

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

LESÕES NA JUNÇÃO DERME-EPIDERME DO CASCO
DE VACAS DE APTIDÃO LEITEIRA DE DESCARTE
COM E SEM SINAIS CLÍNICOS DE LAMINITE

Heloisa Maria Falcão Mendes

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2010

Heloisa Maria Falcão Mendes

**LESÕES NA JUNÇÃO DERME-EPIDERME DO CASCO
DE VACAS DE APTIDÃO LEITEIRA DE DESCARTE
COM E SEM SINAIS CLÍNICOS DE LAMINITE**

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

Orientador: Prof. Rafael Resende Faleiros.

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2010

Dissertação defendida e aprovada em 08 de Outubro de 2010, pela Comissão Examinadora constituída por:

Prof. Rafael Resende Faleiros

(Orientador)

Dr. Luiz Antônio Franco da Silva

Prof. Antônio Último de Carvalho

Dr. Marco Aurélio Ferreira Lopes

Dedico este trabalho aos meus pais:

D. Maria José Falcão Mendes, exemplo de trabalho e fé;

Sr. Genésio Paulino Mendes, quem antes de eu nascer pedia a Deus que o(a) filho(a) que estava por vir fosse dedicado aos estudos.

“_ 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)

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, D. Maria José Falcão Mendes e Sr. Genésio Paulino Mendes. Pelo alicerce moral, pelo apoio emocional, psicológico e financeiro em toda minha vida e durante a execução deste trabalho. Pelo exemplo de humanos que são, que minha maturidade crescente faz cada vez mais admirar, respeitar e honrar.

Aos meus irmãos, Humberto Cleber Falcão Mendes e Sidnei Roberto Leite Mancilha. Por me apoiarem, estimularem e se orgulharem de mim.

Ao meu orientador, Prof. Rafael Resende Faleiros. Por ter sido minha referência acadêmico-científica desde a graduação. Pelas oportunidades concedidas e inclusive pela execução deste trabalho. Por não ter me privado dos desafios deste trabalho, mesmo os dolorosos. Pelo apoio em toda minha jornada em Belo Horizonte/MG.

Ao Prof. Geraldo Eleno Silveira Alves. Pela co-orientação neste trabalho e por ter me orientado durante o período de ausência do Prof. Rafael. Aproveito a oportunidade para expressar minha gratidão pelos ensinamentos de vida e pelo exemplo de humano e profissional, nesta ordem.

Ao Prof. Paulo Marcos Ferreira. Pela pronta disponibilidade de co-orientação neste trabalho e pelas contribuições na metodologia.

Ao Prof. Anilton César Vasconcelos. Por permitir a execução deste trabalho no Laboratório de Apoptose/Instituto de Ciências Biológicas (ICB)/UFMG e pela disposição em colaborar sempre.

Ao Prof. Wagner Luiz Moreira dos Santos. Por intermediar a conversação com os frigoríficos onde parte deste trabalho foi executada.

Ao proprietário e Médico Veterinário Fernando Machado Silva pela cessão da propriedade Coqueiro do Santo Inácio, animais, recursos humanos e materiais para execução deste experimento.

Ao Frigorífico Industrial de Betim Ltda (Frigobet). Por ter permitido a entrada da equipe de trabalho e a coleta dos cascos em suas instalações.

Ao Frigorífico Hiper Carnes. Por permitir a entrada da equipe de trabalho e os treinamentos iniciais na coleta de amostras de cascos em suas instalações.

Aos colegas da pós-graduação, alunos de iniciação científica e estagiários que colaboraram nas etapas deste trabalho. Meu muito obrigada pelo trabalho compartilhado, pelas conversas enriquecedoras e descontraídas. Pela oportunidade que vocês me deram de, ensinar algo, e aprender muito com todos vocês. Agradeço ao Bruno Andrade, Bruno Zambelli Loiacono, Deliene Moreira, Cairo Henrique, Fabiane Cassou, Fernando Passon Casagrande, Ingrid R. Lima, José Ramón Martínez Aranzales, Júlia Timponi, Leonardo R. de Lima, Lílian Gontijo, Mayara Gonçalves, Renata Abrantes e Thiago Maia.

À equipe do Laboratório de Apoptose do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG: Prof^a Luciana Moro, Bárbara Verçosa, Núbia Braga e Soraia. Pelo apoio com materiais e pelas conversas e brincadeiras.

Ao Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB/UFMG. Pela cessão de microscopia para obtenção de fotos histológicas.

Ao Laboratório de Histotécnica do ICB/UFMG: Gisele, Jacqueline, Olinda e Vânia. Pelo apoio com o processamento das amostras de tecido.

À Inês, do Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da UFMG. Pelo apoio junto ao processamento e obtenção dos cortes histológicos.

Ao Sr. Dário, do Laboratório de Reprodução da Escola de Veterinária/UFMG. Pelo armazenamento e cuidado das amostras conservadas em nitrogênio líquido.

À Cássia, do Núcleo de Assessoramento à Pesquisa (NAPq) da Escola de Veterinária da UFMG, pelo carinho e torcida.

Aos colegas Carlos Giovanni Pancoti, Adriano França da Cunha e Paulo Eduardo Machado Gonçalves. Pelo estímulo, exemplo e companheirismo.

À ex-residente do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG, Maria Rachel da Fonseca Matos (Rachel). Pela oportunidade que, durante seu treinamento em residência no hospital, me concedeu de dar meus primeiros passos no campo do trabalho.

Aos colegas da Moradia Universitária da UFMG, muitos já idos para não se sabe onde. Pelas conversas, convivência e aprendizados.

Ao Grupo de Iniciação Científica (GIP) da Escola de Veterinária/UFMG cujas palestras tiveram enorme influência na minha formação em pesquisa desde a graduação.

À Fundação Universitária Mendes Pimentel (FUMP) pela concessão dos benefícios de acesso à moradia universitária, alimentação e saúde durante a execução deste trabalho.

À FAPEMIG e ao CNPq. Pela concessão da bolsa parcial de estudos.

Aos animais utilizados neste experimento.

Àqueles que, se sentindo parte deste trabalho, porventura não tiveram seus nomes lembrados por mim. Meu muito obrigada!

SUMÁRIO

1. RESUMO	13
2. ABSTRACT.....	14
3. INTRODUÇÃO.....	15
4. OBJETIVOS.....	16
5. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
5.1 Importância econômica da claudicação e da laminite em rebanhos leiteiros.....	16
5.2 Incidência e prevalência de claudicações.....	17
5.3 Prevalência de lesões causadas por laminite.....	17
5.4 Prevalência de demais afecções podais.....	18
5.5 Intensificação da produção e perdas econômicas.....	19
5.6 Fatores predisponentes para lesões podais.....	19
5.7 Anatomia dos dígitos do bovino.....	20
5.8 Histologia da epiderme e derme do casco.....	20
5.9 Laminite.....	24
5.9.1 Conceito.....	24
5.9.2 Histórico.....	24
5.9.3 Fisiopatologia.....	24
5.9.4 Fatores predisponentes.....	26
5.9.5 Formas de laminite e tratamento.....	27
5.9.6 Prevenção e controle.....	28
5.9.7 Patogênese das lesões associadas à laminite.....	29
6. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
6.1 Comitê de ética.....	31
6.2 Animais.....	31
6.3 Manejo e alimentação.....	32
6.4 Delineamento experimental.....	32

6.5 Avaliação clínica.....	33
6.6 Colheita de materiais em frigorífico.....	35
6.7 Processamento das amostras.....	37
6.8 Estudo das lesões histológicas.....	42
6.9 Análise estatística.....	45
7. RESULTADOS.....	45
8. DISCUSSÃO.....	59
8.1 Identificação dos membros coletados.....	59
8.2 Método para colheita das amostras de tecidos.....	60
8.3 Prevalência dos achados clínicos no rebanho estudado.....	60
8.4 Comparação entre grupos: achados clínicos.....	61
8.5 Comparação entre grupos: achados histológicos.....	63
8.5.1 Coloração de H&E.....	63
8.5.2 Coloração de PAS.....	66
9. CONCLUSÃO.....	67
10. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	68
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

ANEXOS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização dos grupos experimentais e número de animais por grupo.....	31
Tabela 2 - Grau de claudicação e respectivas alterações clínicas.....	32
Tabela 3 – Relação de possíveis lesões macroscópicas associadas à laminite.....	32
Tabela 4 – Critérios de inclusão para os grupos experimentais.....	32
Tabela 5 – Escores para lesões microscópicas na junção derme-epiderme no casco de bovino.....	41
Tabela 6 – Escores para o estudo de alterações nas células epidermais da junção derme-epiderme do casco de bovino.....	42

Tabela 7 – Caracterização das regiões da membrana basal das lâminas epidermais do casco de bovino.....	42
Tabela 8 – Escores para estudo de irregularidades na membrana basal da junção derme-epiderme no casco de bovino.....	42
Tabela 9 – Prevalência de lesões clínicas associadas à laminite no rebanho estudado.....	43
Tabela 10 – Prevalência de lesões clínicas associadas à laminite nos grupos estudados.....	45
Tabela 11 – Distribuição dos escores para infiltrado inflamatório na derme dos diferentes grupos.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplo da identificação do membro torácico de um bovino.....	33
Figura 2 – Região de obtenção dos fragmentos de casco de bovino.....	34
Figura 3 – Fragmento do casco de bovino em corte transversal demonstrando as regiões solear, axial e dorsal.....	34
Figura 4 – Fragmento de casco bovino com demonstração da junção derme-epiderme.....	35
Figura 5 – Materiais utilizados para recorte de fragmento de casco de bovino.....	35
Figura 6 – Demonstração passo-a-passo do recorte de fragmento de casco bovino na região solear.....	37
Figura 7 – Demonstração passo-a-passo do recorte de fragmento de casco bovino na região axial.....	38
Figura 8 – Demonstração passo-a-passo do recorte de fragmento de casco bovino na região dorsal.....	39
Figura 9 – Amostras da junção derme-epiderme do casco de bovino.....	40
Figura 10 – Fotos dos cascos de bovinos classificados em cada grupo experimental.....	44
Figura 11 – Comparação entre grupos quanto aos escores histológicos para as lesões investigadas na derme das diferentes regiões do casco.....	46
Figura 12 – Histologia da junção derme-epiderme da região da sola em animal de grupo G1 na coloração de H&E.....	48
Figura 13 – Histologia da junção derme-epiderme das regiões axial e dorsal em animal de grupo G1 na coloração de H&E.....	49
Figura 14 – Histologia da junção derme-epiderme das regiões solear, axial e dorsal em animais dos grupos G2 e G3 na coloração de H&E.....	50

Figura 15 – Comparação entre regiões do casco quanto aos escores histológicos nos diferentes grupos.....	51
Figura 16 – Escores histológicos para infiltrado inflamatório na lâmina dermal.....	53
Figura 17 – Escores para alterações na morfologia das células epidermais.....	54
Figura 18 – Histologia das lâminas da região axial do casco na coloração de PAS.....	54
Figura 19 – Escores para irregularidades na membrana basal.....	55
Figura 20 – Escores para irregularidades na membrana basal em suas diferentes regiões.....	56
Figura 21 – Histologia das lâminas dérmicas e epidérmicas evidenciando a membrana basal em suas diferentes regiões.....	57

LISTA DE SIGLAS

G1 – Grupo controle (sem sinais de laminite e sem claudicação)

G2 – Grupo com sinais de laminite mas sem claudicação

G3 – Grupo com sinais de laminite e com claudicação

H&E – Hematoxilina e Eosina

PAS – Ácido Periódico de Shiff

MB – Membrana basal

1. RESUMO

O objetivo foi detectar e comparar as lesões histológicas na junção derme-epiderme do casco de vacas de aptidão leiteira com e sem sinais clínicos de laminite. 39 vacas de aptidão leiteira de descarte provenientes de um mesmo rebanho foram classificadas em três grupos: sem sinais clínicos de laminite e sem claudicação (G1), com linhas de estresse e outras lesões associadas à laminite, porém sem (G2) e com (G3) claudicação. Amostras do casco obtidas na ocasião do abate foram fixadas em formol (48h) e inclusas em parafina. Cortes histológicos de 5µm foram obtidos, corados (pelas técnicas de H&E e PAS) e examinados ao microscópio de luz. Congestão, hemorragia, infiltrado inflamatório, irregularidades na membrana basal (MB) e alterações na morfologia das células epidermais foram avaliadas semiquantitativamente por meio de escores. Para isso, os cortes das regiões solear, axial e dorsal foram avaliados às cegas pelo mesmo pesquisador. Os escores das lesões nas diferentes regiões do casco dentro do mesmo grupo e nos diferentes grupos para cada região do casco foram comparados usando análises não paramétricas ($P < 0,05$). Algum grau de infiltrado inflamatório foi detectado em todas as regiões do casco nos três grupos. Entre as regiões, verificaram-se diferenças apenas na congestão em G1 (solear > axial e dorsal) e na hemorragia em G3 (solear > axial). Entre grupos, não houve diferenças estatísticas para nenhuma das variáveis estudadas, exceto para hemorragia na derme solear ($G3 > G1$ e $G2$) e na derme dorsal ($G3 > G1$). Vacas sem sinais clínicos de laminite (G1) apresentaram índices de inflamação e alteração de células epidermais semelhantes aos dos grupos com sinais de laminite. Inflamação generalizada da junção derme-epiderme associada à alteração das células epidermais foi um achado comum nas vacas estudadas, mesmo em unhas que não apresentaram linhas de estresse ou outros sinais clínicos de laminite. Esses achados indicam que a infiltração leucocitária ocorre em toda a junção derme-epiderme do casco mesmo em animais que não apresentam sinais clínicos de laminite em bovinos de aptidão leiteira.

Palavras-chave: bovino, vaca de aptidão leiteira, podologia, casco, problemas de casco, laminite, junção derme-epiderme

2. ABSTRACT

To detect and compare histopathological lesions in the dermo-epidermal junction of dairy cows with and without signs of laminitis. 39 cows from the same herd were classified in three groups: without any evident sign of laminitis and lameness (G1), and with hoof stress lines and other signs associated to laminitis and without (G2) and with (G3) lameness. Hoof samples were taken at slaughter, formalin fixed (24 h) and paraffin-embedded as usual. 5- μ m tissue sections were stained (H&E and PAS) and examined under light microscope. Congestion, hemorrhage and inflammatory cell accumulation in the dermis, irregularities in the basal membrane (BM) and alterations in the morphology of the epidermal cells were investigated for semiquantitative tissue evaluation. Individual tissue sections from the solar, axial and dorsal regions were blindly scored by the same researcher. Different regions within the same group and different groups within the same region were compared using on ranks analysis of variance ($P < 0.05$). Signs of inflammation were detected in all regions of hoof in cows from the three groups. Within tissues, differences were seen only in congestion in G1 (solar > axial e dorsal) and in hemorrhage in G3 (solar > axial). Within groups, differences were not detected except by hemorrhage in the solar dermis (G3 > G1 e G2) and in the dorsal dermis (G3 > G1). Despite no clinical signs of laminitis, G1 cows presented the same level of lamellar inflammation and epidermal degradation compared to clinical laminitic groups. Generalized dermal-epidermal junction inflammation and epidermal changes were a common finding in studied dairy cows even in those without clinical signs of laminitis. These findings indicates that the clinical signs of laminitis in dairy cows occurs subsequently to leukocyte infiltration and vascular fragility of the whole hoof dermal-epidermal junction.

Key-words: bovine, dairy cattle, podiatry, claw, hoof diseases, laminitis, dermo- epidermal junction

3. INTRODUÇÃO

Estima-se que as perdas econômicas causadas por claudicações em vacas leiteiras só são menores que os prejuízos causados por mastites e doenças do trato reprodutivo (VERMUNT e GREENOUGH, 1995; GREENOUGH, 2007). As claudicações interferem diretamente na produção de leite, causando perda estimada de 20% da lactação em casos graves, e exercem efeitos diretos sobre a reprodução na medida em que reduzem a manifestação de cio e a taxa de concepção (FERREIRA, 2003).

A laminite é considerada a principal causa de claudicação em bovinos leiteiros (NOCEK, 1997). Caracterizada pela inflamação das lâminas do casco, resulta em várias alterações no tecido córneo que, por um lado causam claudicação e por outro, predispõem o animal a outras deformações do casco que podem agravar a claudicação. Assim, a laminite tem sido relatada como desencadeante de várias outras lesões no casco como afecções da sola (hemorragia e úlcera) e da linha branca (alargamento, hemorragia, infecção, abscessos) (GREENOUGH, 2007).

Acredita-se que a laminite seja uma doença de origem multifatorial sistêmica com manifestação local no dígito. Doenças sistêmicas como mastite, endometrite e acetonemia são apontadas como potenciais desencadeadoras de laminite (VERMUNT e GREENOUGH, 1994). Contudo, o principal fator causal da doença é a acidose ruminal, provocada pela ingestão de quantidade excessiva de carboidratos (SHEARER, 2006).

Ainda não se conhece exatamente qual fator determina o aparecimento da inflamação no tecido lamelar, bem como a extensão dessa inflamação em outras estruturas do casco

tanto em bovinos (THOEFNER et al., 2005) como em equinos (LINFORD, 2006), outra espécie em que a laminite tem grande importância clínica e econômica. Nas duas espécies, vários estudos vem sendo conduzidos para tentar determinar fatores desencadeantes da laminite. Entretanto esses estudos estão mais avançados em equinos, onde vários modelos de indução de laminite foram desenvolvidos.

Baseado nesses estudos, hoje existem três principais teorias sobre a fisiopatologia dessa afecção, a isquêmica, a tóxico-enzimática e a da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS). Pela teoria isquêmica, o processo se inicia por meio de alterações circulatórias no casco que prejudicariam a nutrição das células dermais e epidermais promovendo morte celular e subsequente inflamação (NICOLLETTI, 2004). Na teoria tóxico-enzimática, o dano tecidual inicial envolvendo a membrana basal da junção derme-epiderme seria promovido pela ativação de proteinases da matrix extracelular diretamente por toxinas bacterianas (POLLITT, 2007; POLLITT e VISSER, 2010). Já na teoria da SIRS, acredita-se que o processo se inicia diretamente pela resposta inflamatória do dígito ocorrida em resposta ao processo inflamatório sistêmico (BELKNAP, 2009). Por esta teoria, a migração leucocitária pelos tecidos do casco seria a principal promotora das lesões teciduais.

Atualmente em bovinos, a teoria isquêmica tem sido a mais aceita, pois acredita-se que a acidose ruminal provoca a liberação de substâncias vasoativas na corrente circulatória, causando alterações vasculares no cório digital e levando à laminite (NICOLLETTI, 2004). Em virtude das alterações vasculares que reduzem o aporte de nutrientes e oxigênio para a camada de células vivas da epiderme, as fases de

proliferação e diferenciação das células epidermais ficam comprometidas resultando em formação de estrato córneo macio e de baixa qualidade. Assim, tem sido sugerida a substituição da terminologia laminite, pela expressão disfunção do estrato córneo da unha (do inglês: “claw horn disruption” - CHD) (SHEARER, 2006).

Contudo, em equinos, vários estudos têm falhado ao tentar provar que a isquemia seria o principal fator desencadeante (VAN EPS e POLLITT, 2006). Também em equinos, há controvérsias sobre o processo inflamatório. Não se conhece se a inflamação é causa ou consequência das alterações morfofuncionais na junção derme-epiderme do casco (FALEIROS et al., 2009).

De acordo com a teoria da SIRS, a inflamação do tecido laminar do casco não é consequência das alterações morfofuncionais, mas sim a causa delas, em virtude da presença de processos inflamatórios sistêmicos. Ainda, de acordo com esta teoria, acredita-se que as células epiteliais do casco sejam das primeiras células a serem afetadas pelos processos inflamatórios sistêmicos da SIRS, à semelhança do que ocorre no pulmão, rim e fígado de humanos com sepsis (BELKNAP, 2009).

Estudos demonstraram que na sepsis em humanos, ocorre falência múltipla de órgãos subsequente aos processos inflamatórios sistêmicos. Dentre os órgãos afetados estão pulmão, rim, fígado e intestino (BROWN et al., 2006). Em equinos estudos recentes demonstraram indícios de processos semelhantes. Foi demonstrada inflamação no pulmão de cavalos após injúria de isquemia e reperfusão no cólon menor (FALEIROS et al., 2008).

Frente à controvérsia entre os autores que acreditam que a laminite em bovinos resulta

de um processo circulatório, sem que necessariamente haja insulto inflamatório inicial, e os recentes achados em equinos demonstrando envolvimento precoce de mediadores e células inflamatórias na laminite, o objetivo deste trabalho foi investigar indícios histológicos de inflamação e danos teciduais no casco de bovinos de aptidão leiteira procurando similaridades com a espécie equina quanto ao envolvimento dos processos inflamatórios locais.

4. OBJETIVOS

Fazer um levantamento epidemiológico das alterações de casco relacionadas à laminite em vacas de aptidão leiteira de descarte.

Detectar e comparar lesões histológicas na junção derme-epiderme das regiões solear, axial e dorsal do casco de vacas de aptidão leiteira de descarte com e sem sinais clínicos de laminite.

5. REVISÃO DE LITERATURA

5.1 Importância econômica da claudicação e da laminite em rebanhos leiteiros

A incidência de doenças que causam claudicação em bovinos leiteiros aumentou nos últimos anos de tal modo que atualmente a claudicação é considerada um dos principais problemas na bovinocultura leiteira (BLOWEY, 2008).

Estima-se que as perdas econômicas causadas por claudicações em vacas leiteiras só são menores que os prejuízos causados por mastites e doenças do trato reprodutivo (VERMUNT e GREENOUGH, 1995; GREENOUGH, 2007). As claudicações interferem diretamente na produção de leite, causando perda estimada de 20% da lactação em casos graves, e exercem efeitos diretos sobre a reprodução na medida em que reduzem a manifestação de cio e a taxa de concepção (FERREIRA

2003). Vacas claudicantes apresentaram redução média na produção de leite de 1,5kg/dia durante duas semanas após o diagnóstico e tratamento da claudicação. O baixo consumo de alimentos em virtude da dor e relutância à movimentação foram implicados nesta redução (WARNICK et al., 2001).

A laminite subclínica é um importante fator causal das claudicações (VERMUNT e GREENOUGH 1995), sendo responsável por 62% delas em bovinos leiteiros (NOCEK 1997).

Exemplificando a dimensão das perdas econômicas, no Brasil, registrou-se custo de 52,69 dólares/animal com tratamento de lesões podais variadas (SOUZA et al., 2005). Já com o tratamento de animais com sequelas de laminite, registrou-se custo de 44,68 dólares/animal totalizando um gasto de 5.005,23 dólares por ano, em um rebanho de 112 animais tratados, (FERREIRA, 2003) portanto um substancial impacto econômico negativo.

5.2 Incidência e prevalência de claudicações

A incidência de claudicação foi crescente nos últimos anos. Dados britânicos mostram a evolução das taxas de incidência em rebanhos leiteiros: 4% em 1960, 11% em 1977, 25% em 1983, 54,6% em 1996 e 68,9% em 2000 (BLOWEY, 2008).

Estudos de incidência de claudicação não são muito comuns no Brasil, contudo, recentemente, em animais mantidos sob regime de confinamento (“free-stall”) na bacia leiteira de Minas Gerais, foi registrada incidência anual de 122%. Tal achado indica não só que 100% dos animais foram acometidos, mas ainda, que 22% deles foram afetados mais de uma vez durante o ano por episódios de claudicação (FERREIRA, 2003). Quanto à prevalência, em animais confinados foram registradas taxas de 7,9% (MOLINA et al., 1999),

22,2% (NICOLLETTI, 2001) e 29% (FERREIRA, 2003). Em animais criados em regime semi-extensivo registrou-se prevalência de 29,67% de claudicação (SILVA et al., 2001).

No Chile, em rebanhos mantidos sob condições extensivas com ou sem estabulação no inverno, foi encontrada prevalência de claudicação de 28,7% e 32% respectivamente (FLOR e TADICH, 2008).

Portanto, esses dados sinalizam a magnitude do problema que se tornou a claudicação em rebanhos leiteiros no Brasil e no mundo na atualidade.

5.3 Prevalência de lesões causadas por laminite

As lesões causadas por laminite apresentam elevada prevalência nos sistemas de produção na atualidade. Em vacas criadas em sistema “free-stall” as lesões secundárias à laminite como abscessos de sola/talão e doença da linha branca foram responsáveis por 68,02% das claudicações (FERREIRA, 2003). Em outro estudo, o levantamento de lesões em vacas lactantes confinadas, registrou que as lesões podais mais prevalentes foram erosão de talão (100%), estrias horizontais (98,9%), doença de linha branca (82,2%), hemorragia de sola (78,9%), casco em tesoura (37,8%) e hemorragia de linha branca (35,6%). Com exceção da erosão de talão, a elevada prevalência destas lesões pressupõe a ocorrência de laminite subclínica, especialmente levando em consideração as condições de confinamento a que os animais foram submetidos (POZZATTI et al., 2009).

A laminite subclínica é uma condição atribuída à tecnificação dos rebanhos, presente em condições mais intensivas de criação. Contudo, mesmo em condições extensivas, foram diagnosticadas altas prevalências de lesões associadas com a presença de laminite, quais foram: doença

de linha branca (54,9%), hemorragia de sola (52,7%), úlcera de sola (30,6%) e sola dupla (21,4%) (FLOR e TADICH, 2008). Quando, em condições de criação extensiva, a prevalência de lesões associadas à laminite é baixa, tal fato é atribuído à ingestão de fibras em quantidade suficiente para promover o tamponamento ruminal, reduzindo assim os riscos de acidose e laminite (SILVEIRA et al., 2009).

5.4 Prevalência de demais afecções podais

Além das lesões causadas por laminite, as lesões infecciosas dos dígitos ocupam posição de destaque entre as afecções podais nos rebanhos. Foram encontradas prevalências de 44% e 41,1% para dermatite digital e 26% e 6,7% para dermatite interdigital em vacas confinadas nos estudos de FERREIRA (2003) e POZZATTI et al (2009) respectivamente. Em regime semi-extensivo, as lesões podais encontradas foram principalmente as de natureza infecciosa como dermatite digital (24,36%), dermatite verrucosa (14,53%) e pododermatite necrosante (13,68%) (SILVA et al., 2001). Em regime extensivo, a prevalência de dermatite digital, dermatite interdigital ou hiperplasia interdigital, agrupadas, variou de 30,59% após o período chuvoso e 32,85 após o período seco. Já em animais criados sob regime semi-intensivo, essas prevalências foram de 15,45% após o período chuvoso e 31,15% após o período seco (MAUCHLE et al., 2008). Esses dados revelam a importância deste tipo de lesão nos sistemas de produção leiteira atualmente no Brasil.

Nos Estados Unidos, a dermatite digital foi a principal causa de claudicação estando implicada em 50,5% dos casos. Lesões associadas à laminite como úlcera e abscesso de sola estiveram implicadas em 20,1% e 11,1% respectivamente dos casos de claudicação (WARNICK et al., 2001). Logo, pode-se inferir que a laminite e a

dermatite digital são as principais causas de claudicação em rebanhos leiteiros na atualidade.

Em rebanhos do Chile, foram registradas prevalências de variando de 6,6% a 7,7% de dermatite digital em diferentes rebanhos do país. A baixa prevalência em comparação com a situação de outros países pode ser atribuída às condições de criação de bovinos leiteiros naquele país, predominantemente extensiva com os animais a pasto. Neste sistema é reduzida a exposição dos animais às condições de acúmulo de umidade e sujidades (FLOR e TADICH 2008), considerados fatores predisponentes para as lesões podais infecciosas (MAUCHLE, 2001).

Medidas de biossegurança como a realização de quarentena e a higienização dos caminhões que transportam animais são consideradas de relevante importância para o controle das lesões infecciosas dos dígitos, embora esta não seja uma prática frequente nas propriedades (SILVA et al., 2001).

Dada a magnitude da ocorrência de lesões digitais infecciosas em bovinos, pode-se considerar que no futuro próximo as propriedades terão que adotar medidas específicas para o controle destas afecções. Considera-se razoável conviver com taxa de incidência de claudicação de 7 a 10% (NICOLETTI 2004) e reduzir a incidência de claudicação para 14% é uma meta ainda a ser alcançada em rebanhos leiteiros (BLOWEY 2008).

Com isso observa-se que tanto nas condições brasileiras como em outros países há uma distância significativa entre os índices considerados aceitáveis para a claudicação e as enfermidades digitais e os índices realmente obtidos nos sistemas de produção leiteira. Isso porque embora o conhecimento sobre a claudicação aumentou nos últimos anos a incidência não

reduziu significativamente (BLOWEY, 2008).

5.5 Intensificação da produção e perdas econômicas

Vários fatores estão implicados no aumento da incidência de claudicações, especialmente aqueles relacionados à adoção de tecnologias de produção intensiva com o objetivo de maximizar a produção dos animais. Dentre essas tecnologias estão o melhoramento genético, a adoção de sistemas de estabulação permanente com pisos impermeabilizados, o aumento da densidade animal e as práticas de nutrição. Como resultados dessas novas tecnologias, exemplifica-se a manutenção dos animais em pisos impermeabilizados (NICOLETTI et al., 2001; FERREIRA, 2003) e a utilização de raças européias (MOLINA et al., 1999). Como exemplo de seus efeitos, o confinamento é um fator predisponente para erosão de talão e dermatite digital (VERMUNT e GREENOUGH, 1995).

As perdas econômicas em virtude das afecções podais são devidas ao descarte prematuro de animais (geralmente os animais mais produtivos e de maior valor zootécnico), queda na produção de leite, custos com tratamentos, aumento do período de serviço e redução da fertilidade (MOLINA et al., 1999; FERREIRA, 2003; SILVA et al., 2004). Além disso, alterações de saúde como emagrecimento, anestro prolongado, diminuição na produção de leite e deficiências nutricionais foram relatadas em vacas com lesões podais graves e claudicação (SILVEIRA et al., 2009).

Lesões e características estruturais das unhas do casco estão significativamente associadas com longevidade dentre outros parâmetros (VERMUNT e GREENOUGH, 1995). Uma das causas de prejuízo financeiro em animais com claudicação é o descarte prematuro (FERREIRA, 2003),

relacionado com redução da longevidade do animal.

As afecções podais afetam significativamente o bem-estar animal em virtude da dor e desconforto que provocam (VERMUNT e GREENOUGH, 1995; BLOWEY, 2008), prejudicando inclusive a ingestão de alimentos pela relutância dos animais em se locomoverem (WARNICK et al., 2001).

5.6 Fatores predisponentes para lesões podais

O número de lesões podais aumenta com o número de partos e com a idade da vaca (NICOLETTI et al., 2001). Animais confinados apresentaram aumento da prevalência de lesões podais quanto maior a idade, sendo 23% até 4 anos, 26% de 4-6 anos e 37% com idade maior que 6 anos (MOLINA et al., 1999).

O estágio de lactação também interfere no surgimento de lesões. Vacas em estágio inicial de lactação (até 3 meses) apresentam mais lesões quando comparadas com vacas em estágio intermediário (3-6 meses) ou final de lactação (mais que 6 meses) (MOLINA et al., 1999). Em sistema semi-extensivo, houve maior prevalência de afecções podais na faixa etária de 3-4 anos quando 42,38% dos animais foram acometidos, contra 5,26% até 3 anos, 13,9% de 4-6 anos e 7,91% após 6 anos (SILVA et al., 2001). Possivelmente não só a idade exerce influência na ocorrência das lesões, mas seu efeito é concomitante às características de manejo e se relacionam com a produtividade do animal em cada faixa etária.

Alta produção de leite é um fator predisponente para as claudicações, já que os animais mais produtivos permanecem mais tempo no rebanho, aumentando a chance de terem algum episódio de claudicação (WARNICK et al., 2001).

O sistema de produção interfere na prevalência de lesões. Verificou-se que o número de lesões podais em vacas mantidas em sistema “tie-stall” foi maior que naquelas mantidas em “free-stall”, sendo que, especificamente quanto às lesões por laminite subclínica, a prevalência foi maior no sistema “tie-stall”. Este sistema foi considerado mais desfavorável à saúde dos dígitos. Apesar das diferenças entre os sistemas, podem ocorrer variações entre fazendas que adotam um mesmo sistema (NICOLETTI et al., 2001).

Outro fator que interfere na prevalência de lesões podais é a sazonalidade. Verificou-se que as lesões podais diminuíram no período seco em animais criados extensivamente, contudo, ocorreu aumento da prevalência da maioria das lesões no mesmo período em animais criados no regime semi-intensivo. Assim, pode-se inferir que existe o efeito da sazonalidade, porém, combinado com o efeito do sistema de manejo adotado (MAUCHLE et al., 2008).

Outros fatores predisponentes para as enfermidades digitais são: mudanças bruscas na alimentação, traumatismos, elevada umidade e higiene precária nas instalações, falta de critério na aquisição e introdução dos animais nas propriedades, uso de pisos irregulares e abrasivos, promiscuidade entre bovinos doentes e sadios, ausência de quarentena, uso incorreto ou a não utilização do pedilúvio e ausência de casqueamento preventivo (SILVA et al., 2004; SOUZA et al., 2002).

A presença de solos pedregosos, pisos irregulares nos estábulos e higienização deficiente interferem diretamente na manutenção do equilíbrio entre o desgaste e o crescimento dos cascos (SILVA et al., 2001). Danos mecânicos causados aos animais ao percorrerem superfícies abrasivas e a ausência de casqueamento preventivo contribuem para o surgimento de lesões (FLOR e TADICH 2008) e o não

uso de quarentena nas propriedades exerce um efeito sobre a prevalência de doenças infecciosas dos dígitos (SILVA et al., 2001).

5.7 Anatomia dos dígitos do bovino

As extremidades distais dos membros torácicos e pélvicos são conhecidas como mãos e pés respectivamente, e são formadas pela extremidade expandida dos ossos metacarpo e metatarso, os dois dígitos principais e os dois dígitos rudimentares (DYSON, 2004).

O órgão digital é constituído pelos dígitos principais (III e IV) e pelos dígitos rudimentares (II e V). Os dígitos se apresentam envoltos por pele, formando uma estrutura única até os cascos quando ocorre sua separação pela fenda interdigital (DYSON, 2004). Cada dígito é formado pelas falanges proximal, média e distal e pelos ossos sesamóides proximal e distal (GREENOUGH, 2007). O casco é definido como o envoltório epidérmico modificado da extremidade do membro sendo que no bovino, ele é bipartido, uma vez que os dígitos III e IV são separados pela fenda interdigital (DYSON, 2004). Em sentido amplo, o casco representa a epiderme modificada e todo o conteúdo que ela envolve: falange distal, parte distal da falange média, osso sesamóide distal, cório, bolsa podotrocLEAR, ligamentos articulares, inserção dos ligamentos dos tendões flexores e extensores e articulação interfalangeana distal. (DYSON, 2004; NICOLETTI, 2004; FERREIRA et al., 2005).

5.8 Histologia da epiderme e derme do casco

De modo geral, a epiderme no organismo do animal é constituída de 85% de queratinócitos e 15% de não-queratinócitos, dentre os quais, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel (KÖNIG E LIEBICH, 2004). Não foram encontradas

na literatura consultada referências sobre a presença de não-queratinócitos na epiderme do casco, de modo, que não se sabe se eles não existem de fato, ou se apenas não foram investigados.

A epiderme superficial do casco é formada de queratinócitos (células epidermais) que, na região da sola se apresentam dispostos ao longo dos estratos basal, espinhoso, granuloso e córneo (KÖNIG E LIEBICH, 2004).

As células epidermais sofrem três processos biológicos ao longo do seu ciclo celular quais sejam proliferação, diferenciação ou queratinização e corneificação. Na proliferação as células sofrem sucessivas mitoses aumentando sua população. Na diferenciação elas se diferenciam em queratinócitos e iniciam a síntese de queratina e cemento intercelular (GREENOUGH, 2007; VAN AMSTEL e SHEARER, 2006). A corneificação é o estágio final da diferenciação e caracteriza-se pela formação de células corneificadas e mortas, com forte adesão intercelular (GREENOUGH, 2007). Nesta fase, morfologicamente os queratinócitos se tornam grandes, cúbicos e o conteúdo intracelular é substituído por queratina. Assim, a diferenciação dos queratinócitos dá origem à camada córnea (VAN AMSTEL e SHEARER, 2006). A substituição completa de cada geração de células vivas da epiderme ocorre em aproximadamente 20 a 30 dias (KÖNIG E LIEBICH, 2004) e depende da difusão de nutrientes através da derme (LISCHER e OSSENT, 2002; KÖNIG E LIEBICH, 2004, GREENOUGH, 2007). Falhas no suprimento vascular da derme prejudica a difusão de nutrientes para a epiderme, causando redução na qualidade do tecido córneo formado (KÖNIG E LIEBICH, 2004).

Durante o processo de queratinização, a queratina sintetizada forma o citoesqueleto

da célula e se liga aos desmossomos para estabilizar as forças sobre as células, ao mesmo tempo que mantém sua flexibilidade. Deste modo, a forte coesão intercelular entre as células epidermais diferenciadas é atribuída aos desmossomos e à matriz de cemento intercelular (GREENOUGH, 2007) rico em lipídeos (VAN AMSTEL e SHEARER, 2006). A presença de lipídeos no cemento intercelular confere ao estrato córneo uma condição de impermeabilidade às substâncias solúveis em água, contudo, substâncias solúveis em lipídeos podem facilmente penetrar a epiderme. O acúmulo de matéria orgânica nos estábulos contribui para reduzir a qualidade do tecido córneo, pois a uréia destrói a queratina das células corneificadas (KÖNIG E LIEBICH, 2004).

Na região parietal do casco, a epiderme se apresenta disposta na forma de lamelas epidérmicas paralelamente ordenadas, as quais recebem projeções da derme, as lamelas dérmicas, que se intercalam entre as anteriores. Cada lamela epidérmica apresenta em seu centro um eixo queratinizado, o que caracteriza a estrutura lamelar corneificada. (KÖNIG E LIEBICH, 2004).

A lâmina epidérmica é responsável pela transmissão de forças nos deslocamentos para a falange distal, sendo por isto considerada um portador da falange distal. No equino, as lâminas epidérmicas suportam a maior parte do peso do animal, contudo, no bovino, esta função é compartilhada pela sola e parte do coxim digital, que suportam aproximadamente 40 a 60% da carga (KÖNIG E LIEBICH, 2004).

Quanto ao crescimento do estrato córneo, a pressão exercida sobre a sola constitui-se num estímulo para a proliferação de células da camada basal e assim, novo estrato córneo é formado. Por outro lado, o adelgaçamento do estrato córneo

naturalmente aumenta a pressão sobre as células da camada basal, constituindo-se novo estímulo para mais produção de estrato córneo. Assim, através deste mecanismo de retroalimentação, é mantida a produção de estrato córneo saudável nos bovinos. Na região da parede do casco, ao invés de forças de pressão, as forças de tensão regulam o estímulo para a formação de estrato córneo (GREENOUGH, 2007). O estrato córneo da parede é formado pelo cório coronário e desliza distalmente sobre e entre as lâminas (DYCE, 2004).

A epiderme do casco é sustentada por um componente dermal, a derme ou cório do casco, também chamado de pododerma. A estrutura do estrato córneo é diferente para cada região dos córios, que são de quatro tipos: cório perióptico, coronário, laminar e solear. O cório perióptico situa-se abaixo da junção entre pele e estrato córneo e se estende até os talões. O cório laminar situa-se sob as lâminas da parede. O cório coronário encontra-se entre o cório perióptico e o cório laminar. O cório solear localiza-se na superfície solear entre a linha branca e o cório perióptico (VAN AMSTEL e SHEARER, 2006). A linha branca (ou zona alba) é uma estrutura constituída de estrato córneo situada entre a parede do casco e a sola, produzida pelas células epidermais das lâminas epidermais e representa a zona de união entre os córios laminar e solear (MÜLLING, 2002; KÖNIG E LIEBICH, 2004). A dureza de seu tecido córneo é somente 20% da dureza da parede (GREENOUGH, 2007).

A derme ou cório é formada de tecido conjuntivo conectivo altamente vascularizado e inervado (SHEARER, 2006) constituído de fibras colágenas e elásticas que se dispõem formando uma densa rede com capacidade de tracionamento (KÖNIG E LIEBICH, 2004). Na região da sola, a derme apresenta projeções chamadas papilas dérmicas, que se projetam em direção à epiderme,

aumentando sua superfície de contato com o epitélio. Disto resulta a facilitação da difusão de nutrientes da derme para a epiderme e ainda, o aumento do mecanismo de coesão na junção derme-epiderme. Na região parietal do casco, as projeções dérmicas originam as lamelas dérmicas, que se intercalam entre as lamelas epidérmicas. (KÖNIG E LIEBICH, 2004). Ao contrário do que ocorre no equino, em bovinos a formação de shunts arteriovenosos no cório não é comum (VAN AMSTEL e SHEARER, 2006), porém ocorrem no mecanismo da fisiopatologia da laminite (LISCHER e OSSENT, 2002).

A epiderme em todas as regiões do casco encontra-se separada da derme pela membrana basal. A membrana basal é formada por três camadas, lâmina densa, rara e fibroreticular. A lâmina rara sustenta as células epidermais da epiderme, portanto, é a camada mais externa. A lâmina fibroreticular é formada por fibras colágenas que se conectam com as fibras colágenas da derme, logo, esta é a camada mais interna. Esta camada é produzida pelos fibroblastos da derme e é a parte susceptível à degradação por enzimas metaloproteinases da matriz extracelular. A lâmina densa forma uma camada eletrodensa situada entre as lâminas rara e fibroreticular. As lâminas rara e densa são produzidas pela epiderme (GREENOUGH, 2007).

A membrana basal possui um papel importante na regulação da proliferação e diferenciação das células da epiderme. Ela exerce função de sustentação e orientação para os queratinócitos durante esses processos. Deste modo, danos à membrana basal podem causar perda da organização da epiderme, hiperproliferação ou anormalidades no padrão de crescimento dos queratinócitos (VAN AMSTEL e SHEARER, 2006). Exemplificando a importância da membrana basal, estímulos mecânicos sobre o casco resultam na

ativação de fatores de crescimento como o fator de crescimento epidermal (EGF) e citocinas que, para se ligarem a seus receptores específicos na camada basal, migram através da membrana basal (GREENOUGH, 2007). A membrana basal é constituída por colágenos e glicoproteínas como fibronectina, amilóide P, entactina e proteoglicanos, laminina (VAN AMSTEL e SHEARER, 2006) e integrina (HENDRY et al., 2003).

O tecido subcutâneo do casco é representado pelo coxim digital, que se localiza atrás da falange distal e do tendão flexor profundo. Possui constituição fibroadiposa, com função de amortecimento (DYCE, 2004). É importante destacar a importância do coxim digital e do cório como estruturas de suporte do casco no bovino. O coxim e o cório atuam como importantes absorvedores do impacto do peso do animal sobre a unha. Além disso, o coxim digital propicia considerável mobilidade entre a falange distal e a cápsula córnea. Em novilhas, a composição do coxim digital é predominantemente tecido conjuntivo e em vacas, aumenta a quantidade de gordura. Contudo, o tecido adiposo pode ser substituído por tecido conjuntivo em caso de lesões (LISCHER e OSSENT, 2002).

O estojo córneo do casco é subdividido em regiões determinadas pelas características da corneificação em cada local (GREENOUGH, 2007). Assim, ele é dividido nas seguintes regiões: perióplo ou banda coronária, parede coronária, região laminar, sola e bulbo.

O perióplo ou banda coronária constitui-se de uma estreita faixa de 1,5cm de estrato córneo situado entre a parede coronária e a pele da quartela. Normalmente o perióplo possui coloração mais clara em relação ao restante do casco, porém, pode se apresentar mais escurecido em alguns animais por razões desconhecidas. Esta é

uma região rica em lipídeos e alterações nela podem sugerir problemas metabólicos (GREENOUGH, 2007).

A região da parede coronária corresponde à epiderme corneificada, produzida sobre a derme coronária. A taxa de crescimento desta região é de aproximadamente 0,5 cm por mês, podendo sofrer variações conforme estação do ano, idade do animal e plano nutricional (GREENOUGH, 2007).

A região laminar corresponde à região da parede que contém as lâminas epidermais e as lâmina dermais, ambas produzidas sobre o cório laminar. Essas lâminas se apresentam unidas, formando um tecido consistente. Na laminite, ocorre a inflamação das lâminas dermais (GREENOUGH, 2007).

A sola propriamente dita corresponde a uma pequena área do dígito bovino e ela não é a principal área que absorve o peso sobre a unha mas sim a parede e o bulbo (VERMUNT e GREENOUGH, 1995).

O bulbo é a região que recebe forças de concussão durante a locomoção, sendo que estas forças são transferidas para o sistema de suporte da falange distal. O estrato córneo nesta região é macio e as papilas e pequenos túbulos são distribuídos esparsamente. A derme desta região é bastante inervada (GREENOUGH, 2007).

O coxim coronário é formado por tecido adiposo altamente vascularizado. Este coxim possui uma rede de vasos situados abaixo da região coronária, responsáveis por fazer a recirculação do sangue dos dígitos para a circulação sistêmica (GREENOUGH, 2007).

O aparato suspensório é constituído pelas estruturas compreendidas entre a superfície da falange distal e o interior do estrato córneo do casco, logo, o aparato suspensório é constituído de um componente dermal (os córios laminar,

solear e axial) e de um componente epidermal (a porção da epiderme constituída de células vivas mais a região cornificada) (THOEFNER et al., 2005). Fibras colágenas que se inserem na falange distal e na membrana basal das lâminas dermais também compõem o aparato suspensório, cuja função é transferir o peso do animal sobre o osso podal para a cápsula córnea (GREENOUGH, 2007).

5.9 Laminite

5.9.1 Conceito

A laminite é definida como a inflamação das lâminas da parede do casco de bovinos e equinos. Sua fisiopatologia envolve a degeneração, necrose e inflamação das lâminas (SMITH, 2006). A laminite também é chamada de pododermatite asséptica difusa e de coriose (VERMUNT & GREENOUGH, 1994; NICOLETTI, 2004).

Existem controvérsias sobre a propriedade do termo laminite para caracterizar a doença mediante os estudos mais recentes sobre sua fisiopatologia que consideram que: as lâminas do casco não são necessariamente as únicas estruturas afetadas durante a doença; 2) as lâminas do casco não são necessariamente as primeiras estruturas a serem afetadas; 3) inflamação não é um achado sempre presente nas fases iniciais de laminite (GREENOUGH, 2007).

Apesar disto, a laminite é considerada uma doença sistêmica com manifestação local no dígito (SMITH, 2006; GREENOUGH, 2007), de origem multifatorial, associada a distúrbios da microcirculação digital, que possui 4 formas de apresentação, e cuja fisiopatologia embora amplamente estudada permanece não completamente esclarecida (GREENOUGH, 2007; ENEMARK, 2008).

5.9.2 Histórico

A laminite em equinos é conhecida há mais de 2000 anos, porém, a primeira descrição da doença nesta espécie se deu em 1691 por Solleysel (NILSSON, 1963; GREENOUGH, 2007). Em bovinos, a primeira descrição foi feita por Bedel em 1839, que mencionou um caso de laminite pós-parto (NILSSON, 1963). O primeiro grande avanço no conhecimento da doença em bovinos, ocorreu após o trabalho de Nilsson em 1963, cujos conhecimentos construídos influenciam até hoje o conhecimento sobre laminite. Até então, eram conhecidas somente as formas aguda, subaguda e crônica da doença. Em 1976, Toussaint-Raven apresentou os primeiros indícios da forma subclínica da laminite e em 1979, Peterse descreveu pela primeira vez esta forma de manifestação da laminite (GREENOUGH, 2007).

5.9.3 Fisiopatologia

Cabe ressaltar que, apesar do tempo decorrido desde o primeiro relato da laminite bovina, os mecanismos da fisiopatologia da doença propostos hoje, permanecem os mesmos daqueles da época em que a doença foi descrita.

Embora a laminite seja considerada uma doença de etiologia multifatorial, o manejo nutricional é considerado um componente chave no seu desenvolvimento. Animais submetidos a dietas com elevado teor de carboidratos, podem desenvolver acidose ruminal, que por sua vez, possui relação estreita com a laminite (NOCEK, 1997), de tal modo que a laminite é a seqüela mais importante da acidose ruminal subaguda (ENEMARK, 2008).

A ingestão de elevadas quantidades de carboidratos na dieta provoca acúmulo de ácido láctico no rúmen proveniente da fermentação. Com o excesso de ácido láctico (quantidades superiores a capacidade de absorção e tamponamento do rúmen), ocorre diminuição do PH ruminal. Esta condição favorece o crescimento de

bactérias gram-positivas e a morte de bactérias gram-negativas. A morte destas bactérias resulta na liberação de endotoxinas (LPS). Essas endotoxinas podem ser absorvidas pela parede do rúmen e alcançar a corrente circulatória. A presença destas endotoxinas no sangue induz a liberação de mediadores inflamatórios (TNF- α e tromboplastinas) e aminas vasoativas (epinefrina, norepinefrina, histamina, serotonina e bradicinina, entre outras). Essas moléculas causam alterações circulatórias no dígito tais como vasoconstrição, abertura de “shunts” arteriovenosos não fisiológicos, alterações na permeabilidade vascular, agregação plaquetária, formação de trombos, resultando em isquemia e hipóxia nas lâminas do cório e degeneração laminar. Como consequência, ocorre a disfunção da junção derme-epiderme do dígito e inibição da síntese normal do tecido córneo do casco (estojo córneo). Além dos LPS, histamina pode ser absorvida pela parede do rúmen e desencadear alterações circulatórias (NICOLETTI, 2004; NOCEK, 1997).

Em virtude das alterações vasculares que reduzem o aporte de nutrientes e oxigênio para a camada de células vivas da epiderme, as fases de proliferação e diferenciação das células epidérmicas fica comprometida resultando em formação de estrato córneo macio e de baixa qualidade. Assim, tem sido sugerida a substituição da terminologia laminite, pela expressão disfunção do estrato córneo da unha (do inglês: “claw horn disruption” - CHD). Além disso, a doença é considerada também fator predisponente para lesões do casco que são a principal causa de claudicação em vacas leiteiras (SHEARER, 2006).

A patogênese das lesões de sola associadas à laminite ocorre em três fases. A fase 1 inicia-se com o comprometimento do fluxo sanguíneo para o cório devido a ação de substâncias vasoativas como endotoxinas e

histamina na corrente circulatória. A vasodilatação e a abertura dos “shunts” arteriovenosos represa o sangue e como consequência, provoca hipóxia tecidual na epiderme resultando em edema, hemorragia, formação de trombos e por fim, necrose. Na fase 2, em virtude das modificações na microcirculação dos córios do casco ocorrem alterações inflamatórias e degenerativas na junção derme-epiderme sendo a camada de células basais desta junção a primeira estrutura a se deteriorar. A degeneração da junção derme-epiderme leva à falência do aparato suspensório e como consequência, à compressão do cório pela falange distal. Por causa desta compressão agravam-se as alterações vasculares provocadas pelos danos aos capilares, resultando em hemorragia, trombose, reação inflamatória, isquemia e necrose. Enquanto essas lesões se desenvolvem elas provocam dor e claudicação, contudo, nenhuma lesão clínica é visível no casco por semanas desde o início da laminite pois as lesões ocorrem no interior da superfície da cápsula córnea. Na fase 3 as lesões atingem a cápsula córnea tornando-se visíveis clinicamente. Esta fase ocorre aproximadamente 8 semanas após o início da laminite. Nesta fase, o acúmulo de exsudato entre as lâminas, a hiperplasia lamelar e a separação da junção derme-epiderme causam a separação da linha branca de modo que ela se torna mais larga. Este alargamento da linha branca pode se constituir uma porta de entrada para patógenos e iniciar lesões infecciosas. O acúmulo de tecido necrótico e de sangue na superfície do cório retarda a produção de estrato córneo. Quando a produção de estrato córneo é totalmente interrompida, surgem as úlceras de sola. As úlceras se formam em locais de maior compressão e onde o estrato córneo é menos resistente (LISCHER e OSSENT, 2002).

Por analogia com a teoria isquêmica da laminite na espécie equina, considera-se

que a laminite em bovinos resulta de alterações na perfusão vascular periférica do cório do casco, que por sua vez reduz a perfusão capilar na região das lâminas. Assim, vasoconstrição e isquemia no cório estão implicadas na patofisiologia da laminite (VERMUNT e GREENOUGH, 1994). Contudo, em animais com laminite aguda, observa-se aumento da pulsação nas veias digitais e seu ingurgitamento. Tais eventos não compatibilizam com fenômenos de vasoconstrição e isquemia. A explicação para a convergência destas duas situações está nas anastomoses arteriovenosas (AVAs) ou “shunts” arteriovenosos. As AVAs do cório se dilatam em resposta a vários estímulos como histamina, baixo pH do sangue, trauma ou estresse compressivo resultando no aprisionamento do sangue. Deste modo, embora haja aumento do fluxo sanguíneo total para o dígito, uma vez que ele fica represado nas AVAs, ocorre diminuição da perfusão da microcirculação do cório afetando as lâminas. Além disso, as alterações vasculares provocam falência do aparato suspensório na região dorsal e a falange distal perde sustentação dentro da cápsula córnea afundando e comprimindo ainda mais o cório. Entretanto, uma vez que não foram demonstrados distúrbios na microcirculação do cório da região laminar por agentes vasoativos em bovinos, estas explicações permanecem puramente teóricas (LISCHER e OSSENT, 2002). Além disto, acredita-se que a formação de AVAs não é o evento inicial na fisiopatologia da laminite, estando ligada a modificações adaptativas no casco (BERGSTEN e MÜLLING, 2004).

Na espécie equina, onde se concentra maior número de estudos, a teoria de que o processo de degeneração da junção derme-epiderme se inicia a partir de um processo isquêmico está em descrédito, uma vez que diversos trabalhos científicos e relatos clínicos demonstraram que a imersão dos cascos em solução hipotérmica (água) a 1°C

reduz a gravidade da claudicação e das alterações histológicas. O mecanismo envolvido inclui redução do metabolismo celular das lâminas, da inflamação e da perfusão (VAN EPS e POLLITT, 2006). Na atualidade, existem evidências concretas de pelo menos três mecanismos desencadeantes do processo fisiopatológico, que ao que tudo indica não se excluem e devem estar relacionados entre si. A ativação das metaloproteinases no cório laminar decorrentes da absorção de toxinas bacterianas gram-positivas (POLLITT e VISSER, 2010), a migração de células inflamatórias para o cório laminar decorrente de uma resposta inflamatória sistêmica (BELKNAP et al., 2009; FALEIROS et al., 2009) e as alterações laminares decorrentes do aumento das concentrações circulantes de insulina (NOURIAN et al., 2009).

5.9.4 Fatores predisponentes

Como possui etiologia multifatorial, diversos são os fatores predisponentes para a laminite. Acredita-se que doenças sistêmicas como processos inflamatórios de origem infecciosa (mastite, metrite com retenção de placenta e anexos fetais, pneumonia, peritonite, abomasite e enterocolite) podem predispor à laminite em função do potencial que essas doenças apresentam de liberar toxinas na corrente circulatória (VERMUNT e GREENOUGH, 1994). Entretanto, considerando a nova teoria da SIRS (BELKNAP, 2009), pode-se especular também se a laminite nesses casos não seria decorrente da presença de células inflamatórias na corrente circulatória e não da presença de toxinas no sangue nesses processos inflamatórios mencionados.

Quanto à nutrição, conforme já mencionado na fisiopatologia da doença, a ingestão excessiva de carboidratos pode desencadear laminite, especialmente naqueles animais que passam por modificações abruptas na

dieta. Contudo, acredita-se que mais importante que o período de adaptação é a quantidade de concentrado que os animais ingerem (VERMUNT e GREENOUGH, 1994). A laminite é considerada o principal impacto sistêmico da acidose ruminal e a gravidade da doença é determinada pela frequência, intensidade e duração do insulto acidótico (NOCEK 1997). Quando a prevalência de laminite no rebanho é superior a 10% isto constitui-se num indicativo da presença de acidose ruminal subaguda em rebanhos (ENEMARK, 2008).

Quanto à proteína da dieta, não se sabe como a proteína (amônia) atuaria no mecanismo da doença (VERMUNT e GREENOUGH, 1994). Desse modo, entre os fatores nutricionais, os carboidratos assumem a maior importância.

Apesar de a dieta ser apontada como a principal causa, acredita-se que intervenções na ambiência como piso macio e conforto animal são eficazes para reduzir a prevalência de laminite (SHEARER, 2006).

A granulometria da fibra e da ração é um fator predisponente. O tamanho adequado da fibra é importante para estimular a mastigação e produção de saliva. A saliva atua como tamponante do pH ruminal (NICOLETTI, 2004). A importância da produção de saliva pelo animal é tão relevante no controle da acidose e prevenção da laminite, que o sombreamento é indicado como uma medida de controle da laminite subclínica. Os animais com boa oferta de sombra se deitam e ruminam mais produzindo maior quantidade de saliva, que tampona o pH ruminal, prevenindo acidose e conseqüentemente, laminite subclínica (GREENOUGH, 2007).

Outros fatores citados como predisponentes para a laminite são, o fator genético (susceptibilidade de algumas raças), conformação dos dígitos (proporção entre

pernas, pés, tronco e peso corporal), quantidade de exercício (necessário para estimular a circulação digital), qualidade das instalações (pisos e cama), estação do ano, idade, comportamento e estágio de lactação (VERMUNT e GREENOUGH, 2007).

5.9.5 Formas de laminite e tratamento

A doença no bovino possui quatro formas de apresentação e todas provocam alterações na morfofisiologia dos tecidos do casco. São elas: aguda, subaguda, crônica e subclínica (VERMUNT & GREENOUGH, 1994).

Laminite aguda

Embora a laminite aguda seja mais frequente no equino, no bovino esta é a forma menos diagnosticada. Em geral é provocada pelo consumo exagerado de grãos, não acomete um único indivíduo do rebanho e a severidade da doença depende da quantidade de grãos ingerida. A doença deve ser tratada como uma emergência e inclui no protocolo de tratamento o uso de antihistamínicos, lavagem ruminal nos casos mais graves, antiinflamatório não-esteroidal (NICOLETTI, 2004; GREENOUGH, 2007) e tratamento intensivo da causa primária (metrite, acidose ruminal ou outra) (RADOSTITS et al., 2002).

As alterações observadas incluem alteração de comportamento caracterizada por inquietude, aumento da frequência respiratória e cardíaca, presença de fezes líquidas e de coloração mais clara do que o normal, dismotilidade e/ou atonia ruminal. Além disso, os animais afetados apresentam alteração da postura caracterizada por duas formas: 1) flexão das articulações cárpica-metacárpicas (posição de “ajoelhar”); 2) projeção dos membros pélvicos sob o abdome e curvamento da coluna vertebral. É comum encontrar animais apresentando

essas posturas em confinamentos de gado de corte ou leite (GREENOUGH, 2007).

Laminite subaguda

Parece existir alguma controvérsia em relação a esse termo. Alguns acreditam que esta é uma condição transitória, que pode preceder a laminite subclínica, e não carece tratamento (GREENOUGH, 2007).

Laminite crônica

Nesta forma da doença, os animais apresentam alterações na forma e tamanho dos cascos, resultantes da alteração em seu padrão de crescimento. As unhas tornam-se maiores, alongadas e alargadas, apresentando anéis irregulares na parede do casco e cruzamento das pinças (VERMUNT e GREENOUGH, 1994). Também são observadas perda da concavidade da sola, alargamento da unha, presença de sulcos na parede dorsal, alargamento da linha branca, linha branca macia e amarelada, hemorragia de linha branca e de sola, dupla sola e úlcera de sola no “ponto típico” (situado na região intermediária entre a sola e o bulbo) (GREENOUGH, 2007).

Não há tratamento para os animais com laminite crônica. Eles devem ser mantidos no sistema até completarem o ciclo de produção e após isso serem abatidos (GREENOUGH, 2007).

Laminite subclínica

Esta forma de laminite é considerada a mais importante alteração na unha dos bovinos (VAN AMSTEL E SHEARER, 2006), sendo caracterizada por várias lesões nos dígitos indicativas de laminite. O diagnóstico é feito conforme as lesões nos dígitos associadas à laminite subclínica (VERMUNT e GREENOUGH, 1994; GREENOUGH, 2007). Tem sido proposto que a laminite subclínica seja denominada de disfunção do tecido córneo da unha (do

inglês “claw horn disruption” - CHD). Esta denominação se relaciona com as lesões associadas à laminite, mais que à sua patogênese (GREENOUGH 2007).

As lesões digitais resultantes de laminite subclínica são numerosas e a doença de linha branca e a úlcera de sola são as mais importantes delas. Além delas, também ocorre sola dupla (GREENOUGH, 2007), sola amarelada, indicando presença de exsudato, (NOCEK, 1997) hemorragia de sola, úlcera de sola, fissuras ou rachaduras verticais ou horizontais, deformações no estojo córneo (NICOLETTI, 2004), abscesso de sola e talão e úlcera de pinça (FERREIRA, 2003).

Nesta forma da doença, são tratadas as lesões presentes no casco. Para isso, é feito o casqueamento para remoção de tecidos desvitalizados, restabelecimento da forma do casco, e colocação de tamanco no dígito sadio, visando a redução do apoio no dígito afetado. O tratamento, quando realizado corretamente e no momento oportuno, pode alcançar índice de 100% de cura (FERREIRA 2003).

Considera-se que o tratamento da laminite subclínica não é prático, uma vez que é difícil caracterizar corretamente o estágio da doença. E que em função disso, esforços têm que ser feitos para o controle da doença (GREENOUGH, 2007). Contudo, o tratamento das lesões, embora envolva um custo significativo, constitui-se numa opção a ser considerada para aqueles animais já acometidos.

5.9.6 Prevenção e controle

A prevenção deve ser feita através do controle do maior número possível dos fatores predisponentes (LINFORD, 2006), dentre eles a acidose ruminal, cujo controle pode ser considerado a medida imprescindível (GREENOUGH, 2007).

É indicado o fornecimento gradativo das dietas, especialmente aquelas ricas em concentrado, e procurando respeitar a relação forragem:concentrado. Outra medida é o planejamento cuidadoso das instalações visando condições mais confortáveis e menos prejudiciais aos cascos, procurando evitar inclusive a exposição dos animais a traumas (RADOSTITS, 2002; GREENOUGH, 2007).

Além disso, pode ser feita a seleção genética de animais com conformação de casco mais resistente. A oferta de sombreamento é indicada como uma medida indireta de controle, visto que estimula os animais a se deitarem e ruminarem, aumentando a produção de saliva, melhorando o tamponamento do rumem e auxiliando na prevenção da acidose ruminal (GREENOUGH, 2007).

São apontadas ainda medidas como proporcionar exercícios no período pré-parto, o uso de vacina combinada de bacterina-endotoxóide Gram-negativa, que confere proteção contra a laminite por sobrecarga de grãos em ruminantes, e ainda, a suplementação da dieta com biotina (20mg/animal/dia) para reduzir a incidência ou gravidade da claudicação no rebanho (RADOSTITS, 2002). O uso parenteral de cobre também apresentou efeito benéfico na redução da prevalência de enfermidades digitais em bovinos confinados, tendo sido o efeito atribuído à formação de tecido córneo de boa qualidade na presença deste mineral, dada sua ação na formação do colágeno e da queratina (SILVA et al., 2006).

5.9.7 Patogênese das lesões associadas à laminite

As principais lesões associadas à laminite subclínica são: hemorragia de sola, úlcera de sola, dupla sola (FLOR e TADICH, 2008; LISCHER e OSSENT, 2002) doença da linha branca (FLOR e TADICH, 2008),

hemorragia e separação da linha branca, deformação da unha (LISCHER e OSSENT, 2002).

As causas das lesões associadas à laminite são diversas e a incidência e gravidade delas são influenciadas por fatores mecânicos externos como aprumos das pernas e unhas, superfícies de apoio e maciez do estrato córneo (LISCHER e OSSENT, 2002).

Hemorragia de sola

Lesões como hemorragia de sola e sola amarelada (presença de exsudato) indicam a presença de laminite. Quanto à hemorragia de sola, a lesão caracteriza-se pela presença de sangue infiltrado no estrato córneo. Logo, seu diagnóstico clínico só é possível após um tempo do episódio que a desencadeou, pois na medida em que o estrato córneo cresce é que a hemorragia alcança a superfície da sola. Assim, é possível encontrar animais com laminite mas que não apresentam alterações visíveis ao exame do casco, pois as lesões ainda não alcançaram a superfície da sola (GREENOUGH, 1996).

A hemorragia de sola também pode ocorrer em virtude do desgaste excessivo da sola. Quando o animal é exposto a pisos muito abrasivos acelera-se o desgaste do estrato córneo da sola. Consequentemente, ao caminhar ocorre lesão do cório solar levando à formação de hemorragias por debaixo do estrato córneo (GREENOUGH, 2007). Hemorragias de sola provocadas por laminite apresentam elevada prevalência em vacas leiteiras (RASEKH et al., 2008).

Hemorragia de linha branca

A hemorragia de linha branca é causada pelo extravasamento de sangue da derme. Esta hemorragia é removida durante a proliferação e produção de novo estrato córneo da linha branca até alcançar sua superfície. A presença desta lesão tanto

indica a ocorrência de um episódio de laminite, bem como, por enfraquecer o estrato córneo da linha branca, predispõe à ocorrência de lesões secundárias como abscesso de linha branca (MÜLLING, 2002).

Doença de linha branca

Esta lesão tem como principal fator predisponente a laminite subclínica podendo ocorrer também sob estímulos traumáticos. Em condições de manejo intenso é pouco provável encontrar linha branca em perfeito estado de saúde (GREENOUGH, 2007).

O termo doença da linha branca é usado para descrever as várias alterações na linha branca como: abscesso, separação, fissura, lesão, alargamento e hemorragia. O abscesso de linha branca geralmente resulta da penetração de corpo estranho em seu estrato córneo sadio ou enfraquecido por outra lesão. Pode ocorrer a invasão microbiana e o surgimento de lesão infecciosa. A claudicação é o sinal clínico mais evidente neste caso. Separação e alargamento da linha branca são lesões associadas à laminite. Ocorre o enfraquecimento da estrutura e integridade da linha branca, causado por alteração na formação de estrato córneo na região da parede e alteração da integridade estrutural do aparato suspensório. Assim, alterações na qualidade do estrato córneo e na largura da linha branca na região da parede do casco podem ser usados como indicadores de eventos de laminite (MÜLLING, 2002). Na doença da linha branca, ocorre a separação entre a parede e a sola, logo, ocorre a infecção da linha branca por microorganismos dando origem à doença da linha branca. A doença pode evoluir com a formação de um abscesso que pode estender-se pela parede e fistular na região coronária do casco ou aprofundar-se e comprometer a articulação da falange distal (GREENOUGH, 1996).

Dupla sola

A dupla sola está relacionada a episódios de laminite e a mudanças bruscas na dieta dos animais. Atribuiu-se a elevada prevalência de dupla sola ao manejo nutricional inadequado e à falta de casqueamento preventivo (FLOR e TADICH, 2008). A lesão se caracteriza pela formação de duas solas com um espaço entre ambas. Ocorre após a exposição do animal a uma dieta de produção quando antes ele ingeria uma dieta de manutenção. Este tipo de lesão geralmente é identificado durante o casqueamento regular dos animais e o processo tende a se resolver naturalmente, a sola nova crescendo e assumindo o lugar da sola antiga (GREENOUGH, 2007).

Linhas de estresse (fissuras horizontais)

São depressões horizontais na parede da unha que progridem paralelamente à banda coronária. Ocorrem quando o animal é submetido a algum tipo de estresse (daí a designação “linhas de estresse”) como mudança brusca na alimentação ou doenças. Assim como a hemorragia de sola, a medida que o casco cresce estas lesões se distanciam da banda coronária em direção à extremidade distal do casco. Quanto mais estrias e quanto mais profundas elas forem, indica que mais situações estressantes o animal enfrentou ao longo da vida. Quando isso ocorre, a unha assume um aspecto de “unha dobrada”. A presença de linhas de estresse pode estar associada à laminite crônica (GREENOUGH, 2007).

Úlcera de sola (pododermatite circunscrita)

A maioria dos animais que apresentam esta lesão possuem laminite sub-clínica, de modo que a presença de úlcera de sola no rebanho é motivo para investigar mais detalhadamente a presença de fatores de

risco para laminite e claudicação (GREENOUGH, 1996).

A úlcera de sola geralmente está localizada na junção entre a sola e o bulbo que se configura como o “ponto típico” desta lesão (BERGSTEN e MÜLLING, 2004; GREENOUGH, 2007). Geralmente, a úlcera ocorre em animais onde o coxim digital possui menos tecido adiposo devido a sua substituição por tecido conjuntivo fibroso (LISCHER e OSSENT, 2002).

A abrasão do estrato córneo da sola reduz sua espessura aumentando a pressão sobre o cório solear favorecendo a ocorrência de hipóxia tecidual. Além disso, a flexibilização do aparato suspensório, que mantém a falange distal fisiologicamente suspensa no interior do casco, desloca parte da falange distal provocando úlcera de sola (THOEFNER, 2005).

Especula-se que o metabolismo dos lipídeos em animais de alta produção leiteira possa ter alguma relação com o desenvolvimento de lesões de sola, em virtude das alterações na absorção de impacto pelo coxim digital (LISCHER e OSSENT, 2002).

O casqueamento ou o uso de tamancos para aliviar a pressão sobre a sola são medidas eficazes de tratamento (FERREIRA, 2003). Além de causar claudicação, a úlcera de sola pode atuar como porta de entrada de microorganismos e predispor o animal às lesões podais infecciosas (GREENOUGH, 1996).

Rotação de falange

O primeiro sinal de rotação de falange é a hemorragia de linha branca, porém, a rotação ocorre somente nos casos em que a hemorragia é extensa. Subsequentemente à rotação de falange, é comum surgirem fissuras horizontais (linhas de estresse). A falange rotacionada pode ou não perfurar a sola. Quando ocorre perfuração, a falange pode se infectar (GREENOUGH, 2007).

Erosão de talão

Caracteriza-se pela formação de escoriações no estrato córneo da parte posterior do bulbo. A lesão progride diagonalmente em sentido caudal, formando um “V negro” (GREENOUGH, 2007). Pode estar associada à laminite mas principalmente está implicada em lesões de natureza infecciosa (GREENOUGH, 2007), visto que está relacionada com o excesso de umidade e matéria orgânica nas instalações (SOUZA et al., 2007). A lesão provoca dor, redução do amortecimento do talão, alteração na distribuição de peso das unhas e conseqüentemente, predispõe o animal a outras lesões por causa da deficiência na distribuição de forças sobre a unha. O controle desta lesão é feito através do casqueamento preventivo e com o uso de banhos de pedilúvio (GREENOUGH, 2007).

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Aprovação pelo Comitê de Ética

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG) sob o protocolo nº 033/2009 (Anexo I).

6.2 Animais

Foram utilizadas 57 vacas de aptidão leiteira, da raça Girolando, não lactantes, originárias de um mesmo rebanho. Esses animais faziam parte do lote de descarte anual do plantel de uma propriedade no interior do estado de Minas Gerais e estavam confinados em um mesmo local, recebendo a mesma dieta por um período compreendido entre dois e três meses. Os principais motivos do descarte apontados foram mastite, problemas reprodutivos, alterações no casco e idade.

A propriedade não possuía controle zootécnico, logo, informações precisas quanto a raça, idade, ordem de parto, produção leiteira, dieta, histórico de doenças e motivo do descarte dos animais não puderam ser obtidas individualmente. Portanto, as informações acima que caracterizam os animais somente puderam ser obtidas para o rebanho de modo geral e foram fornecidas diretamente pelo proprietário.

6.3 Manejo e alimentação

Antes do abate, os animais foram excluídos da produção, confinados e submetidos a uma dieta específica para ganho de peso. O confinamento iniciou-se no princípio de julho/2009 tendo sido os animais examinados no mês de setembro/2009 e abatidos no mês de outubro/2009, logo, permaneceram nesse regime por aproximadamente 2 meses antes da avaliação clínica e 3 meses antes do abate.

No confinamento, a dieta dos animais era constituída de volumoso composto de silagem de milho e cana-de-açúcar picada e concentrado composto por ração comercial mais caroço de algodão. Esta dieta era misturada em vagão forrageiro e fornecida à vontade cerca de cinco vezes ao dia. A quantidade diária aproximada consumida por cada animal foi de 13kg de silagem de milho, 10kg de cana-de-açúcar, 4kg de ração comercial com 20% de proteína e 800g de caroço de algodão. A relação forragem:concentrado foi de 83:17. Os 57 animais foram mantidos em um piquete de terra juntamente com outros 100, com espaçamento de cocho de um metro.

Antes do período de confinamento os animais vinham sendo manejados em sete propriedades leiteiras mantidas sob o comando de um mesmo proprietário. Nestas propriedades, a criação dos animais e a captação do leite era descentralizada na forma de “retiros”. Os animais eram mantidos em 12 “retiros” diferentes sendo

alimentados conforme a produção de leite e os dias em lactação (DEL). No período do verão, as vacas eram alimentadas a pasto (2,5UA/hectare) com predomínio de *Brachiaria brizantha* e *Panicum maximum* cv. Tanzânia e suplementados conforme a produção leiteira com subprodutos como polpa cítrica, casquinha de soja e caroço de algodão, em quantidade variável de 0,5 a 1,5kg de concentrado administrados duas vezes ao dia ao final de cada ordenha. No inverno, os animais eram alimentados com silagem de milho e subprodutos como polpa cítrica, casquinha de soja e caroço de algodão. Os subprodutos utilizados variavam ao longo do ano conforme sua disponibilidade e preço.

A produção média dos 1300 animais em lactação variou de 16000 litros/dia no verão, até 19000 litros/dia no inverno, configurando uma produção média de 12,3 a 14,6 litros/dia/animal no verão e inverno respectivamente.

A ordenha era do tipo mecânica, feita duas vezes ao dia. A sala de espera e a sala de ordenha eram constituídas de piso concretado. O uso de pedilúvio era feito em quatro dos 12 retiros, à base de formol a 10%. A frequência de utilização do pedilúvio variava conforme a época do ano e o surgimento de lesões no casco, podendo ser uma ou até quatro vezes por semana.

A propriedade não fazia casqueamento preventivo, sendo que, uma vez por ano, era realizado o casqueamento dos animais com alterações clínicas graves no casco.

6.4 Delineamento experimental

Com base em exame clínico realizado entre 15 a 40 dias antes do abate, 39 dos 57 animais foram individualmente identificados e divididos em três grupos experimentais (Tabela 1).

Os demais 18 animais não se enquadraram nos grupos caracterizadas na tabela 1,

contudo, foram igualmente examinados e identificados para levantamento da prevalência de lesões associadas à laminite no rebanho. Os motivos da exclusão destes 18 animais é que não se enquadravam rigorosamente nos critérios de inclusão definidos na tabela 1. Estes animais possuíam lesões no casco impedindo serem agrupados no grupo G1, porém, não tinham linhas de estresse ou claudicação para

serem agrupados nos grupos G2 e G3 respectivamente.

Imediatamente após o abate, amostras de casco foram obtidas e posteriormente processadas e avaliadas quando à presença de lesões histológicas por métodos semi-quantitativos.

Tabela 1 - Caracterização dos grupos conforme presença de claudicação e lesões de laminite e número de animais classificados por grupo.

Grupo 1 (n=9)	Grupo 2 (n=23)	Grupo 3 (n=7)
SEM claudicação e SEM lesões de laminite	SEM claudicação e COM lesões de laminite	COM claudicação e COM lesões de laminite

6.5 Avaliação clínica

As vacas foram conduzidas para um brete de contenção. Enquanto os animais caminhavam para o brete, o seu andamento foi observado para a detecção de claudicação. O membro afetado identificado e o grau de claudicação classificado numa escala de 0-4 graus conforme proposto por FERREIRA (2003) (Tabela 2).

Enquanto contidos no brete, os animais tiveram seus cascos escovados para remoção de toda a matéria aderida ao casco proporcionando a investigação da presença de linhas de estresse na parede dos cascos. Com o auxílio de uma rineta, a superfície solear foi limpa e uma fina camada de material córneo foi removida a fim de proporcionar a identificação de lesões clínicas de laminite conforme descrito na tabela 3. Os achados foram anotados em uma ficha apropriada (Anexo II). Com base nos achados do exame de claudicação e dos

cascos, os animais foram divididos em três grupos, conforme critérios de inclusão descritos na Tabela 4. Em seguida, os cascos apoiados no chão e a superfície solear foram fotografados com uma câmera digital para registrar a presença e tipo ou ausência de lesões.

De cada animal foi escolhido apenas um casco para o estudo, aquele que melhor se enquadrasse nos critérios de inclusão dos grupos pré-estabelecidos, sendo que do casco escolhido, foi selecionada a unha mais representativa do grupo em que o animal se enquadrou.. O membro do casco escolhido para o estudo foi identificado com uma abraçadeira plástica numerada e dois lacres numerados presos na região do metacarpo ou metatarso com o objetivo de assegurar a correta identificação das amostras colhidas após o abate (Figura 1).

Tabela 2 - Grau de claudicação e alterações clínicas correspondentes segundo FERREIRA (2003).

Grau de claudicação	Alterações clínicas
0 (normal)	Ausência de anormalidades de postura ou deambulação.
1 (levemente manco)	Dorso arqueado quando deambulam.
2 (moderadamente manco)	Dorso arqueado quando em estação e ao caminhar. Andar afetado, apresentando passos curtos em um ou mais membros.
3 (manco)	Dorso arqueado e passos cautelosos, poupando um ou mais membros.
4 (gravemente manco)	Inabilidade ou relutância extrema em colocar peso sobre um ou mais dos membros.

Tabela 3 – Relação de possíveis lesões macroscópicas associadas à laminite consideradas para classificação dos grupos experimentais (NOCEK, 1997; MÜLLING, 2002; FERREIRA, 2003; NICOLETTI, 2004; GREENOUGH, 2007).

01- Hemorragia de sola	10- Abscesso de sola
02- Hemorragia na linha branca	11- Abscesso de talão
03- Hemorragia na parede do casco	12- Abscesso de linha branca
04- Hemorragia no talão	13- Sola macia e amarelada
05- Úlceras de sola	14- Sola dupla
06- Úlceras de pinça	15- Fenda na muralha
07- Alargamento da linha branca	16- Casco em tesoura
08- Fissuras na linha branca	17- Casco em saca rolha
09- Doença da linha branca	18- Linhas de estresse bem marcadas na parede do casco (linhas horizontais)

Tabela 4 – Critérios de inclusão de vacas de aptidão leiteira com e sem sinais clínicos de laminite para os grupos experimentais.

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Ausência de linhas de estresse na parede do casco	Presença de linhas de estresse na parede do casco	Presença de linhas de estresse na parede do casco
Ausência de demais lesões associadas à laminite	Presença de no mínimo uma outra lesão associada à laminite	Presença de no mínimo uma outra lesão associada à laminite
Sem sinais de claudicação em nenhum dos membros	Sem sinais de claudicação em nenhum dos membros	Com claudicação evidente (grau 2 a 4) no membro de interesse



Figura 1 – Exemplo da identificação de membro torácico de bovino com abraçadeiras plásticas (1) e lacres numerados (2) colocados na região do osso metacarpo.

6.6 Colheita de materiais em frigorífico

Nas datas do abate desses animais foi feita a colheita dos cascos no frigorífico. Imediatamente após desarticulação, os membros foram afixados em um torno (ou morça) para que o casco fosse estabilizado, serrado e obtidos os fragmentos de tecido. A unha a ser colhida (medial ou lateral) foi escolhida previamente a partir dos dados coletados na fazenda e identificada no momento de serrar por meio de sua marcação com fita isolante. Utilizou-se arco de serra, segueta comum e serra-fita para obtenção dos fragmentos. Para isso, inicialmente foi serrada e desprezada a extremidade distal da pinça, favorecendo que os fragmentos seguintes fossem aqueles

a contemplar área significativa de derme e epiderme. Em seguida, foi serrado outro fragmento, situado aproximadamente na porção médio-distal da unha. Este fragmento foi conservado em nitrogênio líquido para futuras pesquisas e não foi utilizado para as abordagens deste estudo. Por fim, na porção média da unha em sentido médio-proximal, com o auxílio de serra-fita foi obtido o fragmento utilizado nesta pesquisa para análise histopatológica (Figura 2). Estes fragmentos incluíram as paredes dorsal e axial e a sola e possuíam aproximadamente 6,5cm de comprimento, 5cm de largura e 1,5cm de espessura, conforme demonstrado nas Figuras 2 e 3. Os fragmentos de casco foram fixados em formol tamponado a 10% durante 48 horas

sendo em seguida conservados em álcool etílico a 70% até o processamento

laboratorial.

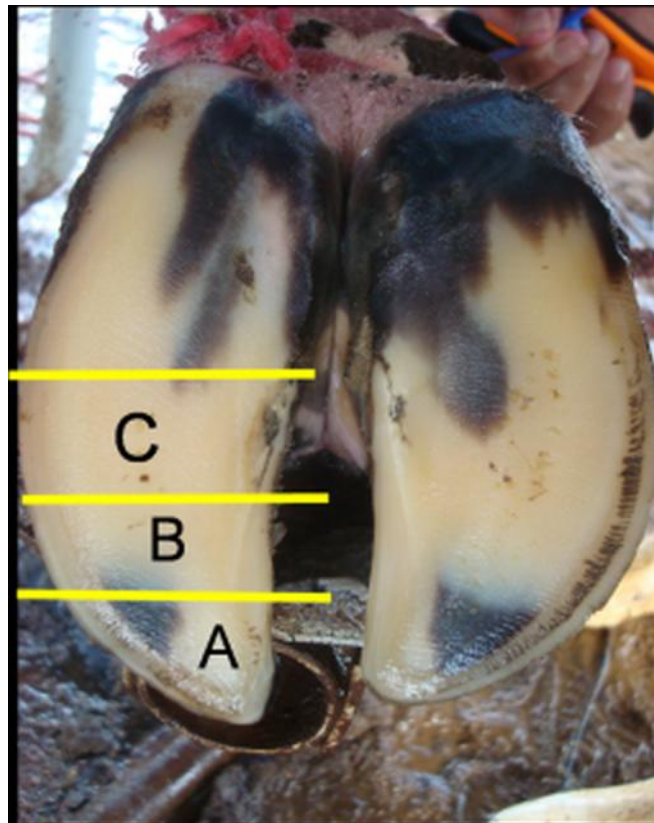


Figura 2 – Demonstração da região do casco de bovino serrada para obtenção de fragmentos de tecido. A- porção distal da unha (fragmento desprezado), B- região de obtenção do fragmento para conservação em nitrogênio líquido, C- região de obtenção do fragmento para histopatologia.



Figura 3 – Fragmento da unha do casco de bovino em corte transversal, demonstrando as regiões solear (S), axial (A) e dorsal (D). Régua em centímetros.

6.7 Processamento das amostras

No laboratório de histopatologia, os fragmentos obtidos no frigorífico foram novamente cortados para obtenção da junção derme-epiderme das regiões solear,

axial e dorsal do casco. Os fragmentos obtidos contemplavam a epiderme e derme das três regiões do casco e parte da falange distal, conforme demonstrado na Figura 4.

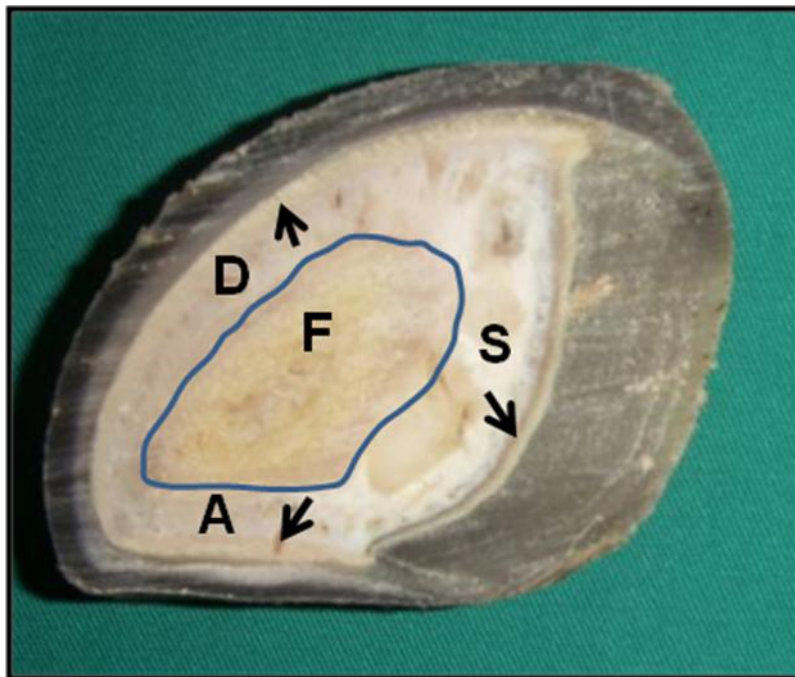


Figura 4 – Fragmento de casco bovino em corte transversal demonstrando a junção derme-epiderme das regiões solear (S), axial (A) e dorsal (D) e parte da falange distal (F), delimitada pela linha azul. Setas indicam as lâminas do casco nas regiões axial e dorsal e o epitélio na região solear.

Para o recorte dos fragmentos foram utilizados materiais como torquês de casco,

navalha e cassetes histológicos conforme demonstrado na Figura 5.



Figura 5 – Materiais utilizados para recorte de fragmento de casco bovino e obtenção da junção derme-epiderme. 1- torquês de casco; 2- navalha histológica descartável; 3- cassete histológico; 4- fragmento de casco conservado em álcool etílico a 70%.

O procedimento de recorte dos fragmentos ocorreu do seguinte modo: 1) iniciou-se o recorte na região solear para retirada do excesso de estrato córneo utilizando-se torquês de casco; 2) desbastou-se o restante de estrato córneo com navalha até alcançar a proximidade dos tecidos moles, porém, procurando manter uma fina camada de estrato córneo; 3) introduziu-se a navalha de fora para dentro (no sentido do estrato córneo para o estrato dérmico) até alcançar o osso podal (falange distal); 4) após inclinar levemente a navalha, conduziu-se a mesma no sentido rente ao osso, para alcançar a maior área de derme possível, até a outra extremidade do fragmento na região da sola; 5) procedeu-se às aparas do recorte

obtido para obtenção da amostra a ser utilizada; 6) acondicionou-se a amostra em cassete histológico para processamento histotécnico. Deste modo, obtiveram-se amostras de tecido que contemplavam uma fina camada de estrato córneo e a junção derme-epiderme da região da sola. Após a obtenção da amostra de tecido da região da sola, procedeu-se o recorte da região axial e por último, da região dorsal, em ambos os casos seguindo o mesmo procedimento de desbastar o excesso de estrato córneo. Ao final de todos os recortes, do fragmento obtido inicialmente no frigorífico restou apenas a amostra de osso. Nas Figuras 6, 7 e 8 demonstra-se passo-a-passo o método de recorte dos fragmentos e obtenção das amostras de tecido na região da sola, axial e dorsal respectivamente.

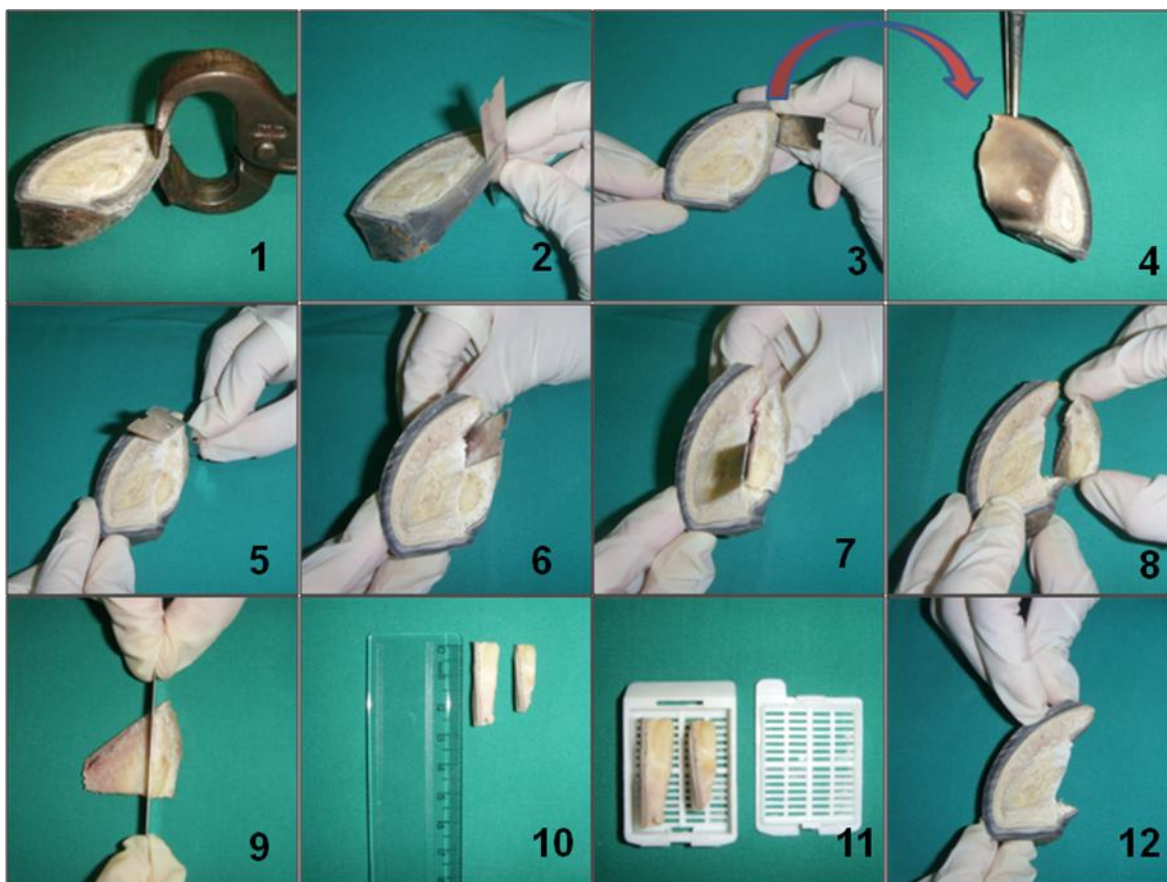


Figura 6 - Demonstração passo-a-passo do recorte de fragmento de casco na região da sola para obtenção de amostra de tecido da junção derme-epiderme. 1- Recorte com torquês do fragmento obtido para remoção do excesso de estrato córneo; 2 e 3- Desbaste fino com navalha histológica do restante de estrato córneo na região da sola. Procurou-se desbastar até próximo aos tecidos moles, porém, preservando uma fina camada de estrato córneo; 4- Fragmento de casco com vistas à superfície solear evidenciando afinamento da camada córnea; 5- Introdução da navalha de fora para dentro (no sentido do estrato córneo para o estrato dérmico) até alcançar o osso podal; 6 e 7- Condução da navalha rente ao osso para inclusão de maior área de derme na amostra a ser obtida; 8- Amostra obtida e aspecto do fragmento de casco após recorte da sola; 9- Realização de aparas na amostra; 10- Amostra obtida com aproximadamente três centímetros de comprimento; 11- Acondicionamento da amostra em cassete histológico para processamento histotécnico; 12- Aspecto final do fragmento após retirada da amostra de sola.

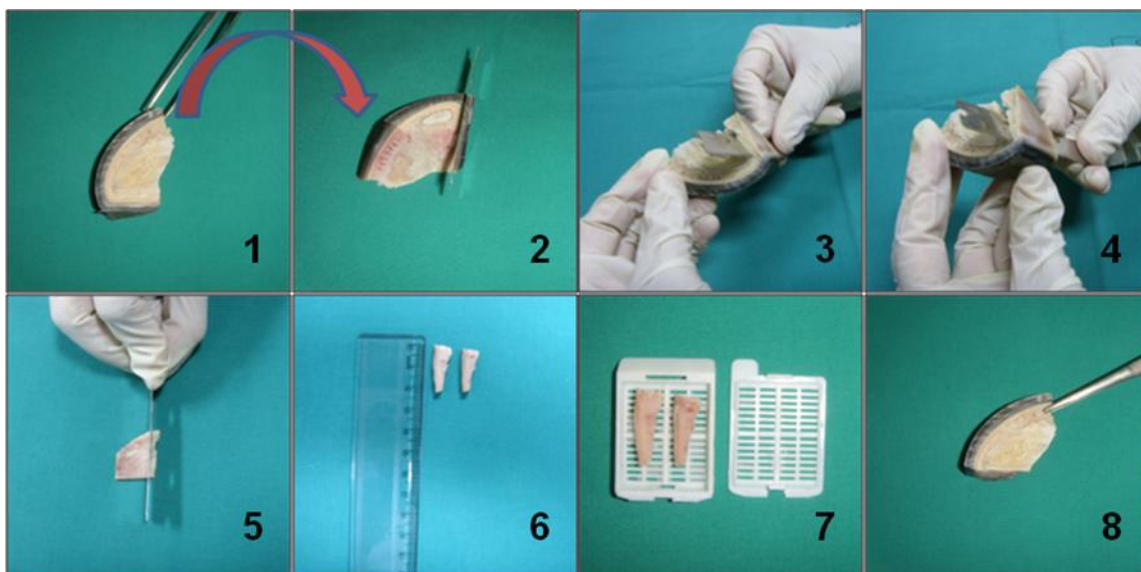


Figura 7 - Demonstração passo-a-passo do recorte de fragmento de casco na região axial para obtenção de amostra de tecido da junção derme-epiderme. 1- Em sequência, demonstração do aspecto do fragmento de casco após aparas do fragmento da foto 12 da Figura 6; 2- Procedeu-se à remoção do excesso de estrato córneo da região axial. Está demonstrado o desbaste fino com navalha. Conforme a espessura do estrato córneo a torquês foi dispensável, sendo utilizada nos casos em que ele era mais espesso. Procurou-se desbastar até próximo aos tecidos moles, porém, preservando uma fina camada de estrato córneo; 3- Introdução da navalha rente ao osso podal; 4- Condução da navalha rente ao osso para inclusão de maior área de derme na amostra a ser obtida; 5- Realização de aparas na amostra; 6- Amostra obtida com aproximadamente três centímetros de comprimento; 7- Acondicionamento da amostra em cassette histológico para processamento histotécnico; 8- Aspecto final do fragmento após retirada da amostra de tecido das regiões solear e axial.

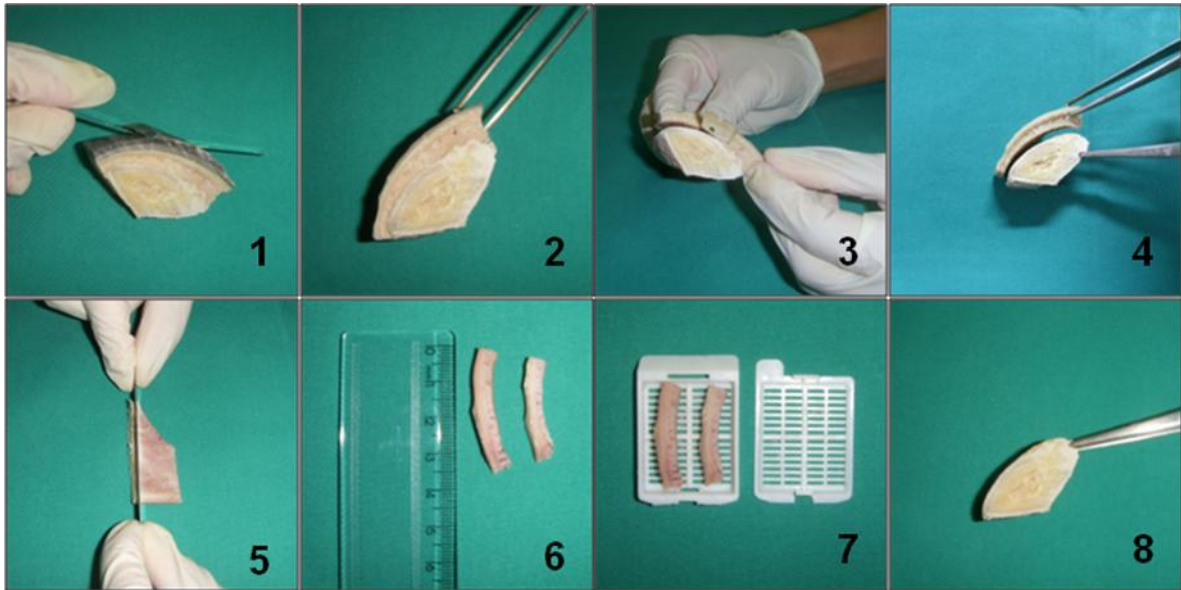


Figura 8 - Demonstração passo-a-passo do recorte de fragmento de casco na região dorsal para obtenção de amostra de tecido da junção derme-epiderme. 1- Desbaste do estrato córneo da região dorsal com navalha. Está demonstrado o desbaste fino com navalha. Conforme a espessura do estrato córneo a torquês é dispensável, devendo ser utilizada nos casos em que ele é mais espesso. Procura-se desbastar até próximo aos tecidos moles, porém, preservando uma fina camada de estrato córneo; 2- Aspecto da região dorsal após remoção do excesso e desbaste fino do estrato córneo; 3- Introdução e condução da navalha rente ao osso podal; 4- Demonstração do aspecto do fragmento após recorte da junção derme-epiderme na região dorsal; 5- Realização de aparas na amostra; 6- Amostra obtida com aproximadamente três centímetros de comprimento; 7- Acondicionamento da amostra em cassete histológico para processamento histotécnico; 8- Aspecto final do fragmento após retirada da amostra de tecido das regiões solear, axial e dorsal. Fragmento de osso podal (falange distal).

Na Figura 9 demonstra-se em detalhes o aspecto da derme e epiderme das amostras obtidas. Após o recorte, as amostras foram processadas histologicamente em aparelho histotécnico e posteriormente incluídas em blocos de parafina, conforme técnicas de

rotina. Em seguida, cortes histológicos de 5 μ m foram montados em lâminas histológicas e corados pelas técnicas de Hematoxilina e Eosina (H&E) e Ácido periódico de Schiff (PAS) conforme previamente descrito (LUNA, 1968).

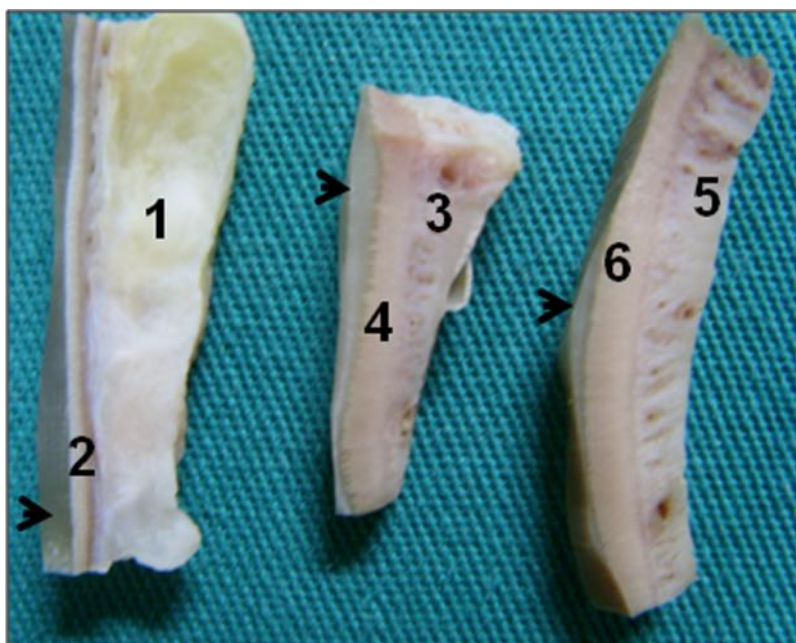


Figura 9 - Amostras da junção derme-epiderme do casco de vacas leiteiras nas regiões solear, axial e dorsal. Números 1, 3 e 5 indicam a derme das regiões solear, axial e dorsal respectivamente; 2 indica o epitélio da sola; 4 e 6 indicam as lâminas dérmicas e epidérmicas das regiões axial e dorsal respectivamente; setas indicam fina camada de estrato córneo.

6.8 Estudo das lesões histológicas

Ao microscópio de luz no aumento de 10X, as lâminas foram avaliadas pelo mesmo investigador sem que o mesmo tivesse conhecimento da identidade da amostra (leitura às cegas).

Nas lâminas coradas com H&E investigou-se a presença de lesões como congestão (vasos dilatados com sangue), hemorragia (presença de hemácias no espaço extravascular) e infiltrado inflamatório (presença de células inflamatórias no interstício, perivascular ou intravascular) na derme das regiões solear, axial e dorsal. Infiltrado inflamatório também foi investigado na lâmina dermal das regiões dorsal e axial. Para tanto, foram atribuídos escores de acordo com a intensidade e frequência das lesões encontradas conforme Tabela 5.

Nas lâminas coradas com PAS foi avaliada a morfologia das células epidermais e a integridade da membrana basal nas regiões axial e dorsal do casco.

A avaliação das células epidermais foi feita no terço médio das lâminas. Para isso foram atribuídos os escores descritos na Tabela 6.

A membrana basal (MB) foi estudada tendo em vista a integridade de sua estrutura. Para isso, analisou-se a presença de irregularidades em sua morfologia considerando três regiões distintas ao longo de seu comprimento. Logo, a MB foi dividida nas regiões apical, média e basal conforme detalhado na Tabela 7.

A presença de irregularidades na membrana basal foi investigada nas três regiões mencionadas atribuindo-se escores conforme a frequência e intensidade das irregularidades observadas (Tabela 8).

Tabela 5 – Escores para lesões microscópicas na junção derme-epiderme do casco de vacas de aptidão leiteira com e sem sinais clínicos sugestivos de laminite.

Escore/Lesão histológica	Congestão	Hemorragia	Infiltrado Inflamatório
0- ausente	Ausência de vasos dilatados com sangue.	Ausência de hemácias no espaço extravascular.	Ausência de células inflamatórias no interstício, peri ou intravascular.
1- discreto	Ocorrência ocasional de vasos dilatados com sangue e vasos pouco dilatados.	Presença de pouca quantidade de sangue no espaço extravascular.	Presença ocasional de poucas células inflamatórias no interstício, peri ou intravascular.
2- leve	Ocorrência pouco frequente de vasos dilatados com sangue e vasos pouco dilatados.	Presença de pequena quantidade de sangue no espaço extravascular.	Presença frequente de leve quantidade de células inflamatórias no interstício, peri ou intravascular.
3- moderado	Ocorrência frequente de vasos dilatados com sangue e vasos evidentemente dilatados.	Presença de quantidade significativa de sangue no espaço extravascular.	Presença frequente de moderada quantidade de células inflamatórias no interstício, peri ou intravascular.
4- acentuado	Ocorrência frequente de vasos dilatados com sangue e vasos muito dilatados.	Presença de grande quantidade de sangue no espaço extravascular.	Presença frequente de grande quantidade de células inflamatórias no interstício, peri ou intravascular.

Tabela 6 - Caracterização dos escores utilizados para estudo de células epidermais da junção derme-epiderme das regiões axial e dorsal do casco de vacas leiteiras.

Escore	Células epidermais
0	Predomínio de células epidermais com núcleo ovalado e perpendicular à membrana basal (MB).
1	Presença de aproximadamente 50% de células epidermais com núcleos ovalados e perpendiculares à MB e 50% com núcleos arredondados.
2	Predomínio de células epidermais com núcleos arredondados.
3	Predomínio de células epidermais com núcleos alongados e achatados ou ausência de núcleos, por desprendimento de células.

Tabela 7 – Caracterização das regiões da membrana basal da junção derme-epiderme das regiões axial e dorsal do casco de vacas leiteiras.

Região da membrana basal	Localização das regiões da membrana basal
Terço apical	Região da membrana basal no limite com a derme.
Terço médio	Região da membrana basal intermediária entre os terços apical e basal.
Terço basal	Região da membrana basal no limite com o estrato córneo

Tabela 8 – Caracterização dos escores para irregularidades na membrana basal utilizados para investigação da morfologia da MB na junção derme-epiderme das regiões axial e dorsal do casco de vacas leiteiras.

Escore	Irregularidades na membrana basal
0- ausente	Ausência de irregularidades.
1- discreto	Presença de poucas irregularidades e não muito acentuadas.
2- leve	Presença frequente de irregularidades, porém não muito acentuadas.
3- moderado	Presença de muitas irregularidades acentuadas.
4- acentuado	Presença de irregularidades muito acentuadas.

6.9 Análise estatística

As prevalências das alterações clínicas em todos os animais examinados (n=57) e naqueles incluídos nos grupos (n=39) foi calculada através de porcentagem simples (POZZATTI et al., 2009).

Para a comparação da prevalência entre os grupos G2 e G3, utilizou-se o teste Exato de

Fisher. Ainda na comparação entre grupos, as variáveis semi-quantitativas considerando-se cada região (solear, axial e dorsal) foram comparados por meio do teste de Kruskal-Wallis. Também realizou-se comparações entre regiões de cada grupo por meio do teste de Friedman. Ambas as análises foram seguidas pelo teste de Dunn. Para todos os testes considerou-se um nível de significância de $P < 0,05$.

7. RESULTADOS

As características clínicas dos cascos dos animais dos grupos G1, G2 e G3 encontram-se exemplificadas na Figura 10.

As lesões clínicas e suas respectivas taxas de prevalência encontradas na unha selecionada dos animais examinados encontram-se descritas na Tabela 9.

Tabela 9 – Prevalência de lesões clínicas associadas à laminite nas unhas selecionadas de bovinos de aptidão leiteira no rebanho estudado (considerando-se o total de animais examinados (n=57)).

Lesões macroscópicas	Prevalência
Linhas de estresse	80,7%
Erosão de talão	52,6%
Alargamento da linha branca	36,8%
Doença da linha branca	24,6%
Hemorragia de sola	24,6%
Hemorragia na linha branca	19,3%
Casco em tesoura	12,3%
Hemorragia na parede do casco	10,5%
Sola dupla	1,8%
Sola macia e amarelada	1,8%
Úlcera de sola	1,8%
Fenda na muralha	1,8%

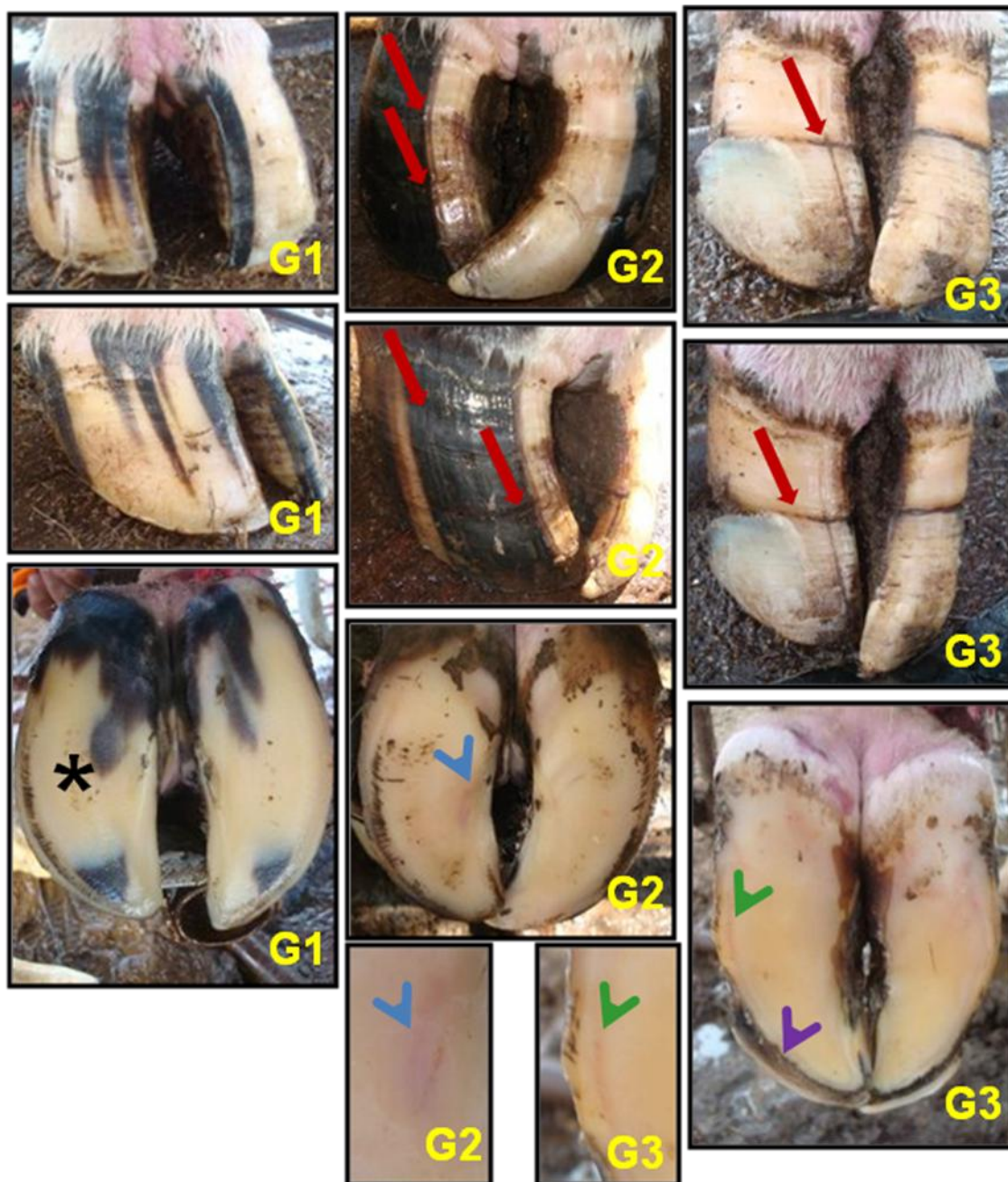


Figura 10 - Fotos dos cascos de bovinos classificados nos grupos 1 (G1), 2 (G2) e 3 (G3) demonstrando as lesões encontradas na unha estudada. Todas as fotos da superfície solear dos cascos encontram-se invertidas horizontalmente (“em espelho”). * indica a unha estudada no animal do G1; setas vermelhas indicam linhas de estresse na unha estudada dos animais do G2 e G3; setas azuis indicam hemorragia de sola; setas verdes indicam hemorragia de linha branca; seta roxa indica alargamento e doença de linha branca.

As lesões mais prevalentes na unha selecionada dos grupos G2 e G3 foram hemorragia de sola, hemorragia de linha

branca, alargamento e doença de linha branca. Observou-se que as lesões hemorrágicas como hemorragia de sola e de

linha branca foram mais comuns no G2 e que as alterações de linha branca como alargamento e doença foram mais comuns

em G3, contudo não houve diferença estatística entre as prevalências de lesões entre os dois grupos ($P>0,05$) (Tabela 10).

Tabela 10 – Prevalência de lesões clínicas associadas à laminite encontradas na unha selecionada de vacas leiteiras classificadas em três grupos: G1 (sem lesões de laminite e sem claudicação), G2 (com lesões de laminite e sem claudicação), G3 (com lesões de laminite e com claudicação).

Lesões clínicas	Prevalência de lesões na unha selecionada			
	G1(n=9)	G2 (n=23)	G3 (n=7)	Total (n=39)
Linhas de estresse	0%	100%	100%	76,92%
Alargamento de linha branca	0%	48,0%	86,0%	43,59%
Doença de linha branca	0%	26%	57%	25,64%
Hemorragia de sola	0%	39%	14%	25,64%
Hemorragia de linha branca	0%	30%	14%	20,51%
Casco em tesoura	0%	17%	14%	12,82%
Hemorragia na parede do casco	0%	9%	14%	7,69%
Úlcera de sola	0%	0%	14%	2,56%
Fenda na muralha	0%	4%	0%	2,56%

Quanto aos resultados da avaliação histológica na coloração de H&E, na comparação entre grupos não houve diferenças quanto à presença de congestão e infiltrado inflamatório na derme solear. Contudo, a hemorragia foi significativamente maior no grupo G3 ($P<0,05$). Na derme axial não houve

diferenças quanto a congestão, hemorragia e infiltrado inflamatório entre os grupos ($P>0,05$). Na derme dorsal não houve diferenças quanto a congestão e infiltrado inflamatório, contudo, a hemorragia foi significativamente maior no G3 ($P<0,05$) (Figura 11).

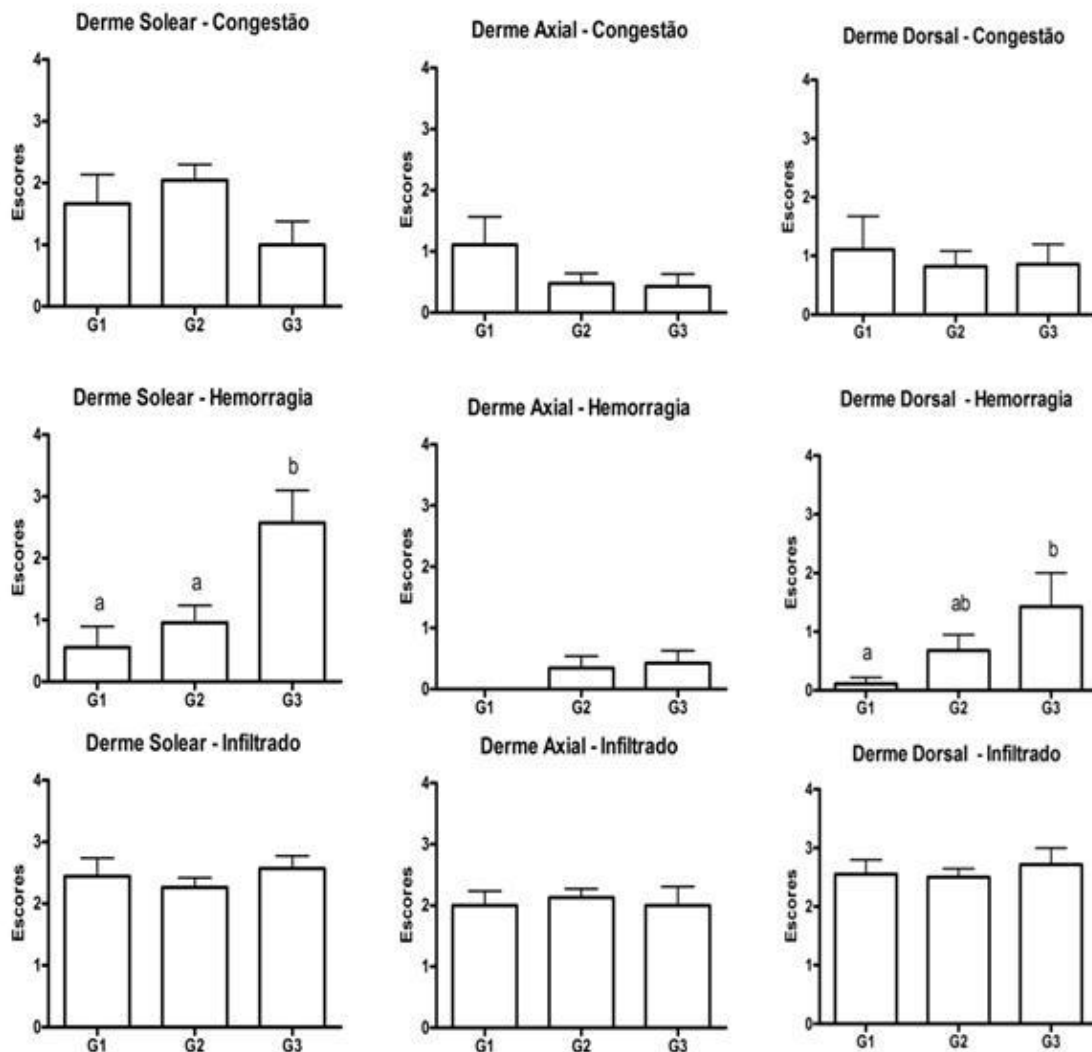


Figura 11 - Resultados gráficos da pesquisa de lesões histológicas (congestão, hemorragia e infiltrado inflamatório) na derme solear, axial e dorsal de vacas leiteiras dos grupos 1 (G1), 2 (G2) e 3 (G3). Comparação entre grupos na mesma região do casco. Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si ($P > 0,05$). Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($P < 0,05$). Média \pm desvio padrão.

As lesões investigadas foram encontradas em todas as regiões do casco, e especialmente o infiltrado inflamatório ocorreu na derme de todas as regiões de todos os animais avaliados (escore maior ou igual a 1) conforme Tabela 11. O grupo G1

não diferiu quanto ao escore de infiltrado inflamatório em relação aos grupos G2 e G3, tendo sido a inflamação, à semelhança do que ocorreu naqueles grupos, encontrada em todas as regiões do casco conforme demonstrado nas Figuras 12 e 13.

Tabela 11 – Distribuição dos escores para infiltrado inflamatório na derme das regiões solear, axial e dorsal do casco de vacas leiteiras sem sinais clínicos de laminite e sem claudicação (G1), com sinais clínicos de laminite sem (G2) ou com claudicação (G3).

G1 (n=9)				
Escore inflamação	Derme solear	Derme axial	Derme dorsal	Total
1	1	2	0	3 (11%)
≥ 2	8 (89%)	7 (78%)	9 (100%)	24 (89%)
G2 (n=23)				
	Derme solear	Derme axial	Derme dorsal	Total
1	3	3	0	6 (9%)
≥ 2	20 (87%)	20 (87%)	23 (100%)	63 (91%)
G3 (n=7)				
	Derme solear	Derme axial	Derme dorsal	Total
1	0	2	1	3 (14%)
≥ 2	7 (100%)	5 (71%)	6 (86%)	18 (86%)

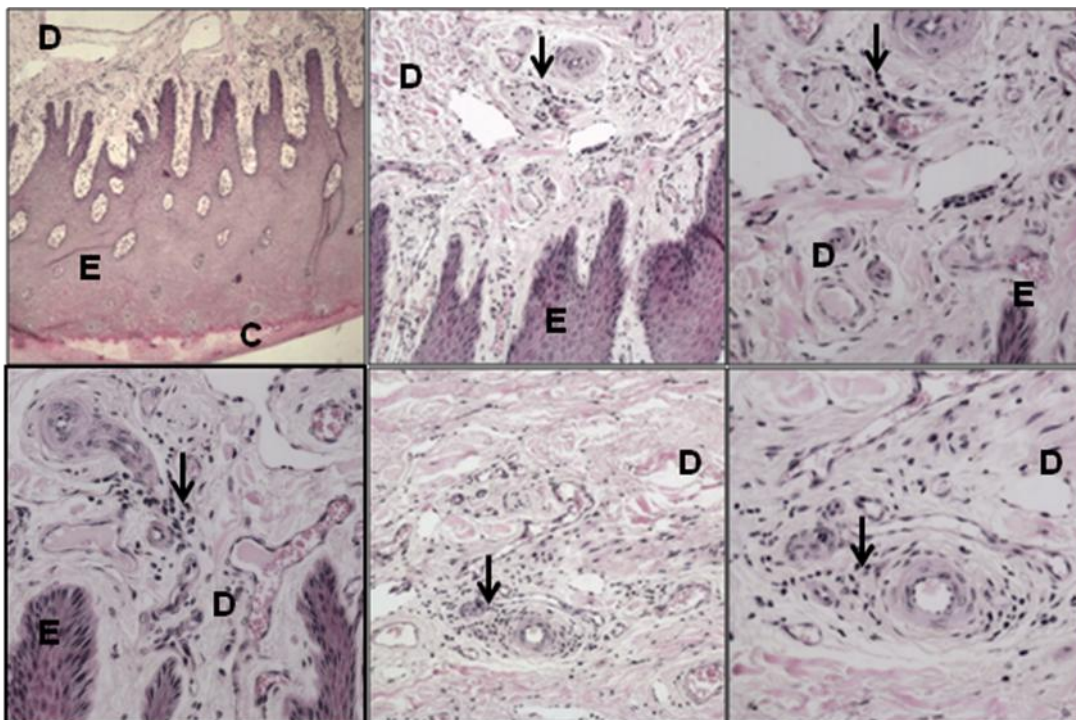


Figura 12 – Histologia da junção derme-epiderme da região solear do casco de vaca de aptidão leiteira sem sinais clínicos de laminite ao exame do casco e sem claudicação (G1). As fotos histológicas são do casco identificado como G1 na Figura 10. Letras indicam: C- o estrato córneo, D- a derme, E- as camadas não corneificadas da epiderme. Setas indicam células inflamatórias. Coloração de H&E. Aumentos de 4, 10 e 20X.

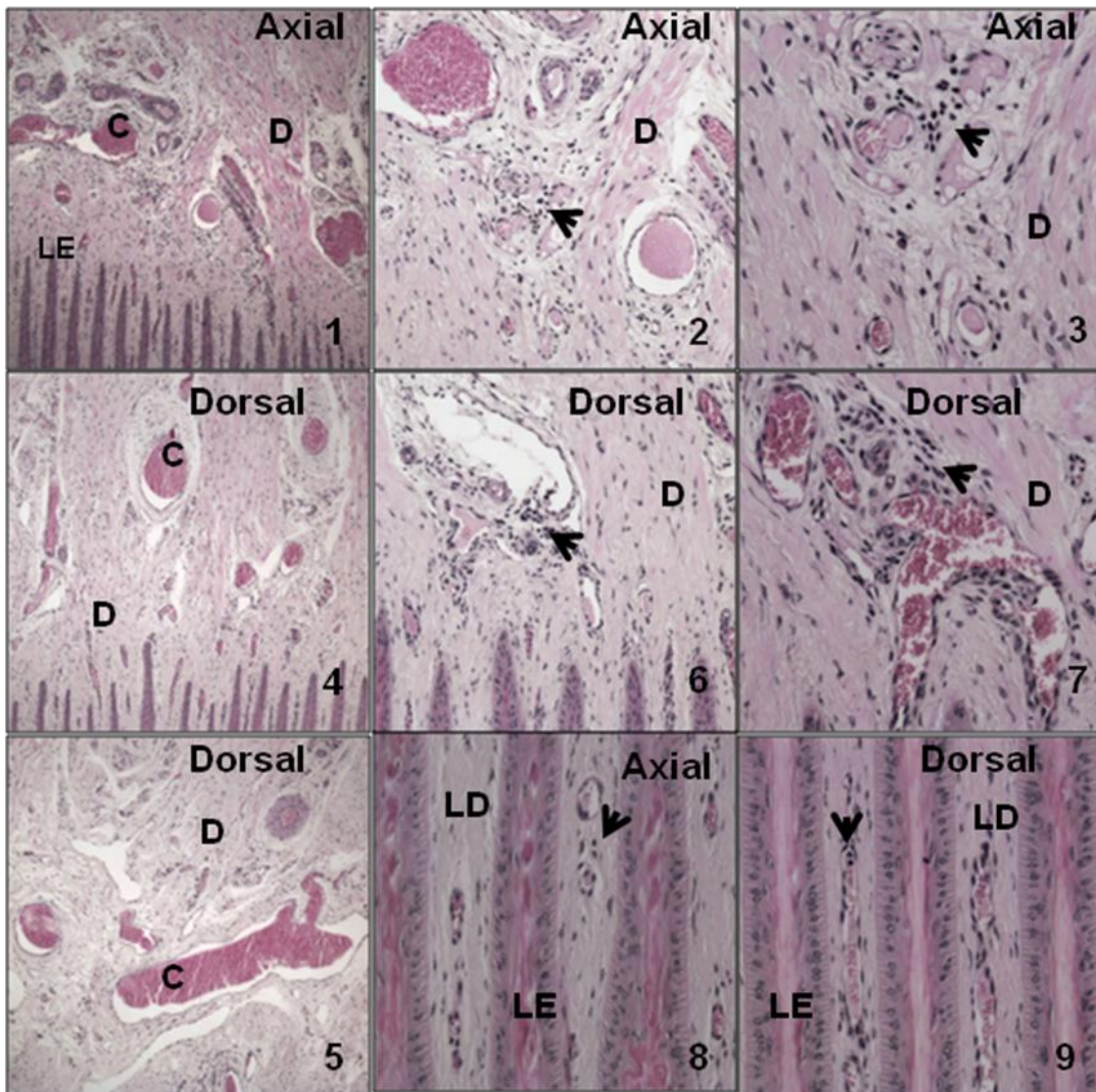


Figura 13- Histologia da junção derme-epiderme das regiões axial e dorsal do casco de vaca leiteira sem sinais clínicos de laminite ao exame do casco e sem claudicação (G1). As fotos histológicas são do casco identificado como G1 na Figura 10. Fotos de 1 a 3 e 8 são da região axial. Fotos de 4 a 7 e 9 são da região dorsal. Letras indicam: C- congestão, D- derme, LD- lâmina dermal, LE- lâmina epidermal. Setas indicam células inflamatórias. Coloração de H&E. Aumentos de 10 e 20X.

Algumas lesões histológicas encontradas nos grupos G2 e G3 estão demonstradas na Figura 14.

Na comparação dentro dos grupos entre as diferentes regiões do casco, no G1 não foi encontrada diferença entre as regiões quanto a congestão, hemorragia e infiltrado inflamatório ($P > 0,05$). Contudo, estas

lesões estiveram presentes no grupo e, ainda que sem significância estatística, congestão e hemorragia foram maiores na derme solear comparada com a axial e dorsal. No G2 a congestão foi maior na derme solear comparada com a derme axial e dorsal ($P < 0,05$) e a hemorragia também ainda que sem significância estatística. Não houve diferença entre as regiões quanto ao

infiltrado inflamatório, embora presente em todas as regiões do casco. No G3 a hemorragia foi maior na derme solear comparada com a axial e dorsal ($P < 0,05$).

Não houve diferença entre as regiões quanto a congestão e infiltrado inflamatório (Figura 15).

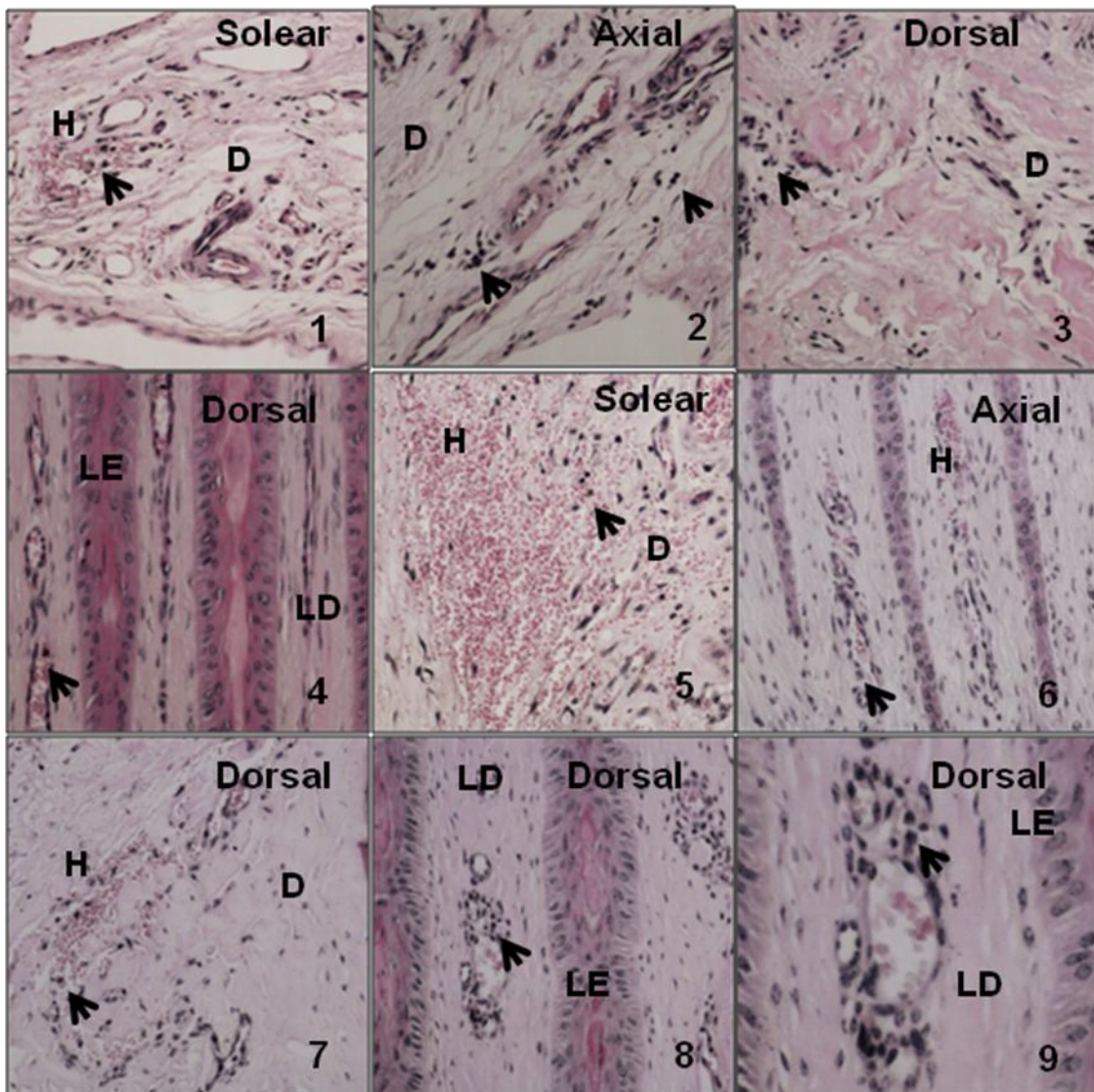


Figura 14- Histologia da junção derme-epiderme das regiões solear, axial e dorsal do casco de vacas leiteiras com sinais clínicos de laminite ao exame do casco sem (G2) ou com (G3) claudicação. As fotos histológicas são dos cascos identificados como G2 e G3 na Figura 10. Fotos de 1 a 4 são do casco G2 e fotos de 5 a 9 são do G3. Letras indicam: D- derme, H- Hemorragia, LD- lâmina dermal, LE- lâmina epidermal. Setas indicam células inflamatórias. Coloração de H&E. Aumentos de 10, 20 e 40X.

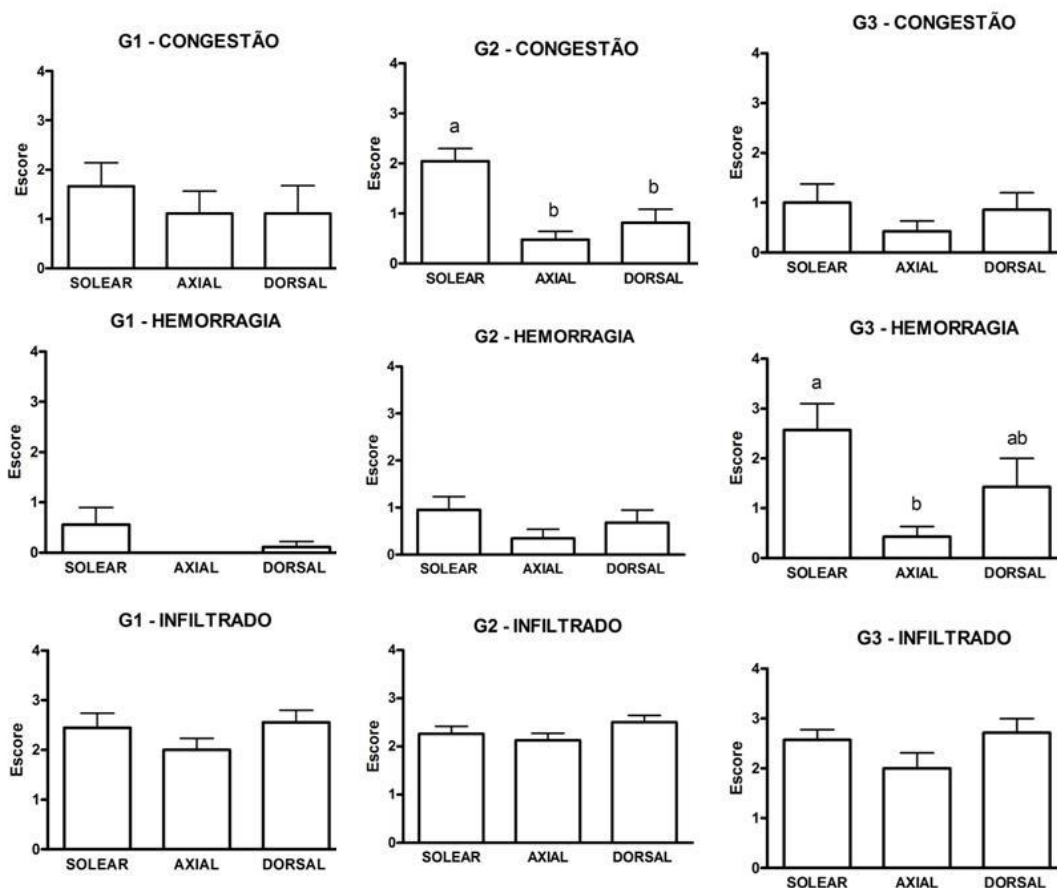


Figura 15 – Resultados gráficos da pesquisa de lesões histológicas (congestão, hemorragia e infiltrado inflamatório) na derme solear, axial e dorsal de vacas leiteiras dos grupos 1 (G1), 2 (G2) e 3 (G3). Comparação entre regiões do casco no mesmo grupo. Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si ($P > 0,05$). Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($P < 0,05$). Média \pm desvio padrão.

Quanto à presença de infiltrado inflamatório na lâmina dermal, observou-se que, embora presente nas regiões axial e dorsal, não houve diferença estatística entre os grupos nem entre as regiões estudadas ($P > 0,05$) (Figuras 13 (fotos 8 e 9) e 16).

Quanto às avaliações da morfologia das células epidermais na coloração de PAS não houve diferença estatística ($P > 0,05$) para as alterações na morfologia das células epidermais entre os grupos na mesma região, nem entre regiões dentro do mesmo grupo (Figuras 17).

Na Figura 18, demonstra-se a morfologia normal das células epidermais da região axial.

Quanto à MB não foram encontradas diferenças quanto às irregularidades encontradas entre os grupos tanto na região axial como na dorsal em nenhuma das três regiões estudadas ($P > 0,05$) (Figura 19).

Já na comparação dentro dos grupos entre as diferentes regiões da MB (terço basal, apical e médio), foi observado que na região axial as irregularidades no terço basal foram mais acentuadas do que no

terço médio ($P < 0,05$) e sem diferença na comparação com o terço apical ($P > 0,05$) no G1. Na região dorsal, ainda que sem diferença estatística, as irregularidades foram mais acentuadas no terço basal do que nos terços médio e apical.

No G2, as irregularidades foram mais acentuadas no terço basal em comparação com o médio e apical tanto na região axial

como na dorsal ($P < 0,05$). No G3, as irregularidades foram mais acentuadas no terço basal em comparação com o apical ($P < 0,05$) tanto na região axial como na dorsal, e, ainda que sem significância estatística, maiores que no terço médio. Em suma, as irregularidades foram mais acentuadas no terço basal de ambas as regiões (axial e dorsal) em todos os grupos estudados (Figuras 20 e 21).

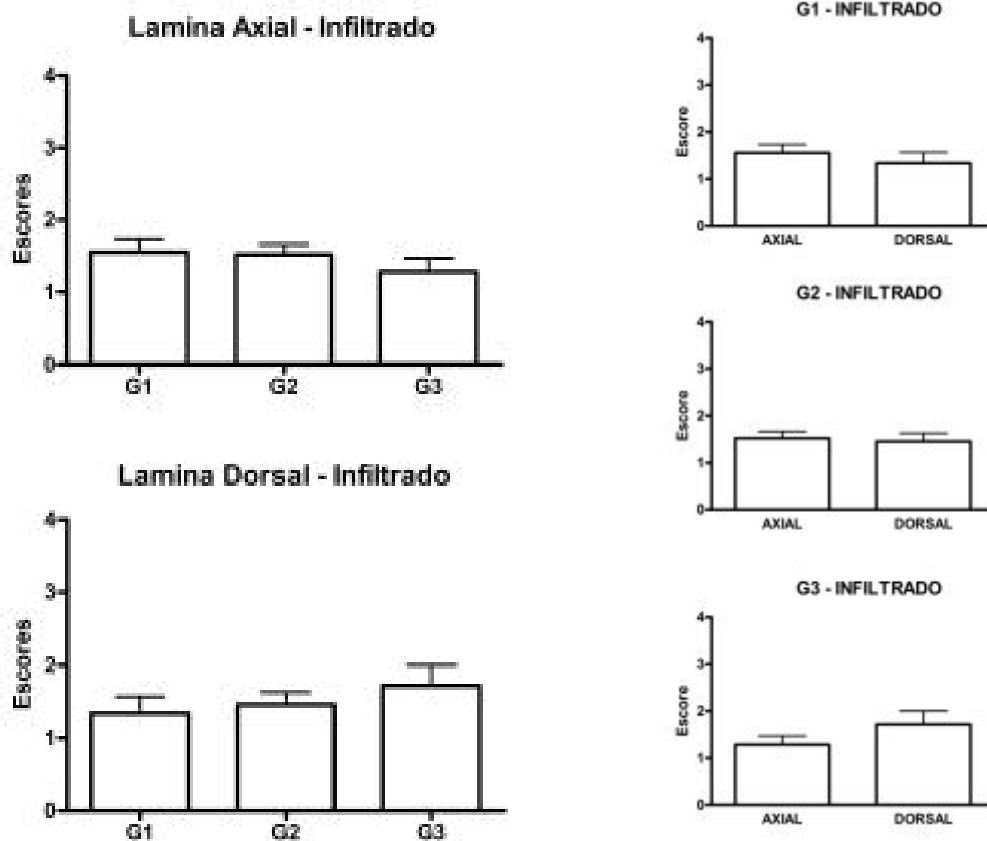


Figura 16 – Resultados gráficos da pesquisa de infiltrado inflamatório na lâmina dermal da epiderme das regiões axial e dorsal de vacas leiteiras classificadas nos grupos 1 (G1), 2 (G2) e 3 (G3). Gráficos à esquerda permitem a comparação entre grupos numa mesma região do casco. Gráficos à direita permitem a comparação entre regiões do casco dentro do mesmo grupo.

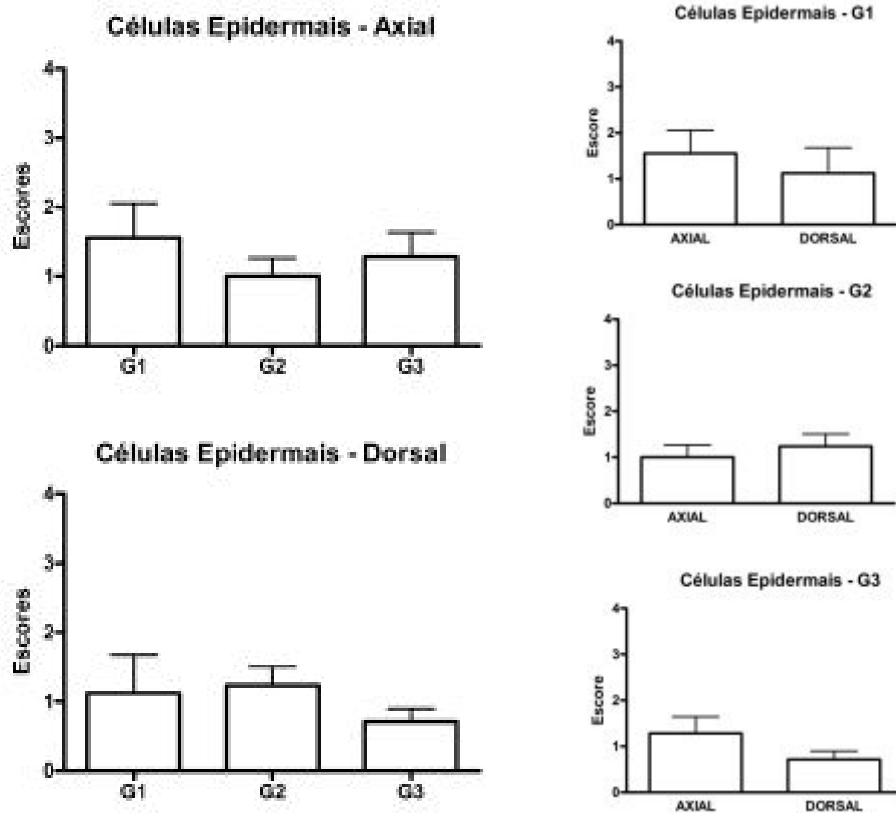


Figura 17 – Resultados gráficos para o estudo de alterações na morfologia de células epidermais das regiões axial e dorsal do casco de bovinos classificados nos grupos 1 (G1), 2 (G2) e 3 (G3). Gráficos à esquerda permitem a comparação entre grupos numa mesma região do casco. Gráficos à direita permitem a comparação entre regiões do casco dentro do mesmo grupo.

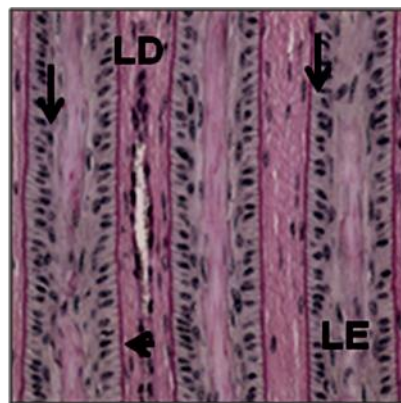


Figura 18- Histologia das lâminas dermais e epidermais da região axial do casco de vaca leiteira evidenciando a morfologia das células epidermais. Setas verticais indicam células epidermais normais, com núcleos alongados e perpendiculares à membrana basal (MB). Seta horizontal indica a MB com escore (0) para irregularidades. LD- lâmina dermal, LE- lâmina epidermal. Coloração de PAS. Aumento de 20X.

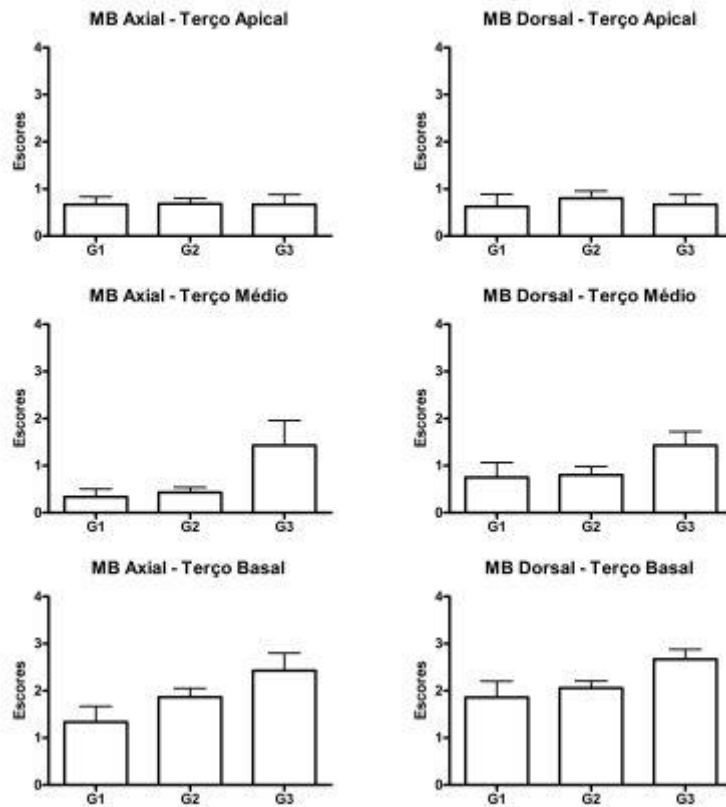


Figura 19 – Resultados gráficos da avaliação de irregularidades na membrana basal das regiões axial e dorsal considerando-a dividida nos terços apical, médio e basal no casco de vacas leiteiras classificadas nos grupos 1 (G1), 2 (G2) e 3 (G3).

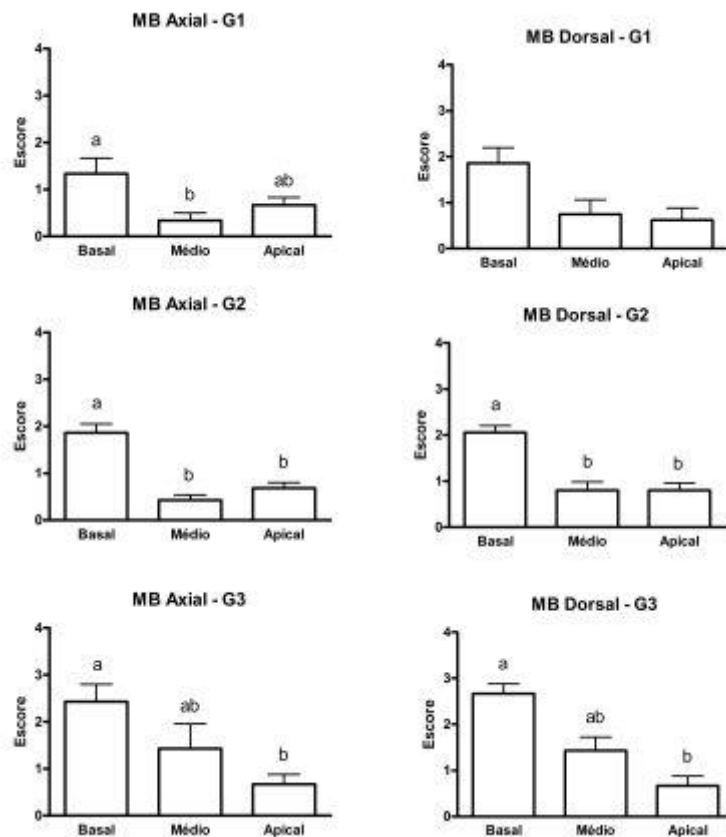


Figura 20 – Resultados gráficos da pesquisa de irregularidades na membrana basal (MB) em seus terços basal, médio e apical das regiões axial e dorsal do casco de vacas leiteiras classificadas nos grupos 1 (G1), 2 (G2) e 3 (G3). Gráficos à esquerda permitem a comparação entre as regiões da MB dentro do mesmo grupo na região axial do casco. Gráficos à direita permitem a comparação entre as regiões da MB dentro do mesmo grupo na região dorsal do casco.

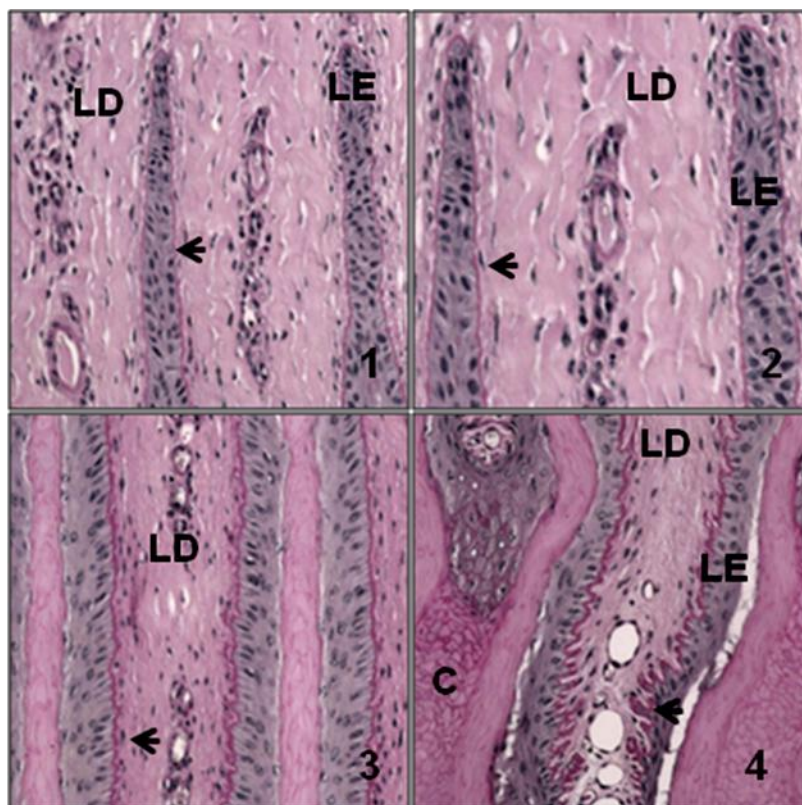


Figura 21- Histologia das lâminas dérmicas e epidérmicas da região dorsal do casco de vaca leiteira evidenciando diferenças quanto às irregularidades da membrana basal (MB) nos terços apical (fotos 1 e 2), médio (foto 3) e basal (foto 4). Setas indicam a MB. Escore para irregularidades na MB no terço apical (1), médio (2) e basal (3). C-camada córnea, LD- lâmina dermal, LE- lâmina epidermal. Coloração de PAS. Aumento de 20X, com zoom na foto 2.

8. DISCUSSÃO

No sentido de abranger a metodologia e os resultados deste trabalho e para facilitar a compreensão do leitor, a discussão foi dividida em subitens. Inicialmente serão tratados alguns aspectos metodológicos que foram necessários ao desenvolvimento da pesquisa, sobre os quais considerou-se relevante detalhar e discutir em decorrência da ausência de informações similares na literatura consultada. Posteriormente, os resultados serão propriamente discutidos, tanto em relação aos achados epidemiológicos no rebanho estudado como em relação à comparação entre os grupos estudados.

8.1 Identificação dos membros coletados

A identificação dos membros para a colheita no frigorífico foi um ponto crítico deste trabalho. O objetivo foi permitir, no frigorífico, a identificação do animal cujo membro deveria ser colhido. Logo, o material utilizado nesta identificação deveria resistir ao manejo dos animais na fazenda (por um período que variou de 15 a 40 dias), ao manejo durante o transporte e ao manejo dentro do frigorífico até a coleta dos cascos. Além disso, considerando que o trabalho dentro do frigorífico obedece a um protocolo bem estabelecido, que não permite muitas intervenções, era preciso criar uma estratégia simples, rápida e eficaz para identificação e posterior colheita dos

cascos dos animais de interesse. Assim, optou-se pela utilização de uma tripla marcação (dois lacres e uma abraçadeira) para garantir o sucesso do trabalho. Considerou-se que a metodologia utilizada foi suficiente para alcançar o objetivo, visto que viabilizou a identificação e colheita dos cascos de aproximadamente 90% dos animais identificados. Contudo, as abraçadeiras plásticas se mostraram mais eficientes do que os lacres numerados. O número de animais que perderam o lacre foi muito superior àqueles que perderam a abraçadeira. Esta se mostrou mais resistente aos desafios de manejo a que os animais foram submetidos.

Para a identificação do indivíduo utilizou-se a gravação de um número na abraçadeira, e no lacre utilizou-se o número feito por encomenda. A gravação na abraçadeira foi a forma mais eficiente encontrada para garantir a identificação do número do animal. A gravação no material plástico foi a mais profunda possível e com o número grande tendo em vista não causar confundimentos por sujeira impregnada na abraçadeira no momento da identificação. Ressalta-se que esta forma de identificação dos animais foi proposta na ocasião deste estudo e não foram encontradas na literatura consultada referências que detalhassem a metodologia de identificação dos animais para colheita de material em frigorífico.

8.2 Método para colheita das amostras de tecidos

O objetivo principal da colheita de amostras foi obter um fragmento de casco provido das três regiões alvo do estudo histológico, as junções derme-epiderme da sola e das regiões dorsal e axial do casco. Desta forma, todas as colheitas foram realizadas na região da pinça, utilizando um corte transversal. Em virtude de variações quanto ao tamanho e forma da unha dos animais, além das limitações em razão de um trabalho que foi feito dentro de um

frigorífico, não foi possível padronizar rigorosamente o local em que a unha foi serrada para todos os animais. Contudo, conforme demonstrado na Figura 2, a região de obtenção do fragmento para histopatologia foi aquela compreendida na região intermediária da pinça.

O método utilizado para alcançar a junção derme-epiderme do casco foi considerado satisfatório. Em geral a torquês foi utilizada para remoção do excesso de estrato córneo em todas as regiões do fragmento, contudo, em alguns casos, quando a espessura deste estrato era muito fina, o uso de torquês poderia prejudicar as lâminas epidermais.. Assim, dependendo da espessura do estrato córneo nas regiões axial e dorsal, a torquês foi dispensável, ficando o trabalho de desbaste da porção corneificada restrito ao uso da navalha. Na sola, a torquês sempre foi necessária em virtude da espessura do estrato córneo. É importante desbastar a camada córnea, pois isso viabiliza a introdução da navalha para recorte da amostra, porém, igualmente importante é manter uma fina camada deste tecido para garantir a referência quanto à estrutura tecidual durante a avaliação histológica. Esta metodologia de obtenção das amostras da junção derme-epiderme do casco também foi proposta durante a execução deste trabalho, sendo que não foram encontradas referências na literatura consultada que detalhassem um método para obtenção destes tecidos.

8.3 Prevalência dos achados clínicos no rebanho estudado

Nas unhas selecionadas no grupo de animais estudados (n=57) foram diagnosticadas lesões clínicas associadas à laminite, sendo as lesões mais prevalentes linhas de estresse (80,7%), alargamento (36,8%) e doença de linha branca (24,6%), hemorragia de sola (24,6%) e de linha branca (19,3%) conforme demonstrado na Tabela 9.

A elevada prevalência de linhas de estresse (80,7%) foi semelhante aos valores de 30,0 e 98,9% citados em outros estudos (FERREIRA, 2003 e POZZATTI et al., 2009). Esses resultados demonstram que os animais, embora mantidos em condições mais extensivas de criação em sua fase produtiva, foram consideravelmente afetados por este tipo de lesão implicada na laminite (GREENOUGH, 2007) e ainda, de modo semelhante aos animais mantidos em condições intensivas. Há que se considerar que as linhas de estresse ocorrem mediante algum tipo de estresse sofrido pelos animais e, dentre eles, a laminite é um importante fator causal (GREENOUGH, 2007). É possível considerar que a elevada prevalência desta lesão no grupo de animais estudados pode ser explicada em razão de se tratar de animais de descarte, que possuíam alguma alteração de saúde, de desempenho ou idade avançada. Deste modo, provavelmente estes animais sofreram situações causadoras de estresse ao longo da vida culminando na elevada prevalência de linhas de estresse. Contudo, a ocorrência desta lesão simultaneamente à presença de outros tipos de lesão características de laminite, permite inferir que sua elevada prevalência esteve fortemente associada à ocorrência desta doença. Há também de serem consideradas as condições de confinamento para engorda a que os animais foram submetidos 90 a 120 dias antes do abate, que poderiam ser determinantes no aparecimento desta alteração.

Quanto à hemorragia de sola, foram citadas na literatura prevalências iguais (24,6%) em estudos realizados com vacas criadas em sistemas não confinados (FLOR e TADICH, 2008) ou superiores em vacas confinadas, que variaram entre 70,0% (FERREIRA, 2003) e 78,9% (POZZATTI et al., 2009). Essa discrepância pode ser facilmente explicada, uma vez que solo abrasivo tem sido considerado como um importante determinante para este tipo de

lesão (VERMUNT e GREENOUGH, 1994).

As afecções de linha branca, apesar de terem sido frequentes no presente estudo, apresentaram menores prevalências quando comparados com outros estudos que relataram prevalência de doença de linha branca entre 73% (FERREIRA, 2003) e 82% (FLOR e TADICH, 2008; POZZATTI et al., 2009).

A erosão de talão não foi considerada uma lesão associada à laminite, logo, não foi considerada para enquadramento dos animais nos grupos estabelecidos. Contudo, esta lesão ocorreu em 52,6% do total de animais avaliados, tendo sido a segunda lesão mais frequente. Este achado é semelhante aos de MAUCHLE et al. (2001) e aos de FLOR e TADICH (2008), quando a prevalência da erosão de talão foi de 67,5% e 48,4% respectivamente. Contudo, foi inferior aos achados de 93% (FERREIRA, 2003) e 100% (POZZATTI et al., 2009). A erosão de talão é uma lesão relacionada às condições de higiene das instalações sendo que umidade excessiva e acúmulo de matéria orgânica favorecem sua ocorrência. Além disso, a patologia está relacionada com a formação de tecido córneo de baixa qualidade (FERREIRA, 2003 e POZZATTI et al., 2009). Na propriedade estudada, o acúmulo de matéria orgânica no confinamento foi apontado como possível causa da elevada prevalência de erosão de talão.

8.4 Comparação entre grupos: achados clínicos

Os critérios de inclusão para o G1 foram ausência de claudicação, de linhas de estresse marcadas e de outras lesões associadas à laminite no casco. Contudo, na unha contralateral, em sete dos nove animais do grupo, foi encontrado algum tipo de lesão ainda que discreta. Assim, não foi possível reunir no grupo G1, animais sem qualquer tipo de lesão nas unhas,

embora tenha sido possível selecionar unhas sem qualquer tipo de lesão associada à laminite. Portanto, ainda que o grupo G1 não possa ser considerado um grupo controle sadio, uma vez que algum tipo de lesão foi detectado no casco, considerou-se que as amostras do G1 constituíram as amostras controle dentro do rebanho estudado, uma vez que foi constituído por unhas desprovidas de lesões associadas à laminite no conjunto de animais avaliados.

As lesões clínicas mais frequentes apresentadas pelos animais dos grupos G2 e G3 foram alargamento e doença de linha branca, hemorragia de sola e de linha branca. As hemorragias foram mais frequentes no G2 e as alterações de linha branca, no G3, ainda que não tenha havido diferença estatística ($P > 0,05$) (Tabela 10). Importante ressaltar que os testes estatísticos de dispersão de frequência, como o teste Exato de Fisher utilizado nesta comparação, exigem amostras maiores. Desta forma, diferenças entre as prevalências de lesões entre grupos podem estar subestimadas. A hemorragia de sola resulta das alterações vasculares na derme (ou cório) do casco e o acúmulo de sangue prejudica a produção de tecido córneo (LISCHER e OSSENT, 2002). Já a hemorragia de linha branca resulta da infiltração de sangue na epiderme da região das lâminas. Com o crescimento do tecido córneo, a hemorragia é removida da região da linha branca. A hemorragia de linha branca indica episódios recentes de laminite. Além disto, esta lesão enfraquece a estrutura do tecido córneo, aumentando a susceptibilidade do animal a lesões secundárias como o abscesso de linha branca. (MÜLLING, 2002). Assim, tanto a hemorragia de sola como a de linha branca resultam no enfraquecimento do tecido córneo do casco e sua elevada prevalência nos grupos G2 e G3 indicam que estes animais foram mais acometidos clinicamente.

Quanto às alterações na linha branca, elas se relacionam na laminite. O alargamento pode ocorrer devido ao acúmulo de exsudato entre as lâminas, ou da hiperplasia laminar ou da separação da junção derme-epiderme. Com isso, o tecido córneo da linha branca torna-se friável favorecendo a entrada de microorganismos e a ocorrência de infecção, levando à doença de linha branca (LISCHER e OSSENT, 2002). Assim, esta relação explica a elevada prevalência de ambas as lesões tanto no G2 como no G3.

A doença de linha branca é considerada a sequela mais comum causada pela laminite subclínica (GREENOUGH, 2007). Os animais dos grupos G2 e G3 apresentaram prevalências elevadas desta alteração sugerindo que clinicamente apresentavam a doença.

Observou-se que as lesões hemorrágicas predominaram nos animais do G2 e que as alterações de linha branca, no G3. Nas doenças que envolvem alterações do tecido córneo da unha como a laminite, hemorragias na sola prejudicam a formação de tecido córneo (LISCHER e OSSENT, 2002), levando à produção de estrato córneo mais macio, que por sua vez, favorece a formação de úlceras de sola (GREENOUGH, 2007). Por outro lado, hemorragias na linha branca enfraquecem o tecido córneo nesta região favorecendo o alargamento e doença de linha branca (MÜLLING, 2002). Assim, pode-se supor que lesões como hemorragia de sola e de linha branca evoluem para lesões como úlcera de sola, alargamento e doença de linha branca. Logo, os animais do grupo G2 potencialmente evoluiriam para a condição do grupo G3. Estes, além de apresentarem as lesões no casco, possuíam claudicação. Portanto, considerou-se que o grupo G3 foi constituído de animais clinicamente mais acometidos que os do G2

8.5 Comparação entre grupos: achados histológicos

8.5.1 Coloração de H&E

Analisando os resultados da avaliação histológica na coloração de H&E, observa-se que a hemorragia na derme solear foi maior no G3 do que no G1 e G2 ($P < 0,05$). Na derme dorsal a hemorragia foi maior no G3 em comparação com o grupo G1 (Figura 11). Assim, observa-se que, embora clinicamente as hemorragias de sola tenham sido mais frequentes nos animais do G2, histologicamente elas foram mais acentuadas no G3. Com isso, constata-se que mesmo com baixa prevalência da lesão, o G3 foi o grupo mais gravemente afetado, o que caracteriza uma condição subclínica (para hemorragia de sola).

Contribuindo para esta noção, a claudicação encontrada nos animais do G3 pode ser justificada inclusive em função da intensidade das hemorragias encontradas tanto na sola como na região dorsal, indicando a presença de alterações vasculares mais acentuadas e, provavelmente, maior estímulo doloroso.

Histologicamente, a região axial foi a menos acometida pelas hemorragias em todos os grupos. Possivelmente esta é a região mais protegida do casco em função de sua localização, ao contrário das regiões da sola e da parede dorsal que ficam mais expostas. Pode-se afirmar que a região axial é menos predisposta às hemorragias na derme, porém, em relação ao potencial de se inflamar (laminite), parece não haver qualquer distinção entre as regiões solear, axial e dorsal, já que para o infiltrado inflamatório, não houve diferença dos escores em nenhum dos grupos (Figura 15).

O objetivo principal do trabalho foi a comparação entre grupos quanto às lesões histológicas investigadas. Partiu-se da hipótese, aparentemente óbvia, de que vacas leiteiras com sinais clínicos de

laminite e suas complicações sem (G2) ou com (G3) claudicação apresentam alterações histológicas características de inflamação e degradação da junção derme-epiderme mais evidentes e acentuadas que vacas com cascos clinicamente normais (G1). Os resultados obtidos para infiltrado inflamatório não confirmaram as expectativas e permitiram rejeitar a hipótese, uma vez que os escores para infiltrado inflamatório não diferiram entre grupos numa mesma região do casco ($P > 0,05$) (Figura 11). Todos os animais avaliados apresentaram infiltrado inflamatório (escore maior ou igual a 1) nas dermes estudadas. Além disso, em 90% das mensurações de infiltrado inflamatório o escore atribuído foi ≥ 2 (Tabela 11).

Considerando a presença de congestão, hemorragia e infiltrado inflamatório nas condições deste estudo, é possível afirmar que todos os animais apresentaram evidências histológicas de laminite. Nos grupos G2 e G3, os achados histológicos se somam aos clínicos para reforçar este diagnóstico e ainda no G3 a presença de claudicação. Histologicamente, a laminite é caracterizada por várias alterações na junção derme-epiderme do casco como: hiperemia, hemorragia, presença de células inflamatórias, edema, necrose, trombose, alteração na morfologia das células basais, separação da membrana basal, dentre outras alterações (NILSSON, 1963; THOEFNER et al., 2005). É importante destacar que estas alterações ocorrem tanto na laminite ocorrida naturalmente (NILSSON, 1963) quanto na doença induzida experimentalmente com sobrecarga de oligofrutose (THOEFNER et al., 2005).

Estes achados foram considerados bastante relevantes, uma vez que sinalizam que bovinos podem desenvolver o processo de laminite mesmo antes que sinais, mesmo aqueles considerados subclínicos (como linhas de estresse, alargamento e hemorragia de linha branca, e

amolecimento e hemorragia de sola), sejam evidentes. Os resultados assim sugerem que, à semelhança do descrito para a laminite aguda de equinos, pode existir uma fase de desenvolvimento (ou fase prodrômica) da laminite que precede a ocorrência de qualquer sinal clínico.

Nos animais do grupo G1, a intensidade do infiltrado inflamatório não diferiu dos animais do G2 e G3 (Figura 11) e, além disso, em 89% dos casos, o escore atribuído foi ≥ 2 (Tabela 11). Na literatura consultada, a infiltração de células inflamatórias com características de linfócitos na derme solear foi encontrada em animais sem sinais clínicos de lesão no casco, aos quais se atribuiu escore leve (escala de 1 a 3 cruzes) (NILSSON, 1963). Recentemente, leucócitos vasculares ou infiltrados no tecido da junção derme-epiderme da região dorsal do casco, foram encontrados em animais aparentemente normais sendo que em 44% dos animais as células estavam dentro de vasos e em apenas 2% se apresentaram infiltradas no tecido (THOEFNER et al., 2005). Esses achados, por um lado, concordam com os resultados deste estudo, uma vez que o infiltrado inflamatório também foi diagnosticado em animais com cascos clinicamente normais e por outro lado, se distanciam, em razão da discrepância observada quanto à intensidade do infiltrado inflamatório diagnosticado.

A forma subclínica da laminite foi proposta em 1979. A terminologia foi usada para caracterizar animais com lesões no casco, porém que não apresentavam claudicação (VERMUNT e GREENOUGH, 1994). Logo, entende-se que subclínica era a claudicação e não as lesões no casco. A partir de 1994, este termo deveria ser substituído pela expressão pododermatite asséptica difusa, conforme proposições de órgãos internacionais de estudo em podologia bovina (FERREIRA et al., 2005). Outra proposição foi a substituição do

termo laminite subclínica pela expressão disfunção do tecido córneo da unha (do inglês, “claw horn disruption”-CHD) (GREENOUGH, 2007). Contudo, em função da consagração do termo laminite subclínica, a expressão continua sendo utilizada (FERREIRA et al., 2005). Relativamente a esta terminologia, pode-se considerar que o grupo G2 representa animais com laminite subclínica. Já os do G3, apresentaram laminite clínica. Os animais do G1 não receberiam qualquer denominação de acordo com as nomenclaturas vigentes. Pode-se dizer que os animais do G1 apresentaram uma condição anterior ao G2, ou que seriam animais com a forma verdadeiramente subclínica da doença já que sequer ao exame clínico do casco nenhuma lesão associada à laminite pôde ser diagnosticada. Os animais do G1 são animais que se apresentaram desenvolvendo laminite sem qualquer manifestação clínica. Em analogia com a espécie equina, estes animais seriam aqueles na fase prodrômica da laminite (POLLITT, 2007). Sendo assim, estes achados corroboram com a recente descrição de infiltrado leucocitário na derme laminar obtida na fase prodrômica de equinos com laminite induzida por extrato de noqueira preta (FALEIROS et al., 2009) e ingestão de excesso de carboidratos (FALEIROS et al., 2010). Na atualidade acredita-se que a laminite promovida por ingestão de sobrecarga de carboidratos em equinos pode estar associada a uma resposta inflamatória sistêmica (SIRS) promovida pela absorção de produtos bacterianos decorrentes da acidose cecal (BELKNAP et al., 2009). Assim considera-se que os achados histológicos do presente estudo representam um indício que o mesmo processo possa ocorrer em bovinos.

Os animais do G1 foram aqueles que não apresentaram linhas de estresse nem qualquer outro sinal clínico de laminite ao exame do casco. Contudo, a avaliação histológica mostrou lesões histológicas

indicativas de laminite neste grupo. Logo, observa-se que a estratégia clínica utilizada para a detecção da doença não foi suficiente para identificar todos os animais acometidos. Assim, os resultados deste grupo fazem pressupor que, do ponto de vista clínico, sempre haverá subestimação da quantidade diagnosticada de animais acometidos em estudos de prevalência da doença. De modo que a laminite pode representar um problema muito mais abrangente nos rebanhos do que se possa efetivamente apurar. Já na década de 50, quando a forma subclínica da doença ainda não era conhecida, considerava-se que a incidência de laminite era muito maior do que o que se conseguia estimar (NILSSON, 1963). Com os resultados deste estudo, pode-se dizer que, ainda hoje, apesar do conhecimento sobre a forma subclínica da doença, tal afirmativa permanece pertinente e atual.

A principal motivação deste trabalho foi a pesquisa de indicadores de inflamação no casco bovino tendo em vista detectar indícios da SIRS na laminite nesta espécie tal como vem sendo demonstrado na espécie equina.

Segundo a teoria da SIRS, em equinos, a laminite pode não ser a consequência das alterações morfofuncionais no casco, mas, ao contrário, a causa delas, já que é possível detectá-la logo nas fases mais iniciais da doença (BELKNAP, 2009; FALEIROS et al., 2009).

A primeira descrição de laminite em bovinos, se deu em uma vaca que desenvolveu a doença após o parto. Além disso, foram diagnosticados casos de laminite em animais que apresentavam outros tipos de processos inflamatórios como enterite aguda, metrite aguda, mastite, pericardite além de acetoneia. (NILSSON, 1963). Logo, é possível pressupor que haja algum tipo de associação entre a ocorrência de demais

processos inflamatórios e a laminite em bovinos.

Neste estudo, os animais permaneceram em torno de 120 dias confinados, recebendo dieta à base de silagem e concentrado. O principal fator causal da laminite é a dieta rica em carboidratos, levando à acidose e laminite subclínica (NOCEK, 1997). Logo, é possível inferir que os animais desenvolveram acidose subclínica e laminite.

Outra possível causa da inflamação detectada seria de origem traumática em razão do tipo de piso frequentado pelos animais (MGASSA et al., 1984). Porém, no confinamento, onde os animais foram mantidos ininterruptamente por aproximadamente 120 dias, o piso era de terra e não de concreto, logo, diminuem as chances de inflamação por insulto traumático.

Quanto ao infiltrado inflamatório nas lâminas dermais, não houve diferença entre grupos numa mesma região do casco, nem entre regiões do casco dentro do mesmo grupo ($P > 0,05$) (Figura 16). Para a identificação de células inflamatórias nas lâminas dermais, às vezes é difícil ou até impossível diferenciar células inflamatórias de células epiteliais do endotélio vascular. Apesar disso, foi possível identificar a presença de infiltrado inflamatório neste tecido (Figura 14, fotos 8 e 9).

A técnica histológica utilizada para pesquisa de inflamação foi a coloração de H&E. Nesta coloração, a identificação do infiltrado inflamatório no tecido foi feita com base nas características morfológicas da infiltração celular. Futuramente, técnicas especiais como imunohistoquímica e reação em cadeia da polimerase (PCR) serão utilizadas para consolidar os resultados encontrados e ainda, para fazer a distribuição dos tipos de células inflamatórias presentes. Através de técnica de imunohistoquímica para marcador de

neutrófilo (calprotectina), resultados preliminares ainda não publicados, confirmaram a presença destas células no infiltrado inflamatório encontrado em todas as dermes avaliadas.

Neste estudo, a junção derme-epiderme foi estudada em três regiões do casco: solear, axial e dorsal. Destas, além da região dorsal, apenas a região solear já foi pesquisada, quando infiltração leve de células inflamatórias foi detectada na derme solear de animais normais (NILSSON, 1963). Não foram encontrados estudos que contemplassem a região axial. Na comparação entre regiões do casco dentro do mesmo grupo, no G2 a congestão foi maior na região solear, no G3 a hemorragia foi maior na região solear e não foram encontradas diferenças para infiltrado inflamatório ($P > 0,05$) (Figura 15). Com este resultado conclui-se que a inflamação está presente em toda a junção derme-epiderme do casco, e não somente na sola e região dorsal. Além disso, aparentemente, não existe diferença entre a susceptibilidade das regiões para inflamação. A inflamação da derme em todas as regiões do casco parece ter relevante importância visto que, uma vez inflamada, a derme produz metaloproteinases que degradam o colágeno da matriz extracelular e enfraquecem o aparato suspensório do casco, levando à sua falência e ao enfraquecimento da função de sustentação da junção derme-epiderme (SHEARER, 2006). Assim, destaca-se a necessidade de se considerar todas as regiões do casco no estudo da fisiopatologia da laminite, uma vez que todas elas contribuem para a formação do aparato de sustentação do casco.

8.5.2 Coloração de PAS

O objetivo da avaliação histológica na coloração de PAS foi identificar possíveis alterações nas células epidermais e na membrana basal procurando estabelecer relações entre estas possíveis alterações e os

achados histológicos na coloração de H&E relacionados à laminite.

Quanto à morfologia das células epidermais, não houve diferença entre grupos na mesma região do casco, nem entre regiões do casco dentro do mesmo grupo ($P > 0,05$) (Figura 17). Possivelmente, não ocorreram alterações morfológicas acentuadas o suficiente para diferenciar os grupos e as regiões. Contudo, em todos os grupos e em ambas as regiões avaliadas, axial e dorsal, os animais apresentaram médias de escores em torno de 1, evidenciando alguma alteração em sua morfologia.

Quanto à presença de irregularidades na MB, não houve diferenças entre grupos em nenhuma região avaliada ($P > 0,05$) (Figura 19). Contudo, na comparação entre regiões da MB dentro da mesma região do casco e dentro do mesmo grupo, observou-se que as irregularidades foram mais acentuadas no terço basal do que nos terços médio e apical em todas as regiões do casco e em todos os grupos, com ou sem diferença estatística (Figuras 20 e 21).

Durante a avaliação histológica, observou-se que a presença de irregularidades na MB se distribui de modo diferente ao longo de seu comprimento. Em razão disso, optou-se pela divisão da MB em três terços diferentes visando facilitar a atribuição de escores. A atribuição de um único escore considerando a MB como um todo, ficaria prejudicada mediante a constatação óbvia de que as irregularidades se distribuem diferentemente conforme sua posição em torno da lâmina epidermal. Esta divisão foi feita considerando-se a distribuição das irregularidades, e ressalta-se que não foi encontrada na literatura consultada descrição semelhante quanto à presença destas irregularidades nem quanto à variação na sua distribuição. Tal variação foi posteriormente confirmada estatisticamente conforme demonstrado na

Figura 20. A presença de colapso da MB foi descrita em bovinos com laminite induzida (THOEFNER 2005) e em equinos (POLLITT, 2007) contudo, não foi citada a ocorrência de irregularidades como as encontradas neste estudo conforme demonstrado na Figura 21. Na espécie equina também não foi encontrada descrição semelhante na literatura consultada.

Na epiderme da sola de bovinos, detectou-se descontinuidade da MB e seu adelgaçamento em animais com úlcera de sola, através do método de imunofluorescência para diagnóstico de laminina e integrina (HENDRY et al., 2003). Contudo, não foi relatada a ocorrência de semelhantes irregularidades como as encontradas neste estudo nas lâminas epidermais das regiões axial e dorsal do casco.

Não foi possível correlacionar a presença das irregularidades observadas com as demais alterações histológicas encontradas na junção derme-epiderme do casco, logo, não foi possível reconhecer a importância deste achado na fisiopatologia das alterações vasculares e inflamatórias encontradas nos cascos avaliados. Além disto, estas irregularidades ocorreram nos animais de todos os grupos experimentais. Como não se pode considerar as amostras do grupo G1 como controle, mas apenas controle do rebanho (por motivos já discutidos), não se pode afirmar que a ocorrência destas irregularidades é uma condição fisiológica. Tal fato sinaliza a necessidade de que outros estudos sejam conduzidos a fim de esclarecer a ocorrência desta condição na MB do casco de bovinos, bem como sua importância na fisiopatologia da laminite e de outras enfermidades do casco.

Estudos sobre a MB em cascos de equinos com laminite apóiam a idéia de que sua desconexão com a derme, posteriormente

desta com a falange distal e consequentemente falência da estrutura de sustentação do casco estão implicadas no mecanismo da doença (teoria enzimática) (POLLITT, 2007). Outra finalidade de estudar a MB neste trabalho, foi verificar a pertinência desta proposição na laminite em bovinos. Contudo, em discordância com esta linha de pensamento, observou-se que tanto clínica como histologicamente os animais apresentaram sinais de laminite mesmo na ausência de alterações significativas na MB que indicassem uma desconexão dela.

9. CONCLUSÃO

Vacas de aptidão leiteira de descarte apresentam elevada prevalência de lesões no casco relacionadas à laminite.

Vacas de aptidão leiteira de descarte com e sem sinais clínicos de laminite ao exame do casco apresentam alterações histológicas sugestivas da doença.

Vacas de aptidão leiteira de descarte sem sinais clínicos de laminite apresentam inflamação na junção derme-epiderme das regiões solear, axial e dorsal do casco na mesma intensidade que em animais com sinais clínicos de laminite com ou sem claudicação, sugerindo a ocorrência da fase prodrômica da laminite nesta espécie, em analogia com a espécie equina.

As alterações na junção derme-epiderme do casco relacionadas à laminite ocorrem sem distinção nas regiões solear, axial e dorsal do casco. Logo, a junção derme-epiderme de todo o casco é afetada na laminite.

As células epidermais da junção derme-epiderme das regiões axial e dorsal do casco de vacas de aptidão leiteira de descarte com ou sem lesões clínicas apresentam alterações morfológicas de mesma intensidade.

A membrana basal da junção derme-epiderme das regiões axial e dorsal do casco de vacas de aptidão leiteira de descarte com ou sem alterações clínicas apresenta irregularidades de intensidade variável ao longo de seu comprimento. Contudo, não é possível afirmar que se trata de uma condição fisiológica ou patológica, sendo necessário outros estudos para investigar melhor este achado.

As células epidermais e a membrana basal do casco de vacas de aptidão leiteira de descarte com ou sem lesões macroscópicas causadas por laminite, não apresentam alterações significativas que apoiem a teoria (na laminite em equinos) de que a doença resulta de alterações que culminem na desconexão da membrana basal e enfraquecimento do aparato suspensório do casco.

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A inflamação da junção derme-epiderme de todo o casco em vacas de aptidão leiteira e de descarte é um achado comum. Esta inflamação ocorre mesmo na ausência de qualquer alteração clínica ao exame do casco. Assim, dada a impossibilidade de diagnosticar clinicamente todos os animais afetados num rebanho, parece ser invariável que os estudos de prevalência de alterações clínicas causadas por laminite sejam subestimados. Tal fato alerta para a necessidade de monitoramento rigoroso dos fatores predisponentes para laminite, tendo em vista o diagnóstico clínico o mais precoce possível e a tomada de medidas de controle e tratamento. Tal medida justifica-se ainda, dada a destacada importância da laminite como causa de impacto econômico negativo na bovinocultura, especialmente a partir da intensificação das práticas de produção.

É necessário avançar no conhecimento da fisiopatologia da doença, para que se possa propor formas diferenciadas de controle e tratamento possibilitando minimizar as

perdas econômicas significativas provocadas pela doença.

Novas teorias para explicar a laminite vem sendo propostas, a partir de estudos da doença em equinos. A expansão deste conhecimento para a espécie bovina pode contribuir para o entendimento da fisiopatologia da laminite. Deste modo, é preciso conduzir novos estudos a fim de investigar melhor as características dos processos inflamatórios relacionados à laminite.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELKNAP, J.K.; MOORE, J.N.; CROUSER, E.C. Sepsis-From human organ failure to dorsal failure. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 129, p. 155-157, 2009.

BERGSTEN, C.; MÜLLING, C. Some reflections on research on bovine laminitis aspects of clinical and fundamental research. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM 13. and CONFERENCE ON LAMENESS IN RUMINANTS 5., 2004, Maribor, Slovenija. Proceedings of the 13th International Symposium and 5th Conference on Lameness in Ruminants, Maribor, Slovenija.

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

BROWN, K.A.; BRAIN, S.D.; PEARSON, J.D. et al. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet*, v. 368, p.157-169, 2006.

DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. *Tratado de anatomia veterinária*. 3. ed. Elsevier, 2004. 813p.

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.
- 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.
- FALEIROS, R.R.; JOHNSON, P.J.; NUOVO, G.J. et al. Lamellar leukocyte accumulation in horses with carbohydrate overload induced-laminitis. *Journal of Veterinary Medicine*, v.1, p.107-115, 2011.
- FALEIROS, R.R.; MACORIS, D.G.; ALVES, G.E.S et al. Local and remote lesions in horses subjected to small colon distension and decompression. *Canadian Veterinary Research*, v. 72, p. 68-76, 2008.
- FERREIRA, P.M.; CARVALHO, A.U.; FACURY FILHO, E.J. et al. Afecções do sistema locomotor dos bovinos. In: SIMPÓSIO MINEIRO DE BUIATRIA, 2., 2005, Belo Horizonte. Anais do II Simpósio Mineiro de Buiatria, Belo Horizonte. Disponível em <<http://www.ivis.org/proceedings/abmg/2005/pdf04.pdf>> Acesso em 10 set. 2010.
- 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.
- FLOR, E.; TADICH, N. Claudicaciones en vacas de rebaños lecheros grandes y pequeños del sur de Chile. *Archivos de medicina veterinaria*, v. 40, p. 125-134, 2008.
- GOZHO, G.N.; PLAIZIER, J.C.; KRAUSE, D.O. et al. Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response. *Journal of Dairy Science*, v. 88, 1399-1403, 2005.
- GREENOUGH, P.R.; SCHUGEL, L.M.; JOHNSON, A.B. *Problemas de patas en bovinos*. Zinpro Corporation, 1996. 30p.
- GREENOUGH, P.R. *Bovine laminitis and lameness: a hands-on approach*. Elsevier, 2007. 311p.
- HENDRY, K.A.; KNIGHT, C.H.; GALBRAITH, H. et al. Basement membrane integrity and keratinization in healthy and ulcerated bovine hoof tissue. *Journal of Dairy Research*, v. 70, p. 19-27, 2003.
- KÖNIG, H.E.; LIEBICH, H. *Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas colorido*. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- LINFORD, R.L. Laminitis (aguamento). In: SMITH, B.P. *Medicina interna de grandes animais*. 3.ed. Manole: Barueri, 2006. p. 1116-1124.
- LISCHER, C.J.; OSSENT, P. Pathogenesis of sole lesions attributed to laminitis in cattle. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON LAMENESS IN RUMINANTS, 12., 2002, Orlando, FL, USA, 2002, *Proceedings of the 12th International Symposium on Lameness in Ruminants*, Orlando, FL, USA, 2002, p.82-89.
- LUNA, L.G. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3ed. New York: McGraw Hill, 1968.
- 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.
- MGASSA, M.N.; AMAYA-POSADA, G.; HESSELHOLT, M. Pododermatitis aseptica difusa (laminitis) in free range beef cattle in

- tropical Africa. *Veterinary Record*, v. 115, n. 16, p. 413-414, 1984.
- MOLINA, L.R.; CARVALHO, A.U.; FACURY FILHO, E.J. et al. Prevalência e classificação das afecções podais em vacas lactantes na bacia leiteira de Belo Horizonte. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 51, p. 149-152, 1999.
- MÜLLING, C.K.W. Theories on the pathogenesis of white line disease – an anatomical perspective. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON LAMENESS IN RUMINANTS, 12., 2002, Orlando, FL, USA. *Proceedings of the 12th International Symposium on Lameness in Ruminants*, Orlando, FL, USA, 2002, p.90-98.
- NICOLETTI, J.L.M. *Manual de podologia bovina*. Barueri: Manole, 2004. 126p.
- NICOLETTI, J.L.M.; SOUZA, F.A.A.; THOMASSIAN, A. et al. Prevalência de lesões podais e graus de claudicação em vacas leiteiras mantidas em confinamento permanente (“free-stall” e “tie-stall”). *Revista de educação continuada do CRMV-SP*, v.4, p.24-32, 2001.
- NILSSON, S.A. Clinical, morphological, and experimental studies of laminitis in cattle. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 4, suppl. 1, p. 1-304, 1963.
- NOCEK, J.E. Bovine acidosis: implications on laminitis. *Journal of Dairy of Science*, v. 80, p. 1005-1028, 1997.
- NOURIAN, A.R.; ASPLIN, K.E.; McGowan, C.M. et al. Equine laminitis: ultrastructural lesions detected in ponies following hyperinsulinaemia. *Equine Veterinary Journal*, v. 41, n.7, p. 671-677, 2009.
- POLLITT, C.C. Laminitis Pathophysiology. In: FLOYD, A.E.; MANSMANN, R.A. *Equine Podiatry*. St Louis, Missouri, 2007. p. 313-319.
- POLLITT, C.C.; VISSER, M.B. Carbohydrate alimentary overload laminitis. *The Veterinary Clinics North America Equine Practice*, v. 26, n.1, p. 65-78, 2010.
- 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_20_09/anais/arquivos/0098_0875_02.pdf> Acesso em 09 jun. 2010.
- RADOSTITS O.M.; GAY C.C.; BLOOD D.C. et al. *Doenças específicas de etiologia incerta*. In: Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 1633-1638.
- RASEKH, M.; SARDARI, K.; SEIFI, H. Dispersion and grade of sole hemorrhages in subclinical laminitis in cattle. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 25. 2008, Budapest, Hungary, 2008, *Proceedings of the XXV Jubilee World Buiatrics Congress*, Budapest, Hungary, 2008, p. 222-223.
- SHEARER, J.K. 2006. The transition period and lameness due to claw disorders in dairy cows. In: NORTH AMERICAN VETERINARY CONFERENCE, 2006, Orlando, Florida. *Proceedings of the North American Veterinary Conference*, v. 20, Orlando, Florida.
- 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.

SILVA, L.A.F.; FIORAVANTI, M.C.S.; TRINDADE, B.R. et al. Enfermidades digitais em vacas de aptidão leiteira: associação com mastite clínica, metrites e aspectos epidemiológicos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 24, p. 217-222, 2004.

SILVA, L.A.F.; FIORAVANTI, M.C.S.; SILVA, M.A.M. et al. Enfermidades digitais em bovinos confinados: uso parenteral do cobre na prevenção. *Veterinaria Notícias*, v. 12, p. 21-28, 2006.

SILVEIRA, J.A.S.; ALBERNAZ, T.T.; OLIVEIRA, C.M.C. et al. Afecções podais em vacas da bacia leiteira de Rondon do Pará. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 29, p. 905-909, 2009.

SOUZA, R.C. *Enfermidades podais em vacas leiteiras: eficiência e custos de tratamentos, efeitos na produção e reprodução, histopatologia e aspectos econômicos*. 2005. 92f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SOUZA, R.C. *Perfil epidemiológico e clínico das afecções podais em vacas nas bacias leiteiras de Belo Horizonte e Pedro Leopoldo*. 2002. 72f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SOUZA, R.C.; CARVALHO, A.U.; FERREIRA, P.M. et al. Prevalência e distribuição de lesões digitais em vacas leiteiras nas regiões de Belo Horizonte e Pedro Leopoldo. *Ciência Animal Brasileira*, v. 8, p. 823-831, 2007.

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.

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

VAN EPS, A.; POLLITT, C. C. Cryotherapy Reduced the Severity of Laminitis Evaluated 7 Days After Induction With Oligofructose. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS - AAEP, 52., 2006, San Antonio, TX, USA. *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP*. Lexington KY: Publisher. Disponível em <<http://www.ivis.org/proceedings/aaep/2006/vaneps/chapter.asp?LA=1>> Acesso em 09 set. 2010.

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.

VERMUNT, J.J.; GREENOUGH, P.R. Predisposing factors of laminitis in cattle. *British Veterinary Journal*, v. 150, p. 151-164, 1994.

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.

ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 33/2009**, relativo ao projeto intitulado "**Caracterização de indicadores do processo inflamatório e morte celular em tecido laminar: investigando indícios da teoria da síndrome da resposta inflamatória sistêmica na laminite em bovinos**", que tem como responsável(is) **Rafael Resende Faleiros**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **6/ 05/2009**.

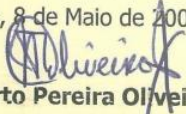
Este certificado expira-se em **6/ 05/ 2014**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 33/2009**, related to the project entitled "**Characterization of the indicators of the inflammatory process and cellular death in laminar tissue: investigating evidences of the syndrome of systemic inflammatory response theory in bovine laminitis**", under the supervisors of **Rafael Resende Faleiros**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **May 6, 2009**.

This certificate expires in **May 6, 2014**.

Belo Horizonte, 8 de Maio de 2009.


Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

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

(Mod.Cert. v1.0)

ANEXO II

Ficha clínica para identificação de animais e lesões podais – (FERREIRA 2003, com modificações).

Fazenda/Proprietário							
Município	Coromandel/MG					Data	
Nº do animal (conforme critérios de inclusão)	Grupo (1,2,3)	Se grupo 3	Grau de claudicação				
			Causa da claudicação				
Raça/Grau de sangue				Idade		Nº de Partos	
Escore corporal (1-5)					Peso corporal (kg)		
Produção de leite							
Motivo do descarte							
Observações (histórico de doenças, casqueamentos, tratamentos para afecções podais, etc.).							

ANTERIOR ESQUERDO



ANTERIOR DIREITO



POSTERIOR ESQUERDO



POSTERIOR DIREITO

