

Palabras clave: Pezuña, histoquímica, bovino

Key words: Hoof, histochemical, bovine

Características histoquímicas de la pezuña en fetos de bovinos

Hugo Ortega; Martín Ludueña; Natalia Salvetti; Juan A. Lorente; Héctor Lanatta y Natalia Ricci

Laboratorio de Investigaciones Histológicas Aplicadas - Cátedra de Histología y Embriología.

Facultad de Agronomía y Veterinaria - Universidad Nacional del Litoral.

R.P. Kreder 2805 - Esperanza (3080) - Santa Fe Argentina.

e-mail: labhisto@unl.edu.ar

RESUMEN

Se realizó un estudio histoquímico para analizar las características tisulares, y la presencia de glucosaminoglucanos en la pezuña de fetos bovinos. Se utilizaron 10 especímenes de 3,1 (+/- 0,5) meses de gestación, los que fueron procesados mediante técnicas histológicas de rutina, coloreándose con Hematoxilina-Eosina, Tricrómico de Ramón y Cajal, P.A.S., Alcian Blue y Azul de Toluidina (Metacromasia), efectuándose las pruebas complementarias necesarias (bloqueo y saponificación), para identificar diferentes grupos químicos. Se observaron los componentes del órgano y sus anexos, identificándose en el epitelio los estratos basal, espinoso y apical. Se detectó la presencia de abundantes glucosaminoglucanos neutros y ácidos (carboxilados y sulfatados) en todas las capas del epitelio y en las uniones intercelulares de los estratos basal y medio. Esto podría atribuirse a la presencia de dermatán sulfato o mucinas sulfatadas (glucosaminoglucanos ácidos sulfatados) o derivados del ácido hialurónico, sialomucinas o mucinas fetales (glucosaminoglucanos ácidos carboxilados).

ABSTRACT

Development of the fetal bovine hoof: Histochemical characteristics.

A histochemical study was performed to examine the presence of glycosaminoglycans in the hoof of bovine fetuses. Ten specimens at 3.1 (+/- 0.5) months of gestation were used. Samples were processed by means of routine histological methods. Sections were stained with either Haematoxylin - Eosin, Tricromic of Ramón y Cajal, P.A.S., Alcian Blue or toluidin blue (metachromasia). Complementary studies (blockade and saponification) were performed to identify several chemical groups. The components of the organ and its anexes were examined identifying 3 strata in the epithelium: basal, spinosum and apical. The presence abundant neutral and acid (carboxilated and sulphated) glycosaminoglycans was detected in all layers of the epithelium and in the intercellular junctions of the basal and spinosum strata. This could be attributed to the presence of dermatan sulphate or sulphated mucins or to carboxilated mucins such as hyaluronic acid, sialomucins, or fetal mucins.



INTRODUCCION

Los métodos histoquímicos permiten demostrar y caracterizar *in situ*, compuestos o radicales presentes en los tejidos. La determinación histoquímica de los monosacáridos es difícil, no así la de los polisacáridos. Existen métodos que detectan polisacáridos sencillos (formados por cadenas de hexosas) y la mayor parte de los polisacáridos complejos nitrogenados (Curran, 1964; Everson Pearse, 1980; Martoja y Martoja, 1976; Spannhof, 1966).

Dada la dificultad de estudiar histológicamente la pezuña en animales adultos debido a su extrema dureza, se planteó la posibilidad de analizar este órgano durante la vida fetal. En este período es factible evidenciar también las relaciones tisulares existentes con las estructuras anexas.

Es destacable la falta de bibliografía referida a la composición histoquímica de este órgano, limitándose la misma a describir sus características morfológicas y funcionales (Banks, 1996; Dellman, 1993; Frandson, 1986; Schwarze y Schröder, 1970). Los aspectos clínicos, tratados en la escasa bibliografía reciente, no aportan información estructural relevante (Kempson and Logue, 1993; Phillips, et al., 1996; Singh, et al., 1993). El órgano digital en los bovinos adultos consta de una

parte queratinizada, el tejido conjuntivo subyacente o dermis, la hipodermis, los huesos y las estructuras asociadas. Embriológicamente, el esbozo de las pezuñas representa un simple engrosamiento epidérmico, en cuya porción dorsal se destaca tempranamente una lámina epitelial que se genera a modo de una excrecencia.

La epidermis engrosada asienta primeramente sobre un corion liso, pronto se diferencian la lámina epidérmica, la suela y los ángulos de inflexión (Banks, *op. cit.*; Dellman, *op. cit.*).

El desarrollo ulterior se caracteriza por las transposiciones de las células epidérmicas, procesos que están relacionados estrechamente con la formación de las papilas que originan la sustancia córnea tubular. Después comienza la queratinización, propia del último período de desarrollo. En los animales adultos el órgano digital consta de pared, suela y bulbos bien desarrollados. La epidermis periéplica, coronaria y laminar forman la muralla de la pezuña. (Frandson, *op. cit.*; Dyce et al., 1991; Schwarze y Schröder, *op. cit.*).

MATERIAL Y METODOS

Se procesaron las pezuñas correspondientes a 10 fetos bovinos de 3,1 (+/- 0,5) meses de gestación obtenidos de animales preñados, inmediatamente

Cuadro 1

Metacromasia (Azul de Toluidina): Especificidad de las distintas reacciones complementarias (Martoja y Martoja, 1976)

Reacción metacromática	Radicales		
	Carboxilos	Sulfatos	Fosfatos
A pH 4,6	+	+	+
A pH 3,4	-	+	+
A pH 3,4 + nitrato de Ur N/1000	-	+	-
A pH 3,4 + nitrato de Ur N/10	-	-	-
A pH 3,4 + nitrato de Ba N/1000	-	+	+
A pH 3,4 + nitrato de Ba N/10	-	-	-
A pH 4,6 después de la metilación completa	-	-	?
A pH 4,6 después de la metilación completa + saponificación	+	-	?



Cuadro 2

Resultados de las Reacciones Metacromáticas. - reacción negativa; X reacción leve; XX moderada; XXX reacción intensa; * reacción intensa en uniones o espacios intercelulares.

Reacción metacromática	Estratos		
	Basal	Espinoso	Córneo
A pH 4,6	XXX *	XX *	X *
A pH 3,4	XX	XX	-
A pH 3,4 + nitrato de Ur N/1000	X	X	-
A pH 3,4 + nitrato de Ur N/10	-	-	-
A pH 3,4 + nitrato de Ba N/1000	X	X	-
A pH 3,4 + nitrato de Ba N/10	-	-	-
A pH 4,6 después de la metilación completa	-	-	-
A pH 4,6 después de la metilación completa + saponificación	XX *	XX *	X

luego de su sacrificio en un establecimiento frigorífico de la ciudad de Esperanza, Provincia de Santa Fe. La edad gestacional fue calculada mediante la fórmula propuesta por Grunert y Eberet (1990).

Una vez disecadas, las extremidades fueron fijadas en líquido de Bouin a 4°C durante 24 horas, lavadas en solución fisiológica por 12 horas, deshidratadas e incluidas en parafina, siguiendo protocolos preestablecidos (Martoja y Martoja, *op. cit.*). Los tacos se realizaron de forma tal, que cada extremidad quedará orientada favoreciendo la visualización del órgano desde distintos ángulos. Finalmente mediante un micrómetro rotativo tipo Minot, se obtuvieron cortes seriados de 5 micrómetros (μm) de espesor.

Se colorearon con Hematoxilina-Eosina y Tricrómico de Ramón y Cajal, para evidenciar las características morfológicas del órgano (Michalany, 1981; Martoja y Martoja, *op. cit.*).

Para identificar glucosaminoglicanos se utilizaron las siguientes técnicas: P.A.S., alcian blue pH 2,5 y 0,5 y azul de toluidina pH 4,6 y 3,4 (metacromasia). En esta última técnica se efectuaron reacciones de bloqueo y saponificación para evidenciar la presencia de grupos glucosaminoglicanos ácidos sulfatados y carboxilados. (Cuadro 1) (Curran, *op. cit.*; Martoja y Martoja, *op. cit.*; Spannhof, *op. cit.*; Scott, 1996).

RESULTADOS

La coloración con hematoxilina-eosina permitió observar los distintos componentes del órgano,

determinándose perfectamente que la pezuña es una continuación modificada de la epidermis. Se evidenció un estrato basal, caracterizado por células cúbicas y cilíndricas, un estrato medio o espinoso constituido por células irregulares, débilmente teñidas, y de escaso desarrollo en algunas zonas. No se observó estrato granuloso ni lúcido. En el estrato superficial se evidenció la presencia de epitelocitos nucleados, con amplios citoplasmas, conteniendo material de aspecto fibrilar.

Una membrana basal bien delimitada, separa el epitelio germinal del corion o lámina propia sin cuerpos papilares.

Con el Tricrómico de Ramón y Cajal, se pusieron de manifiesto detalles del proceso de osificación de la tercera falange que sirve de base a este apéndice corneo (Fig. 1).

Mediante la técnica del P.A.S. se observó la existencia de abundantes glucosaminoglicanos neutros, tanto dentro de las células epiteliales, como en los espacios o uniones intercelulares, siendo más abundantes en los estratos basales. En el corion denso celular, se evidenciaron estructuras fibrilares de reactividad positiva (Fig. 2).

Mediante la utilización del alcian blue se pudo poner de manifiesto la presencia de glucosaminoglicanos ácidos en todos los estratos del epitelio y en las uniones intercelulares de los estratos basal e intermedio. Con la técnica de metacromasia (azul de toluidina), se pudo comprobar que se trataba de glucosaminoglicanos ácidos carboxilados,

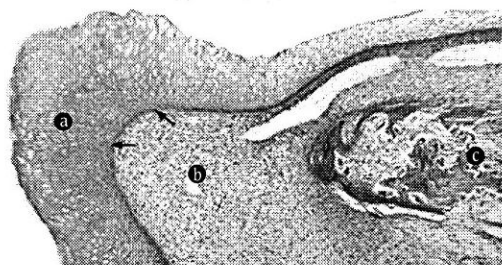


Figura 1

Panorámica del órgano digital. a) Epidermis de la pezuña; b) Corion o lámina propia. Se aprecia la membrana basal del epitelio (→); c) Centro de osificación falángica. Se observa formación de hueso trabecular primario (*). (Tricómico de Ramón y Cajal. 40 X)

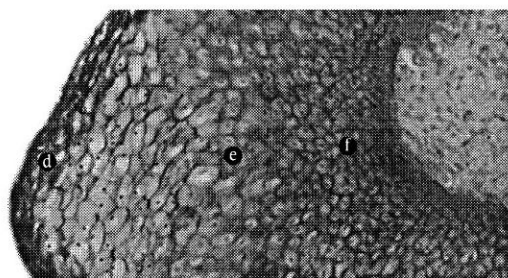


Figura 2

Epidermis y corion. d) Estrato basal; e) Estrato intermedio; f) Estrato superficial. El corion denso celular presenta estructuras fibrilares de reactividad positiva. (P.A.S. 150 X)

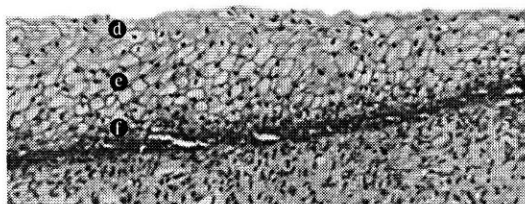
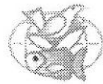


Figura 3

Epidermis y corion. d) Estrato basal; e) Estrato intermedio; f) Estrato superficial. (Metacromasia pH 4,6 metilación completa mas saponificación. 100 X)



presentes en el citoplasma y material fibrilar intracelular de todas las capas, así como los espacios intercelulares de los estratos basal e intermedio (Fig. 3). Se identificaron glucosaminoglicanos ácidos sulfatados en forma intracitoplasmática en los estratos basal e intermedio (Cuadro 2).

No se pudo evidenciar la existencia de papilas ni laminillas, presentes en los animales adultos, por lo que se puede afirmar que su desarrollo se lleva a cabo en estadios más avanzados, más allá del cuarto mes de gestación.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Desde el punto de vista histoquímico, es destacable la ausencia de glucosaminoglicanos fosforados, tal como era de suponer según lo planteado por Martoja y Martoja (*op. cit.*).

La reactividad positiva a la presencia de glucosaminoglicanos sulfatados, podría deberse a la presencia de dermatán sulfato (condroitín sulfato B), cuya existencia se ha demostrado en la piel de diversas especies (Everson Pearse, *op. cit.*) o ciertas mucinas sulfatadas que contendrían ácido siálico (Culling *et al.*, 1985). Los glucosaminoglicanos carboxilados presentes serían derivados del ácido hialurónico o sialomucinas, como las mucinas fetales o ciertas glicoproteínas séricas (Culling *et al.*, *op. cit.*). Cuando los glucosaminoglicanos sulfatados forman enlaces covalentes con un centro proteínico, constituyen una familia de macromoléculas conocidas como proteoglicanos. Muchos de ellos, en especial el agregán (molécula que se encuentra en el cartilago y en el tejido conectivo propiamente dicho) están unidos con el ácido hialurónico, y son los encargados de producir el estado de gel de la matriz extracelular y actuar como barrera contra la difusión rápida de los depósitos acuosos. Además, poseen sitios de fijación para ciertas moléculas de señalamiento, como el factor β de transformación del crecimiento (TGF-). Otros (sindecanes), se encuentran unidos a la membrana celular, actuando su porción proteica central como proteínas transmembrana, fijándose a los filamentos de actina del citoesqueleto. Sus porciones extracelulares se adhieren a los componentes de la medio extracelular, con lo que permiten que las células se unan a las macromoléculas de la matriz. Por esto, muchas de estas moléculas son designadas como glicoproteínas de adhesión, las cuales poseen numerosos dominios, uno de los cuales por lo menos suele fijarse a las proteínas de la superficie celular llamadas integrinas,

uno a las fibras colágenas, y uno a los proteoglicanos. De esta manera, las glicoproteínas de adhesión comprimen a los diversos componentes de los tejidos entre sí (Gartner y Hiatt, 1997).

Por último es importante destacar que serían necesarios estudios histoquímicos complementarios, como por ejemplo el empleo de lectinas (lectinohistoquímica), las que se han utilizado para identificar glicoproteínas, glicolípidos y polisacáridos en diversos tejidos, incluyendo intestino (Chae & Lee, 1995), epidídimo (Arenas *et al.*, 1996), ovario (Parillo *et al.*, 1996), entre otros órganos.

REFERENCIAS

- Arenas, M.I., M.P. de Miguel, F.R. Bethencourt, B. Fraile, M. Royuela & R. Paniagua. 1996. Lectin histochemistry in the human epididymis. *J. Repr. Fert.* 106: 313-320
- Banks, W.J. 1996. Histología Veterinaria Aplicada. 2ª ed. *El Manual Moderno*, México. 750 p.
- Chae C. & YI. Lee. 1995. Age-related lectin histochemical changes in the porcine small intestine. *J. Vet. Med. Sci.* 57 (5):883-889
- Culling, C.F.A, R.J. Allison & W.T. Barr. 1985. Cellular pathology technique. 4ª ed. *Butterworths*, Londres, 642 p.p.
- Curran, R.C. 1964. The histochemistry of mucopolysaccharides. *Int. Rev. Cytol.* 17:149-212.
- Dellman, D.H. 1993. Histología Veterinaria. *Ed. Acribia*. Zaragoza, 398 p.
- Dyce, K.M.; W.O. Sack & C.J.G. Wensing. 1991. Anatomía Veterinaria. *Ed. Médica Panamericana*, Buenos Aires, 480 p.
- Everson Pearse, A.G. 1980. Histochemistry. *Churchill Livingstone*, New York, 1055 p.p.
- Fransdon, R.D. 1986. Anatomía y Fisiología de los Animales Domésticos. 4ª ed. *Ed. Interamericana*, México, 527 p.
- Gartner, L.P y Hiatt J.L. 1997. Histología. Texto y Atlas. *McGraw - Hill Interamericana*, México, 506p.
- Grunert E. y J.J. Eberet. 1990. Obstetricia del bovino. *Ed. Hemsiferno Sur*, Buenos Aires, 322 p.
- Kempson S.A. & D.N. Logue. 1993. Ultrastructural observations of hoof horn from dairy cows. The structure of white line. *Vet. Rec.* 132:499-502.
- Martoja, R. y M. Martoja. 1976. Técnicas de Histología Animal. *Ed. Toray*, Barcelona, 350 p.



- Michalany, J. 1981. Técnica Histológica em Anatomia Patológica. Ed. Pedagógica e Universitaria Ltda., São Paulo, 242 p.
- Parillo F., G. Stradaiooli, C. Dall'Aglio & A. Verini-Supplizi. 1996. Characterization of the complex carbohydrates in the zona pellucida of mammalian oocytes using lectin histochemistry. *Vet. Res. Commun.* 20 (5):225-236
- Phillips C.J.C., S.J. Patterson, I. Apdewi & C.J. Whitaker. 1996. Volume assessment of the bovine hoof. *Res. Vet. Sci.* 61:125-128
- Scott, J.E. 1996. Alcian Blue. Now you see it, now you don't. *Eur. J. Oral. Sci.* 104:2-9
- Schwarze, E.; Schröder, L. 1970. Compendio de Anatomía Veterinaria. Tomo III. Ed. Acribia, Zaragoza, 247p.
- Singh, S.S., W.R. Ward & R.D. Murray. 1993. Technique of hoof biopsy in cattle. *Vet. Rec.* 133:190-191.
- Spannhof, L. 1966. Histoquímica práctica. Ed. Acribia, Zaragoza, 195 p.

Recibido / Received / : 15 de julio de 1997.
Aceptado / Accepted / : 3 de agosto de 1998.