Sangue Inglês e Puro-Sangue Árabe (GOBESSO *et al.*, 2014). O fator idade também tem impacto na condição corpórea, onde animais mais jovens, até cerca de oito anos possuem maior conversão alimentar para a produção de músculos em relação a animais mais idosos (FURTADO *et al.*, 2010). Por fim, o fator sexo também deve ser considerado principalmente para machos não apenas no peso, mas também em sua altura, sendo estes normalmente mais pesados em relação a fêmeas quando na mesma idade e em situações nutricionais semelhantes (DAWSON *et al.*, 1945; SOUZA *et al.*, 2017).

Outro importante ponto de formação de tecido adiposo é intra-abdominal, onde localiza-se a gordura visceral. Morfologicamente, sua principal função é de proteção dos órgãos abdominais contra choques mecânicos. Porém, há décadas se debate o papel desse tecido no desenvolvimento da Síndrome Metabólica Equina (SME), onde os adipócitos dessa região secretam fatores como leptina, adipocinas e TNF- $\alpha$ , levando o animal a uma resistência à insulina, principal característica dos animais que possuem essa afecção (RIBEIRO FILHO *et al.*, 2006).

Contudo, registros sobre o tipo de tecido adiposo e características específicas dos adipócitos do coxim digital equino são deveras escassos, não sendo conhecido se este tecido também comporta-se sendo influenciado pelas alterações dietéticas que o animal sofre ao longo da vida e no metabolismo de mediadores inflamatórios de doenças como laminite e SME. FARAMARZI *et al.* (2017) debatem inclusive sobre a necessidade de estudos mais aprofundados relacionando as características teciduais do coxim digital equino com a conformação corporal dos animais, a fim de se obter um melhor entendimento dessa estrutura fundamental na absorção e dissipação das forças cinéticas internamente ao casco.

**5. CAPÍTULO I - Morfologia macroscópica e histológica do coxim digital de equinos e sua associação com a espessura de gordura subcutânea**

Capítulo que corresponde ao manuscrito que será submetido para publicação na Revista Brasileira de Zootecnia

## Resumo

Este estudo avaliou a influência do Escore de Condição Corporal e, conseqüentemente, da espessura de gordura subcutânea na composição tecidual do coxim digital em equinos. Foram utilizados 60 equinos adultos sem raça definida, sendo 21 machos e 39 fêmeas, encaminhados ao abate, onde todos os animais foram submetidos à análise do ECC, através de avaliação visual *ante mortem*, sendo posteriormente realizada avaliação ultrassonográfica de cada indivíduo para a estimativa da espessura de gordura subcutânea, com transdutor linear na frequência entre 6.0 e 7.0 MHz. Subseqüentemente, foram coletados um membro torácico e um pélvico, após desarticulação em nível das articulações intercárpicas e intertársicas. Foram feitas análises macroscópicas das peças coletadas (peso, volume e densidade dos cascos e dos coxins digitais), além da medição da área das estruturas internas ao casco, e análises histológicas para a medição das áreas de tecido adiposo, fibroelástico e de fibras colágenas do coxim digital. Foi determinado o efeito das variáveis entre membros torácicos e pélvicos e entre sexos ( $p < 0,05$ ), através de teste t ou do teste de Wilcoxon, conforme os pré-requisitos dos testes estatísticos. Para determinar a correlação entre espessura de gordura subcutânea e as variáveis testadas, foi utilizado o teste de correlação de Pearson ( $p < 0,05$ ). Não houve diferenças macroscópicas do coxim digital entre membros torácicos e pélvicos e nem entre sexo. Da mesma forma, não houve diferenças nas características histológicas entre os membros e os sexos. Não houve correlação das variáveis peso, volume e densidade do coxim digital com o ECC ( $p > 0,05$ ), porém foi observada correlação positiva com a área de tecido adiposo ( $p = 0,038$ ;  $R = 0,28$ ) e correlação negativa com a área de tecido fibroelástico ( $p = 0,005$ ;  $R = -0,37$ ) e área de fibras colágenas ( $p = 0,003$ ;  $R = -0,39$ ).

**Palavras-chave:** adipócitos, fibras elásticas, fibras colágenas, escore de condição corporal, anatomia, histologia

## Abstract

This study evaluated the influence of the Body Condition Score and, consequently, of the subcutaneous fat thickness on the tissue composition of the digital pad in horses. Sixty mixed-breed adult horses were used, 21 males and 39 females, sent for slaughter, where all animals were submitted to ECC analysis, through visual *ante mortem* assessment, and then an ultrasound assessment of each individual was performed to estimate the subcutaneous fat thickness, with linear transducer in the frequency between 6.0 and 7.0 MHz. Subsequently, a thoracic and a pelvic limb were collected, after disarticulation at the level of the intercarpic and intertarsic joints. Macroscopic analyzes of the collected pieces (weight, volume and density of the hulls and digital cushions) were carried out, in addition to the measurement of the area of the structures internal to the hoof, and histological analyzes for the measurement of the areas of adipose, fibroelastic and collagen fibers of the digital cushion. The effect of variables between thoracic and pelvic limbs and between sexes ( $p < 0.05$ ) was determined using the t-test or the Wilcoxon test according to their normal distribution. To determine the correlation between subcutaneous fat thickness and the variables tested, Pearson's correlation test ( $p < 0.05$ ) was used. There

were no macroscopic differences in the digital cushion between thoracic and pelvic limbs and neither between sex. Likewise, there were no differences in histological characteristics between members and sexes. There was no correlation between the variables weight, volume and density of the digital pad with the ECC ( $p > 0.05$ ), but a positive correlation was observed with the area of adipose tissue ( $p = 0.038$ ;  $R = 0.28$ ) and a negative correlation with the area of fibroelastic tissue ( $p = 0.005$ ;  $R = -0.37$ ) and area of collagen fibers ( $p = 0.003$ ;  $R = -0.39$ ).

**Keywords:** adipocytes, elastic fibers, collagen fibers, body condition score, anatomy, histology



## 5.1. Introdução

O coxim digital é uma estrutura presente no interior do casco, responsável pela absorção do impacto quando o animal apoia o membro sobre o solo, além do bombeamento de sangue como estímulo ao retorno venoso do dígito. Se localiza entre as cartilagens laterais, dorsal à ranilha e tecido epidérmico do casco (GUNKELMAN & HAMMER, 2017). Esta importante estrutura quando delgada constitui-se da associação de tecido adiposo e elástico e quando espessa de tecido fibroso ou fibrocartilaginoso e elástico (BOWKER *et al.*, 1998). Por estar no interior do casco, o coxim tem íntima relação com o aparelho podotroclear, que é um conjunto de estruturas ósseas, articulares, ligamentos e tendão, capazes de permitir o funcionamento biomecânico da porção mais distal dos membros (RIBEIRO, 2013).

São escassos e recentes os estudos científicos envolvendo o coxim digital equino em termos de composição tecidual e sua correlação com características fenotípicas dos animais. GUNKELMAN & HAMMER (2017) descreveram o padrão ultrassonográfico dessa estrutura e determinaram sua espessura em animais sadios, caracterizando ausência de diferença na espessura dessa estrutura entre cavalos com ou sem ferrageamento. Já FARAMARZI *et al.* (2017) avaliaram histologicamente o coxim digital de 12 equinos adultos da raça Quarto de Milha, não identificando diferenças na composição entre as regiões de pinça e talões. Os autores citam que há inconsistências no estudo dessa estrutura para a espécie, sendo necessário mais investigações para se conhecer o padrão de crescimento e conformação em animais de diferentes categorias.

Em contraste, o coxim digital bovino tem sido amplamente estudado e, pode servir de referência para o desenvolvimento de investigações científicas em equinos (GARD *et al.*, 2015). Em bovinos de leite, encontrou-se associação positiva entre índice de condição corporal e espessura desta estrutura e negativa entre espessura do coxim digital e claudicação, ressaltando assim, a importância desta estrutura para a prevenção de enfermidades ortopédicas (BICALHO *et al.*, 2009; NEWSOME *et al.*, 2017), fato este, ainda não estudado em equinos. Com caráter esclarecedor, a avaliação macroscópica e histológica

de coxins digitais de equinos pode auxiliar no conhecimento da composição e espessura deste tecido, bem como dos fatores que o influenciam. Desta forma, o presente estudo teve como objetivos: (I) Investigar características macro e microscópicas do coxim digital de membros torácicos e pélvicos de equinos; (II) Verificar a ocorrência de possível associação entre as características da constituição tecidual do coxim digital de equinos com seus depósitos de gordura subcutânea.

## **5.2. Material e métodos**

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), sob número de aprovação 137/2019.

O estudo foi realizado em duas etapas. A etapa inicial foi destinada à coleta das amostras e foi realizada em frigorífico dedicado exclusivamente ao abate de equinos, localizado no município de São Gabriel, no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, a 30°25'26.6"S e 54°22'28.2"W. O estabelecimento cumpre todas as exigências legais para funcionamento conforme Decreto n° 9.013 de 29 de março de 2017, artigo 186 do RIISPOA.

A segunda etapa foi dedicada ao processamento e análise das amostras, sendo realizada no Laboratório de Anatomia dos Animais Domésticos e no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia, ambos pertencentes ao Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas.

### **5.2.1. Animais e delineamento experimental**

As amostras foram obtidas de 60 equinos adultos (*Equus caballus*), sendo 21 machos e 39 fêmeas, com peso médio de 374,73 ± 56,64 kg. Todos

os animais foram provenientes dos lotes a serem abatidos na rotina do frigorífico.

O biótipo da amostra selecionada foi considerado relativamente homogêneo e consistente com os padrões fenotípicos da espécie, visto que os animais provenientes do estabelecimento em sua maioria eram sem raça definida. Todos os animais foram submetidos a procedimentos de identificação, pesagem e registros seguindo os protocolos internos do frigorífico. Após, foram alocados em baias separadas e receberam água potável *ad libitum*.

### 5.2.2. Avaliação do escore de condição corporal (ECC)

Durante os procedimentos de identificação e previamente ao abate, todos os animais foram submetidos à análise do Escore de Condição Corporal (ECC), através de avaliação visual *ante mortem*, conforme metodologia descrita por HENNEKE *et al.* (1983). A avaliação foi registrada em fichas individuais e realizada por uma única pessoa treinada, com propósito de reduzir o coeficiente de variação.

A graduação do escore corporal foi de um (animal extremamente magro e sem depósito de gordura) até nove (animal extremamente obeso), sendo cinco para condição corporal intermediária. Logo após a avaliação do escore de condição corporal, foi realizada avaliação ultrassonográfica de cada indivíduo com propósito de determinar a espessura de gordura subcutânea. Para tal, foi utilizado um equipamento de ultrassom **Ultramedic 7V®**, com transdutor linear, na frequência entre 6.0 e 7.0 MHz, segundo metodologia descrita por GOBESSO *et al.* (2014). Foi aferida a espessura do tecido adiposo subcutâneo na região da garupa, quatro centímetros cranial à base da cauda e lateralmente a esse ponto (Figura 1).

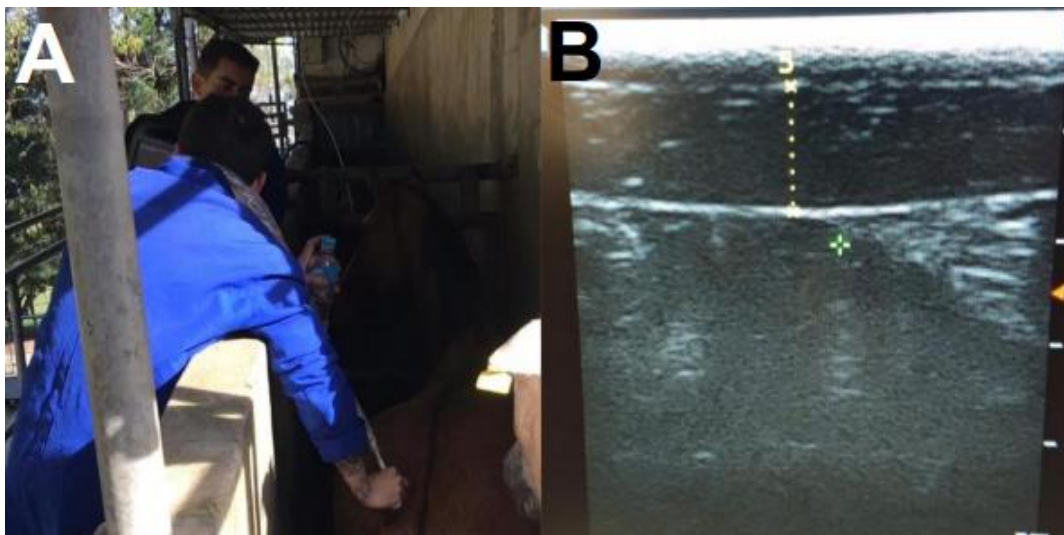


Figura 1 - Ponto de aferição de gordura subcutânea via ultrassonografia (A) e imagem ultrassonográfica da medição de gordura subcutânea (B)

### 5.2.3. Obtenção de amostras *post mortem*

Após aferição do Escore de Condição Corporal e da gordura subcutânea, todos os animais foram abatidos no frigorífico por concussão cerebral, seguida por secção da veia jugular, de acordo com método de insensibilização autorizado pelo MAPA (BRASIL, 2000). De cada indivíduo foram coletados um membro torácico e um pélvico após desarticulação em nível das articulações intercárpicas e intertársicas, sendo identificados e acondicionados em sacos plásticos e refrigerados em isopor com gelo para o transporte imediato até a cidade de Pelotas, RS.

### 5.2.4. Avaliação macroscópica

No Laboratório de Anatomia Animal dos Animais Domésticos, do Departamento de Morfologia do Instituto de Biologia da UFPel (Campus Capão do Leão), foram feitas as análises macroscópicas das peças coletadas. Inicialmente, todas as peças foram separadas de acordo com a identificação do animal ao qual eram referentes (Figura 2).



Figura 2. Membros pareados e divididos por identificação do animal antes do processamento.

Cada peça foi seccionada com uma serra elétrica de fita, em nível da coroa do casco, preservando as estruturas internas do mesmo, com o intuito de padronização proporcional das amostras. A seguir, foram realizados registros fotográficos da vista dorsal e lateral de cada casco com sua respectiva identificação (Figura 3).



Figura 3 - Vistas dorsal (A) e lateral (B) do membro torácico equino, após secção de padronização.

Posteriormente, os cascos foram pesados em balança digital de precisão Equinox® 1105 de 5kg e seus volumes aferidos através de imersão em Becker com graduação de 2000mL, com estimativa volumétrica baseada no aumento do volume líquido auxiliada por medição de régua submergida. Subsequentemente, cada casco foi submetido a uma secção sagital central, exatamente na linha mediana do casco, aqui denominada como eixo de apoio, para a obtenção de dois antímeros simétricos por peça. A densidade foi estimada pela razão entre o peso e o volume de cada peça (ROTTA & GONDA, 2004).

A área de cada estrutura interna (SF: segunda falange; TF: Terceira falange; ON: osso navicular; TFP: Tendão do músculo flexor digital profundo; CD: coxim digital) foi delineada na imagem e mensuradas (cm<sup>2</sup>) (Figura 4) com fotografias realizadas em mini estúdio, com distância uniforme e escala métrica referencial através do software ImageJ® (GEIGER *et al.*, 2016), sendo a proporcionalidade das áreas expressa em percentuais. Utilizou-se a escala métrica da superfície de corte para calibração do software, com conversão de pixels para cm.

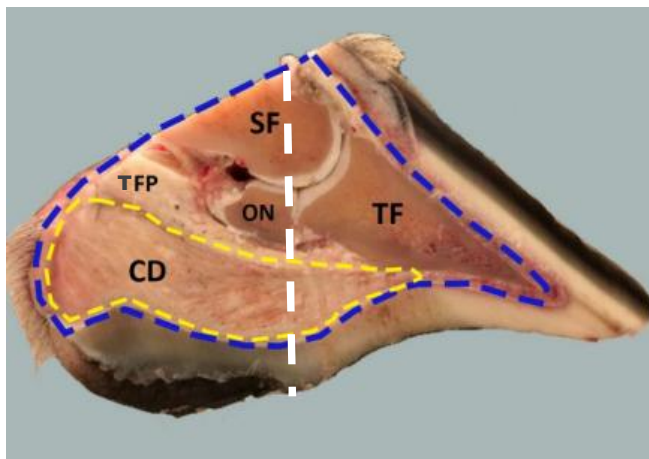


Figura 4 - Estruturas internas ao casco delineadas para cálculo de área (azul), vistas após corte sagital no eixo de apoio (branco). (SF: segunda falange; TF: terceira falange; TFP: Tendão do músculo flexor digital profundo; CD: coxim digital - amarelo; ON: osso navicular).

Para o cálculo do volume do coxim, esta estrutura foi removida por completo dos dois antímeros de cada casco (Figura 5), pesada e imersa em água, seguindo as mesmas técnicas descritas para o volume e densidade do casco total.



Figura 5 – Vista abaxial de coxim digital equino de um antímero de casco de membro torácico esquerdo após sua remoção completa através de dissecação anatômica.

### 5.2.5. Avaliação histológica e morfometria tecidual

As amostras de coxim digital foram aparadas para padronizar as dimensões das peças histológicas em 5x5x5 mm, resultando em blocos de 5 mm<sup>3</sup>. As peças foram identificadas e acondicionadas individualmente em frasco de boca larga com tampa de rosca e capacidade para 12 ml de volume, adequada fixação em formol 10% durante 24 horas e processamento histológico para inclusão em parafina.

Para os cortes histológicos, foi utilizado micrótomo Leica® RM225. Os cortes foram seriados (três cortes por bloco) e posicionados um corte por lâmina. Cada lâmina foi submetida a uma das três colorações: Hematoxilina e Eosina (H&E), Resorcina-Fucsina e Picrosirius. Assim, foram obtidos cortes cujas imagens podem ser sobrepostas que, junto com as três colorações diferenciais, permitiram boa visão geral dos elementos teciduais e reconhecimento dos adipócitos na H&E, evidenciação de fibras elásticas na Resorcina-Fucsina e das fibras colágenas no Picrosirius. Esta última coloração foi escolhida visto que diferencia qualitativamente os colágenos tipo I, sendo este o estrutural, com capacidade tênsil e corando-se em vermelho intenso, do tipo III, que é constituinte do interior de vasos, tendo coloração amarelo-esverdeada.

As quantificações e mensurações das área de tecido adiposo, do tecido fibroelástico e de fibras colágenas das amostras histológicas foram realizadas pela observação de imagens capturadas de três campos aleatórios das lâminas histológicas coradas com H&E (FISCHER *et al.*, 2008), Resorcina-Fucsina (PUCHTLER & SWEAT, 1964) e Picrosirius (WHITTAKER *et al.*, 1994), utilizando lente objetiva de 4x e ocular de 10x, totalizando um aumento de 40x. As imagens foram capturadas com microscópio da marca Nikon®, modelo Eclipse E200, acoplado à câmera digital Moticam, com resolução de cinco megapixels e software de captura Motic Image Plus 2.0 (Figura 6). Da mesma forma que as medições macroscópicas, as áreas foram mensuradas utilizando as ferramentas histológicas do software ImageJ® (plugin Scale bar tools for microscope), através da separação de pixels com valores de intensidade diferentes (Threshold), com base em intervalos selecionados, permitindo, desta



forma, a seleção de zonas que seriam difíceis de mensurar recorrendo apenas a ferramentas de seleção manual (COLLINS, 2007).

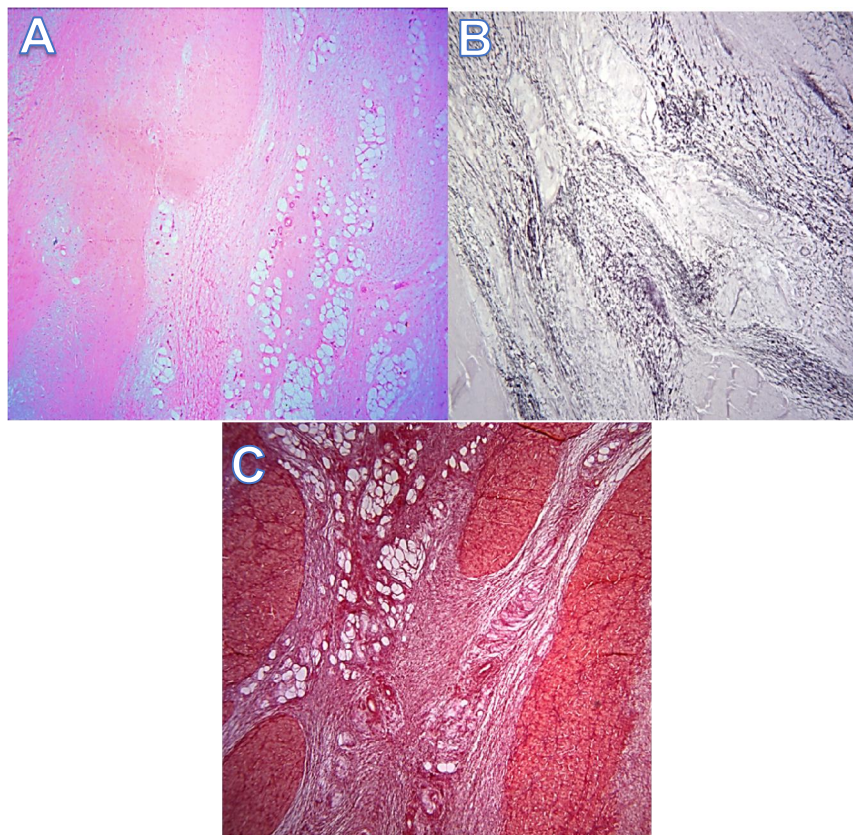


Figura 6 - Tecidos corados pela técnica de H&E (A), Resorcina-Fucsina (B) e Picrosirius (C), para morfometria das áreas de tecido adiposo, tecido fibroelástico e de fibras colágenas. Aumento de 40x.

### 5.2.6. Análise estatística

Todas as variáveis dependentes (peso, volume e densidade dos cascos e dos coxins, área de coxim, área interna de casco, área de tecido adiposo, área de tecido fibroelástico e área de fibras colágenas) no presente estudo foram comparadas entre os membros torácicos e pélvicos e sexos e com a espessura de gordura subcutânea (variável independente) por meio do software estatístico *Statistix 10*.

As variáveis quantitativas analisadas foram testadas quanto a sua normalidade de distribuição por meio do teste de Shapiro Wilk, sendo as variáveis com distribuição normal submetidas ao teste t. As variáveis sem

normalidade foram comparadas pelo teste de Wilcoxon. Quando não houveram diferenças entre os membros, os dados das variáveis foram agrupados em médias para determinar a diferença entre os sexos.

Para determinar a associação entre a espessura de gordura subcutânea e as variáveis dependentes, foi utilizado o teste de correlação de Pearson. Para todos os testes considerou-se um nível de significância de  $p < 0,05$ .

### 5.3. Resultados

Compuseram a amostra deste estudo indivíduos com os seguintes escores de condição corporal: dois (15%), três (15%), quatro (21,7%), cinco (25%), seis (21,7%) e sete (1,6%). Foram obtidos os valores médios das grandezas físicas do coxim digital (peso, volume e densidade) encontrados no grupo experimental, bem como a média da espessura de gordura subcutânea para cada nível de escore de condição corporal onde os animais foram classificados na inspeção visual (Tabela 1).

Tabela 1 - Frequência de distribuição de médias e desvio padrão do peso, volume e densidade do coxim digital e da espessura de gordura subcutânea de equinos para cada grau de ECC.

	Escore de condição corporal (ECC)					
	2 (n=9)	3 (n=9)	4 (n=13)	5 (n=15)	6 (n=13)	7 (n=1)
<b>Peso (g)</b>	32,8 ± 14,6	31,1 ± 7,8	36,6 ± 9,5	37,3 ± 7,8	39,9 ± 10,4	45,6 ± 16,1
<b>Volume (mL)</b>	32,3 ± 14,4	34,4 ± 8,7	36,8 ± 8,7	39,3 ± 7,0	41,3 ± 9,8	44,6 ± 13,8
<b>Densidade (g/mL)</b>	1,04 ± 0,33	0,92 ± 0,16	1,01 ± 0,18	0,95 ± 0,11	0,98 ± 0,15	1,04 ± 0,13
<b>Espessura de gordura subcutânea (cm)</b>	0,17 ± 0,11	0,26 ± 0,11	0,33 ± 0,16	0,36 ± 0,17	0,57 ± 0,24	0,74 ± 0,28

O peso e o volume do casco dos equinos variou entre membros torácicos e pélvicos ( $p = 0,0028$ ;  $0,0003$ ), com maiores valores para o membro

torácico, não havendo diferenças na densidade dos cascos de ambos os membros ( $p > 0,05$ ).

Quando o coxim digital foi considerado, não foram observadas diferenças estatísticas entre o peso, volume e densidade em membros torácicos e pélvicos ( $p > 0,05$ ).

Tabela 2 - Peso, volume e densidade médios e desvio padrão dos cascos e do coxim digital de membros torácicos e pélvicos de equinos.

Membro	Peso (g)		Volume (mL)		Densidade (g/mL)	
	Casco	Coxim digital	Casco	Coxim digital	Casco	Coxim Digital
<b>Torácico</b>	725,28 <sup>a</sup> ± 115,75	36,73 <sup>a</sup> ± 10,98	672,34 <sup>a</sup> ± 105,34	37,39 <sup>a</sup> ± 10,23	1,15 <sup>a</sup> ± 0,07	0,99 <sup>a</sup> ± 0,21
<b>Pélvico</b>	672,34 <sup>b</sup> ± 105,34	37,79 <sup>a</sup> ± 11,60	570,17 <sup>b</sup> ± 100,27	39,01 <sup>a</sup> ± 11,19	1,20 <sup>a</sup> ± 0,18	0,98 <sup>a</sup> ± 0,17

\*Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

Entre machos e fêmeas, não foi observada diferença significativa no coxim digital em peso ( $m = 35,93g \pm 10,53$ ;  $f = 37,81g \pm 9,44$ ), volume ( $m = 35,74mL \pm 9,57$ ;  $f = 39,41 \pm 8,44$ ) e densidade ( $m = 1,00g/mL \pm 0,19$ ;  $f = 0,97g/mL \pm 0,09$ ) ( $p > 0,05$ ).

Não houve correlação entre o peso, volume e densidade do coxim digital com a espessura de gordura subcutânea ( $p > 0,05$ ).

Quando avaliadas as áreas das estruturas internas ao casco, diferenças não foram observadas entre área de coxim digital no eixo axial entre membros torácicos ( $23,09cm^2 \pm 7,78$ ) e pélvicos ( $20,60cm^2 \pm 6,33$ ) e entre equinos machos ( $20,60cm^2 \pm 6,98$ ) e fêmeas ( $22,60 \pm 5,98$ ) ( $p > 0,05$ ). O coxim digital representa a maior parte no plano de corte estudado ( $53,55cm^2 \pm 14,72$ ), ocupando 40% ( $21,60 cm^2 \pm 6,48$ ) desta, seguido de terceira falange (27% -  $14,69 cm^2 \pm 3,30$ ), segunda falange (19% -  $10,11 cm^2 \pm 3,67$ ), tendão flexor digital profundo (7% -  $3,99 cm^2 \pm 1,30$ ) e osso navicular (7% -  $3,50 cm^2 \pm 1,53$ ).

Quando correlacionada a espessura de gordura subcutânea com a área interna do coxim digital de equinos no eixo axial do casco não houve associação ( $p > 0,05$ ).

Nas análises de tecido histológico, não foram observadas diferenças significativas entre as áreas de tecido adiposo ( $t = 493.993\mu\text{m}^2 \pm 232.398$ ;  $p = 523.094\mu\text{m}^2 \pm 286.882$ ), tecido fibroelástico ( $t = 602.300\mu\text{m}^2 \pm 230.593$ ;  $p = 682.711\mu\text{m}^2 \pm 226.143$ ) e de fibras colágenas ( $t = 3.752.832\mu\text{m}^2 \pm 726.705$ ;  $p = 3.604.869\mu\text{m}^2 \pm 618.188$ ) entre membros torácicos e pélvicos ( $p > 0,05$ ). Resultado semelhante foi encontrado quando avaliados os tecidos adiposo ( $m = 571.796\mu\text{m}^2 \pm 442.809$ ;  $f = 473.588\mu\text{m}^2 \pm 611.995$ ), tecido fibroelástico ( $m = 608.214\mu\text{m}^2 \pm 328.536$ ;  $f = 661.457\mu\text{m}^2 \pm 387.531$ ) e de fibras colágenas ( $m = 3.261.122\mu\text{m}^2 \pm 823.153$ ;  $f = 3.909.701\mu\text{m}^2 \pm 970.802$ ) entre os sexos ( $p > 0,05$ ).

No eixo axial do coxim digital equino, a arquitetura tecidual (Figura 7) foi composta em sua maior parte de conjuntos de feixes de fibras colágenas do tipo I, representando 49% da composição da estrutura, alternadas com proteínas do tecido fibroelástico, que representaram 9% da área total do coxim. O tecido adiposo representou 7% da composição histológica do coxim digital. O restante da estruturação tecidual do coxim digital foi formado por vasos, células de tecido nervoso, tecido fibrocartilaginoso e outros tecidos conectivos.

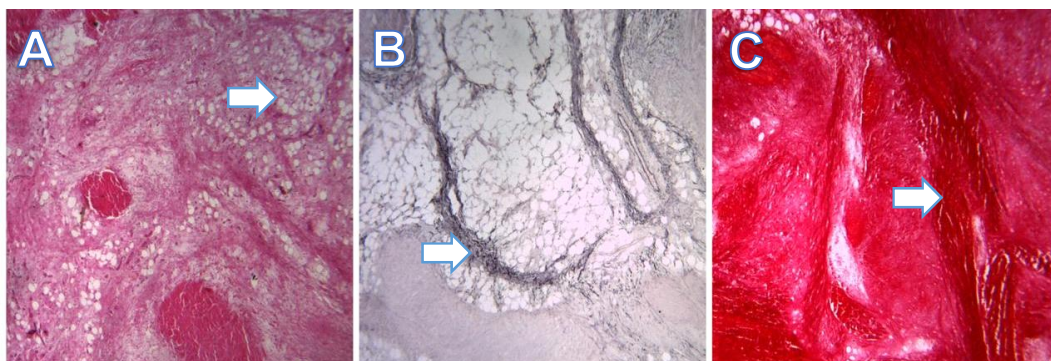


Figura 7 - Tecidos histológicos utilizados para a medição das áreas de tecido adiposo, fibroelástico e de fibras colágenas no eixo axial do coxim digital equino. (A) Tecido adiposo, corado com H&E, onde se observaram os adipócitos uniloculares com vacúolos brancos em seu citoplasma; (B) Fibras elásticas (elastina) coradas em roxo por Resorcina-Fucsina; (C) Fibras colágenas do tipo I coradas por Picrosirius em sentido transversal e longitudinal coradas em vermelho intenso. Aumento de 40x.

Houve correlação positiva entre espessura de gordura subcutânea e área de tecido adiposo presente no coxim digital ( $p = 0,038$ ;  $R = 0,28$ ) (Figura 8) e negativa com a área de tecido fibroelástico ( $p = 0,005$ ;  $R = -0,37$ ) (Figura

9) e área de fibras colágenas ( $p = 0,003$ ;  $R = -0,39$ ) (Figura 10). Visto isso, observa-se que quanto maior foi a espessura de gordura subcutânea do animal, maior foi a área de tecido adiposo, com conseqüente diminuição de área de tecido fibroelástico e de feixes de fibras colágenas no coxim digital.

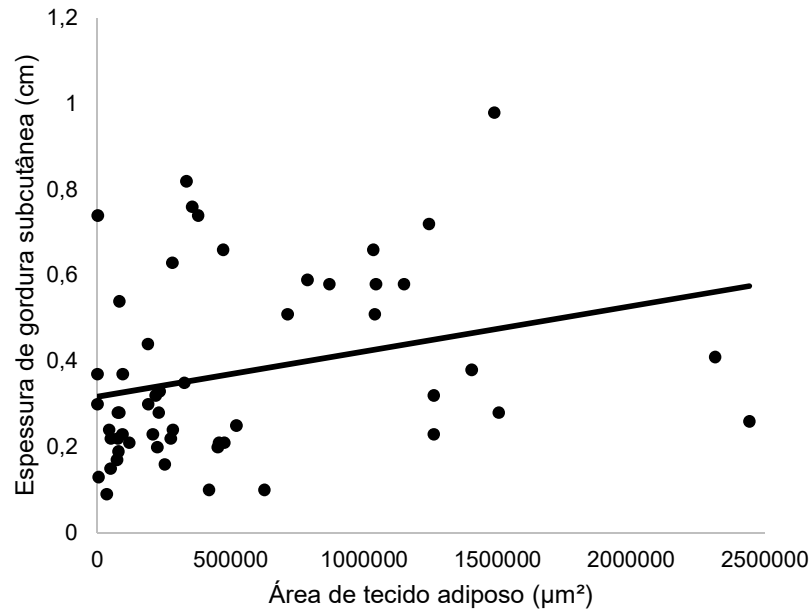


Figura 8 - Dispersão de regressão linear simples, indicando a associação positiva da espessura de gordura subcutânea com a área de tecido adiposo do coxim digital de equinos ( $R = 0,28$ ).

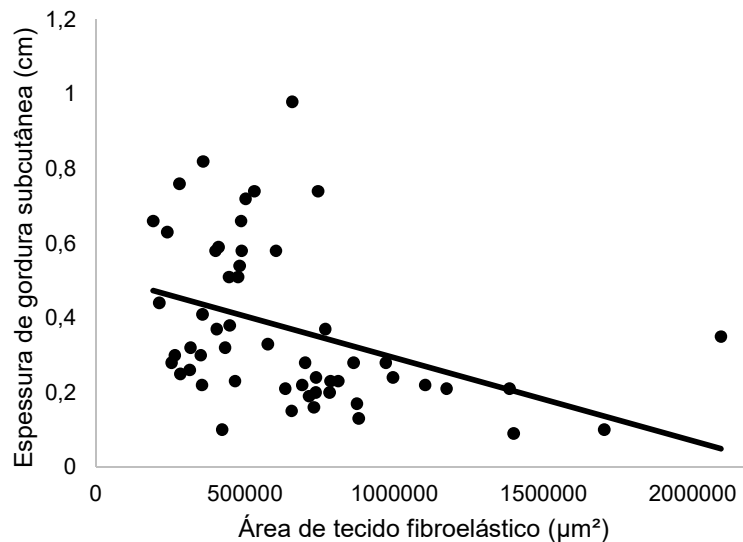


Figura 9 - Dispersão de regressão linear simples, indicando a associação negativa da espessura de gordura subcutânea com a área de tecido fibroelástico do coxim digital de equinos ( $R = -0,37$ ).

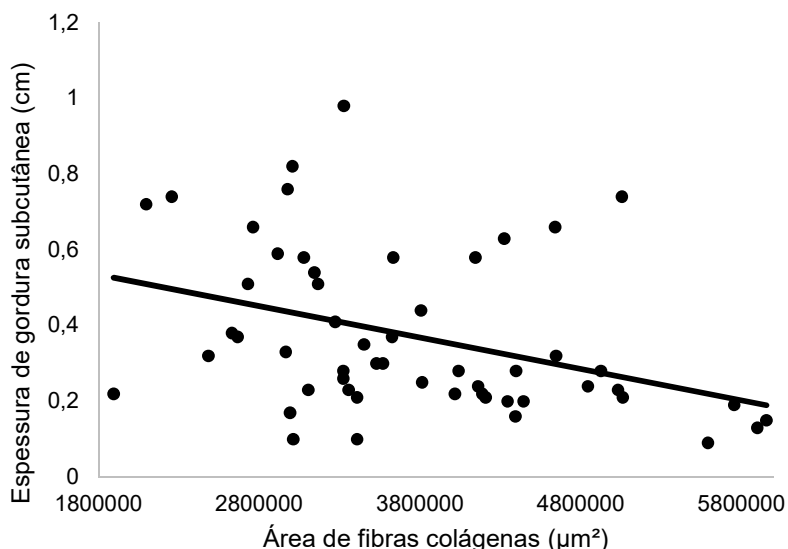


Figura 10 - Dispersão de regressão linear simples, indicando a associação negativa da espessura de gordura subcutânea com a área de fibras colágenas do coxim digital de equinos ( $R = -0,39$ ).

#### 5.4. Discussão

Apesar da amostra populacional utilizada neste estudo não ter contemplado a presença de animais nos extremos de condição corporal (1 e 9), ou seja, muito magros e obesos, a amostra populacional apresentou ampla variabilidade nos escores, com variação entre dois e oito, permitindo inferir sobre as variáveis estudadas entre os distintos grupos (membros e sexos).

Fundamentado nos achados de FARAMARZI *et al.* (2017) que não verificou diferenças nas porções axiais periféricas da composição tecidual do coxim digital equino, no presente estudo utilizou-se para as médias internas dos componentes do casco um eixo axial mais central, denominado eixo de apoio. O eixo de apoio (eixo axial) do coxim digital possui importância biomecânica na região distal dos membros, apresentando íntima relação com estruturas do aparelho podotrocLEAR, somados a sua função dissipatória das forças cinéticas que agem internamente ao casco. No eixo axial do coxim digital encontram-se as áreas dos tecidos histológicos estudados, principalmente de fibras colágenas, visto que nas regiões abaxiais há maior presença de área de tecido fibrocartilaginoso. FARAMARZI *et al.* (2017) já

havam percorrido sobre as diferenças teciduais de ambas as regiões do coxim digital em equinos, e a opção de se enfatizar as diferenças macroscópicas e histológicas no eixo de apoio (axial) do coxim foi uma escolha em função da maior distribuição biomecânica de forças em relação ao solo, somados a proporcionalidade de área dos tecidos estudados.

As grandezas físicas peso e volume apresentaram diferenças entre cascos torácicos e pélvicos. Independente do fator sexo, cascos torácicos têm rânula mais contraída e pinças maiores em relação aos pélvicos, além de paredes mais largas para a sustentação do peso do tronco (STASHAK, 2006) o que justifica valores biométricos maiores observados no presente estudo.

A amostragem experimental foi oriunda de animais de abate em frigorífico, onde desequilíbrios no estojo córneo foram observados ao longo do processamento das amostras. Apesar dessas variações no estojo córneo, a estrutura interna investigada do coxim digital apresentou estabilidade quanto as variáveis peso, volume e densidade, mesmo em cascos com deformidades, não apresentando diferenças entre membros torácicos e pélvicos. Outros estudos verificaram alterações anatômicas com reflexo biomecânico à presença de claudicações, quando outras estruturas internas do casco foram investigadas, como lesões em terceira falange, desmites de ligamentos colaterais interfalângicos, e estruturas podotrocleares relacionadas (TRIDENTE, 2011; COSTA, 2012; RIBEIRO, 2013). Portanto, os aspectos conformacionais do casco da população estudada não influenciaram variações macroscópicas do coxim digital nos equinos.

GUNKELMAN & HAMMER (2017) já haviam descrito também que não há diferença de espessura no padrão ultrassonográfico do coxim digital de membros de equinos com e sem ferrageamento. Acredita-se, portanto, que os aspectos externos do estojo córneo não têm influência na biometria do coxim digital equino.

O fator sexo não influenciou no peso, volume e densidade do coxim digital na espécie equina. Essas grandezas físicas são referenciais para estruturas anatômicas em diversas espécies e importantes para detectar alterações ocorridas em detrimento de patologias, distúrbios ou até mesmo causadas por fatores como idade e sexo (RUDGE *et al.*, 2012).

Não houve associação da espessura de gordura subcutânea com as variáveis macroscópicas do coxim equino. Anatomicamente, a função do coxim é bem estabelecida, bem como das estruturas ósseas, articulares e tendíneas internas ao casco (BOWKER *et al.*, 1998). Visto que não foram encontrados na literatura relatos de alterações constitucionais no coxim digital para a espécie equina influenciada por fatores intrínsecos ao animal, esse resultado na presente investigação reforça o fato do coxim digital ter sua estruturação bem definida para a absorção dos choques biomecânicos, independente das alterações de peso que o animal venha a ser submetido. Isso se dá pelo fato de que o tecido adiposo representa apenas 7% da constituição de área tecidual no coxim digital equino, não alterando os aspectos físicos e macroscópicos dessa estrutura independente do grau de condição corporal em que o animal se encontra.

O coxim digital foi observado com a maior área no eixo axial interno do casco equino, cobrindo grande parte do espaço entre a segunda falange, terceira falange, osso navicular e articulação interfalangeana distal com o casco. BOWKER *et al.* (1998) descrevem que as forças que agem no casco, no momento em que o membro tem contato com o solo, incidem sobre essa área no eixo axial, onde há relações anatômicas com as estruturas osteoarticulares internas ao casco. A descrição da área do coxim digital nos membros de equinos ajuda a reforçar o importante papel dessa estrutura na absorção e posterior dissipação da energia cinética gerada com a movimentação do animal. Além disso, as diferenças entre as áreas do coxim e as outras estruturas internas ao casco caracterizam sua função amortecedora, estabilizando impacto e, conseqüentemente, diminuindo o desenvolvimento de lesões que levariam o animal a claudicação.

A confecção de lâminas com as colorações H&E e Resorcina-Fucsina possibilitaram inferir sobre os diferentes tecidos presentes na estrutura anatômica do coxim digital, permitindo investigação e diferenciação dos tecidos adiposo e fibroelástico e possibilitando uma medição com acurácia das áreas dos tecidos supracitados (HERNÁNDEZ-MORERA *et al.*, 2017; AFANAS'EVA *et al.*, 2018). Para identificação das fibras colágenas, o método de coloração de Picrosirius permitiu avaliação qualitativa da área e diferenciação do



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

Na análise histológica, as áreas de tecido adiposo, fibroelástico e de fibras colágenas foram semelhantes entre membros e sexos, reforçando que a estrutura do coxim digital apresenta distinção na espécie equina. Diferenças entre membros não foram observadas em bovinos, bem como entre sexos nessa espécie (TAVARES, 2018), corroborando o que foi identificado no presente estudo, para esses fatores. A proporção de tecido adiposo no coxim digital equino é inferior à verificada na espécie bovina (TAVARES, 2018), que possui composição de área de  $42,63\% \pm 5,83$ , considerando os dois dígitos de cada membro, em comparação com demais tecidos conjuntivos ( $54,31\% \pm 5,8$ ) e sem diferenças de peso e volume da estrutura em dígitos contralaterais.

Houve correlação positiva para o tecido adiposo e negativa para o tecido fibroelástico e fibras colágenas com os valores de espessura de gordura subcutânea dos equinos em diferentes escores corporais. Pode-se inferir que há variação quantitativa e qualitativa nos tecidos que compõe o coxim digital de equinos em função da variação da espessura de gordura subcutânea corporal, ou seja, animais mais gordos tem proporcionalmente mais tecido adiposo no coxim digital, mantendo constantes as grandezas físicas desta estrutura. Isto implica que os demais tecidos (fibroelástico e colágeno) se remodelam conforme a condição corporal, que apesar de sua variabilidade constitucional, mantém sua funcionalidade. Isso demonstra que há substituição tecidual, com ampliação da área do tecido adiposo e deposição de gordura de acordo com o aumento do escore do animal. Esse achado também ajuda a explicar porque não há diferenças macroscópicas nas características do coxim digital em equinos, visto que, por haverem mudanças proporcionais compensatórias entre os tecidos com aumento do tecido adiposo em relação aos outros

independente dos fatores membros e sexos, se mantém as características de peso, volume e densidade sem alterações evidentes.

Como já identificado na espécie bovina, o tecido adiposo do coxim digital está diretamente associado positivamente ao ECC (BICALHO *et al.*, 2009). Porém, há diferenças anatômicas e biomecânicas entre as espécies. Em bovinos a maior espessura do coxim digital reduz a incidência de lesões nos dígitos, estando relacionada a maior proporção de tecido adiposo (RABER *et al.*, 2006; BICALHO *et al.*, 2009). Já na espécie equina, a espessura do coxim digital não parece ter a mesma relevância clínica que em bovinos, por se tratar de uma estrutura com distribuição de tecido adiposo anatomicamente distinta. Apesar disso, variações significativas foram observadas nessa espécie com aumento de espessura de gordura subcutânea. Este fato enaltece algumas dúvidas que futuramente necessitarão ser esclarecidas, em que padrões excessivos de obesidade poderiam acarretar em maior proporcionalidade de tecido adiposo e, em função disso, aumentando atividade inflamatória na unidade casco, contrapondo as funções unicamente supracitadas de aborção biomecânica.

## **5.5. Conclusões**

O fator sexo e o ECC não influenciam as grandezas físicas do coxim digital equino, bem como sua estrutura macroscópica é bem definida independente do membro.

Os tecidos adiposo, fibroelástico e fibras colágenas do coxim digital alteram suas áreas em função dos diferentes padrões de gordura subcutânea em equinos.

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

## 6. Considerações finais

Os diferentes escores de condição corporal têm influencia na composição tecidual do coxim digital de equinos, fato evidenciado histologicamente com correlação positiva da espessura de gordura subcutânea e a área de tecido adiposo e negativa com as áreas de tecido fibroelástico e de fibras colágenas, mesmo não havendo diferenças macroscópicas observadas.

Os dados investigados são inéditos no que tange a estrutura estudada e complementam estudos anteriores que discorreram sobre a importancia não apenas do coxim digital nos equinos pelo seu papel na biomecânica da porção distal dos membros, mas também da necessidade de se evidenciar se há diferenças estruturais em animais de diferentes condições corporais. Os dados apresentados dão respaldo para se afirmar que equinos com maiores escores de condição corporal, independente de fatores como membros e sexos, possuem mais deposição de gordura no coxim digital.

Há necessidade de se identificar se há a participação do tecido adiposo do coxim digital equino na fisiopatologia da laminite por SME, visto a proximidade dessa estrutura com a terceira falange, tornando-se objeto de estudo para futuras pesquisas.

## 7. Referências

AFANAS'EVA, D. S.; GUSHCHINA, M. B.; BORZENOK, S. A. **Comparison of Morphology of Adipose Body of the Orbit and Subcutaneous Fat in Humans.** Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 164(3), 394–396, 2018.

ARGENTINO, I. N. *et al.* **Avaliação do equilíbrio do casco de cavalos (*Equus caballus*) submetidos à modalidade de três tambores.** Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública. Umuarama/PR, 2017. XIII Semana Acadêmica de Medicina Veterinária e IX Jornada Acadêmica de Medicina Veterinária 23 a 26 de outubro de 2017.

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

BICALHO, R. C.; MACHADO, V. S.; CAIXETA, L. S. **Lameness in dairy cattle: A debilitating disease or a disease of debilitated cattle? A cross-sectional study of lameness prevalence and thickness of the digital cushion.** Journal of Dairy Science, 92(7), 3175–3184, 2009.

BORGES, L. C.; LEONARDO, A. S.; BARRETO-VIANNA, A. R.; BORGES, J. R. J.; CASTRO, M. B.; LIMA, E. M. **Morphoquantitative description of bovine digital cushion.** Pesquisa Veterinária Brasileira, 35(7), 671-676, 2015.

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

BUDRAS, K. D.; SACK, W. O.; ROCK, S.; HOROWITZ, A.; BERG, R. **Anatomy of the Horse.** Schlütersche, 2012.

BUKOWIECKI, C. F.; BRAMLAGE, L. R.; GABEL, A. A. **In Vitro Strength of the Suspensory Apparatus in Training and Resting Horses.** Veterinary Surgery, 16(2), 126–130, 1987.

CASEY, R. A. **Clinical problems associated with intensive management of performance horses.** N. Waran (Ed.). The Welfare of Horses. Kluwer Academic Press, Amsterdam. Kluwer Academic Publishers, p. 19–44, 2002.

CAVAGNA, G.A.; HEGLUND, N.C.; TAYLOR, C. R. **Mechanical work in terrestrial locomotion: two basic mechanisms for minimizing energy expenditure.** American Journal of Physiology 233:243–261, 1977.

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

COLLINS, T. J. **ImageJ for microscopy.** Biotechniques, 43(S1), S25-S30, 2007.

CONTRI, A.; DE AMICIS, I.; MOLINARI, A.; FAUSTINI, M.; GRAMENZI, A.; ROBBE, D.; CARLUCCIO, A. **Effect of dietary antioxidant supplementation on fresh semen quality in stallion.** Theriogenology 75:1319-1326, 2011.

COSTA, J. V.; DUARTE, J. S. **Tecido Adiposo e Adipocinas.** Acta Méd Port. 19: 251-256, 2006.

COSTA, M. H. **Incidência de lesões locomotoras no cavalo, diagnosticadas por raio-x.** Dissertação de Mestrado, 2012.

DAWSON, W. M.; PHILLIPS, R. W.; SPEELMAN, S. R. **Growth of Horses under Western Range Conditions.** Journal of Animal Science, 4 (1), 47–54, 1945.

DENOIX, J. M. **Functional anatomy of tendons and ligaments in the distal limbs (*manus* and *pes*).** Veterinary Clinics of North America: Equine Practice, 10(2), 273-322, 1994.

DENOIX, J. M. **Functional anatomy of the equine interphalangeal joints.** In: Proc. Am. Ass. Equine Practnrs (Vol. 45, pp. 174-177), 1999.

DENOIX, J. M. **Biomechanics and physical training of the horse.** CRC Press, 2014.

DO CANTO, L. S. **Frequência de problemas de equilíbrio nos cascos em cavalos crioulos em treinamento.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

DO NASCIMENTO, C. M. O.; RIBEIRO, E. B.; OYAMA, L. M. **Metabolism and secretory function of white adipose tissue: effect of dietary fat.** An. Acad. Bras. Ciênc. vol.81, n.3, pp.453-466, 2009.

DURO, L. S. **Parasitismo gastrointestinal em animais da quinta pedagógica dos olivais. Especial referência aos mamíferos ungulados.** 155 f. Dissertação (Mestrado integrado em Medicina Veterinária) - Universidade técnica de Lisboa - Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 2010.

DYHRE-POULSEN, P.; SMEDEGAARD, H. H.; ROED, J.; KORSGAARD, E. **Equine hoof function investigated by pressure transducers inside the hoof and accelerometers mounted on the first phalanx.** Equine Veterinary Journal, 26(5), 362–366, 1994.

EGERBACHER, M.; HELMREICH, M.; PROBST, A.; KONIG, H.; BOCK, P. **Digital Cushions in Horses Comprise Coarse Connective Tissue, Myxoid Tissue, and Cartilage but Only Little Unilocular Fat Tissue.** Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C, 34(2), 112–116, 2005.

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

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

FISCHER, A. H.; JACOBSON, K. A.; ROSE, J.; ZELLER, R. **Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections.** Cold spring harbor protocols, 2008(5), pdb-prot4986, 2008.

FLOYD, A.; MANSMANN, R. **Equine Podiatry-E-Book.** Elsevier Health Sciences, 2007.

FREEMAN, D. **Managing young horses for sound growth. Oklahoma, USA.** Oklahoma Cooperative Extension Service (ANSI, 3977), 2005.

FURTADO, C. E.; CAMPOS, M. C.; SOUZA, V. L. F.; GASPARINO, E.; BOSO, K. M. O.; NANNI, M. R. **Influência do peso vivo, da idade e do sexo sobre características de carcaças de equinos.** Revista Brasileira de Zootecnia, 39(12), 2683-2686, 2010.

GARD, J. A.; TAYLOR, D. R.; WILHITE, D. R.; RODNING, S. P.; SCHNUELLE, M. L.; SANDERS, R. K.; VAN SANTEN, E. **Effect of exercise and**

**environmental terrain on development of the digital cushion and bony structures of the bovine foot.** American Journal of Veterinary Research, 76(3), 246–252, 2015.

GEIGER, M.; BLEM, G.; LUDWIG, A. **Evaluation of ImageJ for relative bone density measurement and clinical application.** Journal of Oral Health and Craniofacial Science, 1(1), 12-21, 2016.

GOBESSO, A. A. O.; MARTINS, R. A. D. T.; GIL, P. C. N.; FRANÇOSO, R.; GONZAGA, I. V. F. **Avaliação de escore corporal em equinos por meio da ultrassonografia.** Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., São Paulo, v. 51, n. 2, p. 136-141, 2014.

GOSLINE, J.; LILLIE, M.; CARRINGTON, E.; GUERETTE, P.; ORTLEPP, C.; SAVAGE, K. **Elastic proteins: Biological roles and mechanical properties.** Philos T Roy Soc B. 357:121–132, 2002.

GRAVENA, K.; CALCIOLARI, K; LACERDA-NETO, J. C. **Anatomia do dígito equino: revisão de literatura.** Revista científica de Medicina Veterinária, [s. l.], janeiro, 2017.

GROSSMAN, S. Y.; SISSON, S. **Anatomía de los animales domésticos,** 1982.

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

HENNEKE, D.R.; POTTER, G.D.; KREIDER, J.L.; YEATES, B.F. **Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares.** Equine Vet. J, 1983.

HERNÁNDEZ-MORERA, P.; TRAVIESO-GONZÁLEZ, C. M.; CASTAÑO-GONZÁLEZ, I.; MOMPEÓ-CORREDERA, B.; ORTEGA-SANTANA, F. **Segmentation of elastic fibres in images of vessel wall sections stained with Weigert's resorcin-fuchsin.** Computer Methods and Programs in Biomedicine, 142, 43–54, 2017.

HOBBS, S.J.; CLAYTON, H. M. **Collisional mechanics of the diagonal gaits of horses over a range of speeds.** PeerJ. 7:e7689, 2019.

HUXLEY, A. F. **Muscular contraction.** J. Physiol. 243, 1–43, 1974.

JANIS, C. M. **The horse series**. In: Icons of evolution, 257-280, 2007.

KAINER, R. A. **Anatomia funcional do Aparelho Locomotor**. In: STASHAK, T. (Ed). Claudicação em equinos Segundo Adams, 5 ed. São Paulo: Roca, p 1-54, 2006.

KIELTY, C. M.; SHERRATT, M. J.; SHUTTLEWORTH, C. A. **Elastic fibres**. J Cell Sci; 115:2817–2828, 2002.

LEACH, D.H.; ZOERB, G. C. **Mechanical properties of equine hoof wall tissue**. American Journal of Veterinary Research. Nov; 44(11):2190-2194, 1983.

MARQUES, D. P.; PESSOA, M. S.; ABRÃO, F. O. **Aspectos nutricionais relacionados à reprodução em equinos**. Nutri Time. Vol. 16, Nº 03, maio/jun. p. 8449-8462, 2019.

MCHORSE, B. K.; BIEWENER, A. A.; PIERCE, S. E. **Mechanics of evolutionary digit reduction in fossil horses (*Equidae*)**. Proc. R. Soc. B 284: 20171174, 2017.

MCILWRAITH, C. W. **Developmental orthopedic disease: problems of limbs in young horses**. Journal of Equine Veterinary Science, v.24, n.11, p.475-479, 2004.

MERLIN, A. C. C.; DE ALCÂNTARA, M. A. **Importância do Conhecimento Anatômico na Interação Biomecânica entre Coluna Vertebral e Membros dos Equinos**. Revista eletrônica biociências, biotecnologia e saúde, 6(15), 73-74, 2016.

NEWSOME, R. F.; GREEN, M. J.; BELL, N. J.; BOLLARD, N. J.; MASON, C. S.; WHAY, H. R.; HUXLEY, J. N. **A prospective cohort study of digital cushion and corium thickness. Part 1: Associations with body condition, lesion incidence, and proximity to calving**. Journal of Dairy Science, 100(6), 4745–4758, 2017.

OIKONOMOU, G.; BANOS, G.; MACHADO, V.; CAIXETA, L.; BICALHO, R. C. **Short communication: Genetic characterization of digital cushion thickness**. Journal of Dairy Science, 97(1), 532–536, 2014.

PARKS, A. **Form and function of the equine digit**. Veterinary Clinics of North America: Equine Practice, GA, USA, ed. 19, p. 285 – 307. Agosto, 2003.



PILLINER, S.; ELMHURST, S.; DAVIES, Z. **The Horse in Motion**. Blackwell Science Ltd., Oxford, UK, 2002.

POLLITT, C. C. **Equine laminitis**. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 3(1), 34–44, 2004.

PUCHTLER, H.; SWEAT, F. **Histochemical specificity of staining methods for connective tissue fibers: Resorcin-fuchsin and Van Gieson's picro-fuchsin**. *Histochemie*, 4(1), 24-34, 1964.

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

RÄBER, M.; SCHEEDER, M. R.; OSSENT, P.; LISCHER, C. H. J.; GEYER, H. **The content and composition of lipids in the digital cushion of the bovine claw with respect to age and location: a preliminary report**. *Vet. J.* 172(1):173-177, 2006.

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

RIBEIRO FILHO, F. F.; MARIOSIA, L. S.; FERREIRA, S. R. G.; ZANELLA, M. T. **Gordura visceral e síndrome metabólica: mais que uma simples associação**. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 50(2), 230–238, 2006.

ROTTA, M. A.; GONDA, M. **"Ictioprovetá" para a biometria indireta do peso de surubins (pintado e cachara) utilizando seu volume e densidade**. Embrapa Pantanal-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2004.

RUDGE, M. V. C.; NERO, U.; DAMASCENO, D. C.; MORELI, J. B.; CALDERON, I. M. P. **Influência do peso, volume e densidade absoluta da placenta no peso dos recém-nascidos de gestantes portadores de hipertensão arterial ou diabetes *mellitus***. *Diabetes clínica*. 5: 362-267, 2012.

SAMPAIO, B. F. B.; ZÚCCARI, C. E. S. N.; SHIROMA, M. Y. M.; BERTOZZO, B. R.; LEONEL, E. C. R.; SURJUS, R.; COSTA E SILVA, E. V. **Biometric hoof evaluation of athletic horses of show jumping, barrel, long rope and polo**

**modalities.** Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, 14(3), 448–459, 2013.

SELF DAVIES, Z. T.; SPENCE, A. J.; WILSON, A. M. **Ground reaction forces of overground galloping in ridden Thoroughbred racehorses.** The Journal of Experimental Biology, 222(16), 2019.

SOLOUNIAS, N.; DANOWITZ, M.; STACHTIARIS, E.; KHURANA, A.; ARAIM, M.; SAYEGH, M.; NATALE, J. **The evolution and anatomy of the horse manus with an emphasis on digit reduction.** R. Soc. open sci.5: 171782, 2018.

SOUZA, F. A. C.; MUNIZ, J. A.; FERNANDES, T. J.; CUNHA, F. O.; MEIRELLES, S. L. C.; SOUZA, J. C.; MOURA, R. S. **Estimation methods and correction factors for body weight in Mangalarga Marchador horses.** Revista Brasileira de Zootecnia, 46(12), 903–909, 2017.

SOUZA, L. P.; BORTOLINI, Z.; MÜLLER, T. R.; FONTEQUE, J. H.; SCHADE, J.; LUCIANI, M. G.; VULCANO, L. C. **Estudo anatômico, ultrassonográfico e tomográfico do aparato podotrocLEAR de equinos adultos.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 69(5), 1097–1104, 2017.

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

TAVARES, N. C. **Efeitos da dieta sobre o rúmen, tecido laminar e coxim digital de bovinos de corte confinados.** Orientador: Charles Ferreira Martins. 2018. 62 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Faculdade de Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

TRIDENTE, M. F. **Importância do casqueamento e ferrageamento no cavalo atleta,** 2011.

VAN HEEL, M. C.; MOLEMAN, M.; BARNEVELD, A.; WEEREN, P. R.; BACK, W. **Changes in location of centre of pressure and hoof-unrollment pattern in relation to an 8-week shoeing interval in the horse.** Equine Veterinary Journal, 37(6), 536–540, 2005.

VAN WEEREN, P. R. **General Anatomy and Physiology of Joints.** In: MCILWRAITH, C. W.; FRISBIE, D. D.; VAN WEEREN, P. R. (org.). Joint Disease in the Horse. [S. l.]: Elsevier. cap. 1, p. 1-24, 2016.

VECCHI, I.; SABBIONI, A.; BIGLIARDI, E.; MORINI, G.; FERRARI, L.; DI CIOMMO, F.; SUPERCHI, P.; PARMIGIANI, E. **Relationship between body fat and body condition score and their effects on estrous cycles of the Standardbred maiden mare.** Vet Res Commun 34 Suppl 1: S41-S45, 2010.

VERKADE, M. E.; BACK, W.; BIRCH, H. L. **Equine digital tendons show breed specific differences in their mechanical properties that may relate to athletic ability and predisposition to injury.** Equine Veterinary Journal. p. 1-6, 2019.

WAGNER, I. P.; HOOD, D. M.; HOGAN, H. A. **Comparison of bending modulus and yield strength between outer stratum medium and stratum medium zona alba in equine hooves.** American Journal of Veterinary Research, 62(5), 745–751, 2001.

WESTERVELT, R. G.; STOUFFER, J. R.; HINTZ, H. F.; SCHRYVER, H. F. **Estimating Fatness in Horses and Ponies.** Journal of Animal Science, 43(4), 781–785, 1976.

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

WILSON, A. M.; MCGUIGAN, M. P.; FOURACRE, L.; MACMAHON, L. **The force and contact stress on the navicular bone during trot locomotion in sound horses and horses with navicular disease.** Equine Veterinary Journal, 33(2), 159–165, 2010.

WHITTAKER, P.; KLONER, R. A.; BOUGHNER, D. R.; PICKERING, J. G. **Quantitative assessment of myocardial collagen with picosirius red staining and circularly polarized light.** Basic research in cardiology, 89(5), 397-410, 1994.