

Heloisa Maria Falcão Mendes

Desenvolvimento e teste de viabilidade de instrumento cirúrgico específico para realização de biópsias de casco em bovinos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor na área de concentração Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Orientador: Prof. Rafael Resende Faleiros.

Belo Horizonte/MG
2015

Mendes, Heloisa Maria Falcão, 1980-
M538d Desenvolvimento e teste de viabilidade de instrumento cirúrgico específico para
realização de biópsias de casco em bovinos / Heloisa Maria Falcão Mendes. – 2015.
74 p. : il.

Orientador: Rafael Resende Faleiros
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

1. Bovino – Teses. 2. Casco de animais – Doenças – Teses. 3. Biópsia – Teses.
4. Cirurgia – Equipamentos, acessórios – Teses. I. Faleiros, Rafael Resende.
II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

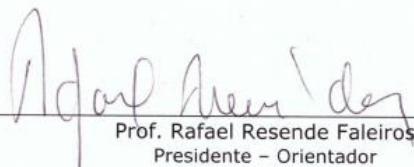
CDD – 636.208 089

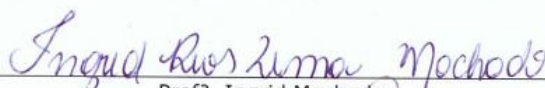
FOLHA DE APROVAÇÃO


HELOÍSA MARIA FALCÃO MENDES

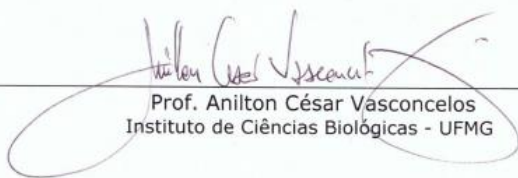
Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Aprovada em 14 de Maio de 2015, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Rafael Resende Faleiros
Presidente - Orientador


Prof. Ingrid Machado
Universidade Federal do Pampa- UNIPAMPA


Prof. Luiz Antônio Franco da Silva
Universidade Federal de Goiás- UFG


Prof. Anilton César Vasconcelos
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG


Prof. Elias Jorge Facury Filho
Escola de Veterinária - UFMG

DEDICO

Aos meus pais,
D. Maria José Falcão
Mendes e Sr. Genésio
Paulino Mendes,

e

A todos os Médicos
Veterinários.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, D. Maria José Falcão Mendes e Sr. Genésio Paulino Mendes, por não medirem esforços para minha formação técnico e científica.

Aos meus irmãos Humberto Cleber Falcão Mendes e Sidnei Roberto Leite Mancilha, por estarem sempre torcendo pelo meu êxito.

Ao meu orientador, Prof. Rafael Resende Faleiros, pela oportunidade de construirmos um belíssimo trabalho em todos estes onze anos de orientação. Eu agradeço pelos ensinamentos, pelos desafios impostos, pela ajuda nas horas certas, pelo tempo e atenção dedicados em lapidar minhas habilidades profissionais, pela paciência, pelo incentivo, pelo entusiasmo contagiante com nossos trabalhos, pelos exemplos de vida... Ficando a sensação de que ficará sempre faltando palavras para agradecer por tudo. Obrigada por tudo!

Ao Prof. Anilton César Vasconcelos, por ter aberto e mantido abertas as portas do Laboratório de Apoptose do ICB/UFMG durante onze anos de colaboração conosco, permitindo o andamento de nossos trabalhos. Pela atenção e dedicação para com nossos problemas sempre que solicitado. Pelo exemplo de ser humano e pesquisador, agradeço. Obrigada por tudo!

Ao Prof. Geraldo Eleno Silveira Alves, que vem acompanhando todo o meu percurso acadêmico na UFMG. Agradeço pela convivência, pelos ensinamentos e pelas sugestões que foram fundamentais para os desdobramentos deste trabalho. Obrigada por tudo!

Aos co-orientadores Prof. Antônio Último de Carvalho, Profa. Danielle da Glória de Souza e Prof. Frederico Soriani, e ao Prof. Luiz Alberto do Lago, por confiarem e estarem dispostos a colaborar com nosso trabalho.

Aos egressos colegas de pós-graduação Ingrid Rios Lima, Leonardo Rodrigues de Lima e Livia Camargo Garbin, por compartilharem os desafios de nossas respectivas trajetórias.

Aos colegas de pós-graduação Cahuê Francisco Rosa Paz, Isabella Caixeta Winter, Jerusa Camillo, Jéssica Fontana de Magalhães, Mayara Gomes Correa, Odael Spadetto Júnior, Rodrigo Martins Ribeiro e Sérgio da Silva Rocha Júnior, por compartilharem comigo os desafios deste trabalho e colocarem seus esforços a disposição de sua realização.

Ao colega de pós-graduação Rodrigo de Castro Valadares, pela atuação decisiva em momentos críticos da execução deste trabalho, e por compartilhar as dores do caminho.

Aos colegas de graduação Celina Alves de Oliveira, Davi Silveira Diniz Azevedo e Isabela Gomes Oliveira Lacerda, Letícia de Oliveira Cota, pela ajuda na execução deste trabalho, sem a qual o mesmo não teria se realizado.

Às colegas de pós-graduação do Laboratório de Apoptose do ICB/UFMG, Bárbara Laurice Araújo Verçosa, Camila Raianna Justiniana Rocha, Irma Ximena Barbosa Sanchez, Luciana Xavier Pereira, Núbia Braga Pereira, Tatiane Furtado de Carvalho e Teresa de Jesús Oviedo Socarrás, pela amizade e por fazerem parte de meu caminho durante minha trajetória.

Ao Prof. Geovanni Dantas Cassali, por permitir o uso de seu laboratório em diversos momentos da execução deste trabalho.

Aos colegas de pós-graduação do ICB/UFMG Conrado de Oliveira Gamba e Karine Araújo Damasceno, por compartilharem suas experiências e conhecimentos sobre imunohistoquímica durante todo o meu período de doutorado.

Às técnicas do laboratório de técnicas do departamento de patologia Geral do ICB/UFMG, Jacqueline Vanessa da Conceição Cassimiro, Luciana do Prado, Mirna D'Auriol, Olinda Disidéria Rodrigues, Raquel e Vânia Aparecida Chagas do Nascimento pela ajuda imprescindível no preparo de material histológico. Em especial agradeço à Olinda, pelo entusiasmo inquietante e por me oferecer apoio espiritual durante meu percurso de doutorado.

À Cássia Gomes, do NAPq da Escola de Veterinária, pela presença constante e torcida pelo meu sucesso.

À Coordenadoria de Transferência e Inovação Tecnológica (CTIT/UFMG), pela qualidade das orientações fornecidas e que contribuíram para o êxito deste trabalho.

À Escola de Veterinária da UFMG, por permitir a realização deste trabalho.

Ao Laboratório Nacional Agropecuário em Minas Gerais (LANAGRO/Pedro Leopoldo) nas pessoas dos senhores Dr. Ricardo Aurélio P. Nascimento, Dr. Rogério (Médico Veterinário) e Sr. Alexandre (Assistente).

À propriedade particular Agroturismo Corrientes/Pedro Leopoldo/MG, na pessoa do Sr. Renato Viana Bahia, pelo empréstimo dos animais utilizados neste experimento.

Aos animais utilizados neste experimento.

Àqueles que porventura, não tiveram seus nomes lembrados por mim. Muito obrigada!

“_ Cultura e santificação representam forças inseparáveis da glória espiritual. A sabedoria e o amor são as duas asas dos anjos que alcançaram o Trono Divino, mas, em toda parte, quem ama segue à frente daquele que simplesmente sabe.” (*Da obra Jesus no Lar de Chico Xavier*)

SUMÁRIO

1. RESUMO.....	11
2. ABSTRACT.....	12
3. INTRODUÇÃO GERAL	13
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
5. OBJETIVOS.....	20
6. CAPÍTULO I - DESENVOLVIMENTO DE UM INSTRUMENTO CIRÚRGICO PARA REALIZAÇÃO DE BIÓPSIA DE CASCO EM ANIMAIS UNGULADOS.....	21
7. CAPÍTULO II - PROCEDIMENTOS INICIAIS PARA REALIZAÇÃO DE BIÓPSIA DO TECIDO LAMINAR DO CASCO DE BOVINOS	41
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
9. CAPÍTULO III - TESTE DE VIABILIDADE DE UM INSTRUMENTO CIRÚRGICO PARA BIÓPSIAS DO TECIDO LAMINAR EM BOVINOS VIVOS.....	51
10. CONSIDERAÇÕES FINAIS	65

ANEXOS

1 – Resumo executivo da patente depositada.....	68
2 – Protocolo do depósito de patente junto ao INPI.....	70
3 – Protocolo da Comissão de Ética no Uso de Animais (286/2013).....	74

LISTA DE FIGURAS

Revisão de literatura

Figura 1 – Histologia do tecido laminar da parede dorsal do casco de bovinos.....15

Desenvolvimento de um instrumento cirúrgico para realização de biópsia de casco

Figura 1 – Desenho esquemático do instrumento proposto.....50

Figura 2 – Desenho esquemático do instrumento proposto com destaque para sua ponta ativa.....51

Figura 3 – Vista explodida do instrumento proposto.....51

Figura 4 – Demonstração das manobras realizadas com o instrumento cirúrgico proposto no sítio de biópsia para colheita da amostra de tecido.....52

Figura 5 – Fragmento de biópsia do casco bovino obtido com o lamelótomo de Falcão-Faleiros.....52

Figura 6 – Histologia do tecido laminar do casco de bovinos obtidas com o lamelótomo de Falcão-Faleiros.....54

Procedimentos iniciais para realização de biópsia do tecido laminar do casco de bovinos

Figura 1 – Ferramenta microretífica e escareador 3/8” utilizados para desgaste da camada córnea do casco de bovino.....23

Figura 2 – Demonstração do desgaste da camada córnea do casco bovino em peça anatômica.....24

Figura 3 – Demonstração da delimitação das bordas internas do sítio de biópsia em casco de bovino.....28

Teste de viabilidade do instrumento cirúrgico desenvolvido

Figura 1 – Instrumento cirúrgico para realização de biópsias de casco em animais unguilados.....61

Figura 2 – Passo-a-passo da realização de biópsias do tecido lamelar do casco utilizando o lamelótomo de Falcão-Faleiros.....62

Figura 3 – Fragmento de tecido lamelar obtido, mostrando medida do comprimento e profundidade.....63

Figura 4 – Fragmento histológico inteiro obtido com o lamelótomo de Falcão-Faleiros, mostrando comprimento do tecido lamelar e profundidade da derme obtida.....66

Figura 5 – Histologia do tecido lamelar e derme do casco de bovinos obtidas por biópsia com o lamelótomo de Falcão-Faleiros.....67

1. RESUMO

A obtenção de tecido laminar do casco é um procedimento que encontra limitações devido à ausência de instrumental e técnica cirúrgicos específicos e eficazes. O objetivo foi desenvolver e testar in vivo em bovinos, um instrumento cirúrgico com finalidade específica de colheita de tecido laminar. Projetou-se, produziu-se e testou-se um protótipo constituído por um cabo, uma haste e uma ponta ativa. Após sedação, cinco bovinos adultos foram contidos em decúbito lateral e anestesiados localmente em dois dígitos. Utilizando ferramenta microretífica acoplada a escareador 3/8", procedeu-se ao desgaste da camada córnea do casco até a proximidade do tecido mole subjacente. Delimitou-se as bordas internas da área desgastada com lâmina de bisturi e empregou-se o instrumento proposto. Os fragmentos histológicos de 16mm de comprimento por 6mm de profundidade foram corados com HE, PAS, Tricrômico de Masson e Shorr. Na análise histológica, as estruturas de interesse foram diferenciadas sem artefatos de técnica e o número de lâminas epidermais foi 86 ± 39 (membro torácico) e 83 ± 52 (membro pélvico). Não houve claudicação importante. Concluiu-se que o instrumento proposto é viável e eficaz para a obtenção de biópsias do tecido laminar do casco de bovinos. O protótipo foi denominado lamelótomo de Falcão-Faleiros e a patente foi depositada junto ao INPI (BR102013018765-8).

Palavras-chave: bovino, casco, biópsia, laminite.

2. ABSTRACT

Laminar tissue from claw harvest is a procedure which has limitations due to lack of surgical instruments and effective technique. The aim was to develop and test in vivo in cattle a surgical instrument with specific purpose to laminar tissue harvest. It was designed, it was produced and it was tested a prototype characterized by a cable, a rod and a active tip. After sedation, five adult cattle were contained in lateral recumbency and locally anesthetized in two digits. With the support of a rotary tool couple to high speed cutter 3/8", it was done the wear of the corneum stratum until the soft tissue proximity. Next, the inner edge of the wear area was bounded with scalpel. The surgical instrument was introduced and used. The histological fragments of 16mm long by 6mm deep were stained with HE, PAS, Masson and Shorr. In the histological analysis, the structures of interest were differentiated without technical artifacts and the number of epidermal laminae was 86 ± 39 (forelimb) and 83 ± 52 (hind limb). There was no significant lameness. It was concluded that the proposed instrument is feasible and effective to obtain the laminar tissue biopsies from cattle claw. The prototype was called lamelotom Falcão-Faleiros and the patent was filed with the INPI (BR102013018765-8).

Key-words: bovine, claw, biopsy, laminitis.

3. INTRODUÇÃO GERAL

A podologia bovina e equina são áreas de estudo amplamente difundidas em razão da importância da saúde dos dígitos (ou cascos) para estas espécies e do elevado impacto econômico negativo que as enfermidades podais causam ao desempenho produtivo nestes animais (WARNICK et al., 2001; SHÖPKE et al., 2013).

Neste sentido, inúmeros são os estudos conduzidos em ambas espécies acerca das afecções podais. Na espécie equina destacam-se os estudos sobre a laminite (WAGUESPACK et al., 2004; BELKNAP et al., 2007; VAN EPS e POLLITT, 2009; FALEIROS et al., 2011; LIMA et al., 2013) doença dos cascos responsável por grande número de mortes entre equinos e invalidez permanente.

Em bovinos, os estudos acerca do tecido laminar do casco são escassos, dificultando o avanço do conhecimento sobre doenças como a laminite na espécie. A ausência de métodos eficazes e de fácil execução que possibilitem a amostragem do tecido laminar pode ser considerado um fator limitante para o estudo deste tecido, tanto em bovinos como em equinos.

Os estudos sobre laminite demandam a colheita do tecido laminar do casco. Em muitos destes estudos recorreu-se à eutanásia dos animais experimentais para a colheita de amostras deste tecido (TARLTON et al., 2002; THOEFNER et al., 2005; DANSCHER et al., 2010). Outros se basearam na colheita de amostras de biópsia tanto em bovinos como em equinos (ALVES et al., 2004; OSORIO et al., 2012; PAES LEME et al. 2010; LIMA et al., 2013). A colheita de biópsias possui a vantagem de evitar a eutanásia e possibilitar a colheita seriada de amostras em um mesmo animal (HANLY et al., 2009; PAES LEME et al., 2010).

Atualmente, a colheita de amostras de tecido laminar é baseada na utilização de *punch* de biópsia de pele, já que não existem instrumentos cirúrgicos específicos para esta função. Este método apresenta inúmeras limitações que comprometem a quantidade e a qualidade das amostras colhidas. A elaboração de ferramentas e métodos mais eficazes para a colheita do tecido laminar do casco possui o potencial de facilitar e favorecer as pesquisas na área (HENDRY et al., 1997). No médio e longo prazo, essas ferramentas podem ainda ser utilizadas para a realização de diagnósticos. Portanto, a disponibilidade de ferramentas diagnósticas podem potencialmente alterar a prática Médico Veterinária favorecendo o diagnóstico precoce, o controle e a intervenção terapêutica em podologia. Deste modo, o objetivo geral deste trabalho é colaborar para o avanço da podologia veterinária seja no âmbito da pesquisa ou da prática Médica Veterinária, através da elaboração de um instrumento cirúrgico específico para realização de biópsias do tecido laminar do dígito.

4. REVISÃO DE LITERATURA

As doenças que causam claudicação (manqueira) em bovinos representam a terceira maior causa de perda econômica na bovinocultura (VERMUNT e GREENOUGH, 1995; GREENOUGH, 2007). Exemplificando a magnitude destas perdas, vacas de aptidão leiteira claudicantes

apresentaram redução na produção de leite da ordem de 1,5kg/dia (WARNICK et al., 2001). Em estudo mais recente, vacas com problemas de casco tiveram de 5 a 20% de redução na produção de leite em toda a lactação (MARTINS e MELO, 2012). Em levantamento realizado na Inglaterra, o custo médio calculado da claudicação foi de £330/ animal (REASEHEALTH COLLEGE, 2013) e nos Estados Unidos, cálculo semelhante resultou no valor de \$346/animal (WESTERN DAIRY DIGEST FALL, 2002), correspondendo aos valores atualizados em reais de R\$1.612,71 e R\$1.065,06 respectivamente.

As doenças de casco como laminite, dermatite digital e dermatite interdigital apresentam prevalência elevada em rebanhos no Brasil e no mundo, sendo responsáveis por episódios de claudicação e prejuízos econômicos acentuados na produção de bovinos (SILVA et al., 2001; WARNICK et al., 2001; FERREIRA et al., 2004; MAUCHLE et al., 2008; POZZATTI et al., 2009). Os prejuízos econômicos decorrem, dentre outros, da diminuição do bem-estar animal, em virtude da dor e relutância à locomoção que estas doenças causam (VERMUNT e GREENOUGH, 1995; WARNICK et al., 2001; BLOWEY, 2008). Como exemplo, animais com problemas de casco permanecem em média 63,76% do tempo deitados, contra 50,41% em animais normais (MARTINS e MELO, 2012).

A laminite figura como a principal doença de casco em bovinos leiteiros (NOCEK, 1997; RADOSTITS, 2002; VAN AMSTEL e SHEARER, 2006) atingindo incidência anual de até 122% em rebanhos confinados e prevalência de 68% (FERREIRA et al., 2004) ou 57% (SHÖPKE et al., 2013) causando prejuízos com o tratamento de animais afetados de \$44,68 dólares/animal (FERREIRA et al., 2004).

A laminite é definida como a inflamação das lâminas sensíveis do casco de bovinos e equinos (RADOSTITS, 2002), porém, o termo também é utilizado de forma genérica para se referir a qualquer dano às lâminas sensíveis do casco (HENDRY et al., 1997). Os mecanismos da fisiopatologia da laminite não estão esclarecidos (THOEFNER et al., 2005) levando a admitir que é uma doença multifatorial (PLAIZIER et al., 2008), sistêmica, com manifestação local no dígito (GREENOUGH, 2007; ENEMARK, 2008).

O tecido laminar do casco de bovinos é formado de lâminas dérmicas e epidérmicas que se intercalam e encontram-se aderidas ao estojo córneo do casco (KÖNIG e LIEBICH, 2004) (Figura 1). A sustentação deste tecido é feita pela derme propriamente dita situada logo abaixo das lâminas do casco. A derme por sua vez encontra-se firmemente aderida à falange distal (osso podal) (VAN AMSTEL e SHEARER, 2006). Em bovinos, o tecido laminar é referido também como junção derme-epiderme do casco (VAN AMSTEL e SHEARER, 2006; THOEFNER et al., 2005).

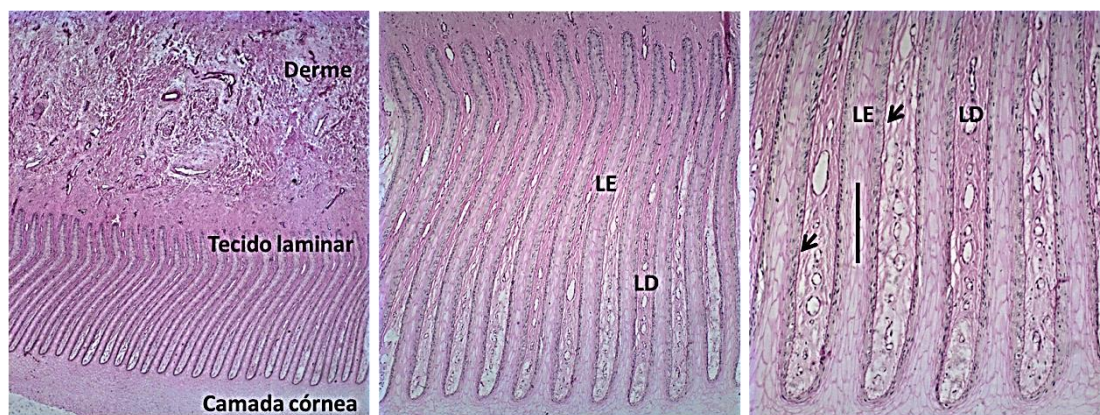


Figura 1 – Histologia do tecido laminar da parede dorsal do casco de bovinos. LE: lâmina epidermal; LD: lâmina dermal; setas indicam a membrana basal e barra preta indica o eixo queratinizado da lâmina epidermal. Coloração de PAS. Aumentos de 4, 10 e 20X respectivamente. (Arquivo Pessoal, Heloisa M. F. Mendes, Escola de Veterinária da UFMG).

Nos estudos sobre laminite, o tecido alvo para estudo é a junção derme-epiderme tanto na espécie bovina como na equina, também referido simplesmente como tecido laminar (NILSSON, 1963; THOEFNER et al., 2005; FALEIROS et al., 2009) ou lamelar (VISSER e POLLITT, 2012) do casco.

Na espécie equina vários trabalhos vêm sendo realizados procurando investigar a fisiopatologia da laminite. Muitos deles utilizaram modelos de indução da doença sendo que nestes casos, foi necessária a eutanásia dos animais após a indução para a obtenção das amostras de tecido (WAGUESPACK et al., 2004; BELKNAP et al., 2007; VAN EPS e POLLITT, 2009; DE LAAT et al., 2010; PAES LEME et al., 2010; DE LAAT et al., 2012). Neste tipo de estudo, HANLY et al (2009) afirmam que diferenças quanto ao curso da doença entre equinos dificultam a caracterização da sequência de eventos da fisiopatogenia sem que haja a eutanásia de grande número de indivíduos. Deste modo, a obtenção de biópsias adequadas e colhidas de forma seriada poderia auxiliar na caracterização do progresso das lesões individualmente no animal afetado (HANLY et al., 2009; PAES LEME et al., 2010). Concorda com esta proposição SINGH et al (1993) ao se referir à espécie bovina. Outra vantagem da técnica de biópsia é a possibilidade de manter o animal vivo mesmo em modelos de indução (PAES LEME et al., 2010).

A laminite bovina apesar de altamente impactante economicamente é menos estudada do ponto de vista de sua fisiopatologia que a laminite equina. Como exemplo, em levantamento recente (29/04/2015) realizado na base de dados pubmed, foram encontradas 688 referências para as palavras chave “laminitis equine” e 686 para “laminitis horse”. Já em bovinos, foram encontradas 153 referências para as palavras chave “laminitis cattle” e 157 para “laminitis bovine”. Assim, em bovinos foi encontrado um número de referências bibliográficas que corresponde a aproximadamente 20% do mesmo número encontrado para equinos. Dentre os estudos em bovinos, a maioria é voltada para os aspectos dos custos econômicos da laminite, fatores predisponentes, epidemiológicos, caracterização das lesões de casco, dentre outros. Raros estudos têm como enfoque as alterações histopatológicas e da biologia molecular do

tecido laminar. Uma possível razão para este cenário é a dificuldade em se obter amostras de biópsia com qualidade e de forma rápida e eficiente nesta espécie.

As principais alterações histológicas em animais com laminite descritas na literatura consultada são descritas a seguir.

Na forma aguda da laminite, macroscopicamente sobre o tecido laminar são encontrados hiperemia, congestão, edema e hemorragia (GREENOUGH, 2007). Histologicamente ocorre acentuada hiperemia na derme das regiões dorsal (estendendo-se para a lâmina dermal) e solear do casco. Além disto, ocorrem diapedese e trombose de pequenos e grandes vasos da derme nas regiões dorsal e solear. As células inflamatórias aparecem na base das lâminas na região dorsal e das papilas epidermais na sola. O infiltrado é predominantemente linfocitário, estando ausentes neutrófilos e eosinófilos (MACLEAN, 1971). Nas lâminas epidermais, as células da camada basal se apresentam arredondadas, com perda da orientação em relação ao eixo da lâmina e com parcial ou total desaparecimento da substância queratogênica central (eixo queratinizado), resultando em seu encurtamento (MACLEAN, 1971; GREENOUGH, 2007). As lâminas podem se apresentar mais alongadas e estreitas em sua extremidade e a membrana basal pode se apresentar colapsada (GREENOUGH, 2007).

Na laminite crônica, predominam os eventos vasculares como proeminente dilatação de capilares e veias na derme das regiões dorsal e solear. Os grandes vasos apresentam proliferação da túnica íntima, hipertrofia da túnica média e fibrose da túnica adventícia (MACLEAN, 1971). Estas alterações vasculares foram classificadas como sendo arteriosclerose e possivelmente decorrem de trombose mural ocorrida durante um episódio anterior de laminite subclínica (BOOSMAN et al., 1989). Corroborando esta interpretação, foram identificadas neovascularização de vasos trombóticos antecedentes, além de formação de novos capilares na base da lâmina dermal (MACLEAN, 1971). As lâminas dermais se apresentam mais amplas que o normal enquanto as lâminas epidermais se encontram mais estreitas. Na sola, as papilas também se apresentam mais amplas e com ramificações. Células mononucleares são identificadas na base da lâmina epidermal e perivascular, sendo mais numerosas na derme da sola (MACLEAN, 1971).

Em bovinos de corte com supercrescimento da sola foram descritos hiperplasia do epitélio das lâminas epidermais, arteriosclerose e formação de trombos em pequenas arteríolas. A presença destas lesões configura um diagnóstico de laminite crônica, que possivelmente esteve ligada à superalimentação, apesar da dieta dos animais neste estudo ser desconhecida (SINGH et al., 1992).

Em modelo experimental de indução de laminite aguda por oligofrutose, foram descritos o arredondamento das células epidermais, redução da densidade de sua cromatina (THOEFNER et al., 2005; DANSCHER et al., 2010), afilamento da lâmina epidermal, colapso da membrana basal, edema, hemorragia e infiltrado leucocitário na derme da região dorsal do dígito (THOEFNER et al., 2005). Já em vacas com sinais de laminite naturalmente adquirida foi detectada hemorragia na derme das regiões dorsal e solear do casco e irregularidades no trajeto da membrana basal. A membrana basal se apresentou mais irregular na extremidade com a camada córnea (MENDES et al., 2013).

Em vacas durante o período periparto, que não apresentaram manifestação clínica de laminite ou outra doença podal, foram descritos desvios do eixo das lâminas epidermais e aumento do

contéudo de fibras colágenas nas lâminas dermais. Estas alterações potencialmente alteram a distribuição de forças dentro do casco pressionando a sola e a linha branca, com isto predispondo os animais a outras doenças de casco (TARLTON et al., 2002). De maneira semelhante, desvio e distensão da lâmina epidermal foi descrita em bovinos infectados com o protozoário *Besnoitia besnoiti*. Nesta infecção, foram encontrados cistos do parasito na lâmina dermal do tecido laminar, associados a moderado ou acentuado infiltrado linfocitário, plasmocitário, necrose e osteomielite da falange distal, levando a laminite crônica (GOLLNICK et al., 2015; LANGENMAYER et al., 2015).

Com base nestes trabalhos consultados, pode-se afirmar que as alterações no tecido laminar e derme do casco de bovinos durante a laminite são diversas, complexas e algumas são mal compreendidas. De modo geral, predominam as alterações vasculares e as modificações nas células epidermais da lâmina epidermal, levando a alterações na estrutura laminar.

O estudo detalhado destas alterações pode contribuir para o entendimento da fisiopatologia da laminite. Dentre os estudos citados acima todos ocorreram a partir da obtenção de amostras de tecido do casco de animais abatidos ou eutanasiados. A obtenção de tecido laminar por método de biópsia foi realizada para estudo da biologia molecular do casco em animais com laminite, mas não sobre a histopatologia (OSORIO et al., 2002).

Para HENDRY et al (1997), o esclarecimento da hierarquia dos elementos envolvidos na fisiopatologia da laminite em bovinos dependerá de estudos longitudinais detalhados *in vivo*. Para isto, o advento de ferramentas de biópsias tem papel preponderante, na medida em que permitem a colheita seriada de tecidos em indivíduos ao invés da colheita terminal. Ainda segundo estes autores, é promissora a combinação das ferramentas de biópsia para a realização de estudos *in vivo* de um lado, e para o estudo de cultivo de tecidos de outro. HENDRY et al (1997) finalizam que a associação das ferramentas *in vivo* e *in vitro* podem alavancar o entendimento da fisiopatologia da laminite em bovinos.

Por outro lado, considerando o elevado impacto econômico provocado por doenças digitais e em especial a laminite, o diagnóstico precoce assume papel preponderante (SHÖPKE et al., 2013). Neste sentido, torna-se bastante desejável e promissora a elaboração de formas de detecção da laminite nas fases iniciais de seu curso. A rapidez em detectar a doença em rebanhos poderia contribuir na elaboração e implementação de estratégias terapêuticas eficazes. Isto permitiria ainda a adoção de métodos de prevenção e controle no rebanho como um todo, possibilitando a interrupção brusca de prováveis perdas econômicas. Nesta linha de diagnóstico precoce, estudos vêm sendo feitos para tentar estabelecer alguma relação entre parâmetros clínicos, produtivos ou de comportamento e a ocorrência de doenças de casco. Com esta estratégia, o objetivo é fornecer ferramentas que possam subsidiar o Médico Veterinário em suas ações preventivas e/ou terapêuticas no campo. Como exemplo, VAN STRATEN et al (2012) identificou que o teor de gordura no leite é menor em animais com lesões no casco causadas por laminite. Por sua vez, MARTINS e MELO (2012) detectaram que há uma relação entre o teor de sólidos totais no leite e a ocorrência de claudicação. THOMSEN et al (2012), identificou forte associação entre escores de locomoção, tempo que o animal permanece deitado e a presença de lesões de casco. LAVEN et al (2012) detectaram que a espessura do extrato córneo da sola varia nas vacas ao longo da lactação e que esta medida está ligada à resistência à claudicação. SHÖPKE et al (2013) demonstrou que a prevalência de laminite tem relação com o estágio de lactação e com o peso da vaca, sendo maior em animais durante os 50-99 dias de lactação e em vacas mais pesadas.

A realização eficiente de biópsias de casco também poderia contribuir nesta linha do diagnóstico precoce, uma vez que se configuraria como uma alternativa a mais a disposição do Médico Veterinário. O uso adequado e oportuno da biópsia de casco permitiria a detecção precoce da laminite em curso em animais isolados ou grupos. Tal fato ainda possibilitaria o estabelecimento de associações entre os achados de biópsia e os demais parâmetros já investigados na literatura, para a definição da situação do rebanho. Isto permitiria orientar melhor as práticas adotadas pelo Médico Veterinário seja no âmbito da terapêutica, prevenção ou controle.

Deste modo, além de sua aplicação em pesquisa na construção de novo saber, soluções para a colheita de biópsias de casco em bovinos podem vir a modificar a prática Veterinária no aspecto da prevenção e diagnóstico precoce das afecções digitais, em especial a laminite.

Neste cenário, surge a necessidade de soluções eficazes para a colheita de biópsias de casco, sob a perspectiva de possibilitarem o avanço mais rápido e consistente do conhecimento sobre as afecções que acometem os cascos de bovinos e fornecer ferramentas funcionais para o trabalho Médico Veterinário em situações de campo. A espécie equina também poderia se beneficiar dessas soluções, uma vez que sofre diversos problemas de casco como a laminite, tão amplamente estudada.

A obtenção de biópsias de casco é um procedimento Médico Veterinário de natureza cirúrgica. O primeiro relato de um método de biópsia de casco foi conduzido em bovinos e descrito no trabalho de SINGH et al (1993). O método foi proposto para ser utilizado tanto na face dorsal como plantar ou palmar do casco. Desde então, passou a ser utilizado em bovinos, búfalos e equinos após sofrer ou não modificações (SINGH et al., 1994; ALVES et al., 2004; CROSSER e POLLITT, 2006; HANLY et al., 2009; GRAVENA et al., 2010; PAES LEME et al., 2010; RANDHAWA et al., 2012; OSORIO et al., 2012). No total destes nove estudos encontrados sobre biópsia de casco, de modo geral o procedimento só foi possível a partir da combinação de instrumentos de uso geral em Medicina Veterinária ou Odontologia. Estes instrumentos não se destinam à obtenção de biópsias de casco, mas sofreram, a critério do Médico Veterinário, adaptações em suas funções ou aplicações que viabilizaram sua utilização para essa função.

O método proposto por SINGH et al (1993) consiste nas seguintes etapas: 1) contenção do animal e anestesia local do casco; 2) limpeza e antissepsia do local da biópsia; 3) desgastar a camada córnea (externa) do casco com uma broca de 7mm acoplada à furadeira, até alcançar próximo da superfície da junção derme-epiderme, porém sem perfurá-la. A determinação do momento de parada deste desgaste deve ser feita pela visualização da coloração rósea do tecido subjacente, indicando a proximidade do tecido sensível e vascularizado. Pela ação da broca, cria-se um orifício arredondado na camada córnea do casco; 4) em seguida, com o uso de um *punch* descartável de 3mm, penetra-se o orifício realizado até alcançar as lâminas; 5) realiza-se de 6 a 8 movimentos rotativos até se conseguir a desconexão entre a derme e a falange distal e a remoção do fragmento de biópsia; 6) realização de curativo local.

O ponto mais crítico na obtenção de biópsias do casco é a desconexão entre a derme e a falange distal (GRAVENA, 2010), em virtude da grande quantidade de fibras colágenas na derme (GREENOUGH, 2007). No método de SINGH et al (1993), esta desconexão foi possível apenas com os movimentos rotativos no *punch* de biópsia. Aplicando esta técnica em equinos, ALVES et al (2004) e PAES LEME (2010), obtiveram êxito na obtenção de fragmentos satisfatórios

para análise histopatológica. Contudo, também na espécie equina, GRAVENA (2010) relatou dificuldades insuperáveis na desconexão entre a derme e a falange distal utilizando o *punch* de modo a inviabilizar o procedimento pelo método de SINGH et al (1993). Por conseguinte, GRAVENA (2010) utilizou um instrumento odontológico chamado esculpidor de Frahm nº 2 para promover a desconexão entre a derme e a falange distal, recorrendo ainda ao auxílio de pinça de dissecação e pinça hemostática de Halsted para concluir a operação. CROSSER e POLLIT (2006) optaram pelo curvamento de uma lâmina de bisturi através de aquecimento, com sua posterior introdução no sítio de biópsia para causar a desconexão entre a derme e a falange distal de equinos. Sobre esta alternativa GRAVENA et al (2010) considerou-a inviável pela dificuldade de promover o curvamento da lâmina de bisturi ou confeccionar um instrumento semelhante, e optou por abandonar esta adaptação.

Na experiência de nosso grupo de pesquisa, tentativas foram feitas em peças anatômicas de bovino em utilizar o método proposto por CROSSER e POLLITT (2006), sem êxito. As razões foram a dificuldade operacional de curvar a lâmina de bisturi por aquecimento, a rápida ruptura da lâmina depois de aquecida e ainda sua difícil inserção no sítio da biópsia. HANLY et al (2009), empregou o método de SINGH et al (1993) em equinos no que se refere ao uso do *punch*, porém, utilizou-se de pinça de dissecação e bisturi para executar a desconexão da derme com a falange distal. Neste estudo foi relatado que houve dano tecidual à amostra causado manualmente durante sua remoção com o *punch*, evento superado posteriormente com a experiência do pesquisador.

Em bovinos, OSORIO et al (2012) também utilizou-se de lâmina de bisturi e pinça de dissecação, em adaptação ao método de SINGH et al (1993). Nesse estudo, os autores concluíram que a quantidade de tecido obtida com o *punch* foi satisfatória para a pesquisa de expressão gênica e histopatologia das lâminas do casco. Contudo, no referido trabalho não houve um estudo detalhado das alterações histológicas das lâminas do casco, mas apenas avaliou-se a expressão gênica nas amostras obtidas. Portanto, é possível questionar a conclusão do autor, uma vez que estudos de histopatologia demandam uma quantidade maior de tecido amostral em comparação com estudos de expressão gênica. A razão disto é que na análise histopatológica é necessário e desejável avaliar um número maior de lâminas e na análise de expressão gênica, fragmentos pequenos permitem colher grande quantidade de material genético (Comunicação pessoal, Prof. Rafael R. Faleiros, Escola de Veterinária, UFMG, 2012). Outro aspecto é que a utilização do *punch* causou uma distorção das lâminas, caracterizada pelo “giramento” delas (OSORIO et al., 2012).

SINGH et al (1994) e RANDHAWA et al (2012), relataram com êxito estudos em bovinos e búfalos respectivamente utilizando-se do método de SINGH et al (1993). Porém, nestes estudos foram colhidas amostras da superfície palmar ou plantar do casco, não sendo, portanto, possível avaliar o êxito quanto à obtenção de amostras da região dorsal do casco, onde estão localizadas as lâminas dérmicas e epidérmicas.

Assim, é possível perceber que diferentes adaptações foram propostas ao método do *punch* de SINGH et al (1993), sempre com vistas a melhorar a eficiência da desconexão entre a derme e a falange distal. Além disto, comumente, foi necessária a utilização de mais de um instrumento, sendo necessário trocar de instrumento durante o procedimento de biópsia.

Em todos estes estudos, os autores foram unânimes em afirmar que o método proposto com adaptações ao de SINGH et al (1993) viabilizou a obtenção de biópsias de boa qualidade de

ponto de vista histológico, apesar de algumas dificuldades relatadas. Apesar disto, os métodos propostos por CROSSER e POLLITT (2006), HANLY et al (2009), GRAVENA et al (2010) e OSORIO et al (2012) apresentaram limitações importantes ligadas primariamente à inserção dos instrumentos utilizados para a desconexão entre a derme e a falange distal no sítio da biópsia. CROSSER e POLLITT (2006) e GRAVENA et al (2010), propuseram a realização de incisões em forma de quadrado na superfície da junção derme-epiderme do casco após o desgaste da camada córnea. Tais incisões devem ser feitas com lâmina de bisturi e visam delimitar o tamanho da amostra a ser colhida. Após a realização das linhas de incisão deste quadrado, deve-se introduzir a lâmina de bisturi curvada (CROSSER e POLLITT, 2006) ou o esculpador de Frahm nº 2 (GRAVENA et al., 2010) sobre as linhas, alcançar até o fundo o limite da derme com a falange distal e promover o corte para desconectar a amostra. Desta forma, uma limitação importante é a inserção e a movimentação dos instrumentos citados na linha de incisão da área delimitada para biópsia. Isto porque a lâmina de bisturi curvada ou o esculpador de Frahm nº 2 concorrem por espaço na linha de incisão com o tecido adjacente sofrendo dificuldades em superar a resistência natural destes tecidos. Outro aspecto é a dificuldade na movimentação destes instrumentos uma vez inseridos, para que haja o corte do limite dérmico com a falange distal. Pela restrição de espaço, as manobras são de difícil execução e acrescentam tempo ao procedimento. Além disto, ainda comprometem a qualidade da amostra obtida, sob o risco de uma desconexão insuficiente entre a derme e falange distal. Por fim, conforme relatado por GRAVENA et al (2010), é necessário recorrer ao auxílio da pinça de dissecação e da pinça hemostática de Halstead para concluir a remoção do fragmento de biópsia, ou seja, aumentando a complexidade e o tempo para a realização do procedimento.

HANLY et al (2009) e OSORIO et al (2012) valendo-se do método de SINGH et al (1993) adaptado, preferiram utilizar pinça de dissecação (para captura) e lâmina de bisturi para a remoção da amostra de biópsia, uma vez que o *punch* unicamente não foi suficiente para esta função. Tal como os instrumentos citados por CROSSER e POLLITT (2006) e GRAVENA et al (2010), a lâmina de bisturi concorre por espaço com o tecido adjacente e enfrenta as mesmas dificuldades já mencionadas.

Assim, frente à ausência no mercado Veterinário de instrumentos eficazes e com destinação específica para obtenção de biópsia do tecido laminar do casco, e considerando a barreira que isto representa para o avanço dos estudos e do conhecimento sobre as doenças podais em bovinos, em especial a laminite, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e testar em bovinos um instrumento cirúrgico específico para realização de biópsias de casco.

5. OBJETIVOS

1 – Desenvolver um instrumento cirúrgico com destinação específica para a colheita de tecido laminar e derme do dígito de bovinos;

2 – Desenvolver uma técnica de biópsia do tecido laminar e derme do dígito de bovinos;

3 – Testar a viabilidade do instrumento cirúrgico desenvolvido em bovinos.

6. CAPÍTULO I - DESENVOLVIMENTO DE UM INSTRUMENTO CIRÚRGICO PARA REALIZAÇÃO DE BIÓPSIA DE CASCO EM ANIMAIS UNGULADOS

Neste capítulo será apresentado o texto definitivo da patente depositada junto ao INPI sob o protocolo BR102013018765-8, em 23 de Julho de 2013, referente ao instrumento cirúrgico desenvolvido, denominado lamelótomo de Falcão-Faleiros. Este é um instrumento cirúrgico que reúne características e propriedades especificamente desenvolvidas para a obtenção de biópsias do tecido laminar do casco em bovinos, podendo ser utilizado na espécie equina ou outras unguladas.

“INSTRUMENTO CIRÚRGICO PARA REALIZAÇÃO DE BIÓPSIA DE CASCO EM ANIMAIS UNGULADOS”

A presente invenção consiste em um instrumento cirúrgico para realização de biópsia de casco em animais ungulados. O tecido obtido a partir de biópsia de casco pode ser utilizado como ferramenta auxiliar definitiva no diagnóstico precoce das alterações da junção derme-epiderme do casco de qualquer animal ungulado, especialmente em bovinos e equinos.

Em bovinos, onde ocorre a exploração dos animais na forma de rebanhos, o diagnóstico precoce de anormalidades à saúde do casco em um pequeno grupo de animais representa o potencial de, por amostragem, diagnosticar a saúde dos cascos do rebanho como um todo. Tal premissa possibilita a intervenção Médico Veterinária em tempo hábil antes da consolidação de doenças e, por conseguinte, de prejuízos econômicos maiores no rebanho. Dentre as alterações mais importantes no tecido da junção derme-epiderme relacionadas à saúde do casco, citam-se aquelas ligadas à laminite, como inflamação, hemorragia, congestão, trombose, alterações nos processos de proliferação, diferenciação, corneificação e morte programada das células epiteliais do casco, prejuízos na arquitetura da membrana basal, dentre outros. Estas alterações constituem o “gatilho” inicial para a série de lesões clínicas diagnosticadas no casco de bovinos tais como: hemorragia de linha branca, de sola e da parede, úlcera de sola e de pinça, doença de linha branca, abscessos de sola e de linha branca, dupla sola, casco em tesoura, casco em saca-rolhas e linhas de estresse na parede do casco. Portanto, diagnosticar precocemente as alterações histológicas na junção derme-epiderme do casco significa antecipar-se de forma consistente à enorme gama de lesões clínicas que podem ocorrer. Esta possibilidade implica na oportunidade de bloquear o curso destas lesões clínicas não só no indivíduo como no rebanho todo, desde que as medidas cabíveis de prevenção, controle e tratamento sejam adotadas. Com isto, a obtenção de biópsias de casco para o diagnóstico precoce de alterações no tecido mole do casco, possui o potencial de reduzir drasticamente os impactos econômicos negativos das doenças de casco que, de outra forma poderiam se realizar.

Cabe ressaltar que mediante a ausência de métodos eficazes disponíveis até o momento para a obtenção de biópsias de casco, é possível que muitas alterações da junção derme-epiderme não tenham sequer sido descritas. Neste caso, o instrumento ora proposto vem a

contribuir como ferramenta científica para que novos conhecimentos sejam construídos acerca das doenças podais, principalmente em bovinos e equinos, onde os impactos econômicos negativos são substanciais.

Outro aspecto a ser considerado é que a biópsia dos tecidos moles em casos de dermatite digital ou interdigital pode ser utilizada para o diagnóstico precoce bem como no entendimento da evolução dos processos infecciosos do casco. Neste sentido, o instrumento ora proposto pode vir a contribuir também no manuseio destas doenças infecciosas, cuja prevalência em rebanhos no mundo todo tem aumentado nos últimos anos.

O presente instrumento é caracterizado por apresentar as seguintes partes: cabo, haste e ponta ativa. A ponta ativa é caracterizada por ser constituída de: um assoalho, duas paredes laterais, uma aresta cortante do assoalho e duas arestas cortantes das paredes.

As doenças que causam claudicação (manqueira) em bovinos representam a terceira maior causa de perda econômica na bovinocultura (Vermunt, J.J.; Greenough, P.R. Lesions associated with subclinical laminitis of the claws of dairy calves in two management systems. *British Veterinary Journal*, v. 151, p. 391-399, 1995; Greenough, P.R. *Bovine laminitis and lameness: a hands-on approach*. Elsevier, 2007. 311p.). Exemplificando a magnitude destas perdas, vacas de aptidão leiteira claudicantes apresentaram redução na produção de leite da ordem de 1,5kg/dia (Warnick, L.D.; Janssen, D.; Guard, C.L. et al. The effect of lameness on milk production in dairy cows. *Journal of Dairy of Science*, v. 84, p.1988-1997, 2001). Vacas com problemas de casco tiveram de 5 a 20% de redução na produção de leite em toda a lactação (Martins, C.C; Melo, C.M. Relation between claudication, rest behavior, body condition and milk production in a dairy cattle. *XXVII World Buiatrics Congress*, 2012, Lisboa, Portugal).

As doenças de casco como laminite, dermatite digital e dermatite interdigital apresentam prevalência elevada em rebanhos, sendo responsáveis por episódios de claudicação e prejuízos econômicos acentuados na criação de bovinos (Ferreira, P.M. Enfermidades podais em rebanho leiteiro confinado. 2003. 79f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte; Pozzatti, P.N.; Casagrande, F.P.; Porfírio, L.C. et al. Prevalência e classificação das afecções podais de rebanho bovino leiteiro de Sete Lagoas-MG. In: encontro latino americano de iniciação científica, 13. e encontro latino americano de pós-graduação, 9. 2009. Disponível em <http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2009/anais/arquivos/0098_0875_02.pdf> Acesso em 09 jun. 2010; Silva, L.A.F.; Silva, L.M.; Romani, A.F. et al. Características clínicas e epidemiológicas das enfermidades podais em vacas lactantes do município de Orizona – GO. *Ciência Animal Brasileira*, v.2, p. 119-126, 2001; Mauchle, U.; Carvalho, A.U.; Alzamora Filho, F. et al. Efeito da sazonalidade sobre a ocorrência de lesões podais em vacas leiteiras. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v.9, p.109-116, 2008; Warnick et al., 2001). Os prejuízos econômicos decorrem, dentre outros, da diminuição do bem-estar animal, em virtude da dor e relutância à locomoção que estas doenças causam (Vermunt e Greenough, 1995; Warnick et al., 2001; Blowey R.W. Claudicação. In: Andrews, A.H. *Medicina bovina: doenças e criação de bovinos*. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008. p.362-384).

Animais com problemas de casco permanecem em média 63,76% do tempo deitados, contra 50,41% dos animais normais (Martins e Melo, 2012). A laminite figura como a principal doença de casco em bovinos leiteiros (Nocek, J.E. Bovine acidosis: implications on laminitis. *Journal of Dairy of Science*, v. 80, p. 1005-1028, 1997), apresentando incidência anual de 122%

em rebanhos confinados e prevalência de 68% causando prejuízos com tratamento de \$44,68 dólares/animal (Ferreira, 2003).

A laminite é definida como a inflamação das lâminas da parede do casco de bovinos e equinos. É considerada uma doença multifatorial, sistêmica com manifestação local no dígito (Greenough, 2007; Enemark, J.M.D. The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA): A review. *The Veterinary Journal*, v. 176, p. 32-43, 2008). Apesar de sua importância, a fisiopatologia da laminite permanece não completamente esclarecida tanto em bovinos como em equinos (Thoefner, M.B.; Wattle, O.; Pollitt, C.C. et al. Histopathology of oligofructose-induced acute laminitis in heifers. *Journal of Dairy of Science*, v. 88, p. 2774-2782, 2005; Linford, R.L. Laminite (aguamento). In: Smith, B.P. *Medicina interna de grandes animais*. 3.ed. Manole: Barueri, 2006. p. 1116-1124; Randhawa et al., 2012).

O tecido laminar do casco de bovinos é formado de lâminas dérmicas e epidérmicas que se intercalam e encontram-se aderidas ao estojo córneo do casco (König, H.E.; Liebich, H. *Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas colorido*. Porto Alegre: Artmed, 2004). A sustentação deste tecido laminar é feita pela derme propriamente dita situada logo abaixo das lâminas do casco. A derme, por sua vez, encontra-se firmemente aderida à falange distal (osso podal) (Van Amstel, S.; Shearer, J. *Manual for treatment and control of lameness in cattle*. Blackwell Publishing, 2006. 212p). Assim, as lâminas dérmicas e epidérmicas e a derme propriamente dita constituem a junção derme-epiderme da parede do casco. Anatomicamente, estas estruturas situam-se abaixo da camada córnea (externa) do casco e aderem-se firmemente à falange distal (osso podal) no interior do casco (Greenough, 2007; Mendes, H.M.F. *Lesões na junção derme-epiderme do casco de vacas de aptidão leiteira de descarte com e sem sinais clínicos de laminite*. 2010. Dissertação de Mestrado, Escola de Veterinária da UFMG).

Nos estudos sobre laminite, o tecido alvo para pesquisa é a junção derme-epiderme tanto em bovinos como em equinos, também referido simplesmente como tecido laminar ou lamelar do casco (Nilsson, S.A. Clinical, morphological, and experimental studies of laminitis in cattle. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 4, suppl. 1, p. 1-304, 1963; Thoefner et al., 2005; Faleiros, R.R.; Nuovo, G.J.; Belknap, J.K. Calprotectin in myeloid and epithelial cells of laminae from horses with Black Walnut extract-induced laminitis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 23, p. 174-181, 2009; Visser, M.B; Pollitt, C.C. The timeline of lamellar membrane basement changes during equine laminitis development. *Equine Veterinary Journal*. 2011).

Em equinos vários trabalhos vêm sendo realizados procurando investigar a fisiopatologia da laminite. Muitos deles utilizaram modelos de indução da doença, sendo que nestes casos, foi necessária a eutanásia dos animais após a indução, para a obtenção das amostras de tecido (Souza, A.H. *Tamponamento cecal: aspectos clínico, fisiopatológico e terapêutico na laminite experimental em equinos*. Tese de Doutorado, UNESP – Jaboticabal, 2007; Faleiros, et al., 2009; Faleiros, R.R.; Johnson, P.J.; Nuovo, G.J. et al. Laminar leukocyte accumulation in horses with carbohydrate overload induced-laminitis. *Journal of Veterinary Medicine*, v.1, p.107-115, 2011). Neste tipo de estudo, Hanly et al (2009) afirma que diferenças quanto ao curso da doença entre equinos dificultam a caracterização da sequência de eventos sem que haja a eutanásia de grande número de indivíduos (Hanly, B.K.; Stokes, A.M.; Bell, A.M. et al. Use of serial laminar tissue collection via biopsy in conscious healthy horses. *American Journal of Veterinary Research*, v. 7, n.6, p. 697-702, 2009). Deste modo, a obtenção de biópsias adequadas e colhidas de forma seriada poderia auxiliar na caracterização do progresso das lesões individualmente no animal afetado (Hanly et al., 2009; Paes Leme, F.O.;

Bonna, F.A.B.; De Marval, C.A. et al. Histopatologia das laminas do casco de equinos com laminite aguda induzida e tratados com ketoprofeno, fenilbutazona e flunixin meglumine. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.62, n.2, p. 241-250, 2010). Concorda com esta proposição Singh et al (1993) ao se referir aos bovinos (Singh, S.S.; Ward, W.R.; Murray, R.D. Technique of hoof biopsy in cattle. *The Veterinary Record*, v. 133, p.190-191, 1993). Outra vantagem da técnica de biópsia é a possibilidade de manter o animal vivo mesmo em modelos de indução (Paes Leme et al., 2010).

A laminite bovina apesar de altamente impactante economicamente é menos estudada do ponto de vista de sua fisiopatologia que a laminite equina. Uma das razões para isto é a dificuldade em se obter amostras de biópsia com qualidade e de forma rápida e eficiente nesta espécie. Ressalta-se que nesta categoria animal, em razão do tipo de exploração voltada à produção de leite ou carne, é mais improvável a obtenção de indivíduos para pesquisa destinados à eutanásia após modelos de indução de laminite, como ocorre nos equinos. Pelo mesmo motivo, é difícil o convencimento de proprietários quanto à utilização de seus animais para procedimentos que possam perturbar de alguma forma a rotina da propriedade ou do rebanho. Por outro lado, estudos recentes apontaram o surgimento de alterações histopatológicas em estágios precoces da doença tanto na espécie equina como bovina (Faleiros et al., 2009; Mendes et al., 2010; Mendes, H.M.F., Ferreirama O.N.; Alves, G.E.S. et al. Presence of macrophages in the hoof dermo-epidermal junction in dairy cows with and without clinical signs associate to laminitis. *XXVII World Buiatrics Congress*, 2012, Lisboa, Portugal). Estas alterações surgem muito antes da ocorrência de sinais clínicos como claudicação e modificação do estojo córneo do casco. Assim, nos bovinos, considerando o elevado impacto econômico provocado por doenças digitais (dentre elas a laminite) somado à sua natureza até certo ponto 'silenciosa', o diagnóstico precoce assume papel preponderante. Neste sentido, torna-se bastante desejável e promissora a elaboração de formas de detecção da laminite nas fases iniciais de seu curso.

A rapidez em detectar a doença em rebanhos pode contribuir na elaboração e implementação de estratégias terapêuticas eficazes. Isto permitiria ainda, a adoção de métodos de prevenção e controle no âmbito do rebanho como um todo, possibilitando a interrupção brusca de prováveis perdas econômicas. Nesta linha de ação, estudos vêm sendo feitos para tentar estabelecer alguma relação entre parâmetros clínicos, produtivos ou de comportamento e a ocorrência de doenças de casco.

Com esta estratégia, o objetivo é fornecer ferramentas que possam subsidiar o Médico Veterinário em suas ações preventivas e/ou terapêuticas no campo.

Como exemplo, Van Straten et al (2012) identificou que o teor de gordura no leite é menor em animais com lesões no casco causadas por laminite (Van Straten, M.; Siani, I.; Bruckstein, S.; Bar, D. Claw horn lesions are associated with decreased milk fat percentage on test-days preceding diagnosis. *XXVII World Buiatrics Congress*, 2012, Lisboa, Portugal).

Por sua vez, Martins e Melo (2012) detectaram que há uma relação entre o teor de sólidos totais no leite e a ocorrência de claudicação.

Thomsen et al (2012), identificou forte associação entre escores de locomoção, tempo que o animal permanece deitado e a presença de lesões de casco (Thomsen, P.T.; Munksgaard, L.; Sorensen, J.T. Locomotion scores and lying behavior are indicators of hoof lesions in dairy cows. *The Veterinary Journal*, v. 193, p. 644-647, 2012).

Laven et al (2012) detectaram que a espessura do estrato córneo da sola varia nas vacas ao longo da lactação e de acordo com a unha, e que esta medida está ligada à resistência à claudicação (Laven, L.J.; Laven, R.A.; Parkinson, T.J. et al. An evaluation of the changes in distance from the external sole surface to the distal phalanx in heifers in their first lactation. *The Veterinary Journal*, v.193, p. 639-643, 2012).

A realização eficiente de biópsias de casco também poderá contribuir nesta linha de ação, uma vez que se configurará como uma alternativa a mais a disposição do Médico Veterinário.

O uso adequado e oportuno da biópsia de casco permitirá a detecção precoce da laminite em curso, em animais isolados ou grupos. Tal fato ainda possibilitará o estabelecimento de associações entre os achados de biópsia e os demais parâmetros já investigados na literatura, para a definição da situação do rebanho. Isto permitirá orientar melhor as práticas adotadas pelo Médico Veterinário seja no âmbito da terapêutica, prevenção ou controle.

Deste modo, além de sua aplicação em pesquisa na construção de novo saber, soluções para a colheita de biópsias de casco em bovinos podem vir a modificar a prática Veterinária no aspecto da prevenção e diagnóstico precoce das afecções digitais, em especial a laminite. Neste cenário, urge a necessidade de soluções eficazes para a colheita de biópsias de casco, sob a promessa de possibilitarem o avanço mais rápido e consistente do conhecimento sobre as afecções de casco em bovinos e fornecer ferramentas reais para o trabalho Médico Veterinário em situações de campo.

Os equinos também poderiam se beneficiar dessas soluções, uma vez que sofrem diversos problemas de casco como a laminite. O primeiro relato de um método de biópsia de casco foi conduzido em bovinos e descrito no trabalho de Singh et al (1993). O método foi proposto para ser utilizado tanto na face dorsal, como plantar ou palmar do casco. Desde então, passou a ser utilizado em bovinos, búfalos e equinos, após sofrer ou não modificações (Singh, S.S.; Murray, R.D.; Ward, W.R. Gross and histopathological study of endotoxin-induced hoof lesions in cattle. *J. Comp. Path.* v. 110, p. 103-115, 1994; Alves, G.E.S.; Paes Leme, F.O.; Marval, C.A. et al. Biópsia digital em equinos com laminite induzida por sobrecarga de carboidratos. *Brasilian Journal Veterinary Research and Animal Science*, v. 41 (supl), p. 264-265, 2004; Croser, E.L.; Pollitt, C.C. Acute laminitis: descriptive evaluation of serial hoof biopsies. *AAEP proceedings*, v. 52, p. 542-546, 2006; Hanly et al., 2009; Gravena, K.; Sampaio, R.C.L.; Dias, D.P.M. et al. Evaluation of the integrity of horse hoof dermal and epidermal tissues collected by dorsal transmural. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 32, p. 858-862, 2012; Paes Leme et al., 2010; Randhawa, S.S.; Dua, K.; Banga, H.S.; Singh, S.S.; Malhotra, P. Arteriosclerosis in buffalo hooves - an age related change or a pathology of lameness? *Indian Journal of Animal Sciences*, 2012 vol. 82 no. 7 pp. 697-701; Osorio, J.S.; Fraser, B.C.; Graunard, D.D. et al. Corium tissue expression of genes associated with inflammation oxidative stress, and keratin formation in relation to lameness in dairy cows. *Journal Dairy Science*, v. 95, p. 6388-6396, 2012).

Nesses estudos sobre biópsia de casco, de modo geral, o procedimento só foi possível a partir da combinação de instrumentos de uso geral em Medicina Veterinária ou Odontologia. Estes instrumentos não se destinam à obtenção de biópsias de casco, mas sofreram, a critério do Médico Veterinário, adaptações em suas funções ou aplicações que viabilizaram sua utilização para essa função.

O método proposto por Singh et al (1993) consiste nas seguintes etapas: 1) contenção do animal e anestesia local do casco; 2) limpeza e antisepsia do local da biópsia; 3) desgastar a camada córnea (externa) do casco com uma broca de 7mm acoplada à furadeira, até alcançar próximo da superfície da junção derme-epiderme, porém sem perfurá-la. Nesta etapa é feito o desgaste da camada córnea até o limite com o tecido mole. A determinação do momento de parada deste desgaste deve ser feita pela visualização da coloração rósea do tecido subjacente, indicando a proximidade do tecido sensível e vascularizado. Pela ação da broca, cria-se um orifício arredondado na camada córnea do casco; 4) em seguida, com o uso de um *punch* descartável de 3mm, penetra-se o orifício realizado até alcançar as lâminas; 5) realiza-se de 6 a 8 movimentos rotativos até se conseguir a desconexão entre a derme e a falange distal e a remoção do fragmento de biópsia; 6) realização de curativo local. O ponto mais crítico na obtenção de biópsias do casco é a desconexão entre a derme e a falange distal (Gravena, 2010), em virtude da grande quantidade de fibras colágenas na derme (Greenough, 2007). No método de Singh et al (1993), esta desconexão foi possível apenas com os movimentos rotativos no *punch* de biópsia.

Aplicando esta técnica em equinos, Alves et al (2004) e Paes Leme (2010), obtiveram êxito na obtenção de fragmentos satisfatórios para análise histopatológica. Contudo, também em equinos, Gravena (2010) relatou dificuldades insuperáveis na desconexão entre a derme e a falange distal de modo a inviabilizar o procedimento pelo método de Singh et al (1993). Por conseguinte, Gravena (2010) utilizou um instrumento odontológico chamado esculpidor de Frahm nº 2 para promover a desconexão entre a derme e a falange distal, recorrendo ainda ao auxílio de pinça de dissecação e pinça hemostática de Halsted para concluir a operação.

Crosser e Pollitt (2006) optaram pelo curvamento de uma lâmina de bisturi através de aquecimento, com sua posterior introdução no sítio de biópsia para causar a desconexão entre a derme e a falange distal de equinos. Sobre esta alternativa Gravena et al (2010) considerou-a inviável pela dificuldade de promover o curvamento da lâmina de bisturi ou confeccionar um instrumento semelhante, e optou por abandonar esta adaptação.

Hanly et al (2009), empregou o método de Singh et al (1993) em equinos no que se refere ao uso do *punch*, porém, utilizou-se de pinça de dissecação e bisturi para executar a desconexão da derme com a falange distal. Neste estudo foi relatado que houve dano tecidual à amostra, causado manualmente durante sua remoção com o *punch*, evento superado posteriormente com a experiência do pesquisador.

Em bovinos, Osorio et al (2012) também utilizou-se de lâmina de bisturi e pinça de dissecação, em adaptação ao método de Singh et al (1993). Nesse estudo, os autores concluíram que a quantidade de tecido obtida com o *punch* foi satisfatória para a pesquisa de expressão gênica e histopatologia das lâminas do casco. Contudo, no referido trabalho não houve um estudo detalhado das alterações histológicas das lâminas do casco, mas apenas avaliou-se a expressão gênica nas amostras obtidas. Portanto, é possível questionar a conclusão do autor, uma vez que estudos de histopatologia demandam uma quantidade maior de tecido amostral em comparação com estudos de expressão gênica. A razão disto é que na análise histopatológica é necessário e desejável avaliar um número maior de lâminas e na análise de expressão gênica, fragmentos pequenos permitem colher grande quantidade de material genético (Comunicação pessoal, Prof. Rafael R. Faleiros, Escola de Veterinária, UFMG, 2012). Outro aspecto é que a utilização do *punch* causou uma distorção das lâminas, caracterizada pelo “giramento” delas.

Singh et al (1994) e Randhawa et al (2012), relataram com êxito estudos em bovinos e búfalos, respectivamente, utilizando-se do método de Singh et al (1993). Porém, nestes estudos foram colhidas amostras da superfície palmar ou plantar do casco, não sendo, portanto, possível avaliar o êxito quanto à obtenção de amostras da região dorsal do casco, onde estão localizadas as lâminas dérmicas e epidérmicas. Assim, é possível perceber que diferentes adaptações foram propostas ao método do *punch* de Singh et al (1993), sempre com vistas a melhorar a eficiência da desconexão entre a derme e a epiderme. Além disto, comumente, foi necessária a utilização de mais de um instrumento, sendo necessário trocar de instrumento durante o procedimento de biópsia.

Em todos estes estudos, os autores foram unânimes em afirmar que o método proposto com adaptações ao de Singh et al (1993) viabilizou a obtenção de biópsias de boa qualidade do ponto de vista histológico, apesar de algumas dificuldades relatadas. Apesar disto, os métodos propostos por Crosser e Pollitt (2006), Hanly et al (2009), Gravena et al (2010) e Osorio et al (2012) apresentaram limitações importantes ligadas primariamente à inserção dos instrumentos utilizados para a desconexão entre a derme e a falange distal no sítio da biópsia.

Crosser e Pollitt (2006) e Gravena et al (2010), propuseram a realização de incisões em forma de quadrado na superfície da junção derme-epiderme do casco após o desgaste da camada córnea. Tais incisões devem ser feitas com lâmina de bisturi e visam delimitar o tamanho da amostra a ser colhida. Após a realização das linhas de incisão deste quadrado, deve-se introduzir a lâmina de bisturi curvada (Crosser e Pollitt, 2006) ou o esculpador de Frahm nº 2 (Gravena et al., 2010) sobre as linhas, alcançar até o fundo o limite da derme com a falange distal e promover o corte para desconectar a amostra. Nós entendemos como uma limitação importante a inserção e a movimentação dos instrumentos citados na linha de incisão da área delimitada para biópsia. Isto porque a lâmina de bisturi curvada ou o esculpador de Frahm nº 2 concorrem por espaço na linha de incisão com o tecido adjacente sofrendo dificuldades em superar a resistência natural destes tecidos. Outro aspecto é a dificuldade na movimentação destes instrumentos uma vez inseridos, para que haja o corte do limite dérmico com a falange distal. Pela restrição de espaço, as manobras são de difícil execução e acrescentam tempo ao procedimento. Além disto, ainda comprometem a qualidade da amostra obtida, sob o risco de uma desconexão insuficiente entre a derme e falange distal. Por fim, conforme relatado por Gravena et al (2010), é necessário recorrer ao auxílio da pinça de dissecação e da pinça hemostática de Halstead para concluir a remoção do fragmento de biópsia, ou seja, aumentando a complexidade e o tempo para a realização do procedimento.

Hanly et al (2009) e Osorio et al (2012) valendo-se do método de Singh et al (1993) adaptado, preferiram utilizar pinça de dissecação (para captura) e lâmina de bisturi para a remoção da amostra de biópsia, uma vez que o *punch* unicamente não foi suficiente para esta função. Tal como os instrumentos citados por Crosser e Pollitt (2006) e Gravena et al (2010), a lâmina de bisturi concorre por espaço com o tecido adjacente e enfrenta as mesmas dificuldades já mencionadas.

O pedido de patente US2012203144 “Methods and systems for treating a hoof on an ungulate mammal” refere-se a um método e sistema para tratamento de laminite através da exposição do tecido próximo às lâminas do casco a uma pressão reduzida. Esse sistema é para o tratamento da laminite e não para o diagnóstico precoce. Além disso, o presente sistema é completamente diferente do instrumento aqui pleiteado.

O pedido de patente WO2008011590 “Lameness evaluation systems and methods” refere-se a um sistema de avaliação de claudicação através de sensores wireless baseado na correlação entre o movimento dos membros com o movimento pélvico ou da cabeça. Esse sistema é para avaliação da claudicação e, não para um diagnóstico precoce. Além disso, o presente sistema é completamente diferente do instrumento aqui pleiteado.

O pedido de patente WO2007119070 “Method and system for monitoring the condition of livestock” refere-se a um método e sistema para monitorização contínua de vários parâmetros relacionados com a saúde do animal. Esse sistema pode ser utilizado para detectar, numa fase precoce, a claudicação dos animais. Apesar de permitir detectar a claudicação, esse sistema é completamente diferente do instrumento aqui pleiteado.

Assim, frente à ausência de instrumentos eficazes e com destinação específica para biópsia de casco, propusemos o presente instrumento cirúrgico, que reúne características e propriedades especificamente desenvolvidas para a obtenção de biópsias de casco em bovinos, equinos ou outros animais ungulados.

Como já referido, de todo o procedimento de biópsia de casco, o principal fator limitante é a desconexão entre a derme e a falange distal, razão pela qual foram feitas adaptações ao método de Singh et al (1993) na tentativa de otimizar esta etapa. O instrumento aqui pleiteado soluciona efetivamente a desconexão entre a derme e a falange distal, de modo mais eficaz que as alternativas atuais. O presente instrumento apresenta a vantagem e o diferencial de ser um instrumento único que reúne todas as características e propriedades necessárias à obtenção de tecido da junção derme-epiderme do casco, uma vez realizado o desgaste da camada córnea até o tecido mole.

As características e propriedades do instrumento, juntas, permitem executar todas as funções pertinentes à colheita propriamente dita de amostra de biópsia do casco quais sejam: a) a inserção do instrumento no sítio de biópsia; b) o recorte superficial da junção derme-epiderme; c) a desconexão entre a derme e a falange distal; d) a remoção do fragmento obtido do local do procedimento.

Por reunir as características e propriedades necessárias em um único instrumento, o presente instrumento viabiliza a execução da biópsia em uma única sequência ininterrupta de manobras. Esta vantagem elimina a necessidade de utilizar mais de um instrumento ou de ter que redefinir as manobras no sítio de biópsia durante o procedimento.

Esta sequência de movimentos caracteriza-se por não exigir maior esforço, é de fácil execução e adequa-se sem dificuldades ao local da biópsia, já que as partes do instrumento se harmonizam à característica anatômica do sítio da biópsia.

A obtenção da biópsia em uma sequência única de manobras se configura como uma das vantagens da presente invenção em comparação aos métodos propostos por Gravena et al (2010), Crosser e Pollitt (2006), Hanly et al (2009), Osorio et al (2012) em que foram utilizados instrumentos de uso geral em Medicina Veterinária ou Odontologia adaptados para a função.

A colheita propriamente dita da amostra de biópsia utilizando o presente instrumento pode ser realizada de forma muito mais rápida. Assim, podemos afirmar que o produto proposto simplifica o procedimento de biópsia de casco, melhora substancialmente sua eficiência,

soluciona dificuldades encontradas com o uso de outros instrumentos e, portanto, configura-se como uma solução para problemas atuais em Medicina Veterinária.

O presente instrumento permite a obtenção de uma biópsia de casco a partir de uma sequência única de movimentos, ao contrário dos estudos consultados, em que foram necessárias interrupções ao procedimento para adequação dos instrumentos e redefinição das manobras. Esta propriedade do instrumento justifica seu desempenho diferenciado e superior na obtenção de biópsias de casco. Além disso, o presente instrumento apresenta maior eficiência e rapidez à realização do procedimento de biópsia no casco.

Em suma, as vantagens do presente instrumento podem ser enumeradas da seguinte forma: 1) permite a obtenção de fragmentos de biópsia de tamanhos variáveis; 2) demanda manobras simples e de fácil execução; 3) permite a obtenção de biópsias em uma sequência única de movimentos; 4) não necessita de instrumentos auxiliares durante seu uso propriamente dito; 5) supera os demais métodos quanto à qualidade da desconexão entre a derme e a falange distal; 6) possui características e propriedades especificamente desenvolvidas para a finalidade a que se destina, não sendo adaptação de instrumentos de outra natureza; 7) apresenta desempenho, eficiência e rapidez superiores aos métodos citados na literatura.

Descrição das figuras

A **Figura 1** apresenta a vista lateral do presente instrumento (1).

A **Figura 2** mostra o presente instrumento (1), com destaque para a ponta ativa (5).

A **Figura 3** exhibe a vista explodida do instrumento (1) aqui pleiteado.

A **Figura 4** demonstra as manobras utilizadas com o presente instrumento para colheita de biópsia do casco e o fragmento de biópsia obtido.

A **Figura 5** mostra um fragmento de biópsia do casco bovino obtido com o uso do presente instrumento.

A **Figura 6** apresenta fotografias histológicas do tecido laminar do casco de bovino obtidas através de biópsia com o presente instrumento (1). A) Seta branca indica camada córnea, seta azul indica camada de lâminas dérmicas e epidérmicas intercaladas entre si, seta vermelha indica derme propriamente dita. Aumento de 4x. B) Camada de lâminas dérmicas (LD) e epidérmicas (LE) intercaladas entre si. Aumento de 10x. C) Camada de LD e LE; seta indica eixo queratinizado das LE perfeitamente distinguível. Aumento de 10x. D) Camada de LD e LE e a derme propriamente dita, mostrando a estreita relação entre as duas camadas. Aumento de 10x. E) Camada de LD e LE; seta preta indica eixo queratinizado e seta alaranjada indica membrana basal no terço médio das lâminas. Aumento de 20x. F e G) Setas alaranjadas indicam membrana basal no terço basal das lâminas, em aproximação com a derme propriamente dita. Aumento de 10x. H) Setas azuis indicam células das camadas epidérmica e dérmica; seta vermelha indica matriz extracelular; seta preta indica eixo queratinizado da LE e seta alaranjada indica membrana basal. Aumento de 40x. I) LD e LE; seta vermelha indica matriz extracelular, seta azul indica células dermais e seta roxa indica a relação das lâminas com a derme propriamente dita. Aumento de 40x. Coloração de PAS, de diferentes biópsias realizadas com o instrumento cirúrgico referido.

Descrição detalhada da tecnologia

A presente invenção consiste em um instrumento cirúrgico para realização de biópsia de casco em animais ungulados. O tecido obtido a partir de biópsia de casco pode ser utilizado como ferramenta auxiliar definitiva no diagnóstico precoce das alterações da junção derme-epiderme do casco de qualquer animal ungulado, especialmente em bovinos e equinos.

Cabe ressaltar que em face da ausência de métodos eficazes disponíveis até o momento para a obtenção de biópsias de casco, é possível que muitas alterações da junção derme-epiderme não tenham sequer sido descritas. Neste caso, o instrumento ora proposto vem a contribuir como ferramenta científica para que novos conhecimentos sejam construídos acerca das doenças podais, principalmente em bovinos e equinos, onde os impactos econômicos negativos são substanciais.

O presente instrumento (1) é caracterizado por apresentar as seguintes partes: cabo (2), haste (3), curvatura da haste (4) e ponta ativa (5) (**Figura 1**). A ponta ativa (5) é caracterizada por ser constituída de: um assoalho (6), duas paredes laterais (7 e 11), uma aresta cortante do assoalho (9) e duas arestas cortantes das paredes (8 e 10) (**Figura 2**).

O cabo (2) é a parte destinada à empunhadura do instrumento pelo Médico Veterinário durante sua utilização. O cabo (2) apresenta comprimento adequado ao punho de um adulto, acabamento preferencialmente oitavado (polígono de 8 lados) podendo também ser sextavado (polígono de 6 lados). O comprimento ideal do cabo é de 8,8cm (podendo variar, preferencialmente entre 8,5 e 10,5cm), com um ângulo de inclinação variável ($3,0^\circ$ a $4,5^\circ$), sendo preferencialmente $3,53^\circ$. Esta angulação determina que na sua porção inicial o cabo possua um diâmetro maior (preferencialmente 2,2cm), que decresce progressivamente até o limite com o segmento seguinte, a haste (3). Em outros termos, a porção inicial do cabo segue a mesma geometria do comprimento, tendo um formato esférico com preferencialmente 2,2cm de diâmetro. A porção final do cabo (2) pode apresentar um declive (entre a porção final do cabo (2) e o início da haste (3), caracterizado por uma espécie de chanfro de tamanho variável, preferencialmente 0,6cm ($0,6\pm 0,3$) de comprimento e 1,1cm ($1,1\pm 0,3$) de diâmetro (**Figuras 1, 2 e 3**).

A Haste (3) é a parte que comunica o cabo (2) à ponta ativa (5), e possui comprimento variável, preferencialmente entre $11,4\pm 2,0$ cm de comprimento e $0,9\pm 0,3$ cm de diâmetro na sua porção inicial, afinando gradativamente até o início da curvatura da haste (4), quando apresenta preferencialmente $0,35\pm 0,15$ cm de diâmetro. O comprimento do cabo (2) somado ao da haste (3) é variável, preferencialmente 20,2cm (17,9 a 23,9 cm) (**Figuras 1, 2 e 3**).

A curvatura da Haste (4), porção final da haste (3), é caracterizada por apresentar uma curvatura variável, preferencialmente de $20^\circ\pm 5^\circ$ em um comprimento variável, preferencialmente entre $1,0\pm 0,5$ cm. Destina-se a facilitar a inserção do instrumento no sítio de biópsia durante seu uso. A função da curvatura é auxiliar a movimentação (inclinação) da haste (3) dentro do sítio de biópsia facilitando a acomodação da ponta ativa (5) do instrumento no local a ser colhida a amostra. Esta movimentação da haste (3) e, por conseguinte, de sua curvatura (4), é uma das manobras realizadas pelo Médico Veterinário durante a inserção do instrumento no sítio da biópsia (**Figuras 1, 2 e 3**).

A ponta ativa (5) do instrumento é destinada à obtenção da biópsia propriamente dita, e é constituída pelo assoalho (6), duas paredes laterais (7 e 11) e três arestas cortantes (8, 9 e 10).

O assoalho (6) possui tamanho variável, preferencialmente entre 0,8 a 1,5 cm de comprimento e as duas paredes laterais (7 e 11) também apresentam tamanho variável, preferencialmente 0,35 a 0,7cm de altura e 0,02 a 0,04cm de espessura. Esta espessura também é aplicável ao assoalho (6) da ponta ativa (**Figuras 1, 2 e 3**).

O assoalho (6) destina-se a apoiar o encaixe da biópsia de casco após a realização das manobras com o instrumento pelo Médico Veterinário. Além disto, o assoalho (6) apresenta uma aresta, a aresta cortante do assoalho (9), que é responsável pela desconexão entre a derme e a falange distal (**Figuras 1, 2 e 3**).

A desconexão entre a derme e a falange distal é considerada o evento crítico na obtenção de biópsias do casco. A eficiência do presente instrumento (1) em separar derme e falange distal, se deve à aresta cortante do assoalho (9).

A ponta ativa (5) também possui duas paredes laterais (7 e 11), que apresentam duas arestas cortantes (8 e 10) (**Figuras 1, 2 e 3**). As paredes (7 e 11) são responsáveis por proteger o assoalho (6), facilitar a acomodação da amostra de biópsia durante sua obtenção e cortar o sítio de biópsia.

As arestas cortantes das paredes (8 e 10) têm a função de cortar o sítio de biópsia na sua superfície (a face dorsal do casco), junto com a aresta cortante do assoalho (9), durante a introdução do instrumento no sítio de biópsia.

A presente tecnologia pode ser melhor compreendida através dos seguintes exemplos, não limitantes.

Exemplo 1: Método de utilização do presente instrumento

Para a obtenção de uma biópsia de casco pode-se utilizar a seguinte sequência de passos:

Passo 1 - desgaste da camada córnea até o mais próximo possível do tecido mole, deixando permanecer uma fina camada córnea;

Passo 2 - delimitação do sítio de biópsia através de incisão com lâmina de bisturi;

Passo 3 - posicionamento vertical do instrumento (1) aqui pleiteado no local escolhido para biópsia (**Figura 4A**);

Passo 4 - primeira manobra com o presente instrumento (1), caracterizada pela introdução do instrumento no sítio de biópsia (**Figura 4A**);

Passo 5 - acomodação da ponta ativa (5) do presente instrumento dentro do sítio de biópsia, manobrando a haste (3) e a curvatura da haste (4) até orientar a ponta ativa (5) para a posição horizontal (**Figura 4B**);

Passo 6 - condução da ponta ativa (5) do presente instrumento rente à falange distal (**Figura 4C**);

Passo 7 - retirada do instrumento (1) do sítio de biópsia (**Figura 4D**). Após a retirada do presente instrumento, pode-se visualizar o aspecto do sítio de biópsia antes do curativo final (**Figura 4E**) e o fragmento de biópsia obtido (**Figura 4F e 5**).

As arestas cortantes (8, 9 e 10), durante o posicionamento vertical do produto (passo 3), iniciam o contato do instrumento (1) com o sítio de biópsia (depois de desgastada a camada córnea) (**Figura 4A**). Contudo, apesar destas arestas (8, 9 e 10) serem extremamente cortantes, é necessário e recomendável que seja feita a delimitação da amostra de biópsia a ser obtida por

incisão com bisturi acoplado a lâmina de bisturi nº 11 (passo 2). A área delimitada pode apresentar forma quadrangular ou retangular cujo tamanho é definido pelo Médico Veterinário. Neste procedimento, o objetivo é delimitar o sítio de biópsia e auxiliar a função de corte das três referidas arestas (8, 9 e 10) no momento em que serão introduzidas dentro do sítio de biópsia. Ressalta-se que, apesar da eficiência de corte das arestas, sua capacidade de corte não supera a de uma lâmina de bisturi. Assim, a lâmina de bisturi é usada apenas para delimitar, por incisão, a área a ser cortada. Este procedimento também reduz a resistência tecidual para o presente instrumento (1) durante a introdução no sítio de biópsia. É oportuno ressaltar que a função requerida da lâmina de bisturi neste caso é aquela à qual se destina, não havendo adaptações de sua função.

Somente após a incisão do sítio de biópsia (passo 2) é que se inicia o posicionamento do presente instrumento (1) (passo 3). Em seguida, com o instrumento (1) em posição vertical e com as três arestas (8, 9 e 10) voltadas para o local da biópsia, o Médico Veterinário realiza a primeira manobra que é a introdução do instrumento (1) dentro do sítio de biópsia (passo 4) (**Figura 4A**). Neste momento, as arestas cortantes (8, 9 e 10) devem seguir exatamente as linhas de incisão preparadas, para que seja facilitada a introdução da ponta ativa (5) do instrumento no sítio de biópsia. Nesta manobra, a resistência que a ponta ativa (5) do instrumento encontra é mínima, uma vez que a resistência tecidual da camada córnea remanescente (passo 1) foi quebrada pela incisão efetuada. Durante a introdução da ponta ativa (5) dentro do sítio de biópsia, as paredes (7 e 11) e o assoalho (6) estabelecem contato com o tecido adjacente exatamente nas linhas de incisão. Para que a resistência tecidual a esta manobra seja mínima, tanto as paredes (7 e 11) como o assoalho (6) devem possuir espessura mínima, para que não haja disputa por espaço entre estas estruturas e o tecido adjacente sobre as linhas. A introdução da ponta ativa (5) do instrumento no sítio de biópsia se encerra quando o Médico Veterinário percebe ao tato acentuada resistência ao movimento de introdução do instrumento (1) ainda na posição vertical. Este momento indica o contato das arestas cortantes (8, 9 e 10) com a falange distal (osso podal) (**Figura 4A**). Concluída esta etapa, inicia-se o passo 5, que consiste em acomodar a ponta ativa (5) do instrumento no sítio de biópsia, procurando orientar a aresta cortante do assoalho (9) em sentido horizontal (**Figura 4B**). Esta manobra prepara a ponta ativa (5) do instrumento para a manobra seguinte, contida no passo 6. O passo 6 é o passo para a obtenção da amostra tecidual, e consiste na condução da ponta ativa (5) do instrumento o mais rente possível à falange distal em sentido medial, lateral, distal ou proximal ao casco (conforme a região escolhida para a biópsia), porém sempre de modo paralelo à falange. A movimentação da ponta ativa (5) rente à falange distal estabelece o contato íntimo da aresta cortante do assoalho (9) com a derme, que se encontra firmemente aderida à falange. Este contato da aresta do assoalho (9) com a derme é responsável pelo corte desta última durante a movimentação da ponta ativa (5) no sítio da biópsia. A manobra executada pelo Médico Veterinário é a de conduzir a ponta ativa (5) rente à falange distal. Esta manobra faz com que a ponta ativa (5) siga um trajeto. Durante o trajeto, a aresta cortante do assoalho (9) corta a derme aderida à falange distal, e, portanto desconecta-a desta última (**Figura 4C**). A retirada do instrumento (1) do sítio de biópsia (passo 7) é ato contíguo ao passo 6, sendo realizado naturalmente (**Figura 4D**). A execução dos passos três a sete pode ser executada em menos de um minuto.

A utilização do presente instrumento (1) é executada em cinco passos (passos 3, 4, 5, 6 e 7), concatenados em uma sequência única de manobras (**Figura 4**). Isto significa que uma vez iniciado o uso do instrumento (1), as manobras anteriores se harmonizam e se coadunam com as seguintes para que o resultado final seja alcançado. Não há necessidade de interrupções seja para redefinição de manobras ou troca de instrumentos. Esta propriedade do presente instrumento (1) justifica seu desempenho diferenciado e superior na obtenção de biópsias de casco.

Exemplo 2: Estudo de biópsia de casco obtidas através do emprego do presente instrumento

O presente instrumento (1) foi testado *ex vivo* em patas de bovinos e *in vivo*. Para o teste *in vivo* realizou-se a contenção física do animal levando-o a posição de decúbito lateral. Foi feita a limpeza dos cascos com água para remoção da matéria orgânica e demais resíduos impregnados. Em seguida, realizou-se limpeza e antissepsia da região da articulação metacarpofalangeana ou metatarsofalangeana e das unhas do casco nos quais foram obtidas as amostras de biópsia.

Para o desgaste da camada córnea do casco utilizou-se ferramenta rotativa do tipo microretífica, a qual se acoplou um acessório chamado escareador 1/18.

A microretífica foi posicionada horizontalmente de modo que o escareador também assumisse a posição horizontal sobre a unha a ser manipulada. O escareador acoplado à microretífica realizou movimentos rotativos a uma velocidade de aproximadamente 10.000 rpm. Durante estas rotações, o escareador desgastou gradativamente a camada córnea. O objetivo do desgaste foi alcançar o mais próximo possível do tecido mole, ou seja, a junção derme-epiderme ou tecido laminar do casco, onde se encontram as lâminas dérmicas e epidérmicas. Durante o desgaste, o referencial para supor o surgimento do tecido mole foi a mudança de coloração do sítio de biópsia (surgimento de um tom róseo) e a presença de macicez moderada mediante palpação com auxílio de agulha descartável.

Após o desgaste da camada córnea foi feita a delimitação do sítio de biópsia em forma retangular. Para isto, utilizou-se uma lâmina de bisturi em sentido vertical partindo da superfície do sítio de biópsia até alcançar a falange distal. As incisões foram feitas em formato retangular, com dimensões aproximadas de 7 mm de largura x 17 mm de comprimento. Este retângulo demarcado por linhas de incisão determinou o tamanho (comprimento e largura) da amostra a ser obtida pelo presente instrumento.

As linhas de incisão realizadas se encaixaram nas arestas das paredes (8 e 10) e na aresta do assoalho (9), facilitando a introdução do presente instrumento (1) no sítio de biópsia. Além de delimitar a área de tecido a ser colhida, a definição do sítio de biópsia por incisão reduziu drasticamente a resistência tecidual que as arestas cortantes das paredes (8 e 10) e do assoalho (9) do presente instrumento (1) enfrentaram durante a introdução do instrumento no sítio. Embora as arestas (8, 9 e 10) do instrumento (1) sejam extremamente cortantes, seu poder de corte não ultrapassa o de uma lâmina de bisturi.

A utilização do presente instrumento (1) foi feita mediante a realização de cinco manobras simples no sítio de biópsia. A primeira manobra é o posicionamento vertical do presente instrumento (1) com as arestas cortantes (8, 9 e 10) voltadas para o sítio de biópsia. A segunda manobra caracteriza-se pela introdução do instrumento (1) no sítio de biópsia exatamente sobre as linhas de incisão realizadas em etapa anterior (**Figura 4A**). Nesta manobra deve-se conduzir o instrumento (1) até a falange distal, o que deve ser confirmado pela acentuada resistência ao movimento introdutório do instrumento (1), uma vez alcançado este tecido. A terceira manobra consiste em acomodar a ponta ativa (5) do instrumento no sítio de biópsia, pela inclinação do cabo (2) e, por conseguinte, da haste (3) e de sua curvatura (4) em sentido diagonal (**Figura 4B**). O objetivo desta manobra é orientar a ponta ativa (5) e principalmente a aresta cortante do assoalho (9) do instrumento em sentido horizontal, preparando-a para a manobra seguinte. A quarta e definitiva manobra consiste na condução da ponta ativa (5) do presente instrumento (1) rente à falange distal em sentido lateral, medial,

distal ou proximal (conforme o local de biópsia) (**Figura 4C**). É nesta manobra que ocorre a desconexão entre a derme e a falange distal, pelo corte da derme que é realizado pela aresta cortante do assoalho (9) durante seu trajeto. Quanto mais rente à falange distal for a condução do instrumento, maior será a área de derme desconectada. A quinta manobra é ato contínuo ao anterior e consiste na retirada do instrumento (1) do sítio de biópsia (**Figura 4D**). A sequência de manobras para obtenção da amostra de biópsia resultará naturalmente na acomodação da amostra no assoalho (6) protegido pelas paredes (7 e 11).

Os fragmentos obtidos apresentaram dimensões aproximadas de 16 mm de comprimento e 6 mm de largura (**Figura 5**). Estas dimensões oscilaram ligeiramente conforme cada biópsia realizada.

A quantidade e qualidade de tecidos obtidos foram consideradas suficientes e satisfatórias para estudos histológicos (microscopia ótica ou eletrônica) e de biologia molecular nas biópsias realizadas.

As amostras obtidas foram fixadas em formol tamponado a 4% por 48 horas, processadas histotécnicamente e incluídas em parafina. Cortes histológicos de 5µm de espessura foram obtidos em lâminas e corados por Hematoxilina e Eosina (H&E) e Ácido Periódico de Schiff (PAS), para avaliação da qualidade histológica das amostras (**Figura 6**).

As colorações de H&E e PAS permitiram evidência nítida e uniforme das características histológicas teciduais quais sejam: distinção da camada córnea, da camada onde se encontram as lâminas dérmicas e epidérmicas e derme; perfeita distinção dos núcleos das células epidérmicas, dérmicas e da matriz extracelular, da membrana basal e do eixo queratinizado das lâminas. Nas colorações de H&E e PAS os núcleos se apresentaram basofílicos enquanto o citoplasma, a matriz extracelular, o eixo queratinizado e a camada córnea se apresentaram eosinofílicos. O eixo queratinizado e a camada córnea se apresentaram fracamente eosinofílicos em comparação com a matriz extracelular. A arquitetura tecidual se apresentou normal e preservada. Na coloração de PAS visualizou-se a membrana basal (eosinofílica), contínua e sem interrupções (**Figura 6**). As lâminas não apresentaram nenhum tipo de distorção (giramento) ou fraturas que comprometessem sua qualidade histológica.

REIVINDICAÇÕES

- 1. Instrumento cirúrgico para realização de biópsia de casco caracterizado por** ser composto por cabo (2), haste (3), e ponta ativa (5), sendo esta constituída de um assoalho (6), duas paredes laterais (7 e 11), uma aresta cortante do assoalho (9) e duas arestas cortantes das paredes (8 e 10).
- 2. Instrumento cirúrgico para realização de biópsia de casco, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo** cabo (2) apresentar comprimento variável, preferencialmente entre 8,5 e 10,5cm, com ângulo de inclinação preferencialmente de 3,53°, podendo variar entre 3,0° a 4,5°; acabamento preferencialmente oitavado, podendo ser sextavado, com diâmetro decrescente desde a porção inicial, preferencialmente 2,2cm, até o limite com o segmento seguinte, a haste (3); pela porção inicial do cabo seguir a mesma geometria do comprimento, tendo um formato esférico, preferencialmente 2,2cm de diâmetro; e pela porção final do cabo (2) poder apresentar um declive (entre a porção final do cabo (2) e o início da haste (3)), uma espécie de

chanfro preferencialmente de 0,6cm ($0,6\pm 0,3$) de comprimento e 1,1cm ($1,1\pm 0,3$) de diâmetro.

3. **Instrumento cirúrgico para realização de biópsia de casco, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela haste (3) comunicar o cabo (2) à ponta ativa (5), e possuir comprimento e diâmetro variáveis, preferencialmente entre $11,4\pm 2,0$ cm de comprimento e $0,9\pm 0,3$ cm de diâmetro na sua porção inicial, afinando gradativamente até o início da curvatura da haste (4).**
4. **Instrumento cirúrgico para realização de biópsia de casco, de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo comprimento do cabo (2) somado ao da haste (3) poder ser variável, preferencialmente entre 17,9 a 23,9cm.**
5. **Instrumento cirúrgico para realização de biópsia de casco, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela haste (3) apresentar em sua porção final uma curvatura (4) preferencialmente entre $20^\circ\pm 5^\circ$, que faz a conexão da haste (3) com a ponta ativa (5) e apresenta comprimento preferencialmente entre $1,0\pm 0,5$ cm, e diâmetro preferencialmente $0,35\pm 0,15$ cm.**
6. **Instrumento cirúrgico para realização de biópsia de casco, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo assoalho (6) apresentar comprimento preferencialmente entre 0,8 e 1,5cm e as duas paredes laterais (7 e 11) apresentar altura preferencialmente entre 0,35 e 0,7cm e espessura preferencialmente entre 0,02 a 0,04cm tanto para o assoalho quanto para as paredes.**
7. Uso do instrumento cirúrgico, caracterizado por ser utilizado na obtenção de biópsia de casco em animais ungulados.

FIGURAS

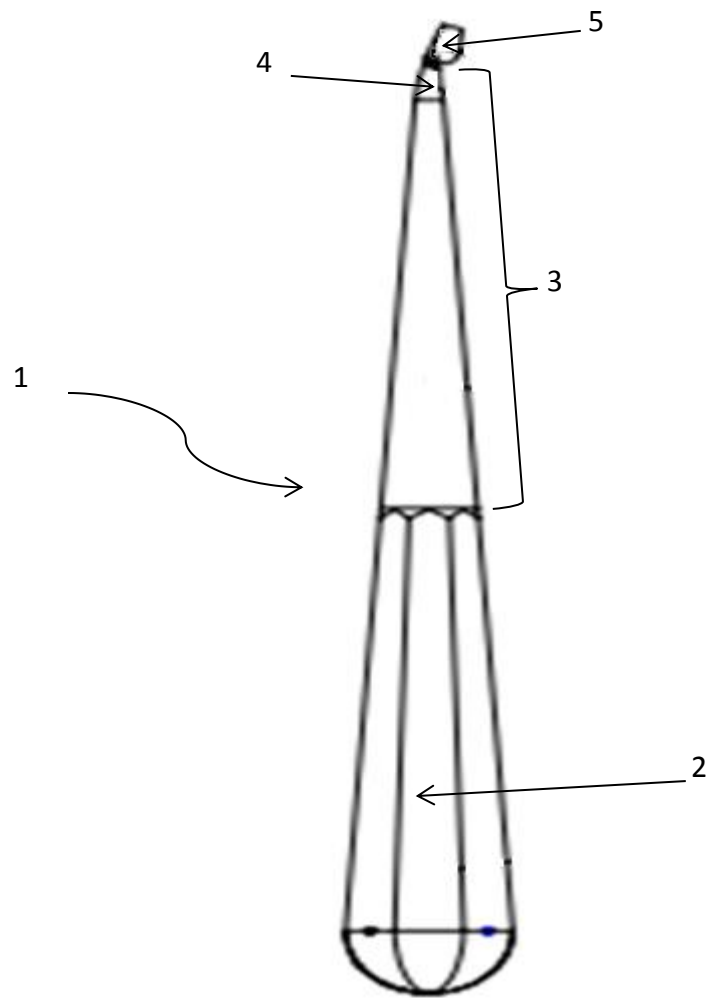


Figura 1

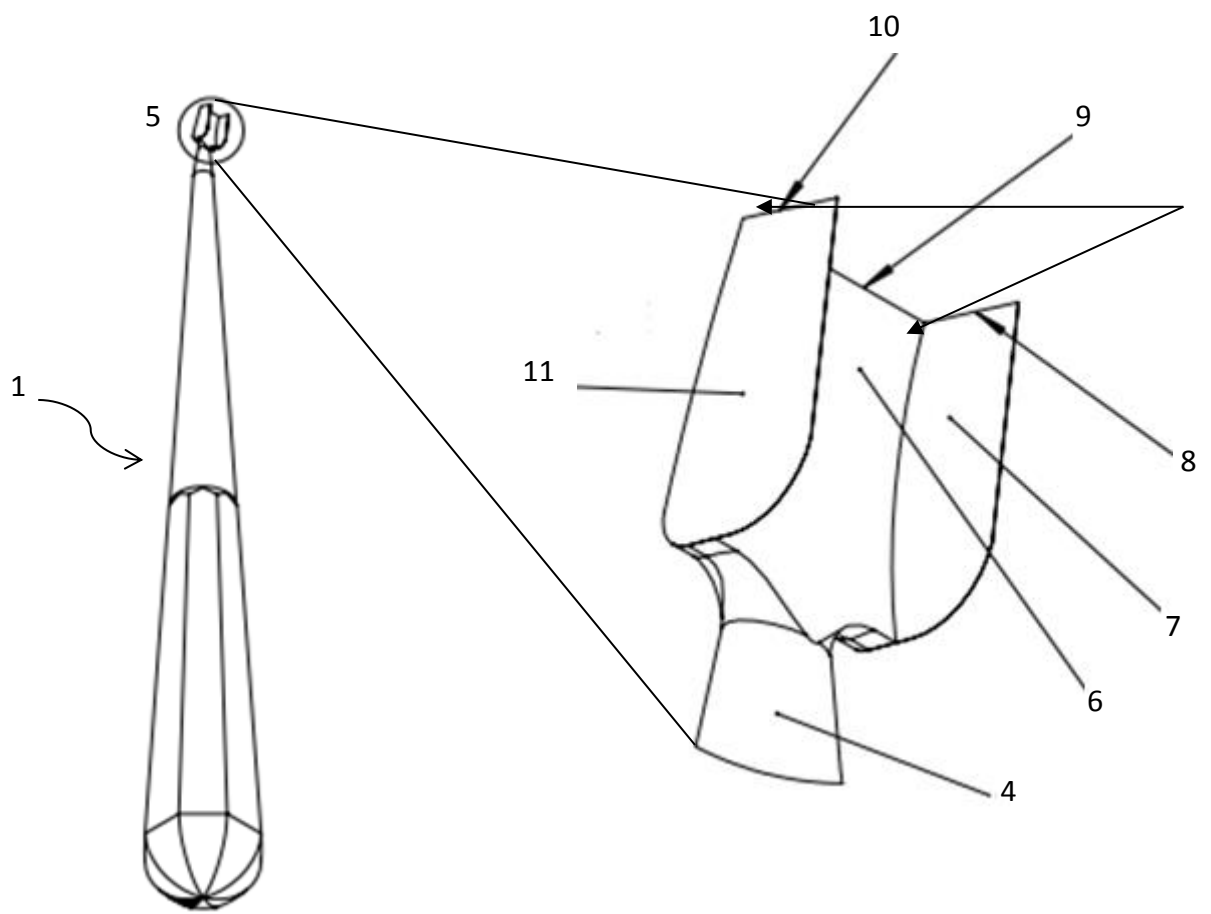


Figura 2

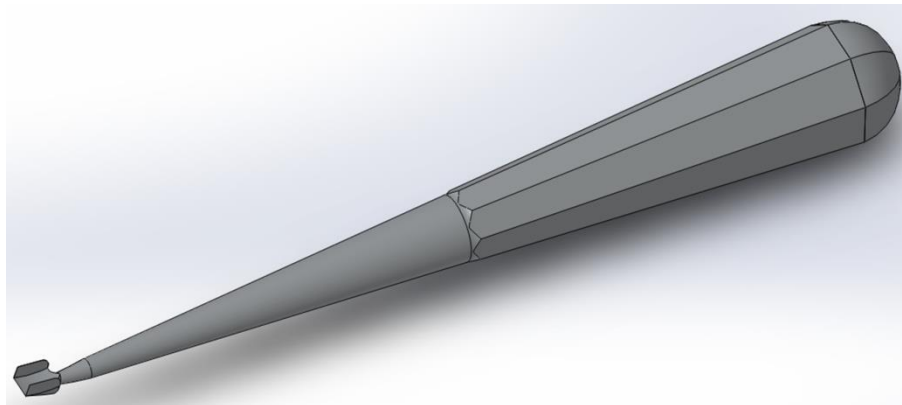


Figura 3

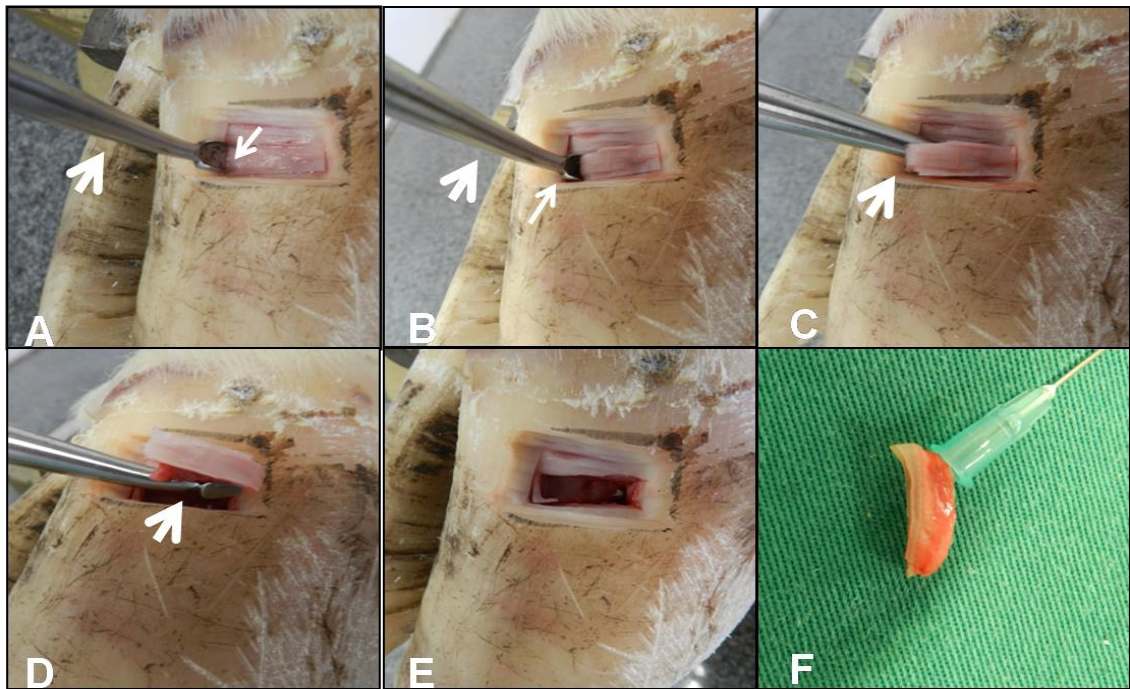


Figura 4

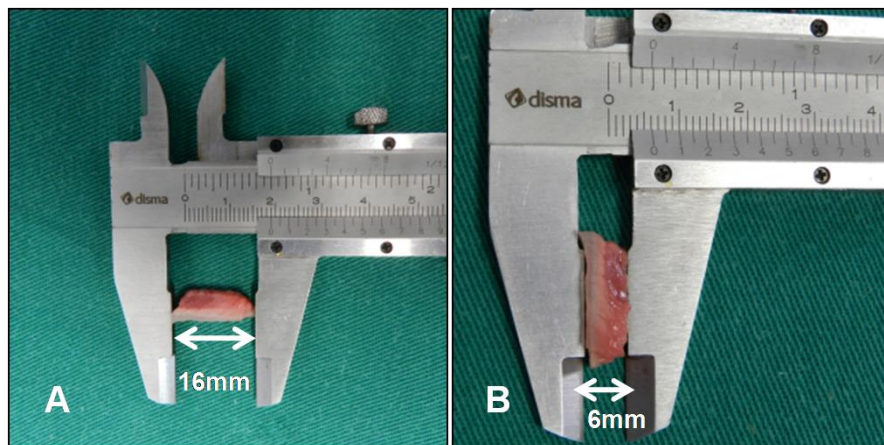
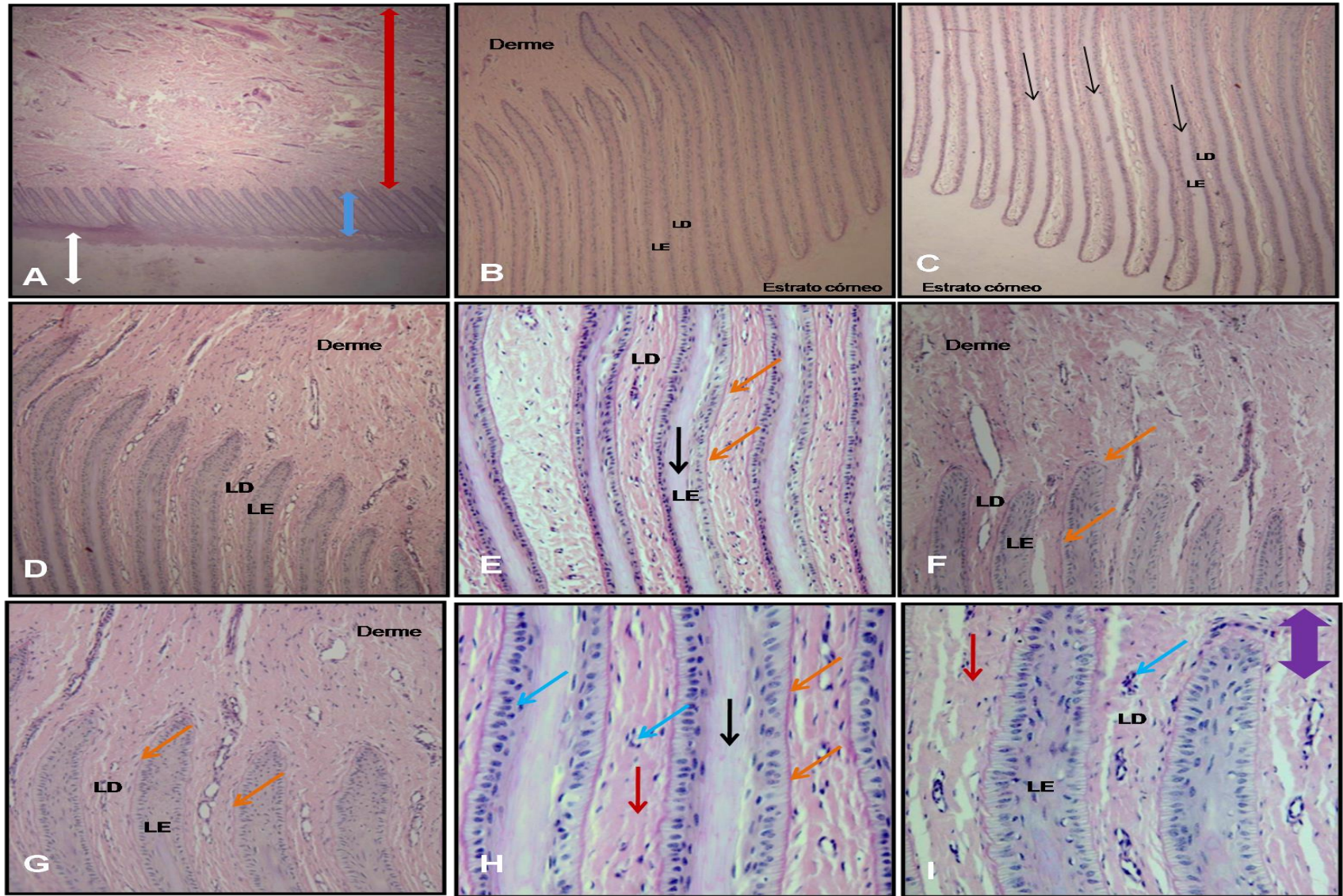


Figura 5



RESUMO

“INSTRUMENTO CIRÚRGICO PARA REALIZAÇÃO DE BIÓPSIA DE CASCO EM ANIMAIS UNGULADOS”

A presente invenção consiste em um instrumento cirúrgico para realização de biópsia de casco em animais ungulados. O tecido obtido a partir de biópsia de casco pode ser utilizado como ferramenta auxiliar definitiva no diagnóstico precoce das alterações da junção derme-epiderme do casco de qualquer animal ungulado, especialmente em bovinos e equinos.

7. CAPÍTULO II - PROCEDIMENTOS INICIAIS PARA REALIZAÇÃO DE BIÓPSIA DO TECIDO LAMINAR DO CASCO DE BOVINOS

Os primeiros procedimentos necessários para a realização de biópsia do tecido laminar do casco de bovinos são a sedação seguida de contenção animal. Os fármacos utilizados neste estudo foram xilazina e acepromazina na dose de 0,04mg/kg em associação. A contenção animal pode ser feita com o animal em decúbito lateral por derrubada ou em troncos especiais. Neste trabalho, a contenção foi realizada predominantemente levando os animais à posição de decúbito lateral, e em algumas raras ocasiões foi utilizado o decúbito esternal. Nesta etapa é importante ter acesso ágil e amplo à parede dorsal do casco, onde se pretende obter a amostra de biópsia.

Na espécie equina, a contenção farmacológica é a mais utilizada, procurando manter o animal em posição quadrupedal (ALVES et al., 2004; HANLY et al., 2009; PAES LEME et al., 2010). No caso da espécie bovina ou bubalina, a posição quadrupedal foi utilizada para a obtenção de tecido da região da sola do casco (SINGH et al., 1993; SINGH et al., 1994; RANDHAWA et al., 2012). Contudo, quando o tecido alvo foi o tecido laminar, a posição de decúbito lateral foi escolhida utilizando troncos especiais (OSORIO et al., 2012).

Vale salientar que a disponibilidade de tronco específico para exame de casco é um aspecto que favorece muito a execução de biópsias de casco em bovinos. A presença deste equipamento pode se configurar como uma facilidade operacional para a realização do procedimento e significar menor resistência por parte dos proprietários em situações de campo. Apesar disto, na ausência deste equipamento a contenção farmacológica e física utilizadas neste estudo se mostraram viáveis e pertinentes.

A etapa seguinte consiste na limpeza e antissepsia rigorosas das unhas a serem manipuladas, considerando um procedimento cirúrgico limpo.

Em seguida, inicia-se o bloqueio anestésico utilizando lidocaína a 2% sem vasoconstritor. As técnicas de anestesia local utilizadas e testadas foram: anestesia de Bier, bloqueio em três pontos (SALOMON e GEYER, 2006) e bloqueio abaxial sesamóideo. Para a anestesia de Bier, procedeu-se à realização de garroteamento do membro na altura logo acima do carpo ou tarso. Para a anestesia foram utilizadas as veias abaxiais palmares ou plantares do dígito manipulado. O acesso venoso foi feito através de *scalp* 19G (Gauge). Fez-se a infusão lenta de anestésico local (lidocaína a 2% sem vasoconstritor) em um volume de 20-35 ml (VAN AMSTEL e SHEARER, 2006). Para o bloqueio anestésico em três pontos (SALOMON e GEYER, 2006), a um 1,5cm proximal da articulação metacarpofalangeana proximal, introduziu-se a agulha transversalmente no tecido subcutâneo para bloqueio dos nervos dorsais (dorsalmente), palmar medial (medialmente) e palmar lateral (lateralmente) com lidocaína a 2% sem vasoconstritor.

Dentre os bloqueios anestésicos testados, a anestesia de Bier foi a escolha menos eficaz, não pelo bloqueio anestésico mas pelas interferências sobre os resultados histológicos. Durante a análise histopatológica das primeiras biópsias obtidas, observou-se moderado grau de congestão vascular na derme. Embora não se possa confirmar, acredita-se que tal congestão foi resultado do garroteamento realizado durante a anestesia de Bier. No intuito de eliminar este fator de confundimento durante as análises histopatológicas, optou-se pela utilização dos outros dois tipos de bloqueio, tendo sido usado predominantemente o bloqueio em três pontos (SALOMON

e GEYER, 2006). Bloqueio semelhante foi utilizado em bovinos, envolvendo os ramos abaxial e axial dos nervos dorsal e palmar ou plantar (OSORIO et al., 2012). Em equinos, foram utilizados o bloqueio dos nervos digitais sesamóideos abaxial e lateral (CROSSER e POLLITT, 2006; HANLY et al., 2009; GRAVENA et al., 2010) e em búfalos, utilizou-se bloqueio do espaço interdigital para colheita de biópsias da sola (RANDHAWA et al., 2012). Não houve relato de intercorrências envolvendo os bloqueios utilizados.

A próxima etapa é a fixação dos campos cirúrgicos. Em seguida, inicia-se o primeiro passo propriamente dito em direção à colheita de biópsia, que é o desgaste da camada córnea do casco, com o intuito de alcançar o mais próximo possível o tecido laminar.

Como mencionado anteriormente, o tecido laminar ou junção derme-epiderme situa-se abaixo do estojo córneo do casco e aderido a ele, comunicando-se com a falange distal através de uma derme rica em fibras colágenas (GREENOUGH, 2007).

O objetivo do desgaste da camada córnea é eliminar a resistência tecidual desta camada do casco, alcançando-se o mais próximo possível do tecido mole e possibilitando o uso do lamelótomo de Falcão-Faleiros. Este instrumento não foi desenvolvido para romper toda a resistência da camada córnea do casco, mas sim para atuar sobre a junção derme-epiderme (tecido mole) recoberta apenas por fina camada remanescente de tecido queratinizado. Portanto, o desgaste da camada córnea do casco é um procedimento necessário antes da utilização do lamelótomo de Falcão-Faleiros.

O desgaste da camada córnea neste trabalho foi feito utilizando-se ferramenta rotativa do tipo microretífica (Dremel®, F300), amplamente disponível no mercado de ferramentas em geral. A esta ferramenta acoplou-se um acessório denominado escareador 3/8". Este acessório caracteriza-se por apresentar uma serra circular em sua extremidade, com capacidade de desgaste a medida que são feitos os movimentos rotativos da microretífica (Figuras 1 e 2).

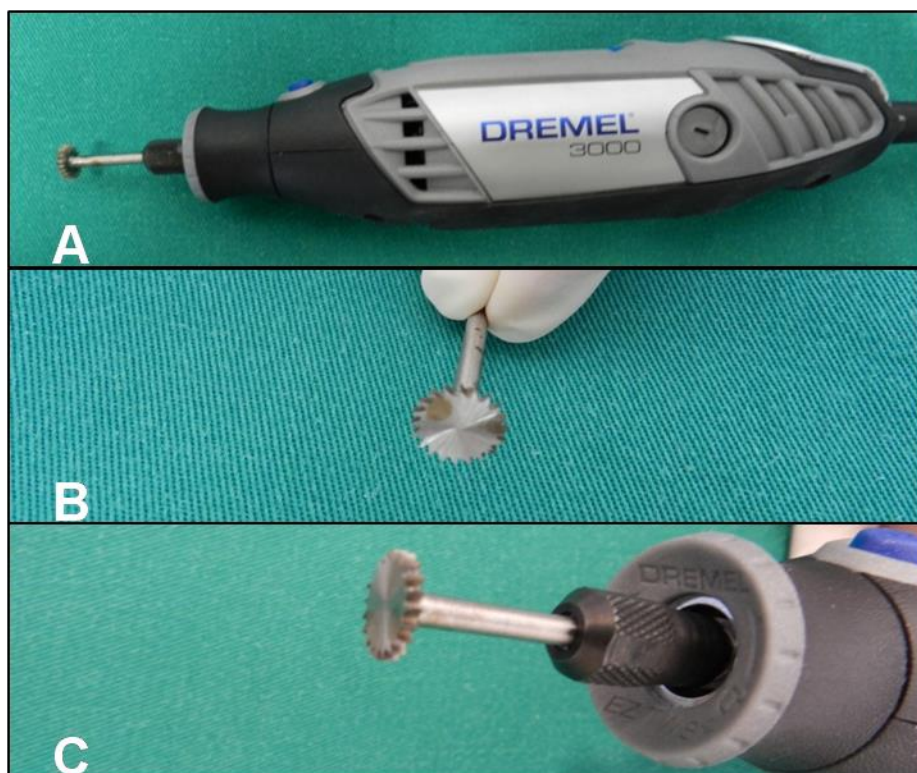


Figura 1 – Ferramenta microretífica e escareador 3/8” utilizados para desgaste da camada córnea do casco de bovino. A) Microretífica com escareador acoplado; B) Vista detalhada do escareador; C) Vista detalhada da microretífica com escareador acoplado, prontos para uso.

Inicialmente foi feita com pincel atômico a delimitação em forma retangular da área de camada córnea a ser desgastada. Em seguida, iniciou-se o uso da microretífica acoplada ao escareador. A microretífica foi posicionada horizontalmente de modo que o escareador também assumisse a posição horizontal sobre a unha a ser manipulada. O escareador acoplado à microretífica realizou movimentos rotativos a uma velocidade de aproximadamente 10.000 rpm (rotações por minuto). Durante estas rotações, o escareador desgastou gradativamente a camada córnea. O referencial para supor a proximidade do tecido mole foi a mudança de coloração do sítio de biópsia (surgimento de um tom róseo) e a presença de maciez moderada mediante teste com agulha descartável 40x12mm (Figura 2).

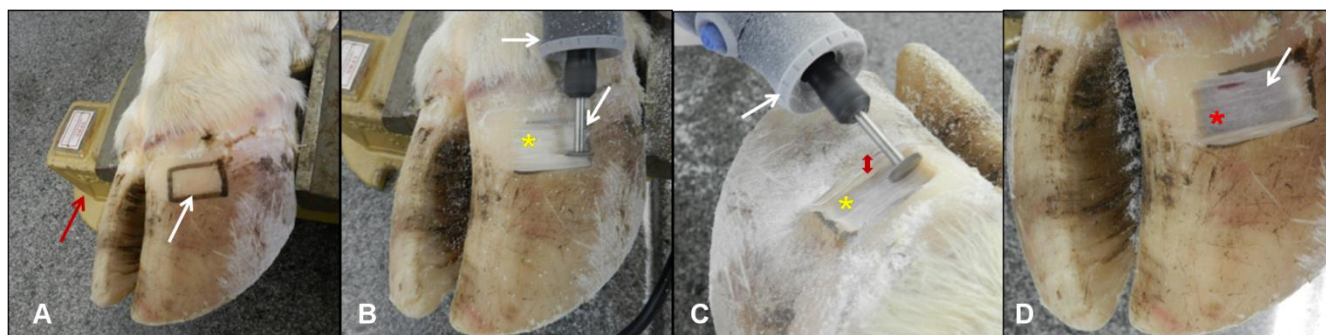


Figura 2 - Demonstração do desgaste da camada córnea do casco bovino em peça anatômica. A) Seta vermelha indica torno para fixação da peça; seta branca indica área retangular a ser desgastada definida

com pincel atômico; B) Setas brancas indicam posicionamento horizontal da microretífica e do escareador sobre a unha; asterisco indica camada córnea esbranquiçada a ser desgastada. C) Seta vermelha indica a espessura de camada córnea já desgastada; asterisco indica camada córnea esbranquiçada a ser desgastada e seta branca indica pó fino oriundo do desgaste. D) Seta indica aspecto final após desgaste da região; asterisco indica permanência de fina camada córnea esbranquiçada e surgimento de tom avermelhado.

Nos estudos consultados, o desgaste da camada córnea foi realizado de maneiras diferentes. Utilizou-se broca de diferentes diâmetros acoplada à furadeira (SINGH et al., 1993; SINGH et al., 1994; CROSSER e POLLITT, 2006; HANLY et al., 2009; RANDHAWA et al., 2012; OSORIO et al., 2012). Em outros estudos, utilizaram-se instrumentos para casqueamento como grosa e rineta (ALVES et al., 2004; PAES LEME et al., 2010). GRAVENA et al (2010) utilizou microretífica acoplada à pedra de esmerilar. No presente estudo, utilizou-se microretífica acoplada a escareador 3/8". O uso conjunto da microretífica e do escareador 3/8" como realizado neste trabalho não foi citado na literatura consultada.

A microretífica acoplada a escareador permitiram a realização do desgaste da camada córnea utilizando esforço mínimo e de forma rápida e fácil, conferindo agilidade e reduzindo o tempo de biópsia. A rapidez com que foi executado e o esforço mínimo realizado superaram o método proposto por ALVES et al (2004), quando o uso de grosa e rineta exigia esforço físico por parte do Médico Veterinário e maior tempo até alcançar-se o tecido mole. Em comparação com a broca e o esmerilador utilizados nos estudos citados, o escareador também mostrou-se mais favorável. Isto porque com o escareador é possível desgastar a camada córnea em diferentes formatos como figuras planas do tipo retângulo ou quadrado de tamanhos variáveis, possibilitando a escolha por parte do Médico Veterinário da área a ser desgastada e do tamanho da biópsia a ser obtida. As brocas e o esmerilador utilizados nos estudos acima citados permitiram apenas a obtenção de um orifício circular na camada córnea do casco, reduzindo o tamanho das biópsias ao diâmetro destas brocas ou esmerilador. Ao contrário, o escareador oferece ao Médico Veterinário a possibilidade de escolher, a seu critério, o tamanho da área a ser desgastada e, portanto, o tamanho do fragmento de biópsia a ser obtido. Isto é possível porque o escareador não possui limitantes para a área do desgaste que ele pode realizar no casco. Deste modo, o Médico Veterinário pode optar por fragmentos de biópsia maiores ou menores.

Neste estudo, de modo geral os fragmentos obtidos tiveram tamanho de 16mm de comprimento por 6mm de profundidade. Fragmentos maiores viabilizam tanto estudos da histologia do casco como de sua biologia molecular. Assim, na necessidade de estudos apenas da biologia molecular do casco, fragmentos menores podem ser escolhidos e o escareador pode limitar o tamanho da amostra para dimensões menores às que foram obtidas neste trabalho. Utilizando o método do *punch*, OSORIO et al (2012) obtiveram fragmentos pequenos, de aproximadamente 0,5mm destinados a estudos da biologia molecular do casco. GRAVENA et al (2010) obteve amostras com 9mm de comprimento para estudos da histologia envolvendo microscopia ótica e eletrônica. Em ambos estes estudos, o tamanho dos fragmentos obtidos foi muito próximo do diâmetro da broca e do *punch* utilizados.

A escolha de fragmentos de biópsia menores resulta em menor ferida cirúrgica no casco, o que pode ser um aspecto favorável em situações de campo para o Médico Veterinário. Finalmente, o lamelótomo de Falcão-Faleiros oferece opções ao profissional quanto ao tamanho das biópsias colhidas. Tal fato deve ser citado como um diferencial do produto frente aos métodos atualmente utilizados.

Durante o desgaste, é preciso identificar o momento de interrompê-lo para iniciar o uso do lamelótomo de Falcão-Faleiros. Uma forma de identificar este momento é o aparecimento de um tom róseo na superfície da área desgastada indicando a presença de tecido vascularizado (tecido mole) (SINGH et al., 1993). Havendo dúvida sobre a proximidade deste tecido, uma alternativa é testar a macicez da área com agulha descartável 40x12mm. Neste caso, testa-se a agulha sobre o tecido visível e verifica-se a resistência tecidual. Pouca macicez indica a presença de espessa camada córnea. No caso de acentuada ou moderada macicez significa que o tecido mole apresenta-se logo abaixo do tecido visível, podendo já ser utilizado o lamelótomo de Falcão-Faleiros. É importante preservar parte da camada córnea durante o seu desgaste, para que se mantenham os referenciais histológicos da biópsia colhida. Contudo, esta camada córnea deve ser o mais fina possível. Caso seja muito espessa, ela aumentará a resistência que o lamelótomo de Falcão-Faleiros irá enfrentar durante sua inserção no sítio de biópsia. Caso seja muito fina, há o risco de lesão tecidual do sítio de biópsia pelo escareador, fato que prejudicaria a qualidade da biópsia.

O desgaste da camada córnea pelo escareador acoplado à microretífica gerou um pó fino esbranquiçado (Figura 2C), resultante da destruição da camada queratinizada. Este resíduo deve ser removido constantemente durante o uso do escareador para que se visualize o progresso do desgaste da camada córnea (Figuras 2C e 2D).

Após o desgaste da camada córnea foi feita a delimitação das bordas internas do sítio de biópsia. Para isto, utilizou-se bisturi acoplado a lâmina nº 11 (*in vivo*) ou 20 (*ex vivo*). Introduziu-se a lâmina de bisturi em sentido vertical partindo da superfície do sítio de biópsia até alcançar a falange distal. As incisões foram feitas em formato retangular, com dimensões aproximadas de sete milímetros de largura x 17 mm de comprimento. Este retângulo demarcado por linhas de incisão determinou o tamanho (comprimento e largura) da amostra a ser obtida pelo lamelótomo de Falcão-Faleiros (Figura 3). O outro objetivo destas linhas de incisão é reduzir a resistência tecidual a ser enfrentada pelo instrumento durante sua introdução no sítio de biópsia. Com esta estratégia, a entrada do instrumento é facilitada e isto resulta na redução do tempo de biópsia.

Após realizadas todas as etapas acima detalhadas, inicia-se o uso do lamelótomo de Falcão-Faleiros conforme descrito no capítulo I.

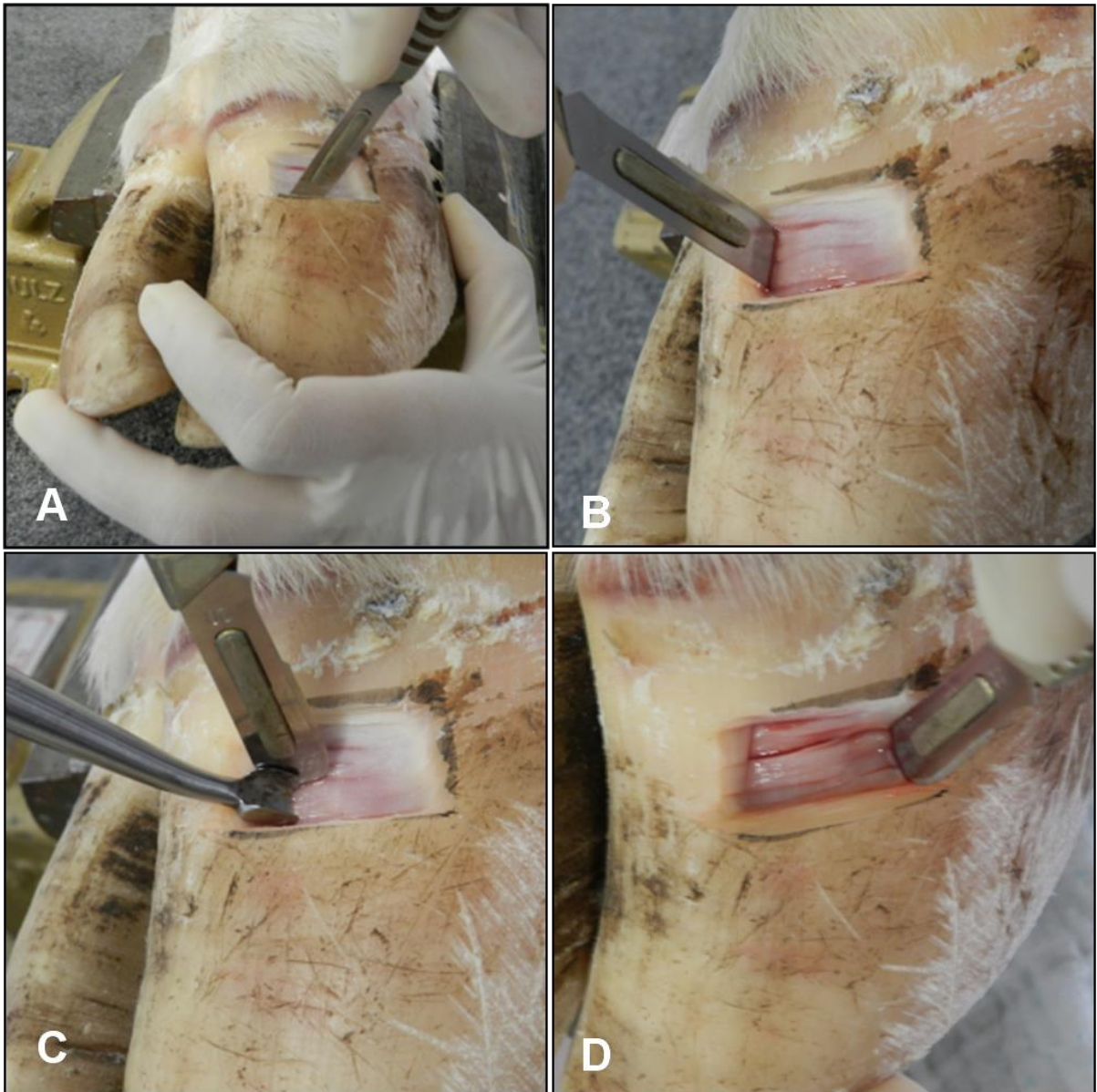


Figura 3 - Demonstração da delimitação das bordas internas do sítio de biópsia em casco de peças anatômicas de bovino obtidas em frigorífico. A área delimitada possuía forma retangular. A e C mostram as linhas de incisão do comprimento do retângulo. B e D mostram as incisões da largura do retângulo. Em C, utilizou-se o próprio lamelótomo de Falcão-Faleiros como referencial para o início da linha de incisão que determinou a largura do retângulo. Notar que a área de tecido córneo desgastada foi superior à do sítio de biópsia.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, G.E.S., PAES LEME, F.O., MARVAL, C.A., BONNA, F.A.B., XAVIER, S.H.N., FALEIROS, R.R., SANTOS, R.L. 2004. Biópsia digital em equinos com laminite induzida por

sobrecarga de carboidratos. **Brasilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 41 (supl), 264-265.

BELKNAP, J.K., GIGUÈRE, S., PETTIGREW, A., COCHRAN, A.M., VAN EPS, A.W., POLLITT, C.C. 2007. Lamellar pro-inflammatory cytokine expression patterns in laminitis at the developmental stage and at the onset of lameness: innate vs. adaptive immune response. **Equine Veterinary Journal**, 39 (1): 42-47. doi:10.2746/042516407X155406.

BLOWEY, R.W. 2008. Claudicação. In: ANDREWS, A.H. **Medicina bovina: doenças e criação de bovinos**. 2.ed. São Paulo: Roca. p.362-384.

BOOSMAN, R., NEMETH, F., GRUYS, E., KLARENBECK. 1989. Arteriographical and pathological changes in chronic laminitis in dairy cattle. **Veterinary Quarterly**, 11 (3): 144-155. doi: 10.1080/01652176.1989.9694213

CROSER, E.L. e POLLITT, C.C. 2006. Acute laminitis: descriptive evaluation of serial hoof biopsies. **AAEP proceedings**, v. 52, 542-546.

DANSCHER, A.M., TOELBOELL, T.H., WATTLE, O. 2010. Biomechanics and histology of bovine claw suspensory tissue in early acute laminitis. **Journal of Dairy Science**, 93:53-62.

DE LAAT, M.A., MCGOWAN, C.M., SILLENCE, M.N., POLLITT, C.C. 2010. Equine laminitis: Induced by 48 h hyperinsulinaemia in Standardbred horses. **Equine Veterinary Journal**, 129, 42 (2) 129-135.

DE LAAT, M.A., SILLENCE, M.N., MCGOWAN, C.M., POLLITT, C.C. 2012. Continuous intravenous infusion of glucose induces endogenous hyperinsulinaemia and lamellar histopathology in Standardbred horses. **The Veterinary Journal**, 191: 317-322.

ENEMARK, J.M.D. 2009. The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA): A review. **The Veterinary Journal**, 176: 32-43.

FALEIROS, R. R., JOHNSON, P.J., NUOVO, G.J., MESSER, N.T., BLACK, S.J., BELKNAP, J.K. 2011. Lamellar leukocyte accumulation in horses with carbohydrate overload induced-laminitis. **Journal of Veterinary Medicine**, v.1,107-115.

FERREIRA, P.M., LEITE, R.C., CARVALHO, A.U., FACURY FILHO, E.J., SOUZA, R.C., FERREIRA, M.G. 2004. Results and costs of treatment for bovine laminitis sequelae: study of 112 lameness cases in lactating cows in free-stall system. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.5, 589-594.

GOLLNICK, N.S., SCHARR, J.C., SCHARES, G., LANGENMAYER, M.C. 2015. Natural *Besnoitia besnoiti* infections in cattle: chronology of disease progression. **BMC Veterinary Research**, 11:35. doi 10.1186/s12917-015-0344-6

GRAVENA, K., SAMPAIO, R.C.L., DIAS, D.P.M., CANOLA, P.A., PEIRÓ, J.R., LACERDA-NETO, J.C. 2010. Evaluation of the integrity of horse hoof dermal and epidermal tissues collected by dorsal transmural. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, p. 858-862.

GREENOUGH, P.R. **Bovine laminitis and lameness: a hands-on approach**. Elsevier, 2007. 311p.

- HANLY, B.K., STOKES, A.M., BELL, A.M., JOHNSON, J.R., KEOWEN, M.L., PAULSEN, D.B., SOD, G.A., MOORE, R.M. 2009. Use of serial lamellar tissue collection via biopsy in conscious healthy horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 7, n.6, 697-702.
- HENDRY, K.A.K., MACCALLUM, A.J., KNIGHT, C.H., WILDE, C.J. 1997. Laminitis in the dairy cow: a cell biological approach. **Journal of Dairy Research**, 64: 475-486.
- KÖNIG, H.E. e LIEBICH, H. 2004. **Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas** colorido. Porto Alegre: Artmed.
- LANGENMAYER, M.C., GOLLNICK, N.S., MAJZOUB-ALTWECK, M., SCHARR, J.C., SCHARES, G., HERMANNNS, W. 2015. Naturally acquired bovine besnoitiosis: histological and immunohistochemical findings in acute, subacute, and chronic disease. **Veterinary Pathology**, 52 (3): 476-488. doi: 10.1177/0300985814541705
- LAVEN, L.J., LAVEN, R.A., PARKINSON, T.J., LOPEZ-VILLALOBOSA, N., MARGERISON, J.K. 2012. An evaluation of the changes in distance from the external sole surface to the distal phalanx in heifers in their first lactation. **The Veterinary Journal**, 193: 639-643.
- LIMA, L.R. *Reparixina, um antagonista de CXCR1 e CXCR2, na laminite experimental de equinos*. 2013. 62 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MACLEAN, C.W. 1971. The histopathology of laminitis in dairy cows. **Journal of Comparative Pathology**, 81: 563-570.
- MARTINS, C.C. e MELO, C.M. 2012. Relation between claudication, rest behavior, body condition and milk production in a dairy cattle. **XXVII World Buiatrics Congress**, 2012, Lisboa, Portugal. (resumo)
- MAUCHE, U., CARVALHO, A.U., ALZAMORA FILHO, F., FERREIRA, P.M., FACURY FILHO, E.J., CAVALCANTE, M.P. 2008. Efeito da sazonalidade sobre a ocorrência de lesões podais em vacas leiteiras. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, 109-116.
- MENDES, H.M.F., CASAGRANDE, F.P., LIMA, I.R., SOUZA, C.H., GONTIJO, L.D'., ALVES, G.E.S., VASCONCELOS, A.C., FALEIROS, R.R. 2013. Histopathology of dairy cows' hooves with signs of naturally acquired laminitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 33(5):613-619.
- NILSSON, S.A. 1963. Clinical, morphological, and experimental studies of laminitis in cattle. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 4, suppl. 1, 1-304.
- NOCEK, J.E. 1997. Bovine acidosis: implications on laminitis. **Journal of Dairy of Science**, v. 80, 1005-1028.
- OSORIO, J.S., FRASER, B.C., GRAUGNARD, D.D., SINGH, S.S., DRACKLEY, J.K., GARRET, E.F., LOOR, J.J. 2012. Corium tissue expression of genes associated with inflammation oxidative stress, and keratin formation in relation to lameness in dairy cows. **Journal Dairy Science**, v. 95, 6388-6396.

- PAES LEME, F.O., BONNA, F.A.B., DE MARVAL, C.A., XAVIER, S.H.N., SANTOS, R.L., FALEIROS, R.R., ALVES, G.E.S. 2010. Histopatologia das laminas do casco de equinos com laminae aguda induzida e tratados com ketoprofeno, fenilbutazona e flunixin meglumine. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 62 (2): 241-250.
- PLAIZIER, J.C., KRAUSE, D.O., GOZHO, G.N., MCBRIDE, B.W. 2008. Subacute ruminal acidosis in dairy cow. The physiological causes, incidence and consequences. **The Veterinary Journal**, 176: 21-31.
- POZZATTI, P.N., CASAGRANDE, F.P., PORFÍRIO, L.C., AMORIM, J.B., FERREIRA, L.O., LAGO, L.A., CARVALHO, A.U., FACURY FILHO, E.J., FERREIRA, P.M. 2009. Prevalência e classificação das afecções podais de rebanho bovino leiteiro de Sete Lagoas-MG. In: **ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 13. e ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 9.** Disponível em <http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2009/anais/arquivos/0098_0875_02.pdf> Acesso em 04 Mai 2015.
- RADOSTITS, O.M., GAY, C.C., BLOOD, D.C., HINCHCLIFF, K.W. 2002. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos.** 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1737p.
- RANDHAWA, S.S., DUA, K., BANGA, H.S., SINGH, S.S., MALHOTRA, P. 2012. Arteriosclerosis in buffalo hooves - an age related change or a pathology of lameness? **Indian Journal of Animal Sciences**, v.82 (7), p. 697-701.
- REASEHEALTH COLLEGE. 2013. Disponível em <<http://www.reaseheath.ac.uk/wp-content/uploads/2014/02/Cattle-Mobility-Final-report-December-2013.pdf>> Acesso em 22 jun 2015.
- SALOMON, F.V. e GEYER, H. 2006. **Atlas de Anatomia Aplicada dos Animais Domésticos**, 2ed.
- SHÖPKE, K., WEIDLING, S., PIJL, R., SWALVE, H.H. 2013. Relationships between bovine hoof disorders, body conditions traits, and test-day yields. **Journal of Dairy Science**, 96:679-689. <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-5728>>
- SILVA, L.A.F., SILVA, L.M., ROMANI, A.F. ET AL. 2001. Características clínicas e epidemiológicas das enfermidades podais em vacas lactantes do município de Orizona – GO. **Ciência Animal Brasileira**, v.2,119-126.
- SINGH, S.S., WARD, W.R., MURRAY, R.D. 1992. Histopathological and morphometric studies on the hooves of dairy and beef cattle in relation to overgrown sole and laminitis. **Journal of Comparative Pathology**, 107: 319-328.
- SINGH, S.S., WARD, W.R., MURRAY, R.D. 1993. Technique of hoof biopsy in cattle. **The Veterinary Record**, v. 133, 190-191.
- SINGH, S.S., MURRAY, R.D., WARD, W.R. 1994. Gross and histopathological study of endotoxin-induced hoof lesions in cattle. **Journal of Comparative Pathology**, v. 110, 103-115.

TARLTON, J.F., HOLAH, D.E., EVANS, K.M., JONES, S., PEARSON, G.R., WEBSTER, A.J.F. 2002. Biomechanical and Histopathological Changes in the Support Structures of Bovine Hooves around the Time of First Calving. **The Veterinary Journal**, 163, 196-204.

THOEFNER, M.B., WATTLE, O., POLLITT, C.C., FRENCH, K.R., NIELSEN, S.S. 2005. Histopathology of oligofructose-induced acute laminitis in heifers. **Journal of Dairy of Science**, v. 88, 2774-2782.

THOMSEN, P.T., MUNKSGAARD, L., SORENSEN, J.T. 2012. Locomotion scores and lying behavior are indicators of hoof lesions in dairy cows. **The Veterinary Journal**, 193: 644-647.

VAN AMSTEL, S. e SHEARER, J. 2006. **Manual for treatment and control of lameness in cattle**. Blackwell Publishing, 212p.

VAN EPS, A.W e POLLITT, C.C. 2009. Equine laminitis model: Lamellar histopathology seven days after induction with oligofructose. **Equine Veterinary Journal**, 41 (8): 735-740. doi:10.2746/042516409X444953.

VAN STRATEN, M., SIANI, I., BRUCKSTEIN, S., BAR, D. 2012. Claw horn lesions are associated with decreased milk fat percentage on test-days preceding diagnosis. **XXVII World Buiatrics Congress**, 2012, Lisboa, Portugal. (resumo)

VERMUNT, J.J. e GREENOUGH, P.R. 1995. Lesions associated with subclinical laminitis of the claws of dairy calves in two management systems. **British Veterinary Journal**, 151, 391-399.

VISSER, M.B e POLLITT, C.C. 2011. The timeline of lamellar membrane basement changes during equine laminitis development. **Equine Veterinary Journal**, 43 (4):471-477.

WAGUESPACK, R.W., KEMPPAINEN, R.J., COCHRAN, A., LIN, H.C., BELKNAP, J.K. 2004. Increased expression of MAIL, a cytokine-associated nuclear protein, in the prodromal stage of black walnut-induced laminitis. **Equine Veterinary Journal**, 36 (3): 285-291.

WARNICK, L.D., JANSSEN, D., GUARD, C.L., GRÖHN, Y.T. 2001. The effect of lameness on milk production in dairy cows. **Journal of Dairy of Science**, v. 84, 1988-1997.

WESTERN DAIRY DIGEST FALL. 2002. Disponível em <http://www.dairyweb.ca/Resources/WDD41/WDD4108.pdf>. Acesso em 22 jun 2015.

9. CAPÍTULO III - TESTE DE VIABILIDADE DE UM INSTRUMENTO CIRÚRGICO PARA BIÓPSIAS DO TECIDO LAMINAR EM BOVINOS

Neste capítulo é apresentado o trabalho científico que foi realizado durante o teste de viabilidade do instrumento cirúrgico proposto em animais vivos.

Teste de um novo instrumento cirúrgico para obtenção de biópsias de casco em bovinos

Mendes HMF¹, Rocha Júnior SS², Paz CFR², Valadares RC¹, Ribeiro RM², Azevedo DSD³
Oliveira CA³, Faleiros RR⁴

Resumo

A avaliação das propriedades histológicas e da expressão de genes e proteínas em biópsias tem sido determinante para o entendimento da fisiopatologia, o diagnóstico e o prognóstico das enfermidades. O objetivo foi testar, na espécie bovina, um instrumento cirúrgico especificamente desenvolvido para realização de biópsias de casco (INPI, BR102013018765-8). Utilizaram-se cinco bovinos adultos, machos, com peso de 355 a 576kg. Os animais foram sedados, contidos em decúbito lateral e tiveram um dos dígitos torácicos e um dos pélvicos anestesiados. Em seguida à antisepsia, promoveu-se o desgaste do estrato córneo na parede dorsal, dois centímetros distal à borda coronária em uma área retangular (7x17mm). Após incisões retilíneas delimitando a borda interna da área desgastada, utilizou-se o lamelótomo de Falcão-Faleiros para obtenção de um fragmento de estrato lamelar. Os fragmentos foram fixados em formalina e processados para histologia com colorações H&E, PAS, Shorr e tricrômico de Masson. A hemorragia local foi estancada por tamponamento, os dígitos foram mantidos enfaixados por dois dias e os animais acompanhados clinicamente por 15 dias. As amostras foram consideradas adequadas quanto à integridade das lâminas e à preservação de sua arquitetura. Obtiveram-se média de 85 lâminas dérmicas/epidérmicas viáveis por biópsia. Os animais não apresentaram claudicação importante e não houve qualquer outra complicação clínica durante o período experimental. Conclui-se que o lamelótomo de Falcão-Faleiros é apropriado e seguro para a obtenção de biópsias de casco em bovinos, se mostrando promissor para uso em estudos clínicos e na rotina de diagnóstico de problemas podais em bovinos.

Palavras-chave: bovino, casco, biópsia, tecido lamelar, junção derme-epiderme, lâminas do casco, claudicação, laminite.

Introdução

¹ Médica Veterinária, Mestre e Doutora em Ciência Animal, Brasil.

² Doutorando em Ciência Animal, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil.

³ Graduando em Medicina Veterinária, Escola de Veterinária da UFMG.

⁴ Professor Associado, Escola de Veterinária da UFMG.

As doenças podais constituem um grave problema para a bovinocultura leiteira e de corte em razão do elevado impacto econômico negativo que acarretam (Silva et al., 2001, Warnick et al., 2001, Miskimins, 2002, Bergsten, 2003, Ferreira, 2004, Mauchle et al., 2008). Em especial, destaca-se a laminite, que é uma doença de produção (Mulligan e Doherty, 2008), de origem multifatorial (Greenough, 2007), considerada a principal doença de casco em bovinos leiteiros (Nocek, 1997) e sua fisiopatologia permanece não esclarecida (Thoefner et al., 2005, Randhawa et al., 2012).

Alguns estudos sobre a fisiopatologia da laminite mostraram alterações histológicas, celulares e ou/moleculares no tecido lamelar do casco (Nilsson, 1963, Tarlton et al., 2002, Thoefner et al., 2005, Danscher et al., 2010, Mendes et al., 2012, Osorio et al., 2012, Mendes et al., 2013). Entretanto pesquisas desta natureza ainda são escassas na espécie bovina (Mgasa e Kempson, 2002), limitando assim a compreensão de sua fisiopatologia. Em contrapartida, na espécie equina, inúmeros avanços foram alcançados no entendimento dos aspectos tissulares, celulares e moleculares envolvendo a laminite, a partir do estudo detalhado do tecido lamelar do casco. Esses estudos foram realizados em amostras de tecido obtidas por biópsia (Crosser e Pollitt, 2006, Paes Leme et al., 2010, Visser e Pollitt, 2011, Lima et al., 2013), ou após a eutanásia dos animais (Waguespack et al., 2004, Belknap et al., 2007, van Eps e Pollitt, 2009, de Laat et al., 2010, Paes Leme et al., 2010, de Laat et al., 2012). A obtenção de biópsias apresenta a vantagem de evitar eutanásia (Paes Leme et al., 2010) e permitir a caracterização do progresso de lesões em colheitas seriadas de tecido (Hanly et al., 2006, Singh et al., 1993).

O tecido lamelar do casco de bovinos é formado de lâminas dérmicas e epidérmicas intercaladas entre si e aderidas à camada córnea do casco (König e Liebich, 2004). Estas lâminas são sustentadas pela derme subjacente firmemente aderida à falange distal (van Amstel e Shearer, 2006). Assim, as lâminas dérmicas e epidérmicas constituem a junção derme-epiderme do casco (Greenough, 2007), também referida como tecido lamelar (Mgasa e Kempson, 2002).

O primeiro relato de um método de biópsia para obtenção desse tecido foi descrito no trabalho de Singh et al (1993), com a utilização de *punch* de biópsia de pele, aplicado ao tecido lamelar do casco de bovinos. O método também foi utilizado em búfalos e equinos após sofrer ou não modificações (Singh et al., 1994, Alves et al., 2004, Crosser e Pollitt, 2006, Hanly et al., 2009, Gravena et al., 2010, Paes Leme et al., 2010, Randhawa et al., 2012, Osorio et al., 2012).

O ponto crítico na obtenção de biópsias do tecido lamelar é a desconexão entre a derme e a falange distal (Gravena et al., 2010). Nos estudos consultados, mediante a ausência de instrumental específico para a biópsia, o procedimento só foi possível a partir da combinação de instrumentos de uso geral em Medicina Veterinária ou Odontologia, após sofrerem adaptações em suas funções ou aplicações que viabilizassem seu uso para a colheita de tecido lamelar. Apesar disto, foram relatadas dificuldades em realizar a desconexão entre a derme e a falange distal.

Assim, considerando a) as limitações dos métodos disponíveis para realização de biópsias de casco, b) que a fisiopatologia da laminite não está esclarecida, c) que a obtenção eficaz de amostras de tecido lamelar pode ampliar os estudos acerca da sua histologia, biologia celular e molecular, o objetivo deste trabalho é apresentar um instrumento cirúrgico especialmente desenvolvido para obtenção de biópsias do tecido lamelar do casco de animais ungulados, validado na espécie bovina.

Material e métodos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de animais (CEUA nº 286/2013) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Animais

Foram utilizados cinco bovinos da raça Girolando, machos, adultos, sendo n=4 da raça Girolando e n=1 da raça Holandesa. O peso dos animais variou de 355 a 576 kg, sendo dois castrados e três não-castrados, adaptados em baia, a dietas de feno (n=4) ou cana picada (n=1) por 15 dias. As biópsias foram realizadas simultaneamente em um membro torácico (unha medial) e em um membro pélvico (unha lateral) e os animais foram avaliados durante 15 dias após as biópsias quanto ao escore de claudicação segundo Sprecher et al (1997).

Realização das biópsias

Após jejum de sólidos por 24 horas, os animais foram sedados com xilazina (0,04mg/kg) em associação com acepromazina (0,04mg/kg) administrados por via intramuscular e em seguida, contidos em decúbito lateral. Os membros foram anestesiados com lidocaína a 2% sem vasoconstritor, pela técnica de três pontos descrita em Salomon e Geyer (2006). Para isto, a um 1,5cm proximal da articulação metacarpofalangeana proximal, introduziu-se a agulha transversalmente no tecido subcutâneo para bloqueio dos nervos dorsais (dorsalmente), palmar medial (medialmente) e palmar lateral (lateralmente). Após antissepsia, aplicou-se um torniquete no terço médio da região do metacarpo/metatarso, com o objetivo de minimizar o sangramento durante a biópsia.

Para obtenção de amostras de tecido lamelar do casco, utilizou-se um instrumento especificamente desenvolvido para tal, denominado lamelótomo de Falcão-Faleiros (INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial/Brasil BR102013018765-8). Trata-se de uma haste que possui um cabo em uma extremidade e uma ponta ativa para remoção de tecido lamelar na outra, conforme detalhado na Figura 1. A ponta ativa é constituída de três superfícies, sendo um assoalho e duas paredes laterais, cada qual com uma aresta cortante em sua extremidade. A ponta ativa foi desenhada de forma a desconectar a amostra de tecido lamelar rente à falange distal, preservando a derme profunda e sem comprometer a arquitetura lamelar.

O procedimento de biópsia foi executado nos seguintes passos: 1- desgaste da camada córnea, 2- delimitação do sítio de biópsia, 3- obtenção da biópsia de tecido lamelar (Figura 2*). Para o passo 1 utilizou-se ferramenta rotativa do tipo microretífica (Dremel) acoplada a escareador 3/8” (Dremel). Realizou-se movimentos retilíneos do conjunto dremel/escareador, na parede dorsal do casco, aproximadamente dois centímetros distal à borda coronária e lateral à fenda interdigital. O desgaste foi realizado até alcançar a proximidade do tecido mole perceptível à palpação com agulha hipodérmica. No passo dois foi feita a delimitação do sítio de biópsia com o uso de bisturi acoplado a lâmina nº 11 ou 20. Para isto, foram realizadas incisões no tecido lamelar acompanhando as bordas internas da área desgastada no passo um. No passo três, o instrumento cirúrgico foi introduzido sobre as linhas de incisão realizadas, orientando-se a ponta ativa verticalmente até alcançar a falange distal. Ato contínuo, realizou-se movimento diagonal com o cabo do instrumento, de modo a deslizar a ponta ativa paralela e rente à superfície da falange, até a desconexão do fragmento.

Após a colheita da biópsia houve hemorragia moderada que foi reduzida pelo torniquete aplicado antes da colheita da amostra. O curativo local foi realizado com o tamponamento do sítio de biópsia com acrílico autopolimerizante mantido afixado ao casco com atadura durante dois dias. Após a remoção do curativo, utilizou-se iodo a 10% tópico no local da ferida. Os animais receberam enrofloxacina (2,5mg/kg) e meloxicam (0,5mg/kg) ambos por via intramuscular durante três dias consecutivos. A avaliação da claudicação foi realizada durante manejo dos animais para o curativo, segundo o escore de Sprecher et al (1997). Apenas um animal apresentou claudicação no grau três por cinco dias, o que demandou a extensão do tratamento anti-inflamatório.

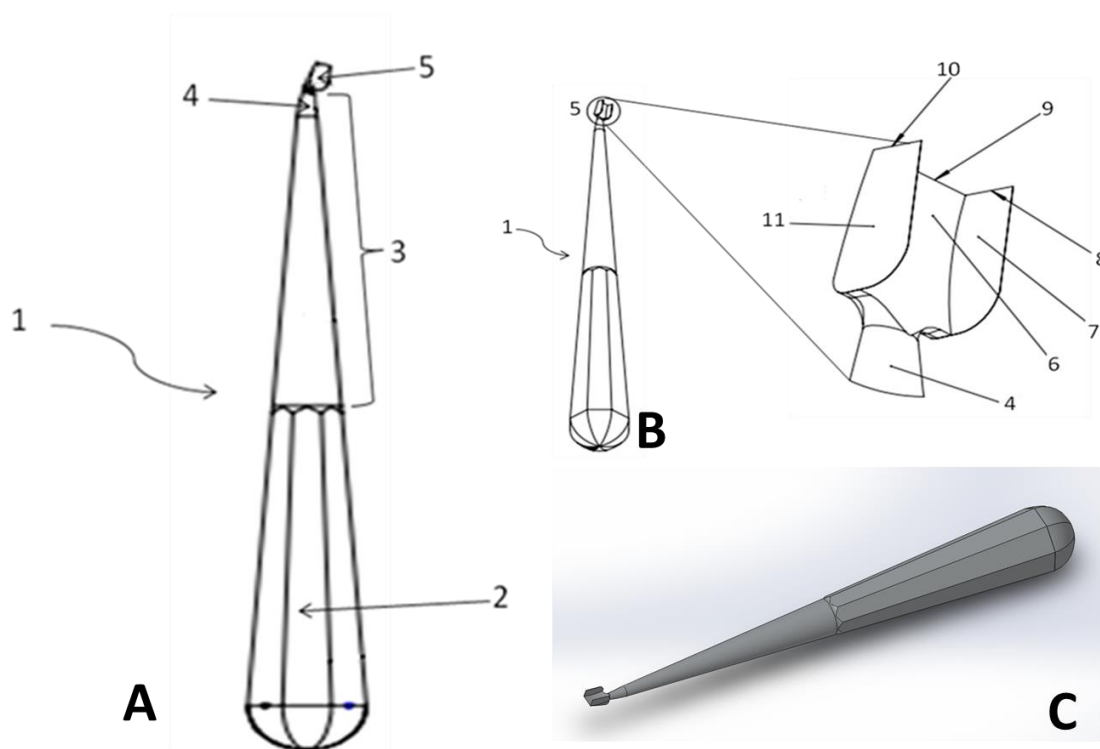


Figura 1- Instrumento cirúrgico para realização de biópsias de casco em animais unguilados, nomeado lamelótomo de Falcão-Faleiros. Os números nas fotos indicam: A) 1- instrumento cirúrgico; 2- cabo; 3- haste; 4- curvatura da haste; 5- ponta ativa. B) 6- assoalho da ponta ativa; 7 e 11- paredes laterais; 8 e 10- arestas cortantes das paredes; 9- aresta cortante do assoalho. C) Imagem em 3D do instrumento.

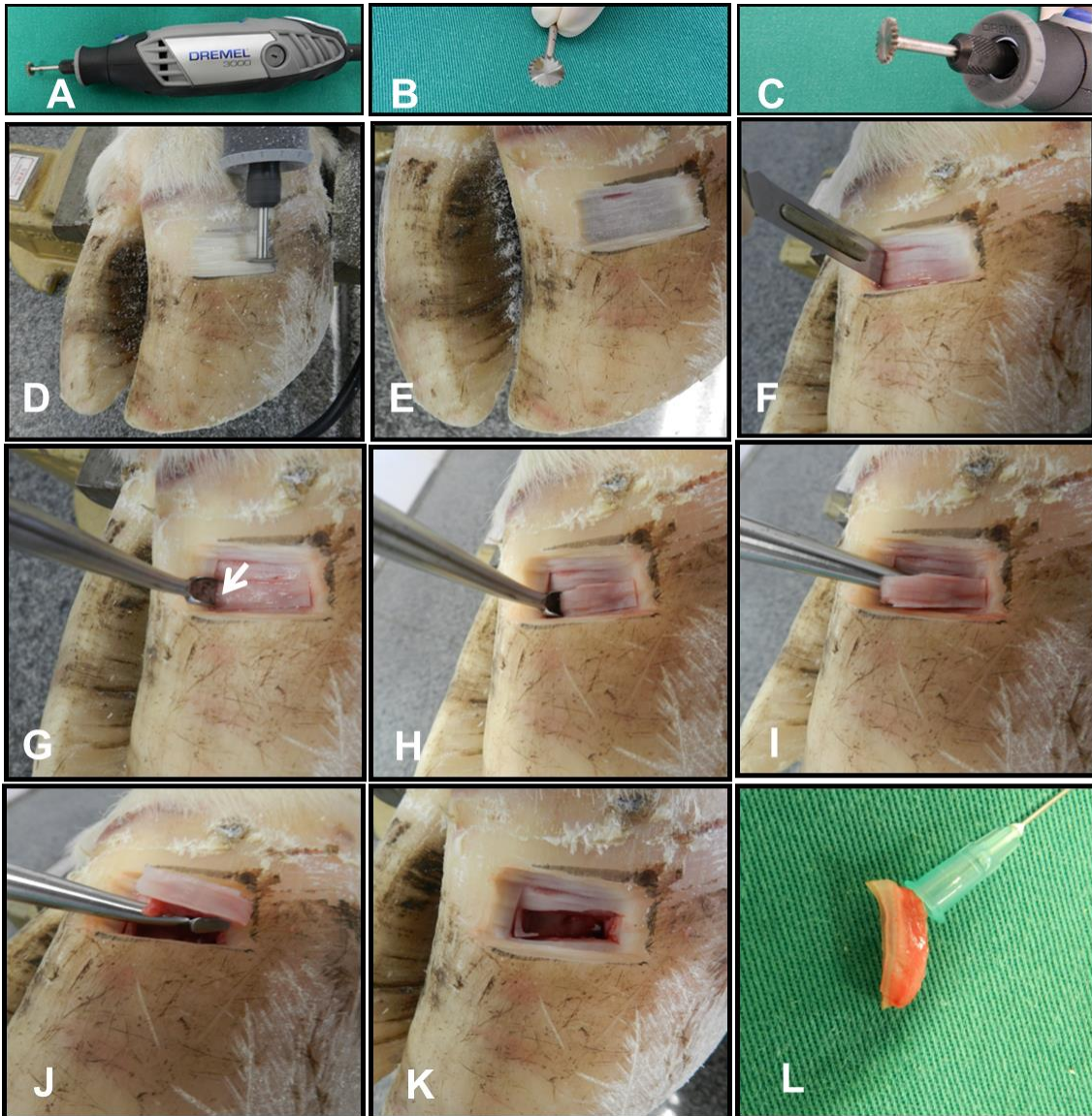


Figura 2- Passo-a-passo da realização de biópsias do tecido lamelar do casco em peça anatômica utilizando o lamelótomo de Falcão-Faleiros. A) ferramenta rotativa do tipo microretífica (Dremel); B) acessório do tipo escareador 3/8" (Dremel); C) detalhe da ferramenta com acessório acoplado; D-E) desgaste da camada córnea do casco em peça anatômica através de movimentos retilíneos horizontais com o conjunto dremel/escareador; F) realização de linhas de incisão ao redor da área desgastada; G) posicionamento vertical do instrumento com a ponta ativa direcionada para as linhas de incisão; H) introdução do Lamelótomo de Falcão-Faleiros em direção à falange distal; I-J) condução do instrumento em sentido horizontal, após mudança de direção de sua haste; K) aspecto final do sítio de biópsia após retirada do fragmento de tecido; L) Fragmento de tecido obtido. * As fotos foram feitas em peça anatômica por facilitar o entendimento da execução da técnica de biópsia e uso do instrumento cirúrgico.

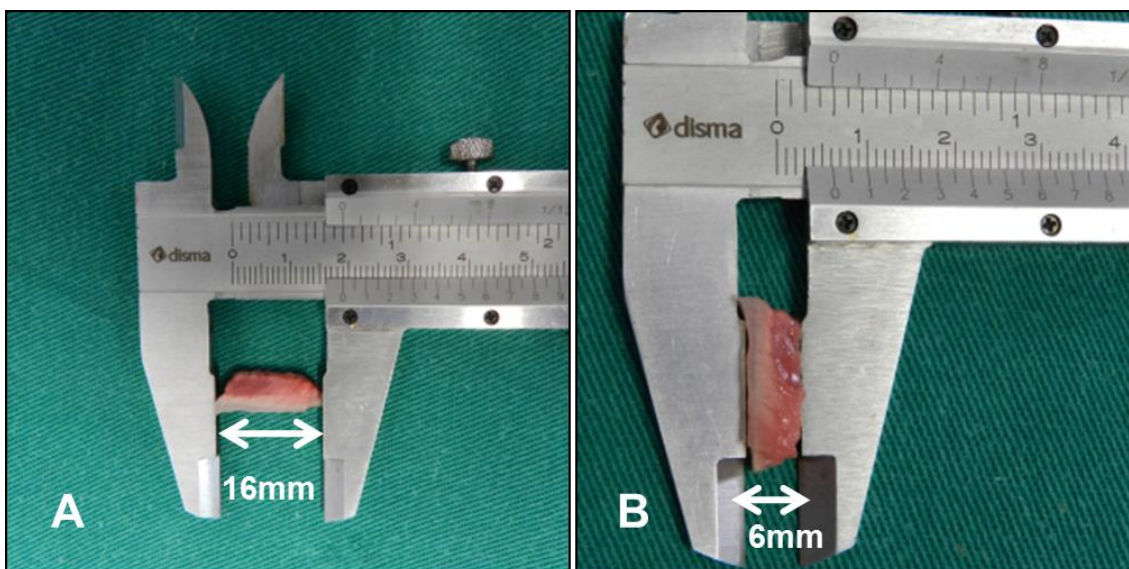


Figura 3- Fragmento de tecido lamelar obtido, mostrando medida do comprimento (A) e da profundidade (B).

Histologia

Os fragmentos obtidos foram fixados em formol tamponado a 4% por 48 horas, processados histotecnica e incluídos em blocos de parafina. Cortes histológicos de cinco micrômetros foram corados nas colorações de hematoxilina e eosina (HE), ácido periódico de Schiff (PAS), Shorr e tricrômico de Masson. Contou-se na coloração de PAS o número de lâminas dérmicas/epidérmicas viáveis obtidas, considerando-se viáveis as lâminas íntegras, desde a região abaxial até a axial da lâmina.

Resultados

O protocolo de sedação e anestesia permitiu a condução do procedimento sem riscos ao animal ou aos profissionais, com tempo de decúbito de aproximadamente 40 minutos, sendo duas unhas manipuladas.

O desgaste da camada córnea com microretífica acoplada a escareador permitiu acesso rápido e satisfatório ao tecido mole subjacente.

As linhas de incisão realizadas com lâmina de bisturi destinaram-se a reduzir a resistência tecidual da camada córnea remanescente durante a inserção do lamelótomo no tecido lamelar. As manobras realizadas com o instrumento apresentado foram consideradas eficazes, rápidas e de simples execução por dois usuários diferentes.

Apenas um animal apresentou claudicação (grau 3) no dia seguinte à cirurgia, que perdurou por cinco dias. Os demais animais (n=4) não apresentaram claudicação nem sinais de desconforto. Não ocorreram complicações na ferida após a remoção do curativo. Após 40 dias o sítio de biópsia apresentou-se recoberto por tecido queratinizado nas duas unhas manipuladas em um animal e por tecido de granulação em outro. Não foram obtidas informações sobre os demais animais.

A quantidade de lâminas dérmicas/epidérmicas obtidas de cada animal está representada na Tabela 1. As dimensões do corte histológico foram satisfatórias quanto ao comprimento do tecido lamelar e da profundidade da derme obtida, demonstrados na Figura 4. O comprimento e profundidade das biópsias oscilaram ligeiramente conforme cada biópsia realizada.

Qualitativamente, as características teciduais foram preservadas. As colorações de HE, PAS, Shorr e tricrômico de Masson permitiram evidenciação nítida e uniforme das características histológicas do tecido lamelar quais sejam: distinção da camada córnea remanescente, da camada de lâminas dérmicas e epidérmicas e da camada dérmica; os núcleos das células epidermais e dermais, a matriz extracelular, a membrana basal e o eixo queratinizado das lâminas foram adequadamente diferenciados histologicamente. A arquitetura tecidual se apresentou normal e preservada. Na coloração de PAS foi possível distinguir a membrana basal e os núcleos das lâminas epidermais. Na coloração de Masson foi possível distinguir o eixo queratinizado (vermelho) das lâminas epidérmicas e o tecido conjuntivo da derme (em azul). As lâminas não apresentaram nenhum tipo de distorção ou fraturas que comprometessem sua qualidade histológica (Figura 5).

Tabela 1 – Número de lâminas dérmicas/epidérmicas obtidas com o lamelótomo de Falcão-Faleiros em bovinos. * A variação no número de lâminas em relação à média observada nestes animais, se deveu ao fato de que as lâminas deles apresentaram morfologia semelhante à papila de sola.

Animal	Nº de lâminas viáveis	
	Membro torácico	Membro pélvico
1	54	78
2	43	65
3	90	47
4	141*	174*
5	103*	50*
Média	86	83
DP	39	52

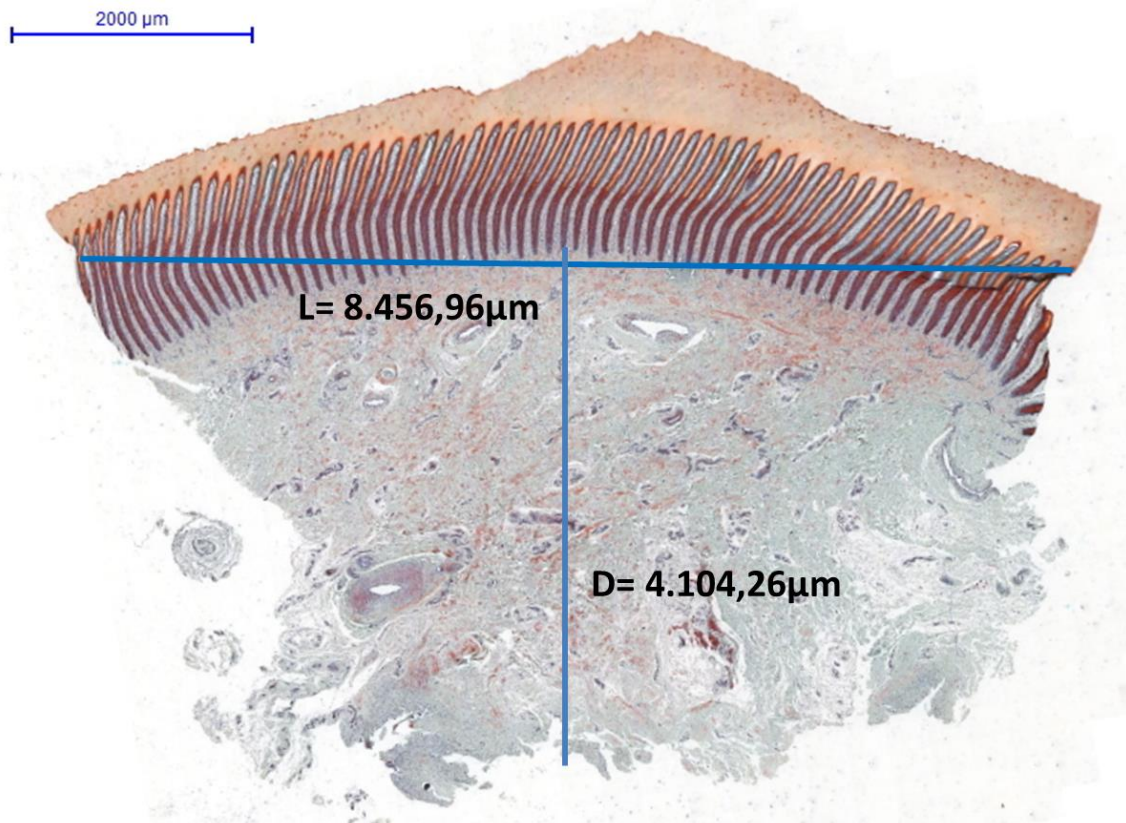


Figura 4- Fragmento histológico inteiro na coloração de Shorr, mostrando comprimento (L) do tecido lamelar e profundidade (D) da derme obtida. A biópsia corresponde ao membro pélvico do animal 2 da Tabela 1.

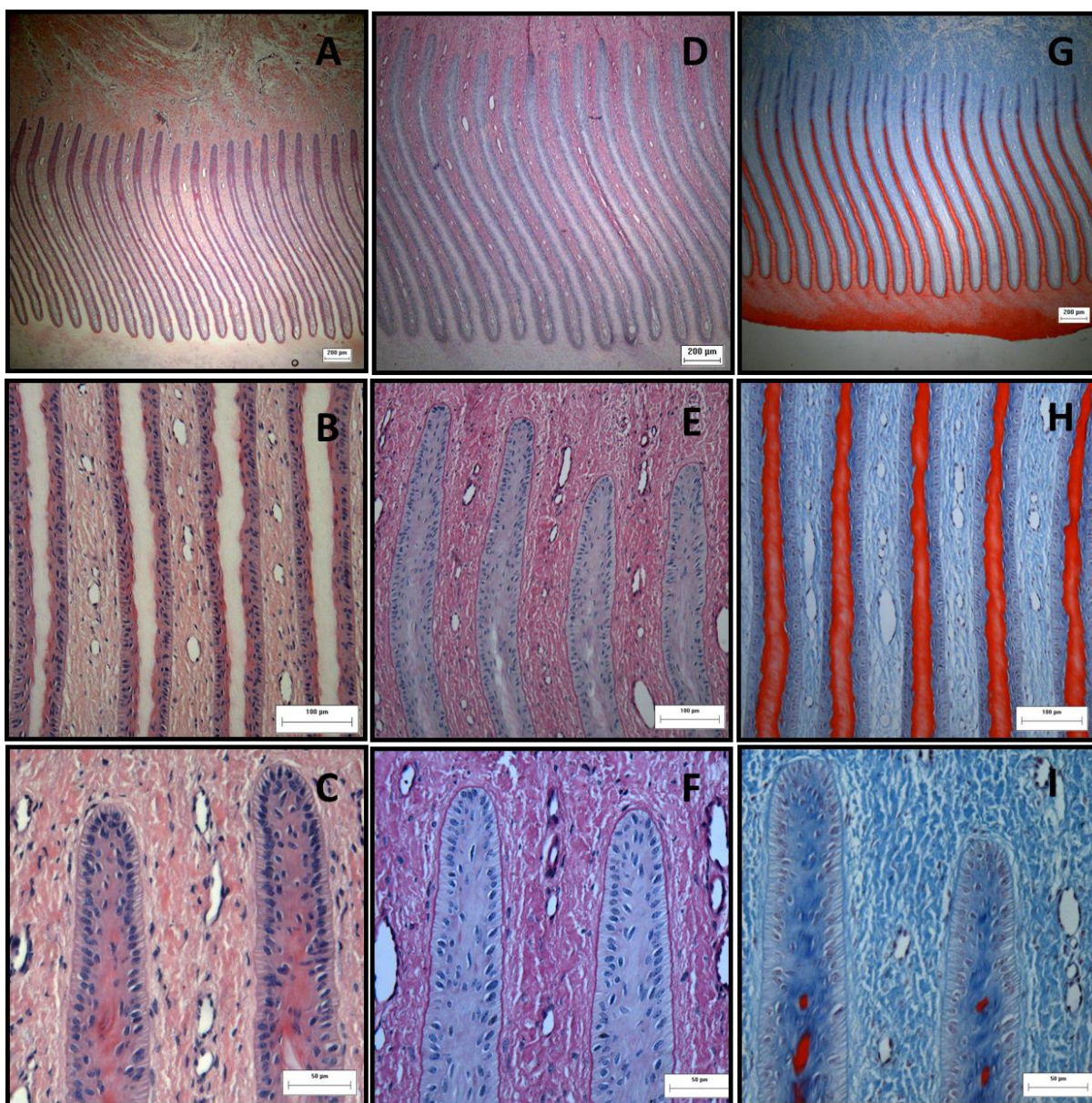


Figura 5- Histologia das lâminas do casco de bovinos obtidas por biópsia com o lamelótomo de Falcão-Faleiros. A-C) Coloração de HE; D-F) Coloração de PAS; G-I) Coloração Tricrômico de Masson. Barras em A, D e G: 200 μm ; barras em B, E e H: 100 μm ; barras em C, F e I: 50 μm .

Discussão

O objetivo do desgaste da camada córnea é alcançar o mais próximo possível o tecido lamelar, eliminando a resistência da camada queratinizada ao instrumento cirúrgico. Portanto, esta etapa é um procedimento necessário antes da utilização do lamelótomo de Falcão-Faleiros e constitui parte da técnica de biópsia apresentada neste trabalho.

Na maioria dos estudos consultados, o desgaste foi realizado utilizando-se broca de diferentes diâmetros acoplada à furadeira (Singh et al., 1993, Singh et al., 1994, Crosser e Pollit, 2006, Hanly et al., 2009, Randhawa et al., 2012, Osorio et al., 2012). Em outros estudos, utilizaram-se instrumentos para casqueamento como grosa e rineta (Alves et al., 2004, Paes Leme et al., 2010). Já Gravena et al (2010) utilizaram microretífica acoplada à pedra de esmerilar. No presente estudo, utilizou-se microretífica acoplada a escareador. Este método de desgaste da parede dorsal se mostrou superior ao uso de broca ou esmerilador. Tais métodos permitiram apenas a obtenção de um orifício circular na camada córnea do casco, limitando o tamanho das biópsias ao diâmetro desses acessórios (Singh et al., 1993, Singh et al., 1994, Crosser e Pollit, 2006, Hanly et al., 2009, Randhawa et al., 2012, Osorio et al., 2012). Ao contrário, o escareador apresentou a vantagem de desgastar a camada córnea em figuras planas como retângulo ou quadrado de tamanhos variáveis, possibilitando a escolha do tamanho dos fragmentos de biópsia a serem retirados com o instrumento cirúrgico proposto. O método utilizado também se mostrou vantajoso em relação ao uso de grosa e rineta, por demandar menor esforço e ser mais rápido e preciso. O conjunto microretífica/escareador permitiu a realização do desgaste da camada córnea utilizando esforço mínimo e de forma rápida e fácil, conferindo agilidade e reduzindo o tempo de biópsia em relação aos outros métodos disponíveis.

Durante o desgaste, a proximidade do tecido mole pôde ser verificada pelo aparecimento de um tom róseo na superfície da área desgastada, indicando a presença de tecido vascularizado (Singh et al., 1993). Havendo dúvida sobre a proximidade deste tecido, uma alternativa foi testar a maciez da área com agulha descartável.

As incisões com o bisturi foram efetivas para delimitar o fragmento de biópsia, e reduzir a resistência tecidual apresentada ao lamelótomo durante sua inserção. Nos demais estudos, esta etapa não foi efetuada, uma vez que foi utilizado *punch* para obtenção dos fragmentos (Singh et al., 1993, Singh et al., 1994, Alves et al., 2004, Crosser e Pollitt, 2006, Hanly et al., 2009, Paes Leme et al., 2010, Randhawa et al., 2012, Osorio et al., 2012).

O ponto mais crítico na obtenção de biópsias do tecido lamelar é a desconexão entre a derme e a falange distal (Gravena, 2010), em virtude da grande quantidade de fibras colágenas na derme (Greenough, 2007). Nos trabalhos consultados, foram utilizados para fazer tal desconexão lâmina de bisturi (Hanly et al., 2009), lâmina de bisturi curvada por aquecimento (Crosser e Pollitt, 2006), o próprio *punch* de biópsia (Singh et al., 1993, Singh et al., 1994, Alves et al., 2004, Hanly et al., 2009, Paes Leme et al., 2010, Randhawa et al., 2012, Osorio et al., 2012) ou esculpador de Frahm nº 2 (Gravena et al., 2010). Em nenhuma destas situações a desconexão entre a derme e a falange distal seguiu uma sequência natural de manobras com os instrumentos empregados, tendo sido necessário redefinir as manobras e/ou trocar de instrumento para alcançar-se o objetivo. Em contrário, o instrumento ora proposto permitiu a colheita de biópsias em uma sequência única e ininterrupta de movimentos, com eficiência na desconexão entre derme e falange distal. Hanly et al (2009) relataram insuficiência do *punch* em separar a derme e a falange, tendo sido necessário recorrer ao auxílio de lâmina de bisturi. Em equinos, Gravena (2010) utilizou um instrumento odontológico chamado esculpador de Frahm nº 2 para promover a desconexão entre a derme e a falange distal. Contudo, foi necessário recorrer ao auxílio de pinça de dissecação e pinça hemostática de Halsted para concluir a operação. Crosser e Pollit (2006) optaram pelo curvamento de uma lâmina de bisturi através de aquecimento, com sua posterior introdução no sítio de biópsia para causar a desconexão entre a derme e a falange distal de equinos. Na experiência de nosso grupo de pesquisa, ocorreu rápida ruptura da lâmina

depois de aquecida e ainda, dificuldade de inserção dela no sítio de biópsia. Também Gravena et al (2010) considerou esta alternativa inviável. Em bovinos, Osorio et al (2012) utilizaram-se de lâmina de bisturi e pinça de dissecação, em adaptação ao método de Singh et al (1993) para desconectar derme e falange distal. Nenhuma destas adaptações foi necessária com o uso do lamelótomo de Falcão-Faleiros, pois a aresta cortante do assoalho da ponta ativa (Figura 1-B-9) se mostrou eficaz em cortar a derme, separando-a da falange distal. Para isto, foi fundamental a condução do instrumento rente à falange proporcionando a obtenção da maior área de derme possível (Figura 4). Portanto, o principal diferencial do instrumento ora proposto é que, uma vez desenvolvido especialmente para a obtenção de biópsias de casco, pode ser utilizado numa sequência única e ininterrupta de manobras e apresenta desempenho diferenciado em desconectar a derme e a falange distal.

O comprimento dos fragmentos oscilou entre animais contudo, todos foram considerados satisfatórios inclusive em razão do número de lâminas obtido. Osorio et al (2012) obtiveram fragmentos pequenos, de aproximadamente meio milímetro destinados a estudos da biologia molecular do casco. Não foram encontrados estudos acerca da histologia do tecido lamelar obtido através de *punch* em bovinos. Gravena et al (2010) obtiveram amostras com nove milímetros de comprimento para estudos da histologia envolvendo microscopia ótica e eletrônica em equinos. Fragmentos maiores são desejáveis especialmente em estudos da histologia do casco, por oferecerem maior área de tecido para ser analisada. Assim, na necessidade de fragmentos maiores ou menores, tanto o escareador como o lamelótomo de Falcão-Faleiros podem determinar o tamanho da amostra para qualquer dimensão desejada.

A avaliação histológica demonstrou que, nos fragmentos removidos pelo lamelótomo de Falcão-Faleiros, as estruturas teciduais foram preservadas, sendo possível a evidênciação histológica normal do tecido lamelar como citado em estudos histológicos para a espécie bovina (Nilsson, 1963, Tarlton et al., 2002, Thoenes et al., 2005, Danscher et al., 2010, Mendes et al., 2013).

Nos fragmentos de tecido obtidos foi possível observar número médio de lâminas viáveis de 86 ± 39 no membro torácico e de 83 ± 52 no membro pélvico. Tais valores foram superiores àqueles relatados com o emprego de *punch* na espécie equina, quando obtiveram-se fragmentos de 7x5mm cada qual com 8 a 12 lâminas epidérmicas primárias (Gravena et al 2010). Ressalta-se que devido às características da forma de desgaste retangular da muralha e do lamelótomo, fragmentos maiores podem ser facilmente obtidos com o método ora proposto.

Em dois animais as lâminas epidérmicas se apresentaram alteradas, com formato semelhante à papilas de sola, o que causou a elevação do número de lâminas contabilizadas (Tabela 1). Contudo, esta alteração não foi causada pelo instrumento cirúrgico e/ou técnica empregados, tendo sendo considerada intrínseca aos animais amostrados.

Aproximadamente 1/3 do comprimento dos fragmentos obtidos neste trabalho foram direcionados para estudos da biologia molecular, portanto, o número de lâminas obtido encontra-se reduzido em relação ao tamanho do fragmento propriamente dito. Com base nisto, é possível afirmar que fragmentos de até 12mm de comprimento fornecem quantidade satisfatória de lâminas e sem prejuízos de claudicação para o animal.

Outro critério avaliado histologicamente foi a presença de distorções ou fraturas nas lâminas epidérmicas e dérmicas que caracterizassem artefato de técnica de biópsia. Distorções das

lâminas foram observadas no estudo de Osorio et al (2012) com o uso de *punch*, contudo, no presente trabalho não foram detectados artefatos de técnica.

Em equinos, Crosser e Pollitt (2006) relataram claudicação moderada em alguns animais após as biópsias, entretanto o procedimento foi considerado bem tolerado. No presente trabalho, o impacto das biópsias sobre os animais foi considerado pouco relevante já que quatro dos cinco animais não apresentaram claudicação. Apenas um animal apresentou claudicação após a biópsia e tal fato foi atribuído a falhas no bloqueio anestésico durante a biópsia e à possível inexperiência já que foi o primeiro animal a ser testado. O ressurgimento de tecido queratinizado no sítio de biópsia após 40 dias em um animal sugerem a recomposição rápida do tecido removido.

Conclusão

Concluiu-se que o lamelótomo de Falcão-Faleiros é apropriado para a obtenção de biópsias do tecido lamelar do casco de bovinos, produzindo amostras com quantidade e qualidade histológica satisfatórias e sem promover prejuízos clínicos para os animais. O lamelótomo demonstrou potencial significativo para utilização em pesquisas na área de podologia veterinária podendo vir a contribuir para o avanço do conhecimento nesta área. Além disto, o uso do instrumento ora proposto pode ser promissor na rotina de diagnóstico de problemas podais em bovinos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves, G.E.S., Paes Leme, F.O., Marval, C.A., Bonna, F.A.B., Xavier, S.H.N., Faleiros, R.R., Santos, R.L. 2004. Biópsia digital em equinos com laminite induzida por sobrecarga de carboidratos. **Brasilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 41 (supl), 264-265.

Belknap, J.K., Giguère, S., Pettigrew, A., Cochran, A.M., Van Eps, A.W., Pollitt, C.C. 2007. Lamellar pro-inflammatory cytokine expression patterns in laminitis at the developmental stage and at the onset of lameness: innate vs. adaptive immune response. **Equine Veterinary Journal**, 39 (1): 42-47. doi:10.2746/042516407X155406.

Bergsten, C. 2003. Causes, risk factors, and prevention of laminitis and related claw lesions. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Suppl. 98,157-166.

Crosser, E.L. e Pollitt, C.C. 2006. Acute laminitis: descriptive evaluation of serial hoof biopsies. **AAEP proceedings**, v. 52, 542-546.

Danschler, A.M., Toelboell, T.H., Wattle, O. 2010. Biomechanics and histology of bovine claw suspensory tissue in early acute laminitis. **Journal of Dairy Science**, 93:53-62.

de Laat, M.A., McGowan, C.M., Sillence, M.N., Pollitt, C.C. 2010. Equine laminitis: Induced by 48 h hyperinsulinaemia in Standardbred horses. **Equine Veterinary Journal**, 129, 42 (2) 129-135.

de Laat, M.A., Sillence, M.N., McGowan, C.M., Pollitt, C.C. 2012. Continuous intravenous infusion of glucose induces endogenous hyperinsulinaemia and lamellar histopathology in Standardbred horses. **The Veterinary Journal**, 191: 317-322.

Ferreira, P.M., Leite, R.C., Carvalho, A.U., Facury Filho, E.J., Souza, R.C., Ferreira, M.G. 2004. Results and costs of treatment for bovine laminitis sequelae: study of 112 lameness cases in lactating cows in free-stall system. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.5, 589-594.

Gravena, K., Sampaio, R.C.L., Dias, D.P.M., Canola, P.A., Peiró, J.R., Lacerda-Neto, J.C. 2012. Evaluation of the integrity of horse hoof dermal and epidermal tissues collected by dorsal transmural. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, 858-862.

Greenough, P.R. **Bovine laminitis and lameness: a hands-on approach**. Elsevier, 2007. 311p.

Hanly, B.K., Stokes, A.M., Bell, A.M., Johnson, J.R., Keowen, M.L., Paulsen, D.B., Sod, G.A., Moore, R.M. 2009. Use of serial lamellar tissue collection via biopsy in conscious healthy horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 7, n.6, 697-702.

König, H.E. e Liebich, H. **Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas colorido**. Porto Alegre: Artmed, 2004.

Lima, L.R. 2013. **Reparixina, um antagonista de CXCR1 e CXCR2, na laminite experimental de equinos**. 2013. 62 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Mauchle, U.; Carvalho, A.U.; Alzamora Filho, F. et al. 2008. Efeito da sazonalidade sobre a ocorrência de lesões podais em vacas leiteiras. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9,109-116.

Mendes, H.M.F., Casagrande, F.P., Lima, I.R., Souza, C.H., Gontijo, L.D', Alves, G.E.S., Vasconcelos, A.C., Faleiros, R.R. 2013. Histopathology of dairy cows' hooves with signs of naturally acquired laminitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 33(5):613-619.

Mendes, H.M.F., Ferreira, P.M., Alves, G.E.S., Zambelli, B.L., Lima, I.R., Vasconcelos, A.C., Faleiros, R.R. 2012. Presence of macrophages in the hoof dermo-epidermal junction in dairy cows with and without clinical signs associate to laminitis. **XXVII World Buiatrics Congress**, 2012, Lisboa, Portugal. (resumo)

Mgasa, M.N. e Kempson, S.A. 2002. Functional anatomy of the lamellar region of normal bovine claws. **PROCEEDINGS OF THE 12 th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON LAMENESS IN RUMINANTS 9 th – 13 th JANUARY 2002**, Marriott World Center, Orlando, Florida, USA, p. 180-183.

Miskimins, D. 2002. Predominant causes of lameness in feedlot lameness and stocker cattle. **PROCEEDINGS OF THE 12 th INTERNATIONAL ON LAMENESS IN RUMINANTS 9 th – 13 th JANUARY 2002**, Marriott World Center, Orlando, Florida, USA, p. 147-151.

Mulligan, F.J. e Doherty, M.L. 2008. Production diseases of the transition cow. **The Veterinary Journal**, 176, 3-9.

- Nilsson, S.A. 1963. Clinical, morphological, and experimental studies of laminitis in cattle. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 4, suppl. 1, 1-304.
- Nocek, J.E. 1997. Bovine acidosis: implications on laminitis. **Journal of Dairy of Science**, v. 80, p. 1005-1028.
- Osorio, J.S., Fraser, B.C., Graugnard, D.E., Singh, S.S., Drackley, J.K., Garrett, E.F., Loor, J.J. 2012. Corium tissue expression of genes associated with inflammation oxidative stress, and keratin formation in relation to lameness in dairy cows. **Journal Dairy Science**, 95: 6388-6396. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-5143>
- Paes Leme, F.O., Bonna, F.A.B., De Marval, C.A., Xavier, S.H.N., Santos, R.L., Faleiros, R.R., Alves, G.E.S. 2010. Histopatologia das laminas do casco de equinos com laminate aguda induzida e tratados com ketoprofeno, fenilbutazona e flunixin meglumine. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 62 (2): 241-250.
- Randhawa, S.S., Dua, K., Banga, H.S., Singh, S.S., Malhotra, P. 2012. Arteriosclerosis in buffalo hooves - an age related change or a pathology of lameness? **Indian Journal of Animal Sciences**, 82 (7): 697-701.
- Salomon, F.V. e Geyer, H. 2006. **Atlas de Anatomia Aplicada dos Animais Domésticos**, 2ed., 2006.
- Silva, L.A.F., Silva, L.M., Romani, A.F., Rabelo, R.E., Fioravanti, M.C.S., Souza, T.M., Silva, C.A. 2001. Características clínicas e epidemiológicas das enfermidades podais em vacas lactantes do município de Orizona – GO. **Ciência Animal Brasileira**, v.2, 119-126.
- Singh, S.S., Ward, W.R., Murray, R.D. 1993. Technique of hoof biopsy in cattle. **The Veterinary Record**, v. 133, 190-191.
- Singh, S.S., Murray, R.D., WARD, W.R. 1994. Gross and histopathological study of endotoxin-induced hoof lesions in cattle. **Journal of Comparative Pathology**, 110: 103-115.
- Sprecher, D.J., Hostetler, D.E., Kaneene, J.B. 1997. A lameness scoring system that uses posture and gait to predict dairy cattle reproductive performance. **Theriogenology**, 47:1179-1187.
- Tarlton, J.F., Holah, D.E., Evans, K.M., Jones, S., Pearson, G.R., Webster, A.J.F. 2002. Biomechanical and Histopathological Changes in the Support Structures of Bovine Hooves around the Time of First Calving. **The Veterinary Journal**, 163, 196-204.
- Thoefner, M.B., Wattle, O., Pollitt, C.C. et al. 2005. Histopathology of oligofructose-induced acute laminitis in heifers. **Journal of Dairy of Science**, v. 88, 2774-2782.
- van Amstel, S. e Shearer, J. 2006. **Manual for treatment and control of lameness in cattle**. Blackwell Publishing, 212p.
- van Eps, A.W e Pollitt, C.C. 2009. Equine laminitis model: Lamellar histopathology seven days after induction with oligofructose. **Equine Veterinary Journal**, 41 (8): 735-740. doi:10.2746/042516409X444953.

Visser, M.B e Pollitt, C.C. 2011. The timeline of lamellar membrane basement changes during equine laminitis development. **Equine Veterinary Journal**, 43 (4):471-477.

Waguespack, R.W., Kemppainen, R.J., Cochran, A., Lin, H.C., Belknap, J.K. 2004. Increased expression of MAIL, a cytokine-associated nuclear protein, in the prodromal stage of black walnut-induced laminitis. **Equine Veterinary Journal**, 36 (3): 285-291.

Warnick, L.D., Janssen, D., Guard, C.L. et al. 2001. The effect of lameness on milk production in dairy cows. **Journal of Dairy of Science**, v. 84, 1988-1997.

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O instrumento cirúrgico para realização de biópsia do tecido laminar do casco de animais ungulados proposto neste trabalho mostrou-se viável e adequado para a colheita de amostras da espécie bovina, podendo ser utilizado em equinos e/ou outras espécies unguladas. A eficácia demonstrada pelo lamelótomo de Falcão-Faleiros torna o instrumento uma ferramenta promissora em estudos de podologia veterinária, com potencial para ser utilizado por profissionais Médicos Veterinários no diagnóstico precoce de enfermidades podais em rebanhos bovinos.

O instrumento apresentado reúne características desenvolvidas cuidadosa e especificamente para a função a que se destina, o que o eleva à qualidade de um instrumento cirúrgico especial.

Conforme foi demonstrado ao longo deste trabalho, o lamelótomo de Falcão-Faleiros efetivamente rompeu uma barreira encontrada pelos estudiosos em podologia de grandes animais.

A perspectiva imediata é que o instrumento proposto possa contribuir massivamente na elaboração de novos conhecimentos científicos sobre o tecido laminar e/ou laminite em bovinos e equinos. Há no lamelótomo de Falcão-Faleiros um enorme potencial gerador de conhecimento, dado pela facilidade na obtenção de amostras do tecido laminar e pela qualidade das biópsias obtidas. A expectativa é que a comunidade científica perceba este cenário e dê seguimento a novos estudos, procurando elaborar e agregar novas informações científicas em podologia.

O lamelótomo de Falcão-Faleiros pode contribuir no melhor entendimento das doenças podais em bovinos e equinos, a partir da associação dos resultados histopatológicos e da biologia molecular de biópsias obtidas, com dados clínicos dos animais sob diferentes condições experimentais. Em especial em bovinos, a associação da histopatologia e biologia molecular com dados clínicos sobre as lesões de casco e parâmetros bioquímicos em diferentes fases da vida produtiva do animal, podem contribuir decisivamente para elucidar o mecanismo das lesões podais. O instrumento proporciona que informações histopatológicas dos mesmos animais possam ser colhidas de forma seriada, eliminando-se a necessidade da eutanásia de grupos de animais.

Outro aspecto imprescindível no campo da ciência é a possibilidade de desenvolver estudos *in vitro* com fragmentos de biópsia submetidos a cultivo (cultivo de *explants*). Em condições de

cultivo celular um universo de informações pode ser obtido em um espaço curto de tempo. Obviamente, nem todas as informações obtidas *in vitro* se validam *in vivo*. Entretanto, ter a opção de trabalhar com o cultivo de *explants* tanto em bovinos como em equinos, significa poder reunir informações preliminares consistentes que não de tornar a trajetória de pesquisa *in vivo* mais produtiva. Em última análise, isto tende a melhorar a qualidade das hipóteses e dos objetivos a serem perseguidos nos estudos *in vivo*. Este resultado em si mesmo já significa um grande salto em ciência.

Para que o potencial gerador de conhecimentos do lamelótomo de Falcão-Faleiros se realize, será necessário dar ampla divulgação da tecnologia aos grupos de pesquisa interessados no Brasil e no mundo, por meio da publicação deste trabalho de tese, do artigo científico e por meio da articulação direta com pesquisadores interessados.

A perspectiva no médio e longo prazos é que este instrumento possa tornar-se mais uma ferramenta diagnóstica na rotina Médico Veterinária, especialmente na espécie bovina, em que as enfermidades podais acometem grande número de indivíduos e com impactos econômicos elevados. Para que esta proposta se concretize, é necessário primeiramente que haja intensa atividade científica sobre o tecido laminar obtido por biópsias. É necessário elaborar uma plataforma de conhecimentos e informações sobre o tecido laminar e sua relação com as doenças podais em bovinos. Esta base de conhecimentos deverá subsidiar a utilização do instrumento em escala maior, no diagnóstico precoce em Medicina Veterinária. Quando esta proposta tornar-se viável, a perspectiva é que amostragens de tecido laminar em pequenos grupos de animais possam trazer informações objetivas sobre o rebanho. Isto possibilitará ao Médico Veterinário uma intervenção mais efetiva perante as estratégias de prevenção, controle e terapêutica das enfermidades podais. Ao mesmo tempo, haverá maior consciência do estágio do curso da doença em que as intervenções serão feitas, bem como dos resultados prováveis que estas podem produzir.

A perspectiva no futuro mais distante é que o uso na prática veterinária da tecnologia apresentada neste trabalho seja cada vez mais raro. Espera-se que o instrumento proposto possa realizar sua contribuição científica e posteriormente, técnica, até alcançar-se o momento em que seja raro realizar biópsias do tecido laminar para compreender e/ou diagnosticar as alterações podais.

O instrumento foi desenvolvido para a utilização sobre o tecido laminar, especialmente da parede dorsal do casco. Embora seu uso não tenha sido testado em outras regiões do casco, acredita-se que ele possa ser estendido para outras regiões, especialmente a sola em bovinos.

A motivação para a invenção do instrumento cirúrgico desenvolvido durante este trabalho de tese partiu de uma barreira de pesquisa vivenciada na prática pelos pesquisadores responsáveis. A escolha por inventar uma solução foi o resultado natural do intenso, autêntico e entusiasta envolvimento dos pesquisadores responsáveis com a idéia de ciência, de geração de conhecimento e de contribuição para o bem comum, em que o bem-estar de bovinos e equinos figura como o meio.

A proteção intelectual proposta neste trabalho não foi apenas do mérito dos pesquisadores, mas das instituições nas quais estão inseridos, ou seja, Escola de Veterinária e Universidade Federal de Minas Gerais, que ampararam os capitais humano e material e forneceram as condições jurídicas para a elaboração da proposta de patente.

Em outras palavras, o pedido de patente deste trabalho faz parte de uma cultura e mentalidade voltadas para a valorização do conhecimento e da produção intelectual em território brasileiro. Com isto, é oportuno afirmar que esta cultura deve ser multiplicada às gerações seguintes, para que o país esteja atento a melhorar a qualidade de sua produção científica seja no cenário interno ou mundial. Igualmente importante é ressaltar que a nem toda produção científica cabe proteção intelectual e que isto jamais desqualificará seu mérito científico. A proteção intelectual não deve ser vista em si mesma como um fim que se sobrepõe aos demais aspectos da produção científica, mas como um caminho possível dentro de uma cultura de valorização e de qualidade da produção científica.

A UFMG ocupa posição de destaque entre as universidades brasileiras pelo número de patentes que gera. Indubitavelmente estes dados expressam a mentalidade de seus pesquisadores (alunos, professores e técnicos) quanto à produção de conhecimento original, inovador e com potencial comercial. Contudo, esta posição de destaque não deve obscurecer a necessidade de dar continuidade aos depósitos de patente no aspecto da transferência da tecnologia. A transferência de tecnologia é uma etapa importante de todo o processo de produção de patentes. É nesta etapa que os produtos gerados realizam seus objetivos técnicos, sociais e econômicos.

A etapa da transferência de tecnologia não foi iniciada durante este trabalho. Para seu início, é necessária a articulação com empresas do setor de instrumental cirúrgico veterinário. Para isto, precisa-se manter a comunicação com o órgão da universidade responsável pela orientação dos pesquisadores sobre os pedidos de patente, o CTIT.

A expectativa quanto à transferência de tecnologia é que haja efetivamente a transferência da patente para uma empresa interessada e capaz de produzir e comercializar o lamelótomo de Falcão-Faleiros. A realização desta etapa consagrará o pleno êxito do processo de produção da patente apresentada neste trabalho.

No âmbito internacional, é desejável a articulação com empresas do ramo de instrumental cirúrgico, principalmente a partir da publicação deste trabalho de tese e do artigo científico relacionado. A partir deste momento, o produto terá ampla divulgação e caso não haja o patenteamento internacional e/ou a transferência da tecnologia internamente, haverá o risco de que todo o esforço empenhado em prol da proteção intelectual realizados neste trabalho se perca.

Se a etapa de desenvolvimento do produto e seu depósito de patente, se constituíram um desafio superado neste trabalho, acredita-se que a transferência de tecnologia é uma etapa em aberto que pode vir a ser enfrentada pelas próximas gerações.

Por fim, este trabalho é também dedicado a todos os Médicos Veterinários, e em especial aos Médicos Veterinários Brasileiros, para que se sintam orgulhosos da profissão que escolheram e da Medicina Veterinária praticada no Brasil.

ANEXO 1

Resumo executivo da patente depositada



INSTRUMENTO CIRÚRGICO PARA REALIZAÇÃO DE BIÓPSIA DE CASCO

DESCRIÇÃO TÉCNICA

A presente invenção consiste em um instrumento cirúrgico para realização de biópsia de casco em animais ungulados. A análise do tecido obtido a partir de biópsia de casco pode ser utilizada como ferramenta auxiliar definitiva no diagnóstico precoce das alterações da junção derme-epiderme do casco de qualquer animal ungulado, especialmente em bovinos e equinos.

INDICAÇÕES

- ✓ Biópsia de casco para diagnóstico precoce das alterações da junção derme-epiderme do casco.
- ✓ Biópsia de casco para fins de estudo e pesquisa das doenças digitais em bovinos e equinos.

BENEFÍCIOS E VANTAGENS

- ✓ Permite a colheita de extensa quantidade de material, incluindo a derme profunda, sem distorcer ou danificar o tecido;
- ✓ Obtenção de fragmentos de biópsia de tamanhos variáveis; Demanda manobras simples e de fácil execução;
- ✓ Obtenção da biópsia em uma sequência única de movimentos;
- ✓ Não necessita de instrumentos auxiliares durante seu uso propriamente dito; Supera os demais métodos quanto à qualidade da desconexão entre a derme e a falange distal;
- ✓ Supera os demais métodos quanto à qualidade histológica das amostras obtidas; Apresenta desempenho, eficiência e rapidez superiores aos métodos citados na literatura.

ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO

- Protótipo desenvolvido.

PUBLICAÇÃO RELEVANTE

Ainda não foi publicada

PROPRIEDADE INTELECTUAL

TÍTULO DA APLICAÇÃO: "INSTRUMENTO CIRÚRGICO PARA REALIZAÇÃO DE BIÓPSIA DE CASCO EM ANIMAIS UNGULADOS"

Número de depósito:

Data de prioridade:

OPORTUNIDADE DE NEGÓCIO

Disponível para licenciamento ou convênio de pesquisa.

A empresa interessada deverá contatar a **Coordenadoria de Transferência e Inovação Tecnológica da UFMG - CTIT**.

*Referência CTIT:
Última atualização: 19/07/2013*



Fone: +55 31 3409.3929 / 3409.6465

E-mail: transferencia@ctit.ufmg.br


Para mais informações, visite nosso site: <http://www.ufmg.br/ctit>


Referência CTIT:
Última atualização: 19/07/2013

ANEXO 2

Protocolo do depósito de patente junto ao INPI

< Uso exclusivo do INPI >

 INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL PROTOCOLO DE DEPÓSITO 23/07/2013 13:02 DEHG 014130001533 BR 10 2013 018765 8	Espaço reservado para a etiqueta	Espaço reservado para o código QR
---	----------------------------------	-----------------------------------

 INPI INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL	INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL Sistema de Gestão da Qualidade Diretoria de Patentes		
DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 1/3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:
 O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. **Depositante (71):**
 - 1.1 Nome: Universidade Federal de Minas Gerais
 - 1.2 Qualificação: Instit. de Ensino e Pesquisa
 - 1.3 CNPJ/CPF: 17217985000104
 - 1.4 Endereço Completo: Av. Antonio Carlos, 6627 - Pampulha, Belo Horizonte - MG, Brasil
 - 1.5 CEP: 31270-901
 - 1.6 Telefone: (31) 3409-4774
 - 1.7 Fax: (31) 3409-6430
 - 1.8 E-mail: patentes@clit.ufmg.br

continua em folha anexa

2. **Natureza:** Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

3. **Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):**
 INSTRUMENTO CIRÚRGICO PARA REALIZAÇÃO DE BIÓPSIA DE CASCO EM ANIMAIS UNGULADOS

continua em folha anexa

4. **Pedido de Divisão:** do pedido Nº _____ Data de Depósito: _____

5. **Prioridade:** Interna (66) Unionista (30)

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

País ou Organização do depósito	Número do depósito (se disponível)	Data de depósito

continua em folha anexa

INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL
 PROTOCOLO DE DEPÓSITO
 23/07/2013 13:02 DEHG
 014130001533
 52400 048214/2013-81

Handwritten signature



INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA Título do Documento:	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 2/3
	Depósito de Pedido de Patente	Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

6. Inventor (72):

Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seus nome(s), neste caso não preencher os campos abaixo.

6.1 Nome: RAFAEL RESENDE FALEIROS

6.2 Qualificação: PESQUISADOR

6.3 CPF: 468.924.276-34

6.4 Endereço Completo: RUA PARÁ, 50, BAIRRO JOÁ, LAGOA SANTA, MG

6.5 CEP: 33.400-000

6.6 Telefone: 31 - 3409-4774

6.7 FAX: 31 - 3409-6430

6.8 E-mail: patentes@clit.ufmg.br

continua em folha anexa

7. Declaração de divulgação anterior não prejudicial.

Artigo 12 da LPI – período de graça.

Informe no item 11.13 os documentos anexados, se houver.

8. Declaração na forma do item 3.2 da Instrução Normativa PR nº 17/2013:

Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

9. Procurador (74):

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço Completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 FAX:

9.8 E-mail:

continua em folha anexa

10. Listagem de seqüências biológicas.

Informe nos itens 11.9 ao 11.12 os documentos anexados, se houver.

Handwritten signature



INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 3/3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

11. Documentos Anexados:

(Assinale e indique também o número de folhas):

(Deverá ser indicado o número total de somente uma das vias de cada documento).

	Documentos Anexados		folhas
<input checked="" type="checkbox"/>	11.1	Guia de Recolhimento da União (GRU).	1
<input type="checkbox"/>	11.2	Procuração.	
<input type="checkbox"/>	11.3	Documentos de Prioridade.	
<input type="checkbox"/>	11.4	Documento de contrato de trabalho.	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.5	Relatório descritivo.	23
<input checked="" type="checkbox"/>	11.6	Reivindicações.	2
<input checked="" type="checkbox"/>	11.7	Desenho(s) (se houver). Sugestão de figura a ser publicada com o resumo: nº, _____ por melhor representar a invenção (sujeito à avaliação do INPI).	3
<input checked="" type="checkbox"/>	11.8	Resumo.	1
<input type="checkbox"/>	11.9	Listagem de seqüências em arquivo eletrônico: _____ nº de CDs ou DVDs (original e cópia).	
<input type="checkbox"/>	11.10	Código de controle alfanumérico no formato de código de barras referente às listagem de seqüências.	
<input type="checkbox"/>	11.11	Listagem de seqüências em formato impresso.	
<input type="checkbox"/>	11.12	Declaração relativa à Listagem de seqüências.	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.13	Outros (especificar) ANEXO DE INVENTORES, PORTARIA.	2

12. Total de folhas anexadas: 32 fls.

13. Declaro, sob as penas da Lei que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Belo Horizonte, 23/07/2013

Local e Data

Marcia Cotta Mancini

Assinatura e Carimbo

Prof. Marcia Cotta Mancini
Pró-Reitora Adjunta de
Pesquisa/UFMG
Nomeação: 021/2011

ANEXO DE INVENTORES

Título: INSTRUMENTO CIRÚRGICO PARA REALIZAÇÃO DE BIÓPSIA DE CASCO EM ANIMAIS UNGULADOS

Página 1

Nome: HELOISA MARIA FALCAO MENDES

Qualificação: PESQUISADOR

CPF: 049.380.336-07

Endereço Completo: RUA JOAO ANTONIO CARDOSO, 399, KITNET 108, BAIRRO OURO PRETO, BELO HORIZONTE, MG

CEP: 31.310-490


Telefone: 31 - 3409-4774

FAX: 31 - 3409-6430

E-mail: patentes@clit.ufmg.br

ANEXO 3

Protocolo da Comissão de Ética no Uso de Animais

	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
UFMG	
CERTIFICADO	
Certificamos que o Protocolo nº. 286 / 2013, relativo ao projeto intitulado "Efeitos da hiperinsulinemia sobre o tecido laminar do casco de bovinos leiteiros", que tem como responsável Rafael Resende Faleiros, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 15/10/2013. Este certificado expira-se em 15/10/2018.	
CERTIFICATE	
We hereby certify that the Protocol nº. 286 / 2013, related to the Project entitled "Effects of hyperinsulinemia on the hoof lamellar tissue dairy cattle", under the supervision of Rafael Resende Faleiros, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 15/10/2013. This certificate expires in 15/10/2018.	
FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS Coordenador(a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 15/10/2013.	
Atenciosamente.	
Sistema CEUA-UFMG https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/	
Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br	