

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós Graduação em Zootecnia



Dissertação

Perfil metabólico e desempenho produtivo de vacas leiteiras com alterações podais

ANTONIO AMARAL BARBOSA

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

B238p Barbosa, Antonio Amaral

Perfil metabólico e desempenho produtivo de vacas leiteiras com alterações podais / Antonio Amaral Barbosa ; Francisco Augusto Burkert Del Pino, orientador ; Charles Ferreira Martins, coorientador. — Pelotas, 2015.

78 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Alterações radiográficas. 2. Laminite. 3. PON1. I. Pino, Francisco Augusto Burkert Del, orient. II. Martins, Charles Ferreira, coorient. III. Título.

CDD : 636.234

Perfil metabólico e desempenho produtivo de vacas leiteiras com alterações podais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Área do conhecimento: Produção animal: ênfase em afecções podais em bovinos).

Orientador: Dr. Francisco Augusto Burkert Del Pino
Co-orientadores: Dr. Marcio Nunes Correa
Dr. Charles Ferreira Martins
Dra. Viviane Rohrig Rabassa

Pelotas, 2015

Banca examinadora: Dr. Francisco Augusto Burkert Del Pino

Dra. Raquel Raimondo

Dr. Rubens Alves Pereira

Dr. Vinicius Tabeleão

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas que ajudaram na realização desse trabalho, e que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal. O sucesso de mais esta etapa é resultado da confiança e força de cada um de vocês (família, amigos e mestres);

Aos meus pais Gisela e Paulo por todo o esforço, dedicação e apoio incondicional para que eu chegasse até aqui, pelo apoio nos momentos difíceis e por sempre acreditarem em mim, enfim por tornarem o meu sonho o nosso também;

Aos meus amigos indelévels, que mesmo tendo que superar minha ausência em vários momentos sempre me incentivaram... muito de tudo que idealizo em minha vida é para que vocês se orgulhem de mim!

Ao Dr. Francisco Del Pino pela orientação. Ao Prof. Marcio Correa pela oportunidade de participar do NUPEEC e crescer tanto pessoalmente como profissionalmente, além dos conselhos e amizade de sempre, à coorientadora Viviane pelas muitas revisões de artigos;

Em especial agradeço ao meu coorientador Charles Ferreira Martins pela disponibilidade para longas conversas desde a época da graduação, pelos conselhos, pela paciência, pelo companheirismo e amizade que construímos nessa jornada que talvez seja tão importante quanto a elaboração de tal dissertação;

A todos os colegas do Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária, pelos momentos agradáveis e pela troca de experiências. Dentre todos, saliento as colegas de pós-graduação Josiane Feijó, pelas incansáveis ajudas tanto profissionais como pessoais e a Aline Marangon pelas diversas conversas e auxílios em diferentes momentos, certamente vocês tornaram esse período mais leve com a cumplicidade diária e troca de conhecimento durante esse tempo; e aos graduandos que se propuseram a auxiliar nosso projeto, tornando-o possível, o auxílio e a amizade de vocês foram imprescindíveis em especial a Gabriela Bueno Luz e Lucas Barbosa pela amizade e trabalho de sempre;

Ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia pela oportunidade de efetuar meu mestrado por esse programa;

À Granja 4 Irmãos, desde o gerente administrativo Eduardo Xavier aos funcionários da leitaria. Obrigado pela ajuda à campo;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico –Cnpq- pela concessão da bolsa. À Fapergs pelo suporte financeiro recebido para a realização deste trabalho;

E, finalmente, a Deus por me permitir estar aqui, Muito Obrigado!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”

Marthin Luther King

RESUMO

BARBOSA. Antonio Amaral. **Perfil metabólico e desempenho produtivo de vacas leiteiras com afecções podais**. 2015. 78f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

As alterações podais causam diminuição na produção leiteira que geram consideráveis perdas econômicas. Prevenir e evitar essas alterações é um grande desafio. Diante dessa problemática foram realizados três estudos, sendo que o objetivo do primeiro artigo foi relacionar lesões associadas à laminite subclínica no período de transição de vacas de leite com a ocorrência de sinais radiográficos vinculados a essa enfermidade. Foram utilizadas 17 vacas, multíparas, da raça Holandês, com três lactações e peso vivo médio de $656,89 \pm 92,6$ kg, divididas em dois grupos, vacas com laminite (VCL; duas ou mais lesões associadas à laminite subclínica; sem claudicação) e vacas sem laminite (VSL). A dinâmica radiológica foi realizada em dois momentos (pré-parto e pós-parto) com o propósito de determinar possíveis alterações de posicionamento capsular e degeneração óssea da terceira falange (F3). Não foram observados efeitos da presença de lesões associadas à laminite subclínica frente ao posicionamento da terceira falange à cápsula do casco ($p > 0,05$). Concluiu-se que vacas leiteiras com lesões associadas à laminite subclínica não apresentaram sinais radiográficos de desalinhamento falangeano ao estojo córneo digital. O segundo artigo (relato de caso) acompanhou os mesmos animais do estudo 1, não utilizando categorização, e teve como objetivo descrever o aspecto variável de lesões no processo extensor do osso terceira falange detectadas por radiografia digital. Foi observado reação óssea proliferativa na região do processo extensor em 73,5% dos membros torácicos dos animais, a artropatia interflangeana distal em 13,7% e apenas 2% dos dígitos foram observados com fratura do processo extensor. O exame radiográfico digital acrescentou informações importantes no diagnóstico e prognóstico das lesões e relatou a extensão das alterações ósseas em bovinos com laminite subclínica, demonstrando que as lesões no processo extensor são mais frequentes em rebanhos leiteiros. Já o artigo 3 monitorou os mesmos animais com a mesma metodologia de diagnóstico utilizada no estudo 1 (grupos VCL e VSL), semanalmente do dia 23 dias antes do parto até 23 dias pós-parto. Foram feitas coletas de sangue para análise de biomarcadores, paraoxonase (PON), ácidos graxos não esterificados (AGNE), metaloproteína 9 (MMP9), glicose (GLI) e escore de condição corporal (ECC). Observou-se níveis maiores de AGNE e menores de PON1 no grupo VCL ($p < 0,05$) nos dias 3 e 9 pós-parto. Os demais marcadores (MMP9, ECC e GLI) não apresentaram diferenças, embora quando analisados em combinação os marcadores ECC, PON e AGNE, mostraram-se mais expressivos no grupo VCL, caracterizando a associação de fatores inflamatórios e energéticos na patogênese dessas lesões associadas à laminite subclínica. Diante do exposto observa-se a importância da utilização do exame radiográfico digital no diagnóstico de alterações no sistema podal e a associação dos biomarcadores na ocorrência de laminite subclínica no período de transição de vacas leiteiras.

Palavras chave: alterações radiográficas; laminite; PON1.

ABSTRACT

BARBOSA. Antonio Amaral. **Metabolic profile and productive performance of dairy cows with foot alterations.** 2015. 78f. Thesis (Master). Graduate Program in Animal Sciences. Federal University of Pelotas, Brazil.

The hoof disorders cause a decrease in milk production that leads to considerable economic losses. Early detection and prevent these changes is a major challenge. Given this issue were conducted three studies, which the aim of the first article was to relate lesions associated with subclinical laminitis in Holstein cows during the transitional period with the occurrence of radiographic signs linked to this disease. 17 multiparous cows of Holstein breed, with three lactations and live weight of 656.89 ± 92.6 kg, were used in this study, being divided into two groups, cows with laminitis (VCL; two or more lesions associated with subclinical laminitis; without claudication) and cows without laminitis (VSL). Radiological dynamics was performed in two stages (prepartum and postpartum) in order to determine the possibilities of capsular positioning changes and bone degeneration of the third phalanx (F3). There was no effect of the presence of injuries associated with subclinical laminitis front of the positioning of the third phalanx to the hoof capsule ($p > 0.05$). Overall, dairy cows with subclinical lesions associated with laminitis showed no radiographic signs of misalignment phalangeal to the digital corneal case. The second article (case report) used the same animals in the study 1, not using categorization. The aim was describe the variable aspect of lesions in the extensor process of the third phalanx bone diagnosed by digital radiography. It were observed proliferative bone reaction in the region of the extensor process in 73,5% of forelimbs from the animals, distal interphalangeal osteoarthritis (13,7%) and extensor process fracture in 2% of the digits. The digital radiographs throw out important information in the diagnosis and prognosis of injuries and reported the extent of bone changes in cattle with subclinical laminitis, showing that the lesions in the extensor process are more common in dairy herds. The same animals with the same methodology used in the study 1 (VCL and VSL gourps) were weekly monitored from 23 days before partum up to 23 days postpartum in the article 3. Blood samples were collected for analysis of biomarkers: paraoxonase (PON), non-esterified fatty acids (NEFA), metalloproteinase-9 (MMP9), glucose (GLU) and body condition score (BCS). It was observed higher levels of NEFA and lower PON in VCL group ($p < 0,05$) on 3 and 9 days postpartum. The other markers (MMP9, BCS and GLU) did not differ, although when used in combination BCS, PON and NEFA, were significant in VCL group, featuring the combination of inflammatory and energy factors in the pathogenesis of these lesions associated with subclinical laminitis. In summary, it was observed the importance of the use of digital radiographic examination in the diagnosis of changes in foot system and the association of biomarkers in subclinical laminitis in the transition period of dairy cows.

Key-Words: radiographic alterations; laminitis, PON1.

SUMÁRIO

1. Introdução geral.....	9
2.0 Objetivo Geral.....	13
2.1 Objetivos Específicos.....	13
3. Projeto de pesquisa.....	14
4. Relatório de trabalho de campo	29
5.0 Artigo 1	30
5.1 Artigo 2.....	40
5.2 Artigo 3.....	48
6. Conclusão geral.....	63
7. Referências	64
8. Anexos.....	68

1. Introdução geral

A intensificação dos sistemas de produção favorece o desenvolvimento do balanço energético negativo (BEN) durante o período de transição – entre três semanas pré parto e três semanas pós parto - onde o consumo de matéria seca está fisiologicamente diminuído em virtude de um maior desenvolvimento fetal, juntamente com mudanças hormonais (SCARAMUZZI et al., 2006). Este período é considerado uma fase crítica para vacas leiteiras, pois as exigências nutricionais são muito elevadas e a alimentação não condiz com a demanda energética (DRACKLEY et al., 2010). Esta é a fase em que a maioria dos distúrbios metabólicos, principalmente após o parto, prejudicando fundamentalmente a produção de leite, o desempenho reprodutivo e aumentando os riscos de descarte dos animais (HUZZEY et al., 2009).

Especificamente com relação aos problemas relacionados ao casco dos animais, são elevadas as perdas econômicas deles decorrentes, tanto em fases precoces como nas fases mais avançadas da vida produtiva das vacas leiteiras. Esses problemas contribuem, portanto, com uma parcela significativamente das perdas econômicas, não somente pela diminuição da produção de leite, mas também sua interferência negativa nos demais sistemas do organismo (ENTING et al, 1997; FERREIRA 2003).

A principal causa de claudicação em bovinos leiteiros é a laminite, que é definida como a inflamação das lâminas da parede do casco causando degeneração e necrose do tecido lamelar (SMITH, 2006). Esta afecção resulta em várias alterações no tecido córneo que, por um lado, causam claudicação e, por outro, predis põem o animal a outras deformações do casco que podem agravar esse sinal. 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).

Ainda não se conhece exatamente qual o fator determinante no 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. Acredita-se que a laminite em bovinos seja uma doença de origem multifatorial sistêmica, com manifestação local no dígito. Doenças sistêmicas como mastite, endometrite e cetose são apontadas como potenciais desencadeadoras de laminite (VERMUNT e GREENOUGH, 1994). Contudo, a acidose ruminal provocada pela ingestão de

quantidade excessiva de carboidratos tem demonstrado expressiva contribuição para o desenvolvimento dessa enfermidade (SHEARER, 2006).

Em bovinos, a teoria isquêmica tem sido a mais aceita, pois se acredita que a acidose ruminal provoca a liberação de substâncias vasoativas na corrente circulatória, causando alterações vasculares no cório digital e levando, assim, 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 (SHEARER, 2006). Em decorrência, 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 não obtiveram êxito em tentar provar que a isquemia seria o principal fator desencadeante (VAN EPS e POLLITT, 2006). Também em equinos, há controvérsias sobre o processo inflamatório. Ainda não pode ser definido se a inflamação é causa ou consequência das alterações morfofuncionais na junção derme-epiderme do casco (FALEIROS et al., 2009).

A doença no bovino possui quatro formas de apresentação e todas provocam alterações na morfologia dos tecidos do casco. São elas: aguda, subaguda, crônica e subclínica (VERMUNT & GREENOUGH, 1994). Na laminite subclínica, a qual é o foco do trabalho, o animal não apresenta alterações posturais ou na locomoção, sendo o diagnóstico feito conforme a visualização das lesões nos dígitos associadas à esta forma da doença (VERMUNT e GREENOUGH, 1994; GREENOUGH, 2007).

As condições fisiológicas associadas com insuficiente fornecimento de energia podem predispor vacas leiteiras a diferentes enfermidades, inclusive laminite (DRACKLEY, 1999; DUFFIELD e HERDT, 2000).

Por óbvio, o monitoramento e diagnóstico precoce desta enfermidade é fundamental para a redução da taxa de descarte animal. Com esse objetivo, o desencadeamento inicial do processo patológico ligado à estrutura digital em bovinos pode ser precocemente detectado através de exames complementares ou análise do comportamento de biomarcadores que possam se alterar antes mesmo dos sinais clínicos, assim como muitos estudos já vem demonstrando esse comportamento em eqüinos com afecções podais (KNOTT, 2007), para facilitar o diagnóstico e diminuir possíveis prejuízos.

Além do exame clínico geral e específico do casco, Stanek (1997) afirma que o exame radiográfico constitui método auxiliar importante no diagnóstico alterações do sistema locomotor, pois indica a extensão das lesões, sua natureza e sugere o prognóstico provável. Barnabe (2005), em estudo radiográfico com bovinos claudicantes, encontrou enfermidades podais com a

seguinte prevalência: doença degenerativa articular (28,72%), osteíte (24,22%), periostite (11,42%), artrite séptica (7,96%) e osteomielite (7,26%). Borges et al., (2006) avaliando 70 extremidades de animais portadores de enfermidades podais constataram 58% de osteíte, 32% de fisite asséptica e 31% de periostite. Ainda que os estudos reforcem a importância do assunto, não se esclareceu quais lesões são clinicamente relevantes e quais são os achados radiográficos considerados normais.

A associação entre diversos fatores resultando em um quadro de laminite está sendo muito discutido como fator envolvidos na fisiopatologia da doença, principalmente em equinos, sendo essa enfermidade tratada como uma síndrome metabólica a qual envolve diferentes sistemas do organismo (MOBASHERI, 2004). Já em bovinos alguns estudos tem demonstrado que fatores inflamatórios e energéticos possuem efeitos diretos sobre a ocorrência de laminite. Bicalho (2011), correlacionou escore de condição corporal (ECC) e espessura de coxim digital, citando a importância desses na concussão do dígito ao solo e concluindo que vacas com maior ECC possuem maior amortecimento e, portanto, apresentam menos chance de ter lesões podais. Já Bionaz, em 2007 e 2012, encontrou relação direta de Paraoxanase 1(PON1) e ácidos graxos não esterificados (AGNE) no diagnóstico de laminite durante o período de transição. Outro metabólito que vem sendo bastante discutido como um importante marcador no processo inicial é a metaloproteína 9 (MMP9), uma metaloproteína cuprodependente que, quando está alterada faz com que ocorra uma destruição da membrana basal, desordenação da produção de queratinócitos resultando na inflamação difusa das lâminas do casco (KNOTT, 2006).

O reconhecimento da importância do período compreendido entre o final da gestação até a adaptação à fase de lactação inicial levou ao desenvolvimento do conceito de período de transição, que é comumente compreendido de três semanas antes até três semanas após o parto (DRACKLEY, 1999).

Compreender o papel-chave de respostas imunes em inúmeros transtornos da vaca de leite no período de transição pode ajudar a explicar as interações metabólicas e/ou inflamatórias que ocorrem nessa época. A nível molecular, a ativação de alguns mecanismos de defesa podem induzir à inflamações sistêmicas. Os níveis sistêmicos de moléculas imunes tais como a proteínas de fase aguda e interleucina 8 (IL8) são significativamente elevados em torno de parto (BIONAZ et al., 2007; BERTONI et al., 2008; HUZZEY et al., 2009).

Além disso, dada a inter-relação entre o sistema imunológico, endócrino e sistemas metabólicos (PITTMAN, 2011), diminui a competência imunológica nesse período próximo ao parto aumentando a susceptibilidade à infecções (TREVISI et al., 2011).

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 achados em equinos demonstrando envolvimento precoce de mediadores e células inflamatórias, além da não utilização na rotina de exames complementares em animais com laminite subclínica, o intuito desse trabalho foi verificar a influência de alguns marcadores na ocorrência de laminite e seu efeito sobre parâmetros produtivos, além de determinar a aplicabilidade do raio-x como método de diagnóstico.

2.0 Objetivo Geral

- ✓ Verificar a influência de alguns marcadores na ocorrência de laminite e seu efeito sobre parâmetros produtivos, além de determinar a aplicabilidade do raio-x como método de diagnóstico

2.1 Objetivos Específicos

1. Verificar lesões associadas à laminite subclínica com a ocorrência de sinais radiográficos a essa enfermidade durante o período de transição.
2. Constatar a importância do exame radiográfico digital no diagnóstico de alterações podais em vacas leiteiras durante o período de transição
3. Diagnosticar a possibilidade de movimentação da terceira dentro do aparelho suspensório do casco durante o período de transição em vacas leiteiras com laminite subclínica
4. Relatar a frequência e variação de alterações radiográficas diagnosticadas na região extensora
5. Verificar as mudanças nas concentrações sanguíneas de AGNE, MMP9, PON1, glicose e ECC durante o parto em vacas com lesões associadas à laminite subclínica, bem como seu efeito sobre parâmetros produtivos.

3. Projeto de pesquisa

**Universidade Federal de Pelotas
Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**

Laminite Subclínica pós parto em vacas resistentes a insulina durante o período de transição de vacas leiteiras da raça Holandês.

Equipe:

Pesquisadores colaboradores:

Francisco Augusto Burkert Del Pino

Marcio Nunes Corrêa

Viviane Rabassa

Augusto Schneider

Cássio Cassal Brauner

Charles Ferreira Martins

Eduardo Gonçalves Xavier

Eduardo Schmitt

Ivan Binachi

Luiz Francisco Machado Pfeifer

Alunos Pós-Graduação:

Ana Rita Tavares Krause (Doutoranda em Veterinária)

Bárbara Scherer (Residente em Clínica Veterinária)

Carolina Bernalhok Jacometo (Doutoranda em Biotecnologia)

Camila Pizoni (Residente em Clínica Veterinária)

Claudia Demarco (Mestranda em Zootecnia)

Diego Andres Velasco Acosta (Doutorando em Veterinária)

Elizabeth Schwegler (Pós Doutoranda em Veterinária)

Josiane de Oliveira Feijó (Doutoranda em Veterinária)

Lais Fernanda Mielke (Mestranda em Zootecnia)

Leila Cardoso (Doutoranda em Zootecnia)

Lucas Teixeira Hax (Doutorando em Biotecnologia)

Luis Gustavo Crochemore da Silva (Mestrando em Biotecnologia)

Marcio Erpen Lima (Mestrando em Veterinária)

Marina Menoncin Wensche felder (Mestranda em Veterinária)

Paula Montagner (Doutoranda em Biotecnologia)

Pedro Augusto Silva Silveira (Mestrando em Veterinária)

Ruven Alves Pereira (Pós Doutorando em Veterinária)

Vinícius Tabeleão (Doutorando em Biotecnologia)

Alunos Graduação:

Aline Marangon de Oliveira (Medicina Veterinária)

Andressa Stein Maffi (Medicina Veterinária)

Arthur de Castro Jorge e Silva (Biotecnologia)

Douglas Perazzoli (Medicina Veterinária)

Érica Ferri de Oliveira (Medicina Veterinária)

Fabiane Pereira de Moraes (Medicina Veterinária)

Fernanda Trindade da Rosa (Zootecnia)

Gabriela Bueno Luz (Medicina Veterinária)

Guilherme Nunes Bolzan (Medicina Veterinária)

Jéssica Halfen (Zootecnia)

Leandro Krenski da Silva (Medicina Veterinária)

Leila Cardozo (Doutoranda em Zootecnia)

Lucas Balinhas Farias (Medicina Veterinária)

Mityelle da Costa Chaves Rodrigues (Medicina Veterinária)

Patrícia Mattei (Ciências Biológicas)

Pelotas, Fevereiro de 2015.

Caracterização do Problema

A obesidade tem sido alvo de várias pesquisas recentes que relatam os prejuízos dessa enfermidade para os animais. A intolerância a insulina é um desses prejuízos. A glicose ou outras moléculas de açúcar, normalmente encontradas na alimentação bovina, causam um estado normal de hiperglicemia que estimula a liberação pancreática de insulina para a remoção da glicose sanguínea. Uma vez na célula, a glicose pode ser utilizada para o exercício, crescimento ou ser armazenada no fígado como glicogênio (Treiber et al., 2006).

A resistência à insulina implica que os tecidos periféricos são, relativamente, insensíveis a ação da insulina ou que a quantidade de insulina liberada pelo pâncreas em resposta a hiperglicemia é diminuta, ou por haver insensibilidade da insulina na superfície da célula ou por inefetividade desta devido à interrupção do metabolismo da glicose dentro da célula (Annandale et al., 2004; Hoffman et al., 2003). A intolerância a insulina, caracterizada pela hiperglicemia e hiperinsulinemia, sujeita as células que não são dependentes de insulina, em níveis de glicose relativamente altos (Hsueh and Law, 1998). Este efeito tóxico da glicose é especialmente importante para as células endoteliais, levando a um quadro denominado endoteliopatia glucotóxica; caracterizada pelo aumento da produção de endotelina-1 e redução da liberação de óxido nítrico pelas células endoteliais (Cosentino and Luscher, 1998).

Dessa maneira, a produção de fatores constritores pela musculatura lisa vascular seria um fator potencial que poderia predispor as alterações na perfusão do casco e o risco de laminite. Outra consequência do excesso de adiposidade é a exacerbação da ação das metaloproteinases, que tem como implicação o desencadeamento de laminite. O tecido adiposo pode sintetizar e segregar suas próprias citocinas conhecidas como adipocinas. O aumento na atividade das adipocinas pode predispor o aparecimento da laminite pela crescente expressão das metaloproteinases. As metaloproteinases facilitam a degradação da matriz extracelular levando a dissolução descontrolada dos constituintes da membrana, resultando na separação da lamina epidérmica e da lamina dérmica no casco dos equinos.

Apesar dos grandes esforços científicos em se determinar a etiopatogenia da laminite, essa ainda não foi totalmente esclarecida, entretanto, os resultados de pesquisas recentes demonstram que obesidade pode ser um fator determinante para o desenvolvimento dessa patologia. Como a obesidade tem se tornado uma enfermidade presente no terço final da gestação em vacas leiteiras é de extrema importância que saibamos qual a relação entre a adiposidade e a ocorrência de laminite, principalmente no que se refere a bovinos de leite, os quais não possuem estudos específicos. O estabelecimento dessa relação será fundamental para determinação de grupos de risco para o desenvolvimento da laminite no que se refere à adiposidade dos animais.

2.1 Objetivo Geral

- Correlacionar a ocorrência de laminite subclínica em uma população de vacas da raça Holandês com a ocorrência de resistência à insulina.

2.2 Objetivos Específicos

1. Verificar a relação de laminite subclínica pós parto com o grau de adiposidade durante o período de transição.
2. Verificar a relação entre laminite subclínica pós parto e resistência a insulina pós parto.
3. Verificar a correlação do grau de adiposidade subcutânea das vacas no período de transição com a ocorrência de resistência a insulina no pós parto.

2.3 Hipótese

A resistência a insulina pré parto provoca laminite subclínica durante o pós parto de vacas leiteiras.

2.4 Metodologia

Estação Experimental

O experimento será realizado em uma propriedade leiteira ao sul do Rio Grande do Sul, no município de Rio Grande, nas coordenadas geográficas 32 ° 16 'S, 52 ° 32' E.

Os animais mantidos em sistema semi-intensivo de produção sob mesmas condições de manejo.

Animais

Serão utilizadas 20 vacas, multíparas, pertencentes à raça Holandês, com mais de três lactações. Os animais serão mantidos sob manejo da propriedade durante período pré e pós parto.

As coletas de sangue ocorrerão conforme esquema abaixo, sendo obtidas as amostras através de punção do complexo arterio-venoso coccígeo após antissepsia adequada do local, em tubo de soro, sem anticoagulante, para posteriores análises bioquímicas, conforme esquema abaixo:

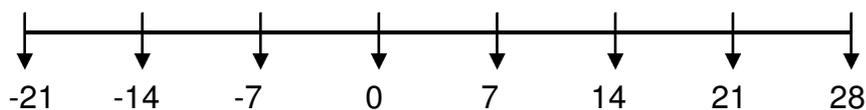


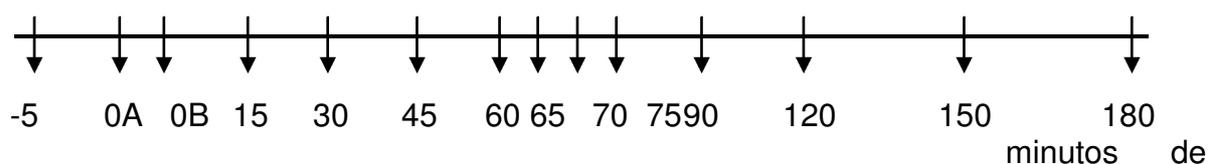
Figura 1. Períodos de coleta de sangue para desenvolvimento dos testes de AGNE, BHBA, Haptoglobina e insulina.

Análises Bioquímicas e Hormonais

Serão avaliadas as concentrações plasmáticas de AGNE, BHBA, Haptoglobina, MMP-2, MMP-9 e insulina nos dias descritos acima, através de ELISA e avaliações glicêmicas através do método colorimétrico em espectrofotômetro. Também serão mensuradas as concentrações de Bicarbonato Sódico no dias 7, 14, 21 e 28 pós parto a fim de descartar qualquer possibilidade de SARA.

Semanalmente, as vacas serão pesadas em plataforma de pesagem Eaziweigh 5® (TruTest Group®) e coletados dados de Escore de Condição Corporal (Edmonson, 1989) e Escore de Claudicação (Stashak, 2006) (STASHAK, 2006).

Para diagnóstico da resistência a insulina, as vacas serão submetidas ao teste de tolerância a glicose e resistência a insulina (TTGI) 20 dias antes do parto e, posteriormente, nove dias após o parto. O TTGI consiste na cateterização jugular das vacas com o objetivo de estabelecer um acesso à veia jugular, possibilitando a infusão em bolus de glicose 50% (0,5 mg/Kg de PV) e a posterior coleta de sangue distribuída conforme diagrama abaixo:



TTGI

Figura 2.

Diagrama demonstrando o tempo (min) de infusão intravenosa, em bolus, de glicose 50% nas vacas pertencentes ao experimento.

As amostras de soro e plasma obtidas durante o TTGI serão centrifugadas a 3000 x g no Laboratório de Bioquímica Aplicada (UFPEI), onde serão avaliadas as concentrações plasmáticas de glicose por métodos colorimétrico em espectrofotômetro (FEMTOM 300®) e as concentrações de insulina através do método de ELISA.

A mensuração da camada de gordura subcutânea dos animais será avaliada

com a utilização de ultrassom de 500V de potência e transdutor linear de 5 megahertz que será realizada entre a 12^a e a 13^a costelas e 5 cm da base da cauda, entre sacral 5 e sacral 6, sendo os animais contidos em tronco de contenção equipado com tesoura para apreensão da cabeça.

Para o diagnóstico de laminite subclínica, inicialmente, os animais serão clinicamente avaliados quanto à presença de claudicação pela utilização do escore de claudicação (Tabela 1) e presença de lesões clínicas associadas à laminite (Tabela 2). Subseqüentemente, a sensibilidade dolorosa a pinça de casco e a presença de pulso digital palmar aumentado, segundo metodologia descrita por Stashak (2006). A pinça de casco será pressionada em toda extensão da sola, talões e parede do casco.

Tabela 1. Grau de claudicação 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 2. Lesões clínicas associadas à laminite.

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- Úlcera 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)

Avaliação radiográfica digital dos cascos das vacas

Será realizada a avaliação radiográfica da terceira falange dos membros torácicos e pélvicos de todos os animais. As projeções serão obtidas na posição lateromedial (Figura 1). As radiografias serão avaliadas e mensuradas quanto a: distância entre parede dorsal do casco e falange distal, distância da banda coronária ao processo extensor da terceira falange e ângulo da falange distal e ângulo palmar, de acordo com Thrall (2002) (Figura 3).

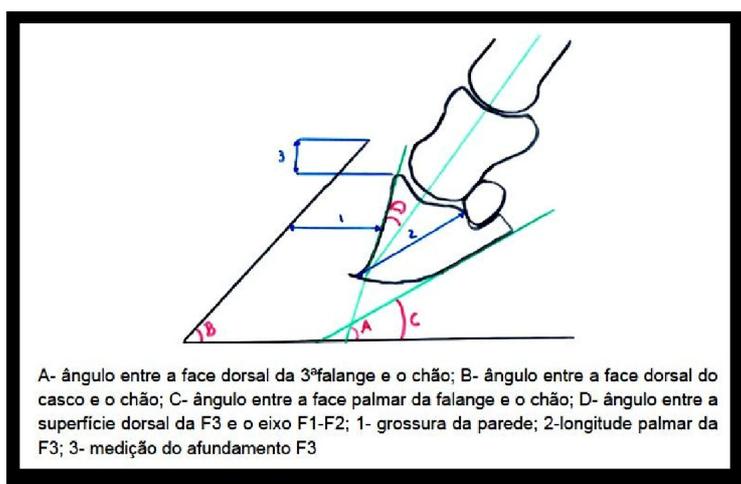


Figura 3. Mensuramento da terceira falange dos bovinos frente ao seu posicionamento à cápsula do casco.

Infra-estrutura disponível

Os procedimentos experimentais serão realizados junto ao Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC). Tal grupo mantém convênio com a Granjas 4 Irmãos, Laboratório de Análise de Leite (Embrapa), Laboratório Regional de Diagnóstico (UFPEL), Laboratório de Patologia Clínica (UFPEL), Laboratório de Patologia Clínica (UFPEL), Laboratório de Bioquímica Aplicada (UFPEL), Hospital de Clínicas Veterinária (UFPEL) e, também, com o Centro de Desenvolvimento Tecnológico (UFPEL). Além destes, o grupo contar com o auxílio técnico e científico do pesquisador norte-americano Ph.D. Juan Llor da Universidade de Illinois – EUA.

Análise Estatística

. Para se verificar uma possível relação entre as características estudadas a análise estatística será realizada por meio da aplicação do testes de Correlação de Pearson (ambas as variáveis paramétricas) ou Spermam (uma ou ambas variáveis não paramétricas) para se verificar a intensidade e a significância ($P < 0,05$). As análises serão realizadas no software SAS®.

Impactos esperados

Esperamos que o resultado deste estudo auxilie no diagnóstico precoce das doenças em questão contribuindo assim para menor incidência de casos de laminite clínica, os quais demandam recursos financeiros aos proprietários rurais e diminuição da produção por parte das vacas, além de interferirem no bem-estar animal do rebanho.

Qualificação da equipe envolvida

Para execução deste projeto trabalharemos com uma equipe multidisciplinar, com a participação de pesquisadores/professores de nossa instituição.

Indicadores de resultados esperados ao final do projeto

Produzir uma dissertação de mestrado;

Publicar pelo menos 1 artigo em revistas de circulação internacional e 1 nacional, classificadas na

área de medicina veterinária como entre “A1” e “B1” no Sistema de Classificação de Periódicos,

Anais e Revistas da CAPES;

Divulgar os resultados em congressos da área em âmbito nacional e internacional;

Divulgar os resultados em congressos da área em âmbito local e regional, tais como Congressos de Iniciação Científica e Encontros de Pós-graduação.

Referências Bibliográficas

Annandale E.J., Valberg S.J., Mickelson J.R., Seaquist E.R. (2004) Insulin sensitivity and skeletal muscle glucose transport in horses with equine polysaccharide storage myopathy. *Neuromuscular disorders : NMD* 14:666-74. DOI: 10.1016/j.nmd.2004.05.007.

Cosentino F., Luscher T.F. (1998) Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Journal of cardiovascular pharmacology* 32 Suppl 3:S54-61.

Edmonson A.J., Lean, I.J., Weaver, L.D., Farver, T. and Webster, G. (1989) A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows. *Journal of dairy science* 72:68-78.

Hoffman R.M., Boston R.C., Stefanovski D., Kronfeld D.S., Harris P.A. (2003) Obesity and diet affect glucose dynamics and insulin sensitivity in Thoroughbred geldings. *Journal of animal science* 81:2333-42.

Hsueh W.A., Law R.E. (1998) Diabetes is a vascular disease. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research* 46:387-90.

Stashak T.S. (2006) *Claudicação em Equinos segundo Adams*. 5 ed., São Paulo.

Treiber K.H., Kronfeld D.S., Geor R.J. (2006) Insulin resistance in equids: possible role in laminitis. *The Journal of nutrition* 136:2094S-2098S.

Thrall D.E. (2002) *Text book of Veterinary diagnostic radiology*. 4ed. Philadelphia.

4. Relatório de trabalho de campo

4.1 Local

Este estudo foi realizado em uma propriedade leiteira no sul do Rio Grande do Sul, no município de Rio Grande, nas coordenadas geográficas 32 ° 16 'S, 52 ° 32' E, a qual possui convênio firmado com a Universidade Federal de Pelotas para a realização de atividades de pesquisa. Em atividade há 60 anos, a propriedade compreende quatro diferentes setores produtivos, plantações de arroz e soja, rebanho de gado de corte e leite, com 197 funcionários fixos. A região é de clima subtropical ou temperado, com temperatura média no verão de 28° e no inverno de 5°, com precipitação média anual de 1.196mm/ano.

4.2 Animais, dieta e manejo

O período do estudo a campo foi de agosto de 2012 a março de 2013, com vacas multíparas da raça holandês de um rebanho médio de 900 animais em lactação, mantidas em sistema semi extensivo, com produção média de 28 litros/leite/animal/dia em duas ordenhas diárias, com intervalo de 12 h.

A alimentação do período pré-parto consistiu de dieta a pasto e suplementação de dieta aniônica e após o parto, dieta concentrada para vacas em lactação e pastagens cultivadas, as quais recebiam após a ordenha. Imediatamente após o parto os animais eram transferidos para o lote colostro, e permaneciam neste por aproximadamente 12 ordenhas, após este período são distribuídos em lotes de primíparas e multíparas de maior ou menor produção de leite. No presente estudo os animais acompanhados foram de multíparas de maior produtividade até 60 dias de lactação.

5.0 Artigo 1

Artigo formatado e submetido segundo as normas da revista Ciência Animal Brasileira.

LESÕES ASSOCIADAS À LAMINITE SUBCLÍNICA E EXAME RADIOGRÁFICO DIGITAL EM VACAS DA RAÇA HOLANDÊS NO PERÍODO TRANSICIONAL

Resumo

A laminite subclínica é responsável por grandes prejuízos na pecuária leiteira, sendo o seu diagnóstico de grande relevância no intuito de evitar reflexos negativos à produção. Portanto, o objetivo deste trabalho foi relacionar lesões associadas à laminite subclínica no período de transição de vacas da raça Holandês com a ocorrência ou não de sinais radiográficos vinculados a essa enfermidade. As vacas foram avaliadas durante o período de transição e divididas em dois grupos (com e sem sinais de laminite subclínica) de acordo com as lesões associadas a essa enfermidade subclínica. A dinâmica radiológica foi realizada em dois momentos durante o período de transição, com o propósito de determinar possíveis alterações de posicionamento capsular e degeneração óssea da terceira falange (F3). Não foram observados efeitos da presença de lesões associadas à laminite subclínica frente ao posicionamento da terceira falange à cápsula do casco ($p>0,05$). Diferenças radiográficas significativas ($p<0,05$) angulares entre a F3 e a cápsula do casco foram observadas entre as unhas lateral e medial do mesmo dígito, mas não entre grupos ($p>0,05$). Assim, neste estudo vacas leiteiras no período de transição com lesões associadas à laminite subclínica não apresentaram sinais radiográficos de desalinhamento falangeano ao estojo córneo digital.

Palavras chave: Casco; bovinos; pododermatite asséptica; exames complementares.

LESIONS/INJURIES ASSOCIATED WITH SUBCLINICAL LAMINITIS AND DIGITAL RADIOGRAPHIC EXAM IN HOLSTEIN COWS IN THE TRANSITIONAL PERIOD

Abstract

Subclinical laminitis has been responsible for economic losses in the dairy industry, being its diagnostic very important in order to prevent negative response to the milk production. Thus, the aim of this study was identify lesions associated with subclinical laminitis during the transition period with presence or absence of radiographic signs linked to this disease in Holstein cows. The cows were evaluated during the transition period and categorized into two groups (with and without laminitis) according with the lesions associated with this subclinical disease. The radiological dynamic was performed in two target points during the transition period (prepartum and postpartum), with the objective to set possible alterations of the capsular position and the third phalanx bone degeneration (F3). There was no effect of the presence of lesions associated with subclinical laminitis related to the position of the third phalanx to the hoof wall ($p>0,05$). Significant radiographic angular differences ($p<0,05$) between F3 and the hoof wall were observed between the lateral and medial nails of the same digit, but not within groups ($p>0,05$). Overall, this study did not show radiographic signs of phalangeal

misalignment in the hoof of dairy cows during the transition period with lesions associated with subclinical laminitis.

Keywords: hoof; bovines; aseptic pododermatitis; complementary exams.

Introdução

Diferentes fatores estão relacionados com o 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 está a adoção de sistemas de estabulação permanente com pisos impermeabilizados, o aumento da densidade animal e o manejo nutricional^{1,2}.

A seleção genética tem sido feita unifatorialmente, com enfoque maior em produção leiteira, dando-se pouca ênfase na estrutura músculo esquelética desses animais, que no contexto atual sofrem consequências por desequilíbrios metabólicos, principalmente observados no período transicional, momento onde a vaca está sob maior desafio, tornando-se mais vulnerável a danos sistêmicos, muitas vezes irreversíveis ao sistema locomotor³.

Dentre os problemas podais cerca de 90% está relacionado ao casco, sendo 70% destes, provocados por pododermatite asséptica difusa (laminite)^{1,4}. Alguns trabalhos vêm demonstrando o reflexo negativo à produção leiteira de animais que são acometidos por essa enfermidade, que pode se manifestar tanto de forma aguda, crônica ou subclínica⁵.

Apesar de inúmeros estudos sobre as diferentes formas de apresentação da laminite ainda existem divergências no que diz respeito aos mecanismos da fisiopatologia da doença propostos em equinos^{6,7}. Algumas teorias buscam explicar os eventos fisiopatológicos vinculados a esta afecção digital, destacando-se as teorias enzimática, metabólica, biomecânica, inflamatória e vascular⁸. Contudo, até o momento são escassos os estudos científicos em bovinos com laminite que enfatizam consequências relacionadas às alterações radiográficas proporcionadas por este estágio da enfermidade durante o período de transição.

Independente da teoria, o aparecimento das lesões associadas à enfermidade são os mesmos, porém é possível que ocorram diferenças quanto a severidade dessas lesões.

Os animais que se enquadram dentro da categoria subclínica apresentam lesões macroscópicas digitais associadas, dentre elas destacam-se principalmente: hemorragia de sola, úlcera de sola, dupla sola^{9,10}, doença da linha branca⁹, hemorragia e separação da linha branca e deformação da unha¹⁰.

Os métodos diagnósticos frequentemente utilizados baseiam-se, principalmente, em observações de escore de locomoção e sinais clínicos específicos do sistema podal. A utilização de métodos complementares de diagnóstico em bovinos, como o diagnóstico por imagem radiológica, não é rotina na pecuária leiteira, diferentemente da crucial importância que é dada a equinos. Com isso, muitas informações importantes do sistema ortopédico digital, associadas a essa enfermidade, deixam de ser observadas.

Portanto, o objetivo desse estudo foi verificar lesões associadas à laminite subclínica com a ocorrência de sinais radiográficos a essa enfermidade durante o período de transição.

Materiais e Métodos

O experimento foi realizado em uma propriedade leiteira comercial localizada no sul do Brasil. Foram utilizadas 17 vacas, multíparas da raça Holandês, com três lactações, produção média de $30,67 \pm 5,39$ litros de leite aos 70 dias em lactação (DEL) e peso vivo de $656,89 \pm 92,6$ Kg. Os animais foram monitorados 14 dias antes do parto até 70 dias após o parto. As vacas foram ordenhadas duas vezes ao dia com intervalo de 12 horas e submetidas ao mesmo manejo semi-extensivo recebendo dieta concentrada, como consta na tabela 1, segundo NRC¹¹.

Tabela 1 - Ingredientes disponíveis diariamente para as vacas leiteiras na dieta (kg) e sua composição no pré e pós-parto

Alimentos	Pré-parto (%)		Pós-Parto (%)		
	Forragem	Concentrado	Forragem	Pré-secad.	Concentrado
Matéria Seca	89,2	87,67	27,4	52,94	87,31
FDN	67,65	47,42	64,32	63,46	32,57
FDA	51,37	13,56	41,74	45,75	13,14
Proteína total	9,16	15,61	9,84	8,88	14,92
Extrato Etéreo	1,73	3,57	2,02	2,00	4,01

Minerais totais	9,23	8,9	9,99	8,84	9,02
-----------------	------	-----	------	------	------

A metodologia empregada para o diagnóstico de laminite subclínica foi a utilizada por Falcão⁷. O grupo laminite subclínica (VCL) foi categorizado pela presença de duas ou mais lesões associadas a essa enfermidade no dígito e o grupo (n=12) sem lesões associadas à laminite (VSL) foi composto por animais com ausência ou presença de no máximo uma lesão associada (n=5), como descrito no quadro 1.

Todas as fêmeas bovinas que fizeram parte do grupo experimental foram submetidas a avaliação dinâmica de locomoção (escore de locomoção) e não apresentaram nenhum grau de instabilidade ortopédica.

Quadro 1 - Lesões macroscópicas identificadas no dígito das fêmeas bovinas associadas à condição subclínica de laminite consideradas para classificação dos grupos experimentais^{1,2,6,12,13}

01- Hemorragia de sola	10- Abscesso de sola
02- Hemorragia na linha branca	11- Abscesso de talão
03- Hemorragia na muralha	12- Abscesso de linha branca
04- Hemorragia no talão	13- Sola macia e amarelada
05- Úlceras de sola	14- Sola dupla
06- Úlcera 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 na muralha

A avaliação radiográfica podal foi realizada com aparelho de radiografia digital (*Cuatro*[®] modelo Slate 2; 68Kv; 0,05 seg;) nos membros torácicos, bilateralmente, em projeção latero-medial com afastamento entre as unhas, no intuito de evitar sobreposição (Figura 2). A dinâmica radiológica foi realizada 14 dias antes da data prevista do parto e nos 70 dias após o mesmo, com o propósito de determinar possíveis alterações angulares¹⁴ e degeneração óssea da terceira falange (F3).

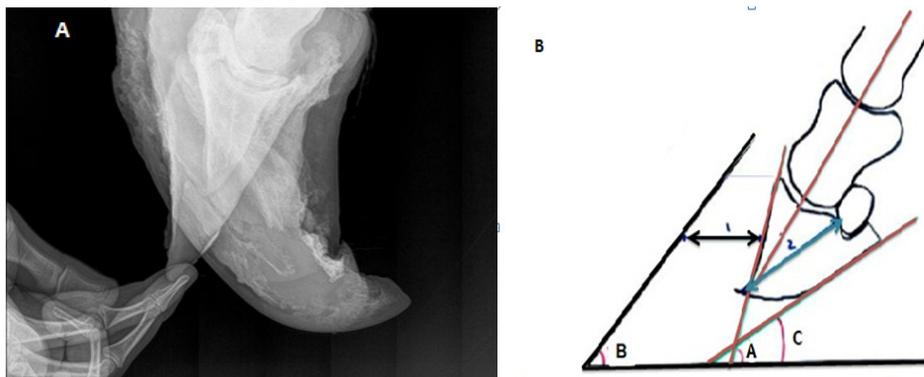


Figura 2 - Método de posicionamento radiográfico dos dígitos para obtenção das imagens radiológicas (A). Mensuração da angulação da F3 dos bovinos frente ao seu posicionamento ao estojo córneo (B)^{14,15}. Ângulos: A: ângulo entre a face dorsal da terceira falange (F3) e o chão; B: ângulo entre a face dorsal do casco eo chão; C: ângulo entre a face dorsal da F3 e o chão; 1: espessura da parede; 2: longitude palmar da F3.

Para as análises dos dados, foi utilizada análise de variância simples (ANOVA One Way AoC), considerando os efeitos da presença ou não de sinais de laminite nos diferentes grupos frente ao posicionamento da terceira falange à cápsula do casco e diferenças de sinais radiográficos entre dígitos e unhas (Statistix8.0, 2013).

Resultados e Discussão

Dentre as lesões observadas pode-se verificar que a reação óssea proliferativa na região no processo extensor foi a mais expressiva (n=68) nos animais seguida dessa mesma lesão com extensão à articulação interfalangeana distal e fraturas. Porém é importante ressaltar que nenhum animal possuía ambos os membros torácicos hígidos.

Efeitos traumáticos biomecânicos ao processo extensor foi uma condição crônica observada em 100% dos animais, que não pode ser desvinculada a consequências clínicas prévias como, erosão de talão e/ou úlcera de sola (lesões comuns em vacas que sofrem de laminite) que proporcionam dor aguda palmar ao dígito, alterando a biomecânica de apoio através da deformidade flexural interfalangeana imposta pelo quadro algico agudo, já que o desalinhamento falangeano com a cápsula do casco (rotação de F3) é uma condição que não foi encontrada o que, certamente seria uma contradição, visto que há presença dessas lesões na região do processo extensor.

O método de avaliação radiográfica utilizado por García e Pérez¹⁵ tinha como principal objetivo avaliar o grau de rotação da F3 em equinos com laminite. Fato este que, nas condições em que foi realizado este estudo, não foi observado nas vacas com mais de duas lesões associadas à laminite subclínica ($p>0,05$) (Tabela 2). Isto caracteriza que, esses sinais digitais macroscópicos vinculados à condição de enfermidade laminar subclínica não foram associados ao desequilíbrio de posicionamento falangeano à cápsula do casco. Sendo assim, reduzindo as possibilidades de efeitos dolorosos biomecânicos à dinâmica de apoio do dígito ao solo, que de certa forma pode ser comprovado pela ausência de claudicação das vacas que apresentaram lesões associadas à laminite.

Apesar dos sinais evidenciados uma das hipóteses que explicaria a ausência de sinais álgicos no sistema ortopédico está vinculado com a anatomia e a biomecânica de movimento no dígito em bovinos, possuindo caráter relevante a ser considerado no grau de manifestação dessa enfermidade. Acredita-se que, o casco biungulado nesses animais, pode influenciar com menor intensidade na severidade dos sinais clínicos, uma vez que possuem o amortecimento podal compartilhado entre as lâminas, os coxins e a sola¹⁶ distribuindo a amortização e proporcionando menor movimentação falangeana dentro do aparelho suspensório do casco, diferentemente do que alguns estudos vêm enfatizando em equinos, os quais são unglados e possuem sua biomecânica de apoio do dígito ao solo amortecida somente pelas lâminas epidérmicas, fato esse que corrobora para a maior severidade e prevalência de afecções podais nesta espécie⁸.

Tabela 2 - Mensuração radiográfica da F3 frente ao seu posicionamento ao estojo córneo do casco (média (X) \pm erro padrão (SE) em vacas com e sem lesões associadas à laminite subclínica.

	N unhas	A	B	C	1	2
VCL ¹	48	46,9 (0,4)	50,1 (0,5)	13,1 (0,3)	14,5 (0,3)	60,2 (0,8)
VSL ²	20	46,3 (0,7)	49,8 (0,8)	12,2 (0,6)	15,1 (0,4)	57,8 (1,3)
Total	68					

¹VCL= Vacas com laminite; ²VSL= vacas sem laminite

A: ângulo entre a face dorsal da terceira falange (F3) e o chão; B: ângulo entre a face dorsal do casco e o chão; C: ângulo entre a face dorsal da F3 e o chão; 1: espessura da parede; 2: longitude palmar da F3.

Diferenças radiográficas significativas ($p>0,05$) angulares (A, B, C, 1 e 2) entre a F3 e a cápsula do casco foram observadas entre as unhas lateral e medial do mesmo membro, mas não entre grupos de vacas com e sem lesões associadas à laminite (Tabela 3), ou seja, existe diferença somente entre a unha lateral e medial do mesmo animal, mas não entre animais. Isso caracteriza uma condição anatômica específica à unha e não à enfermidade, de acordo com o que descreve Nicolleti¹ e Van Der Tolet al¹⁷.

A diferença angular da F3 frente ao estojo córneo entre as unhas pode estar relacionada ao desequilíbrio látero medial digital anterior promovido pelo centro gravitacional localizado exatamente sob o apêndice xifoide, caracterizando maior pressão biomecânica à locomoção sob a unha medial^{1,17}.

Tabela 3 - Mensuração radiográfica da F3 dos bovinos frente ao seu posicionamento a estojo córneo do casco em vacas com e sem laminite subclínica

	N	A		B		C		1		2	
		Med.	Lat.	Med.	Lat.	Med.	Lat.	Med.	Lat.	Med.	Lat.
VCL¹		45,7 ^b	48,2 ^a	49,3	50,8	11,7 ^b	14,6 ^a	15,8 ^a	13,2 ^b	63,6 ^a	56,7 ^b
	48	0,01		Ns		0,01		0,01		0,01	
P											
VSL²		44,9 ^b	47,8 ^a	49	50,6	10,2 ^b	14,2 ^a	16,2 ^a	13,9 ^b	59,9	55,8
	20	0,05		Ns		0,01		0,01		0,06	
P											

¹VCL= Vacas com laminite; ²VSL= vacas sem laminite

A: ângulo entre a face dorsal da terceira falange (F3) e o chão; B: ângulo entre a face dorsal do casco eo chão; C: ângulo entre a face dorsal da F3 e o chão; 1: espessura da parede; 2: longitude palmar da F3.

Lesões radiográficas vinculadas ao osso terceira falange como osteólise, reação óssea proliferativa do processo extensor associada ou não a fraturas desta região anatômica e osteoartrite interfalangeana distal foram observadas em ambos os grupos ($p>0,05$). Esses fatos não estão ligados ao momento subclínico, mas podem estar relacionados a uma condição dolorosa de laminite aguda prévia, pois as lesões associadas à laminite subclínica sugerem isso.

Baseado na ausência de diferenças angulares na posição da F3 frente ao estojo córneo e na presença de lesões associadas à laminite encontradas nos cascos desses bovinos acredita-se que, essas sejam, provavelmente, oriundas de desequilíbrios

sistêmicos e/ou metabólicos antecedentes, eventualmente não identificados clinicamente, expressos visualmente pelas lesões mensuradas neste estudo, não obrigatoriamente, sendo traduzidas como uma condição subclínica momentânea.

Conclusões

Vacas leiteiras no período de transição com lesões associadas à laminite subclínica não apresentaram sinais radiográficos de alterações angulares entre a terceira falange e o estojo córneo.

Lesões crônicas na região do processo extensor podem ser uma consequência clínica em vacas com episódios de laminite, sem rotação de falange.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo apoio financeiro e à Granja 4 irmãos pela disponibilidade da execução do projeto.

Referências

1. Nicoletti JLM. Manual de podologia bovina. Barueri: Manole; 2004. 126p. Portuguese.
2. Ferreira PM. Enfermidades podais em rebanho leiteiro confinado. 2003. 79f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
3. Blowey RW. Claudicação. In: Andrews AH. Medicina bovina: doenças e criação de bovinos. 2nd ed. São Paulo: Roca; 2008. p. 362-384. Portuguese.
4. Silva LAF, Silva LM, Romani AF, Rabelo RE, Fioravanti MCS, Souza TM, Silva CA. Características clínicas e epidemiológicas das enfermidades podais em vacas lactantes do município de Orizona -GO. [Clinical and epidemiological characteristics of foot diseases in dairy cows in the municipality of Orizona – GO]. *Ciência Animal Brasileira* [Internet]. 2001 Jul/Dec [cited 2014 Aug 21]; 2(2):119-126. Available from: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/264/236>. Portuguese.

5. Warnick LD, Janssen D, Guard CL. The effect of lameness on milk production in dairy cows. *Journal of Dairy of Science* [Internet]. 2001 Sep [cited 2014 Jul 18]; 84(9):1988-1997. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11573778>. English.
6. Nocek JE. Bovine acidosis: implications in laminitis. *Journal of Dairy Science* [Internet]. 1997 [cited 2014 Aug 21]; 80(5):1005-1028. Available from: [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(97\)76026-0/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(97)76026-0/pdf). English.
7. Falcão, H. M. Lesões na junção derme-epiderme do casco de vacas de aptidão leiteira de descarte com e sem sinais clínicos de laminite. Dissertação (Mestrado em Medicina e Cirurgia Veterinárias) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2010. [citado 2014 Ago 24]; 74f. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1843/BUOS-8SDM87>. Portuguese.
8. Orsini JA, Parsons CS, Capewell L, Smith G. Prognostic indicators of poor outcome in horses with laminitis at a tertiary care hospital. *The Canadian Veterinary Journal* [Internet]. 2010 [cited 2014, Aug 21];51(6):623-628. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2871359/pdf/cvj_06_623.pdf. English.
9. Flor E, Tadich N. Claudicaciones en vacas de rebaños lecheros grandes y pequeños del sur de Chile. *Archivos de medicina veterinária* [Internet]. 2008 [cited 2014 Aug 22]; 40(2):125-134. Available from: <http://www.scielo.cl/pdf/amv/v40n2/art03.pdf>. Spanish.
10. Ossent P, Lisher CJ. Bovine laminitis: the lesions and their pathogenesis. *Practice*; 1998. p. 415-427. English.
11. NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. Nutrients requirements of the dairy cattle. 7 ed. Washington, D.C.: 2001. 381p. English.
12. Andreson DE, Rings M. *Current Veterinary Therapy: Food Animal Practice*. 5st ed. St. Louis: Saunders Elsevier; 2008. 736p. English.
13. Greenough PR. The laminitis syndrome. In: *Ibid.* (Ed.), *Bovine Laminitis and Lameness: a hands-on approach*. Toronto: Elsevier; 2007. p. 36-54. English
14. Thrall DE. *Text book of veterinary diagnostic radiology*. 4ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2002. 429p. English.
15. García JS, Pérez ECP. Síndrome infosura. In: *I Curso de Podiatria Equina Especializada da Universidade de Évora*. Évora: Unievora; 2007. 27-30p. Portuguese.
16. König HE, Liebich H. *Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas colorido*. Porto Alegre: Artmed; 2004. 787p. Portuguese.

17. Van Der Tol PPJ, Metz JHM, Noordhuizen-Stassen EN, Back W, Braam CR, Weijs WA. The pressure distribution under the bovine claw during square standing on a flat substrate. *Journal of Dairy Science* [Internet]. 2002 Jun [cited 2014 Jul 20]; 85(6):1476-1481. Available from: [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(02\)74216-1/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(02)74216-1/pdf). English.

5.1 Artigo 2

Formatado Segundo a revista *Veterinary Record* casereports.

Veterinary Record
casereports

Submission template for full cases.

TITLE OF CASE

Variation of lesions diagnosed in the extensor process of the third phalanx bone in Holstein cows

SUMMARY

The present approach bring up the variable aspect of lesions in the extensor process of the third phalanx bone, diagnosed by digital radiography, in 17 Holstein cows, with or without joint involvement, the study was conducted in a commercial farm located in the South of Rio Grande do Sul State, Brazil. In the animals evaluated in this study there was antecedent clinical record of macroscopic lesions to the digit, without lameness. Among the radiographic lesions in thoracic digits, it was found the following array, according with the frequency distribution: proliferative bone reaction in the region of the extensor process in 73.5% ($n_{\text{nails}}=34$) of forelimbs from the animals, distal interphalangeal osteoarthritis (13.7%) and extensor process fracture was observed only in 2% of the digits. The digital radiographic examination showed the extent of bone changes in cattle with subclinical laminitis, providing important diagnostic and prognostic information of associated lesions, characterizing the extensor process lesions that may be more significantly common in dairy herds, given the absence of nociceptive signals and complementary diagnostics.

BACKGROUND *Why you think this case is important – why did you write it up?*

During decades, dairy cows have been selected for its productive character, with the main focus on the breeding production (Butler, 1998, Washburn et al., 2002). There are few reports correlating the anatomy structure of a dairy cow with the orthopedic support anatomy.

Longevity, in high production milk cows is conserved by maintaining the integrity of the mammary, reproduction and musculoskeletal systems. A lack in specific breeding strategic for genetic improvement for these systems might result in disequilibrium and instability that affects the physical integrity of one

system (Garbarino, Hernandez, Shearer, Risco & Thatcher, 2004; EFSA, 2009).

With the advance of genetic progress, dairy cows are increasingly challenged, being submitted to constant conditions of metabolic disorders, likewise submitted to permanent or intermittent episodes of systemic and / or mechanical aggression, anatomofunctional of its orthopedic system, appearing locomotion injuries, which until then fewer studies have been reported in bovines, such as orthopedic diseases located in supporting tissues of the digits (Lima, 2009).

In horses, the distal phalanx (F3) can be affected by laminitis, osteitis, fractures, hoof abscesses and remodeling in flexion deformities (Honnas, 1999; Staschak, 2004). Fractures of the distal phalanx are well known orthopedic conditions, which usually occur as a result of severe trauma to the plant Digit, requiring further examination by imaging for definitive diagnosis (Blowey, 2008; Welker, 1993).

Up to now, there are few studies that report the occurrence of lesions in the extensor process of the third phalanx in cattle (Honnas *et. al.*, 1988; BORGES *et al.*, 2006; Taguchi *et. al.*, 2010).

Historically, these lesions on F3 have been associated with constant periosteal stimulus on the extensor region of the third phalanx, clinically showing nociceptive signals to palpation, and added swelling in the face proximal dorsal of the coronary band with possible deformations of the hoof horn on the same aspect (Stashak, 2004). There is variation both in extent and in degree of severity of complications in this region, especially when surrounding anatomical structures are involved (Nouri *et. al.* 2013).

Approaches on the structure and function of the suspensory apparatus of the distal phalanx has been significant to understanding the development of laminitis in horses (Pollitt, 2010), nevertheless this tasks have been tentatively investigated in dairy cattle, even less the routine use of complementary diagnostics, such as X-ray evaluations on the herd management (Parizi & Shakeri, 2007), which could display dynamic instability of motion.

Therefore, this study reports the frequency and variation of lesions in the extensor process of the third phalanx bone, with or without joint involvement in dairy cows from a farm located in the south of Rio Grande do Sul state of Brazil.

CASE PRESENTATION *Presenting features, clinical and environmental history*

This case report describes the identification and the appearance of lesions on the extensor process of the third phalanx bone in dairy cattle from a commercial herd located in the South of Brazil (32 ° 16 'S, 52 ° 32' E), with sandy soil, average annual rainfall of 1207 mm.

17 Holstein cows with three lactations, with average production in two milkings of 30.67 ± 5.39 liters of milk and average weight of 656.89 ± 92.6 kg were evaluated. The animals were submitted to semi-extensive system, with daily walk of 2.2 km between pasture, food and milking parlor.

Weekly, the cows were submitted to clinical diagnosis and radiological exploration, on two periods (pre- and postpartum), from 14 day pre partum to 50 day post partum, being held under the same management conditions.

Clinically, the cows manifested macroscopic signs of bleeding soles, presence of cracks and / or bleeding white line, ulcers or sole abscesses, yellow soft soles, crack in the wall, scissor claw or corkscrew claw and stress lines in the walls, the frequency of these observations are shown in Table 1, but the presence of lameness was not observed (Ferreira, 2004).

Foot condition	Cases	Percentage %
White Line extension	14	23.72
Scissor claw	13	22.03
horizontal lines	11	18.64
dual sole	8	13.6
Wall bleeding	5	8.47
Crack in the wall	4	6.77
Corkscrew claw	3	5.08
Cleft White line	1	1.69
Total	59	100

The complementary radiological exams were performed with digital equipment (68Kv; 0,05 s. brand: *Cuatro@* model: Slate 2), in which the forelimbs were bilaterally radiographed in lateromedial projection, in order to determine possible radiographic changes present in members.

All animals despite the zero score of locomotion, demonstrated no abnormalities of posture or walking, however expressed at least one radiographic change in at least one member.

Thereafter, radiographic lesions were evaluated for their variety and severity, indeed animals that had only injury extensor process, with fracture and / or joint involvement were detected.

Among the radiographic lesions observed, it can be seen that the proliferative bone reaction in the region of the extensor process (Figure 1A) was diagnosed in 73.5% (n=34) of the forelimbs of the animals.

In addition, this same injury, extending to the distal interphalangeal joint (Figure 1B) was observed in 13.7% of the members. On a smaller scale, fractures (Figure 1C) were identified on 2% of animals, while 10.8% had no abnormalities (Figure 1D) in a member, however it is important to note that bilateral healthiness of both forelimbs was not observed.

INVESTIGATIONS *If relevant*

DISCUSSION *Include a very brief review of similar published cases*

In the animals evaluated in this report, there was clinical record of macroscopic lesions antecedent of aggression to the digit, without lameness, even with these bone lesions detected by digital radiographic examination, in other words, chronic lesions in the extensor process, with or without joint involvement, did not promote nociceptive signals in the locomotion of the cows, further emphasizing the importance of digital imaging in the detection of relevant subtle lesions that may subsequently lead to serious failings by the involvement of the distal interphalangeal joint.

It is likely that more severe osteoarthritis damage, bilaterally, are necessary for the manifestation of lameness. However, may a deviation from the center of support for the contralateral digit of the forelimb, that shows the lesion reduces the biomechanical stress and painful to the affected region, thus, the use of complementary exams such as radiology and ultrasonography are requirements, in some cases, for diagnosing podal diseases in cattle due to the

indication of extent lesions, the pathology and the most likely prognosis (Bargai *et al.*, 1988), especially when the lesions are unilateral to the same digit.

In this study, can be considered that the lesions to the extensor process may have been caused by repeated biomechanical stress caused by the irregularity of the ground surface, associated with the distance that the cows walk at the farm.

Additionally to these factors, the excessive humidity condition of the farm soil promotes the formation of undulations that have probably contributed to the locomotor imbalances of the animals, leading to overextension of the joint and the dorsal digital extensor tendon to the insertion to the pyramidal process of the third phalanx, which had been reported in horses by Kaneps *et. al.* (1993).

Some of these etiological factors were already described by Greenough *et al.*, (1981); Blowey (2008) and Rutherford (2009), who emphasized that irregular surfaces, long walks, estrous behavior, weight, excessive hoof growth and advanced age are predisposing factors for foot lesions.

The shaft misalignment prune phalangeal and bulbar pain may also contribute to increased biomechanical stress with constant assaults on proximal site of insertion of the extensor process of the distal interphalangeal joint portion.

According to Stashak (2004), a slight bone reaction on the dorsal surface of the distal phalanx may suggest an early sign of laminitis in horses, however, in bovines have not yet exist surveys to consider this relationship. In the animals evaluated was not observed the existence of radiographic signs of laminitis, also no change in the positioning of the F3 front of the hoof capsule in cattle was analyzed, disconsidering the interrelationship.

Ross & Dyson (2003) reported that, in horses, fractures or injuries to the extensor process derived from chronic events, usually traumatics, being diagnosed as findings on routine, that do not present evident lameness in the specie. Furthermore, this data agrees with the case study reported, whereas lameness was not observed, despite the presence of evident lesions in radiographic extensor process. But when diagnosis involves joint lesions these authors described as major etiological factors the advanced age, fractures on F3 and subchondral lesions. However, it disagrees with the present study, in

which the cows evaluated were in an intermediate age group ($\mu = 5$ years) and only 2% had lesions of fracture, so they probably were not given these causes as precursors of aggression to this region.

If these animals do not show irreversible damage to the mammary and / or reproductive systems, their permanence in the production cycle can be compromised given the possibility of expression of relevant nociceptive signals caused by degenerative osteoarthritis disorders interphalangeal with negative dynamic reflections on digital biomechanics.

Currently, most diagnoses of foot diseases in cattle occurs only at specific and general clinical examination of the musculoskeletal system, however, Parizi & Shakeri (2007) demonstrated that the use of radiography was essential for differential bone and joint diseases in animals with lameness. Radiographic examination is an excellent diagnostic imaging method for lesions involving the orthopedic system in horses. The technology of digital radiology provides a higher accuracy of diagnosis of lesions on the locomotor system (Ross & Dyson, 2003), nevertheless, in dairy cattle, its use is still limited when compared to horses (Nouri et. al. 2013).

Extensor process lesions may be more common in dairy herds, given the absence of complementary diagnostics. Therefore, further studies are needed to confirm the importance and its relation with predisposing factors in rural establishments.

LEARNING POINTS/TAKE HOME MESSAGES *3 to 5 bullet points – this is a required field*

The severity of radiographic findings in the extensor process of the F3 was not related to the score of locomotion, suggesting insidious character of the lesions in the population studied.

The proliferative bone reaction in the region of the extensor process was the most evident lesion in cattle.

Radiographic examination showed the extent of bone changes in cattle with subclinical laminitis, providing important information for diagnosis and prognosis of associated lesions.

REFERENCES Harvard style

BARGAI, U., PHARR, J.W. & MORGAN, J.P. (1988) *Bovine radiology*. Ames: Iowa State University.

BLOWEY, R. (2008) Common diseases of the foot and their treatment. In: Blowey, R. (ed). *Cattle Lameness and Hoofcare: An Illustrated Guide*. 2nd ed. Diamond Farm Book Pubns.

BORGES, N.C.A. et al. (2006) Postmortem radiographic study of the digits of bovine raised in natural grazing environment. In: *Simposio Internacional, 14^o & Conferencia Lameness in Ruminantes*. Uruguai, June 2006. Uruguai: Central de impresiones , p. 43-44.

BUTLER, W.R. (1998) Review: Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 81. p.2533-2539.

European Food Safety Authority. (2009) *Effects of farming systems on dairy cow welfare and disease*. Parma: EFSA.

FERREIRA, P. M. et al. (2004) Custo e resultados do tratamento das sequelas de laminitite bovina: relato de 112 casos em vacas em lactação no sistema free stall. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 56 (5). p. 589-594.

GARBARINO, E.J. et al. (2004) Effect of lameness on ovarian activity in postpartum Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 87. p. 4123–4131.

GREENOUGH, P. R., MACC ALLUM, F. J. & WEAVER, A. D. (1981) Disease of deep structures of the digit. In: Wright & Sons. *Lameness in Cattle*. 2nd ed. p. 197-218.

HONNAS, C. M., O'BRIEN, T. & LINFORD, R. L. (1988) Distal phalanx fractures in horses: a survey of 274 horses with radiographic assessment of healing in 36 horses. *Veterinary Radiology*. 29. p.98-107.

HONNAS, C. M. (1999) In: Auer, J.A. & Stick, J.A. (eds). *Equine surgery*. Philadelphia: WB Saunders, p.779–791.

KANEPS, A. J. et al. (1993) Characterisation of osseous bodies of the distal phalanx of foals. *Equine Veterinary Journal*. 25. p. 285-292.

LIMA, I. R. (2009) Estudo clínico e radiográfico das extremidades distais dos membros locomotores de bovinos machos de corte. *Ciência Animal Brasileira*. (1).

NOURI, M. et al. (2013) Post-mortem qualitative radiographic study of the foot with special reference to the digital lesions in culling lame cows. *Animal and Veterinary Sciences*. p. 27-31.

PARIZI, A.M. & SHAKERI, M.A. (2007) Abattor study of radiographic changes of bones and joints of digital region in cattle with abnormal claws. *Veterinarki ARHIV. Zagreb.* 77. (2). p. 187-194.

POLLIT, C. C. (2010) The anatomy and physiology of the suspensory apparatus of the distal phalanx. *Vet Clin Equine.* (26). p. 29-49.

ROSS, M. W. & DYSON, S. J. (2003) *Diagnosis and management of lameness in the horse.* St Louis Missouri : Saunders, p.348-362.

RUTHERFORD, K.M.D. et al. (2009) Lameness prevalence and risk factors in organic and non-organic dairy herds in the United Kingdom. *The Veterinary Journal.* 180. p. 95-105.

SILVA, L.A.F. (2001) Características clínicas e epidemiológicas das enfermidades podais em vacas lactantes do município de Orizona – GO. *Ciência Animal Brasileira.* 2 (2). p. 119-126.

STASHAK, T. S. (1998) Adams' lameness in horses. 5 (ed). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p.645-733.

STASHAK, T. S. (2004) Claudicación, el pie. In: Stashak, T.S. *ADAMS: Claudicación en el caballo.* 5 (ed). Buenos Aires: Editorial Inter-Médica. p. 685-706.

TAGUCHI, K., NAKAMURA, S. & HYAKUTAKE, K. (2010) Fracture of the extensor process of the distal phalanx in a bull and a cow. *Veterinary Record.* 167. p. 904-906.

WASHBURN, S.P. et al. (2002) Trends in reproductive performance in Southeastern Holstein and Jersey DHI herds. *Journal of Dairy Science.* 85. p.244-251.

WELKER, B. 1993. Osteomyelitis. Diseases of the musculoskeletal System. In: *Current Veterinary Therapy 3 and Food Animal Practice.*

Copyright Statement

I, Antonio Barbosa, The Corresponding Author, has the right to assign on behalf of all authors and does assign on behalf of all authors, a full assignment of all intellectual property rights for all content within the submitted case report (other than as agreed with the BMJ Publishing Group Ltd and the British Veterinary Association) ("BMJ" and "BVA") in any media known now or created in the future, and permits this case report (if accepted) to be published on Veterinary Record Case Reports and to be fully exploited within the remit of the assignment as set out in the assignment which has been read
<http://journals.bmj.com/site/misc/vetreccrcopyright.pdf>

5.2 Artigo 3

PARÂMETROS METABÓLICOS E INFLAMATÓRIOS DE VACAS LEITEIRAS COM ALTERAÇÕES PODAIS DURANTE O PERIPARTO

Resumo

A laminite bovina é uma das principais causas de prejuízos na pecuária leiteira e está sendo cada vez mais relacionada à alterações metabólicas resultando em eventos fisiopatológicos que derivam no descolamento das lâminas epidérmicas do casco. O objetivo deste estudo foi verificar as mudanças nas concentrações sanguíneas de AGNE, ECC, glicose, MMP9 e PON1 durante o periparto em vacas leiteiras com lesões associadas à laminite subclínica. Foram avaliadas 17 vacas da raça Holandês com 3 lactações durante o período de transição (23 dias antes e 23 dias depois do parto) e divididas em dois grupos (com e sem sinais de laminite subclínica). O grupo laminite subclínica (VCL) (n=12) formado por animais com mais de duas lesões associadas à laminite subclínica e o grupo sem laminite (VSL) composto por animais com ausência ou presença de no máximo uma lesão associada (n=5).. As análises estatísticas foram efetuadas pela análise ROC e medidas repetidas. Durante o período de transição não foi observado diferença entre grupos em todos metabólitos avaliados, porém vacas com laminite subclínica apresentam variação nos níveis de AGNE e PON1 nos primeiros 9 dias pós-parto. Os marcadores ECC, PON1 e AGNE, quando analisados em combinação, mostraram-se mais expressivos no diagnóstico precoce de laminite durante o periparto, caracterizando a associação de fatores inflamatórios e energéticos na patogênese das lesões associadas à laminite subclínica.

1. INTRODUÇÃO

A laminite ou pododermatite asséptica é caracterizada pela inflamação difusa das lâminas do casco, sendo responsável por cerca de 70% de todas as lesões que afetam o sistema locomotor em bovinos de leite (Ferreira 2003). A forma subclínica, apesar de difícil diagnóstico é de grande importância pelos numerosos prejuízos causados. Desde o primeiro relato, há cerca de 500 anos atrás e os mecanismos da fisiopatologia da doença propostos ainda permanecem os da primeira descrição (FALCÃO, 2010).

Acredita-se que a laminite seja uma doença de origem multifatorial sistêmica com manifestação local no dígito. Ainda é desconhecido o fator que determina o aparecimento da inflamação no tecido laminar, bem como a extensão dessa inflamação em outras estruturas do casco tanto em bovinos (THOEFNER et al., 2005) como em equinos (LINFORD, 2006).

As grandes perdas na produção leiteira causadas por afecções podais podem ser reduzidas se for possível reconhecer a tempo (BRUIJNIS, et al., 2009) e monitorar a evolução de alterações nas respostas adaptativas do casco, ou conseguir antecipar e identificar o desenvolvimento de condições patológicas associadas à laminite. Como alternativa, o desencadeamento inicial do processo patológico ligado à estrutura digital em bovinos pode ser diagnosticado precocemente através da análise de marcadores biológicos relacionados com afecções podais, como descrito por Knott (2007) através de estudos feitos em equinos.

VAN KNEGSEL (2007) e HAMMON et al. (2006) citam que a severidade do balanço energético negativo (BEN) interfere diretamente na formação de anticorpos e função dos neutrófilos, caracterizando assim a elevada importância do metabolismo energético na ocorrência de doenças. Corroborando com essa ideia ORTOLANI (2009) comenta que 70% das doenças, inclusive a laminite, ocorrem no periparto, mostrando que esse é o período crítico e de maior atenção para os bovinos de leite e para a ocorrência de afecções podais. Sendo assim, alguns marcadores como ácidos graxos não esterificados e (AGNE), glicose e outras avaliações como escore de condição

corporal (ECC) podem servir para mostrar a influência do metabolismo, principalmente energético, na ocorrência de pododermatite asséptica.

Já a paraoxanase (PON1) e metaloproteína 9 (MMP9) são biomarcadores que possuem bastante relação com eventos inflamatórios envolvendo laminite, visto que ambas são citadas como participantes da patogenia da enfermidade, podendo assim ter valor preditivo quanto a ocorrência da laminite (KNOTT et. al., 2007; FARID 2013; BIONAZ et.al., 2007).

Este estudo teve por objetivo verificar as mudanças nas concentrações sanguíneas de AGNE, ECC, glicose, MMP9 e PON1 durante o parto em vacas com lesões associadas à laminite subclínica.

2. METODOLOGIA

O experimento foi realizado em uma propriedade leiteira comercial, localizada no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. Foram utilizadas 17 vacas leiteiras, multíparas, da raça Holandês, com três lactações e peso vivo de $656,89 \pm 92,6$ Kg. Os animais foram monitorados do dia -23 até parto até 23 dias pós-parto semanalmente. As vacas eram ordenhadas duas vezes ao dia, com intervalo de 12 horas e submetidos ao mesmo manejo semi extensivo, baseado a pasto com suplementação de concentrado após a ordenha, durante todo período do experimento, conforme tabela 1.

Tabela 1. Composição dos constituintes da dieta disponível diariamente no pré e pós-parto para as vacas durante o experimento, segundo NRC (2001).

Ingredientes	Pré-parto (kg)	Pós-parto (kg)
Pastagem nativa	À vontade	--
Sorgo forrageiro	--	À vontade
Farelo de trigo	0,50	1,50
Farelo de soja	1,00	2,40
Farelo de arroz	0,68	2,88
Milho	1,05	3,00
Sorgo	1,05	2,13
Suplemento mineral	0,40	0,11
Uréia	--	0,09

Bicarbonato de Sódio	--	0,19
Calcário	0,12	0,19
Cloreto de Sódio	--	0,002

O diagnóstico de laminite subclínica foi realizado aproximadamente 30 dias antes do parto. A metodologia empregada para o diagnóstico de laminite subclínica foi à mesma utilizada por FALCÃO (2010). O grupo laminite subclínica (VCL) foi categorizado pela presença de duas ou mais lesões associadas a essa enfermidade (n=12) e o grupo sem laminite (VSL) foi composto por animais com ausência ou presença de no máximo uma lesão associada (n=5), como descrito na tabela 2. Todas as vacas envolvidas no experimento não apresentavam claudicação segundo método de WINCKLER e WILLEN (2001), onde 0 = normal e 4 = claudicação grave.

Tabela 2. Lesões associadas à laminite consideradas para classificação dos grupos experimentais (Falcão, 2010).

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 - Úlcera 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

As coletas de sangue foram realizadas semanalmente do dia - 23, - 14, -7 -3, 0, 3, 9, 16, 23 em relação ao parto (exceto MMP9 a qual foi coletada nos dias -14, -7, 0 e 3) através de punção do complexo arterio-venoso coccígeo, após antissepsia adequada do local, em tubo de coleta de sangue sem anticoagulante. Após a coleta as amostras de sangue foram centrifugadas e o soro obtido foi armazenado a -80^o C para posteriores análises.

As análises de AGNE foram mensuradas através do método colorimétrico (Wako Chemicals USA®, Richmond, EUA) em leitor de placa.

A MMP9 foi analisada através do método de ELISA (Elisa MMP-9 Kit, Novatein Biosciences, Cambridge (USA). Já a atividade da PON1 foi determinada por técnica enzimática utilizando kit comercial (Zepto Metrix®, EUA).

A mensuração dos níveis glicêmicos foi analisada através do método colorimétrico (kit glicose PAP, Labtest®, BR) em espectrofotômetro de luz visível. As avaliações de ECC foram feitas obedecendo uma escala de uma escala de 1 a 5, onde 1 = magra e 5 = obesa (WILDMAN, 1982).

A produção de leite foi determinada pelo programa Alpro® *Delaval* 2010 até os 60 dias pós parto.

As análises estatísticas foram realizadas análise de variância através do uso de medidas repetidas utilizando o MIXED PROCEDURE para avaliar o efeito da coleta, grupo e suas interações (LITTELL et al., 1998). O modelo estatístico e as análises dos dados foram feitos separadamente para o pré-parto e pós-parto. A acurácia dos parâmetros para laminite subclínica pré e pós-parto foi calculada usando a estimativa de máxima verossimilhança de uma curva de resposta do operador binormal a partir de dados de classificação categórica (análise ROC).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diferenças entre grupos VCL e VSL foram observadas no dia 3 (AGNE; $p < 0,05$, Figura 1A) e 9 (PON1; $p < 0,05$, Figura 1D) em relação ao parto. Fato esse que sugere que os dez dias pós parto seriam o momento de maior atenção durante o período transicional no que tange a influência do metabolismo sobre a laminite subclínica, corroborando com os resultados encontrados por BIONAZ et al. (2007) que cita a importância do AGNE e PON1 como preditores de laminite durante o periparto, salientando a relevância que o equilíbrio metabólico, nutricional e inflamatório do organismo exerce sobre a prevalência da laminite.

A partir do momento em que os animais entram em BEN os mesmos sofrem intensa lipomobilização no intuito de fornecimento de energia alternativa

à glicose, sendo esse processo acompanhado de alterações inflamatórias, imunes e oxidativas (CONTRERAS e SORDILLO, 2011; SOSTAR e TURK et al., 2005). A duração e a intensidade do BEN está negativamente associada à prevalência de afecções podais. Além disso, a concentração e composição de alterações nos lipídios plasmáticos associada com a mobilização lipídica afeta diretamente a atividade leucocitária aumentando a suscetibilidade a doenças, inclusive laminite (CONTRERAS et al., 2011).

Bovinos, no periparto, podem sofrer consequências profundas não só relacionados à disponibilidade de energia, mas também com as respostas inflamatórias e a função imunitária (Van Knegsel, 2007). A lipomobilização pode alterar o equilíbrio entre o início e término do processo inflamatório modificando assim a resposta e aumentando a suscetibilidade à afecções podais nesse período (KOSKINEN ET AL. 2011)

Durante a inflamação laminar, citocinas pró-inflamatórias como Fator de Necro Tumoral alfa (TNF α) e interleucinas são produzidas em altos níveis, estimulando o fígado a sintetizar proteínas de fase aguda, como a PON1 (CERON, 2014), fato esse que, talvez possa esclarecer os resultados observados no presente estudo onde vacas com mais lesões associadas à laminite possuíram maiores níveis de PON1 em alguns momentos.

Em processos inflamatórios a PON1 atua auxiliando no diagnóstico precoce de diversas doenças. Entretanto, muito do que se sabe até hoje a respeito do comportamento desta proteína e sua relação com enfermidades baseia-se em estudos envolvendo humanos e camundongos, devendo-se validar estes conhecimentos e ampliá-los em bovinos (FARID et al., 2013; SILVEIRA et al., 2011).

As concentrações de PON1 no periparto refletem fatores característicos deste período, onde há mobilização de gordura, redução da ingestão de matéria seca, início da lactação e estresse oxidativo causado pelo processo inflamatório (KRAUSE, et al., 2013), como laminite sendo assim, provavelmente quanto maior o desafio metabólico imposto às vacas no periparto maiores serão os níveis de PON1, o que talvez possa ser a justificativa para a não ocorrência de diferença estatística entre todo período de

transição nos animais avaliados, tendo em vista que os bovinos possuíam uma produção leiteira média.

Segundo MOBASHERI (2004), altos índices de glicemia estão relacionados com a presença de laminite, principalmente em equinos, citando a importância do fluxo contínuo de glicose às lâminas do casco associado à insuficiência sistêmica no dígito e à diminuição da função da enzima glucose transporter 4 (GLUT4) no sistema digital, porém em bovinos essa teoria é muito discutida e controversa. No presente trabalho os valores encontrados estavam, em sua maioria dentro dos parâmetros fisiológicos (45mg/dl a 75 mg/dl) não sendo encontrado diferença nas concentrações glicêmicas entre grupos (Figura 1C), fato que talvez possa ser explicado pela glicose não ser um marcador específico para ruminantes, tendo em vista o mecanismo de insulino resistência periférica que é desencadeado em bovinos visando a maior produção leiteira durante esse período, sendo caracterizado por redução do transporte de glicose para os demais tecidos (KANGDUK CHOI AND YOUNG-BUM KIM, 2010). As concentrações de glicose encontradas também podem estar relacionadas com as concentrações de AGNE, visto que esta mobilização de tecido adiposo permite que a glicose seja redirecionada para a glândula mamária, entretanto estas adaptações metabólicas estão acompanhadas por alterações inflamatórias (CONTRERAS SORDILLO et al., 2011).

A MMP9 está diretamente relacionada com o aparecimento da pododermatite asséptica, visto que tem como função, em momentos de multiplicação desordenada, a destruição da membrana basal do casco reduzindo a sustentação e tornando-o mais vulnerável à laminite (KATWA et. al 1999). Nesse estudo não foi verificada diferença estatística ($p > 0,05$) entre grupos (Figura 1A), talvez, pelo fato da forma subclínica ainda não ter caracterizado disfunção de sustentação do aparelho suspensório do dígito (MULLING, 2002), assim como encontrou KNOTT (2007), ao avaliar a presença de lesões podais em novilhas, que apresentavam laminite clínica, corroborando com a informação de que as concentrações de MMP-9 não estão relacionadas a patogênese precoce de distúrbios podais, diferentemente da PON1.

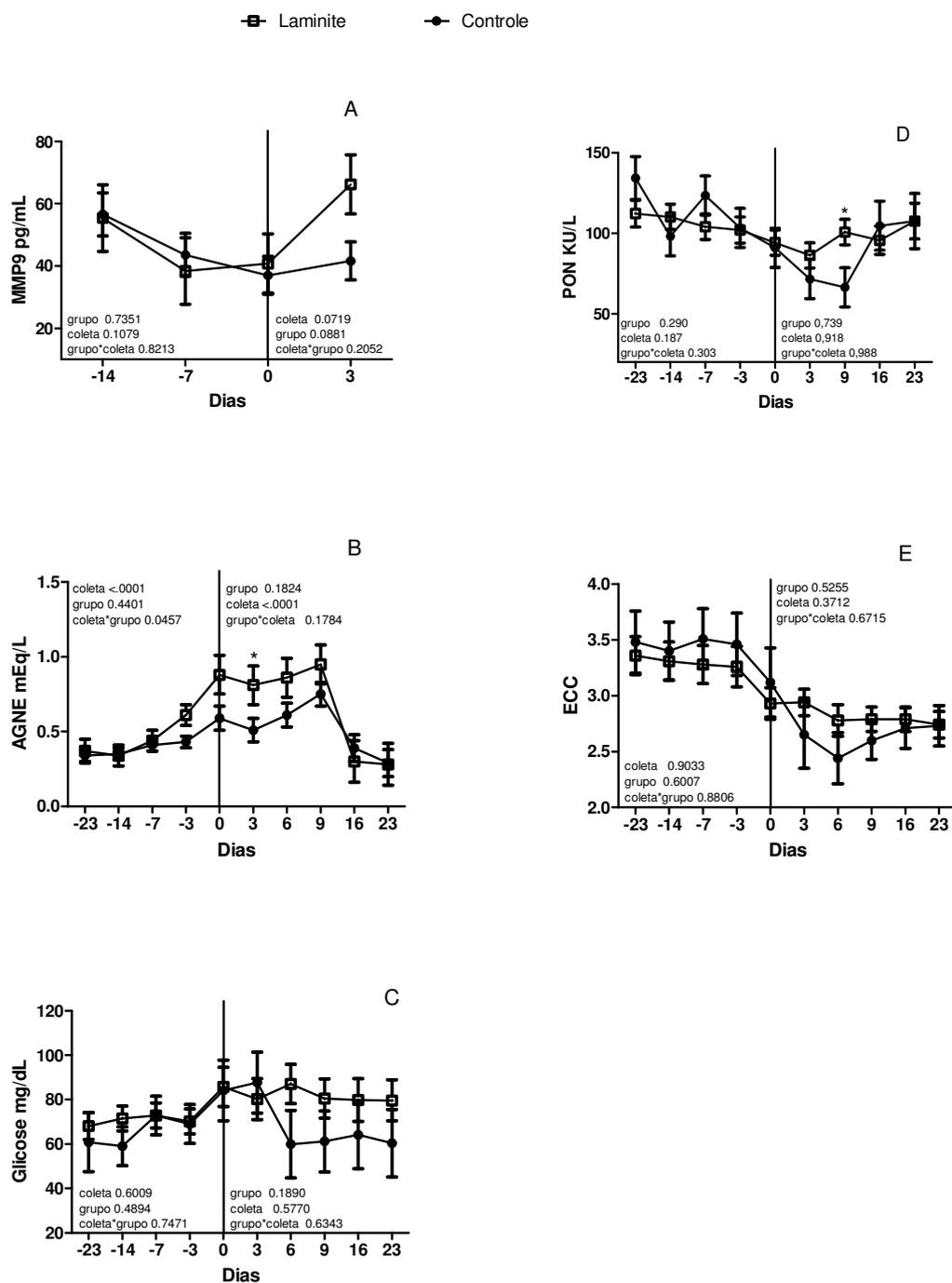
BICALHO et al. (2011) cita a relação do ECC com a presença de laminite e espessura de coxins digitais, citando que, vacas com laminite clínica apresentaram ECC e espessura de coxim digital inferior, visto que o coxim tem como principal função o amortecimento da concussão do dígito ao solo, sendo assim quanto menor for a espessura desta região anatômica maior será a predisposição à lesões associadas à laminite. Nesse estudo foi possível detectar redução de ECC para ambos os grupos, durante o período transicional (Figura 1E), porém, diferença ($p < 0,05$) não foi observada entre grupos. Há controvérsias no que tange o efeito do ECC em afecções podais. Segundo BERNABUCCI (2005) há relação entre escore condição corporal e incidência de inflamações. BUCKLEY (2003) relata que vacas que perdem mais condição corporal no periparto apresentam maior concentração de AGNE, e possivelmente, desta forma ocorre maior incidência de distúrbios metabólicos assim como laminite devido aos eventos inflamatórios e oxidativos proporcionados por esses processos. O aumento das concentrações plasmáticas de AGNE é resultado do aumento das taxas de lipólise apresentando profundo impacto no escore de condição corporal.

Pesquisa feita por Bernabucci (2005) sugere a inclusão de ECC e BEN como uma ferramenta para avaliar o bem estar das vacas leiteiras (ROCHE et al. 2009). Além disso, relatou a influência do ECC no pré-parto sobre as proteínas de fase aguda e marcadores do metabolismo energético durante o periparto, indicando assim que existe uma possível ligação nas alterações de tais marcadores.

Apesar de não existir diferença entre grupos nos níveis de AGNE, vacas com lesões associadas à laminite subclínica apresentaram níveis acima dos valores fisiológicos (0,4 meq/L no pré parto e 0,7 meq/L no pós parto, Schneider et. al. 2010) durante todo período de transição, podendo assim pressupor que tais animais sofreram mais com o BEN nesse período, talvez pelo fato de que a laminite poder aumentar os níveis de cortisol diminuindo a ingestão de matéria seca e, consecutivamente, interferindo negativamente no status metabólico e energético do animal (Ferreira, 2003)

Em equinos, a síndrome metabólica vem sendo muito discutida como uma das causas de laminite. FRANK et. al. (2005) cita que, em muitos casos a

laminite vem acompanhada de uma síndrome que inclui resistência à insulina e obesidade, além disso, também discute sobre a deficiência de GLUT 4 no tecido podal, fato esse que já foi mencionado anteriormente. O autor comenta que o tecido adiposo é o responsável pela liberação de várias substâncias pró inflamatórias no organismo como adiponectina, resistina, grelina, interleucinas, citocinas e fator de necrose tumoral (FRANK et. al. 2005). No caso do animal obeso ocorre uma inflamação que, apesar de apresentar em baixo grau, se mostra crônica. Com o passar do tempo esse evento crônico desencadeia a produção de MMPs no casco (BAILEY et al., 2004) e acarreta na morte lisossomal com descolamento das lâminas epidérmicas do tecido podal (POLLITT et al., 1998). Porém, em bovinos, o tecido adiposo está sendo mais relacionado com os coxins digitais do que com a síndrome descrita em equinos, talvez pelo fato de que essa estrutura possui maior relevância no processo de amortização do impacto do dígito ao solo quando comparada com equinos, onde a maior parte desse processo é feito somente pelas lâminas epidermais.



*Significa diferença significativa entre grupos no dia.

Figura 1. Variação dos níveis de marcadores metabólicos em vacas leiteiras com e sem laminite subclínica durante o período periparto. A. MMP9; B. AGNE; C. Glicose; D. PON1; E. ECC.

A estimativa de acurácia de cada marcador para laminite subclínica está ilustrada na Tabela 3. Os melhores resultados de acurácia, quando foram feitas análises dos marcadores em combinação, foram encontrados com AGNE e PON1 no pré parto (52,9%) e AGNE, ECC e PON1 no pós parto (76,5%). Sendo assim, tais valores caracterizam a importância do uso desses marcadores no diagnóstico, possivelmente preventivo, da forma clínica da enfermidade.

Tabela 3. Percentual de acurácia individual de AGNE, glicose, MMP9, PON1 e ECC para diagnóstico de laminite subclínica durante o período de transição de vacas leiteiras.

Marcador	Acurácia	
	Pré parto (%)	Pós parto (%)
AGNE (mEq/L)	41,2	49,5
GLICOSE (mg/dL)	47,1	42,3
MMP9 (pg/mL)	29,4	52,9
PON1 (KU/L)	52,9	58,8
ECC	35,3	33,0

A partir dos resultados encontrados, principalmente de AGNE e PON1 no presente estudo é possível considerar que a laminite é uma enfermidade de etiologia multifatorial, tendo relação direta com as concentrações séricas de vários parâmetros ligados à imunidade e metabolismo energético, corroborando com resultados encontrados por ZHANG et al. (2005) em equinos, podendo servir para monitorar o estado de saúde do período de transição de vacas leiteiras.

4. CONCLUSÕES

Vacas com laminite subclínica apresentam variação nos níveis de AGNE e PON1 nos primeiros nove dias pós-parto, porém sem alteração nos níveis médios de AGNE, MMP9, glicose e ECC durante o período de transição.

Os marcadores ECC, PON1 e AGNE, quando analisados em combinação, mostraram-se mais expressivos no diagnóstico precoce de laminite durante o periparto, caracterizando a associação de fatores inflamatórios e energéticos na patogênese das lesões associadas à laminite subclínica.

1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAILEY, S.R.; MARR, C.M.; ELLIOTT, J. Current research and theories on the pathogenesis of acute laminitis in the horse. **The Veterinary Journal**, v.167, p.129–142, 2004.

BERNABUCCI, U.; RONCHI, B.; LACETERA, N.; NARDONE, A. Influence of Body Condition Score on Relationships Between Metabolic Status and Oxidative Stress in Periparturient Dairy Cows. **J. Dairy Sci.**, v.88, p. 2017–2026, 2005.

BICALHO, R. C. Lameness in dairy cattle: a debilitating disease or a disease of debilitated cattle? In: **WESTERN DAIRY MANAGEMENT CONFERENCE**, 10., Reno, 2011,. Anais eletrônicos;

BIONAZ, M.; TREVISI, E.; CALAMARI, L.; LIBRANDI, F.; FERRARI, A.; BERTONI, G. Plasmaparaoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. **J. of Dairy Sci.**, v. 90,p. 1740–1750. 2007;

BUCKLEY, F. K.; O’SULLIVAN, J. F.; MEE, R. D.; DILLON, P. Relationships among milk yield, body condition, cow weight, and reproduction in spring-calved Holstein-Friesians. **J. DairySci.**, v. 86, p. 2308–2319, 2003.

BRUIJNIS, M.R.; HOGEVEEN, H.; STASSEN, E.N. Assessing economic consequences of foot disorders in dairy cattle using a dynamic stochastic simulation model. **J Dairy Sci.**, v. 93(6), p. 2419-2432. 2009.

CERON, J.J.; TECLES, F.; TVARIJONAVICIUTE, A. Serum paraoxonase 1 (PON1) measurement: an update. **BMC Vet Res.** v.10, p 74. 2014.

CONTRERAS, G. A.; SORDILLO, L. M. Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 34, p. 281-289, 2011.

FALCÃO, M. F. M. **Lesões na junção derme-epiderme do casco de vacas de aptidão leiteira de descarte com e sem sinais clínicos de laminite**. 2010. 74 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, UFMG;

FARID, A. S.; HONKAWA, K.; FATH, E. M.; NONAKA, N.; & HORII, Y. Serum paraoxonase-1 as biomarker for improved diagnosis of fatty liver in dairy cows. **BMC veterinary research**. v. 9(1), p. 73. 2013.

FRANK N.; ANDREWS, F.M.; ELLIOTT, S.B. et al. Effects of rice bran oil on plasma lipid concentrations, lipoprotein composition, and glucose dynamics in mares. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 2509-2518, 2005.

HAMMON, D. S.; EVJEN, I. M.; DHIMAN, T. R., GOFF, J. P., WALTERS, J. L. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 113, n. 1-2., p. 21-29, 2006.

KANGDUK CHOI AND YOUNG-BUM KIM. Molecular Mechanism of Insulin Resistance in Obesity and Type 2 Diabetes. **The Korean Journal of Internal Medicine**, v. 25, p. 119-129, 2010.

KATWA LC, JOHNSON PJ, GANJAM VK, KREEGER JM, MESSER NT, Expression of endothelin in equine laminitis. **Equine Veterinary Journal** (3):243-7. 1999.

KOSKINEN et al. **Arthritis Research & Therapy**. 2011. 13: R184 :<http://arthritis-research.com/content/13/6/R184>.

KNOTT, L.; TARLTON, J. F.; CRAFT, H.; WEBSTER, A. J. F. Effects of housing, parturition and diet change on the biochemistry and biomechanics of the support structures of the hoof of dairy heifers. **The Veterinary Journal**, v. 174, p. 277–287, 2007.

KRAUSE, A. R. T.; PFEIFER, L. F. M.; MONTAGNER, P.; WESCHENFELDER, M. M.; SCHWEGLER, E.; LIMA, M. E.; XAVIER, E. G.; BRAUNER, C. C.; SCHMITT, E.; DEL PINO, F. A. B.; MARTINS, C. F.; CORREA, M. N.; SCHNEIDER, A. Associations between resumption of postpartum ovarian activity, uterine health and concentrations of metabolites and acute phase proteins during the transition period in Holstein cows. **Animal Reproduction Science**, v. 145, p. 8-14, 2014.

LINFORD, R.L. Laminite (aguamento). In: SMITH, B.P. **Medicina interna de grandes animais**. 3 ed. Barueri: Manole, 2006. p. 1116-1124.

LITTELL, R.C.; HENRY, P.R.; AMMERMAN, C.B. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. **J. Ani. Scie**, v.76, p.1216-1231, 1998.

MOBASHERI, A.; CRITCHLOW, K.; CLEGG, P. D.; CARTER, S. D. AND CANESSA, C. M. Chronic equine laminitis is characterised by loss of GLUT1, GLUT4 and ENaC positive lamellar keratinocytes. **Equ. Vet. J.** v.36, n.3, p. 248-254, 2004;

MULLING, C. K. W. Theories on the pathogenesis of white line disease: anatomical perspective. In: **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON LAMENESS IN RUMINANTS**, 12., 2002, Orlando. Anais eletrônicos. 2002;

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrients requirements of the dairy cattle**. 7 ed. Washington, D.C.: 381p. 2001.

ORTOLANI, E. L. **Enfermidades do Período de Transição**. Ciência Animal Brasileira, USP, 2009. p.. 1-8.

POLLITT C. C.; PASS M. A.; POLLITT S. Batimastat (BB-94) inhibits matrix metalloproteinases of equine laminitis. **Equine Veterinary Journal**. v.26, p.119-124. 1998.

ROCHE, J. R.; FRIGGENS, N. C.; KAY, J. K. Berry. Invited review: Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 5769–5801, 2009.

SILVEIRA, P. A. S.; CORREA, M. N.; DEL PINO, F. A. B.; HALFEN, J.; GARLET, T; SCHNEIDER, A. Efeito de polimorfismo no gene da paraoxonase (PON1) sobre a sua atividade sérica. Anais eletrônicos. **ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**, Pelotas, 2011.

ŠOSTAR-TURK, S.; SIMONIČ, M.; PETRINIĆ, I. Wastewater treatment after reactive printing. **Dyes and Pigments**, v. 64, n. 2, p. 147-152, 2005.

THOEFNER, M. B.; POLLITT, C. C.; VAN EPS, A. W.; MILINOVICH, G. J.; TROTT, D. J.; WATTLE, O.; ANDERSEN, P. H. Acute bovine laminitis: A new induction model using alimentary oligofructose overload. **J. Dairy Sci.**, v. 87, p.2932–2940, 2004.

VAN KNEGSEL, A.T.M.; VAN DEN BRAND, H.; DIJKSTRA, J. *et al.* Effect of glucogenic vs. lipogenic diets on energy balance, blood metabolites and reproduction in primiparous and multiparous dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.90, p.3397-3409, 2007.

WILDMAN, E.E.; JONES, G. M.; WAGNER, P. E. AND BOMAN, R. L. A Dairy Cow Body Condition Scoring System and Its Relationship to Selected Production Characteristics. **J. of Dairy Sci.**, v.65, p. 495-501, 1982.

WINCKLER, C.; WILLEN, S. The reliability and repeatability of a lameness scoring system for use as an indicator of welfare in dairy cattle. **Acta Agriculture Scandinavia**, London, n.30, p.103-107, 2001.

ZHANG, X.; CHEN, Y.; JENKINS, L.W. et al. Bench-to-bedside review: Apoptosis/programmed cell death triggered by traumatic brain injury. **Critical Care**. v.9, p.66-75, 2005

6. Conclusão geral

Vacas leiteiras no período de transição com lesões associadas à laminite subclínica não apresentam sinais radiográficos de alterações angulares entre a terceira falange e o estojo córneo. Porém, lesões crônicas na região do processo extensor podem ser uma consequência clínica em vacas com episódios de laminite, sem rotação de falange.

Ainda, vacas com laminite subclínica apresentam variação nos níveis de AGNE e PON1 nos primeiros nove dias pós-parto, porém sem alteração nos níveis médios de AGNE, MMP9, glicose, PON1 e ECC durante o período de transição. Os marcadores ECC, PON1 e AGNE, quando analisados em combinação, mostraram-se mais expressivos no diagnóstico precoce de laminite subclínica durante o periparto caracterizando a associação de fatores inflamatórios e energéticos na patogênese das lesões associadas à essa enfermidade.

7. Referências

BARNABÉ, P. A. **Alterações radiográficas nos dedos de bovinos claudicantes**. 2005. 50f. Tese (Doutorado em cirurgia veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, São Paulo.

BERTONI, G., TREVISI, E., HAN, X., BIONAZ, M. Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. **J. Dairy Sci**, v 91, p. 3300-3310. 2008.

BICALHO, R. C. Lameness in dairy cattle: a debilitating disease or a disease of debilitated cattle? In: **WESTERN DAIRY MANAGEMENT CONFERENCE**. 10., Reno, 2011. Anais eletrônicos. 2011.

BIONAZ, M.; TREVISI, E.; CALAMARI, L.; LIBRANDI, F.; FERRARI, A.; BERTONI, G. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions and liver function in transition dairy cows. **Journal Dairy of Science**, v. 90, p. 1740–1750, 2007.

BIONAZ, M.; THERING, B.J.; LOOR, J.J. Fine metabolic regulation in ruminants via nutrient-gene interactions: Saturated long-chain fatty acids increase expression of genes involved in lipid metabolism and immune response partly through PPAR-alpha activation. **Br. J. Nutr.** v. 107, p. 179-191. 2012.

BORGES, J. R.; SANTIAGO, S. F.; SILVA, N. L. Custos do tratamento e descarte causados por doenças digitais em rebanho leiteiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 2, n. 1, p. 23-26, 1995.

BORGES, N.C.A. et al. Post mortem radiographic study of the digits of bovine raised in natural grazing environment. In: **SIMPÓSIO INTERNACIONAL, 14º & CONFERENCIA LAMENESS IN RUMINANTES**. Anais. 2006, Uruguai. Uruguai: Central de impressões, p. 43-44.

DRACKLEY, J.K. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier?. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2259–2273, 1999.

DUFFIELD, T.; HERDT, T. Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 16, p. 231–253, 2000.

ENTING, H.; KOUIJ, D.; DIJKHUIZEN, A. A.; HUIRNE, R. B. M.; NOORDHUIZEN-STASSEN, E. N. Economic losses due to clinical lameness in dairy cattle. **Livestock Production Science**, v. 49, p. 259-267. 1997.

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.

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.

GREENOUGH, P.R. **Bovine laminitis and lameness: a hands-on approach**. 3.ed. Philadelphia: Elsevier, 2007. 311p.

HUZZEY, J.M; WEARY, D.M.; VON KEYSERLINGK, M.A.G. Board-invited review: using behavior to predict and identify ill health in animals. **Journal of Animal Science**, v. 87 (2), p. 770-777. 2009.

JANOVICK, N.A. AND DRACKLEY, J.K. Prepartum dietary management of energy intake affects postpartum intake and lactation performance by primiparous and multiparous holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v 93, p. 3086-3102. 2010.

KNOTT, L.; TARLTON, J. F.; CRAFT, H.; WEBSTER, A. J. F. Effects of housing, parturition and diet change on the biochemistry and biomechanics of

the support structures of the hoof of dairy heifers. **The Veterinary Journal**, v. 174, p. 277–287. 2007.

LINFORD, R.L. Laminitis (aguamento). In: SMITH, B.P. **Medicina interna de grandes animais**. 3 ed. Barueri: Manole, 2006. p. 1116-1124.

MOBASHERI, A., CRITCHLOW, K., CLEGG, P.D., CARTER, S.D., CANESSA, C.M. Chronic equine laminitis is characterised by loss of GLUT1, GLUT4 and ENaC positive laminar keratinocytes. **Equine Veterinary Journal**, v. 36, p. 248-254. 2004.

NICOLETTI, J. L. M. Manual de podologia bovina. São Paulo: Manole, 2004. 126p.

PITTMAN, D.Q.J. A neuro-endocrine-immune symphony. **Journal of Neuroendocrinology**. v. 23, p. 1296–1297. 2011.

SCARAMUZZI R.J., CAMPBELL B.K., DOWING J.A., KENDALL N.R., KHALID M., MUNOZ-GUTIERREZ M., SOMCHIT A. A review of the affects of supplementary nutrition in the eweonth econcentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculo genesis and ovulation rate. **Reprod. Nut. Develop**, v. 4, n. 46, p. 339-354. 2006.

SMITH, B.P. **Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais**. 3. ed. Editora Manole, 2006. 1784p.

STANEK, C. Examination of the bovine locomotor system. In: GREENOUGH, P.R.; WEAVER, A.D. **Lameness in cattle**. 3 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997. p. 14-23.

THOEFNER, M.B., WATTLE, O., POLLITT, C.C. et al. Histopathology of oligo fructose-induced acute laminitis in heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 2774-2782. 2005.

TREVISI, E.; AMADORI, M.; ARCHETTI, I.; LACETERA, N.; BERTONI, G. Inflammatory response and acute phase proteins in the transition period of high-yielding dairy cows. **Acute Phase Proteins as Early Non-Specific Biomarkers of Human and Veterinary Diseases**, v. 15, p. 355–379. 2011

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

VAN EPS A.W. & POLLITT C.C. Equine laminitis induced with oligofructose. **Equine Vet. J.**, v. 38(3), p. 203-208. 2006.

VERMUNT, J.J.; GREENOUGH, P.R. Predisposing factors of laminitis in cattle. **British Veterinary Journal**, v. 150, n. 2, p. 151-164, 1994.

8. Anexos.

Artigo 4.

Submetido e formatado segundo as normas da revista Semina.

1
2 **Concentração de elementos inorgânicos no tecido córneo do casco e sua relação com**
3 **afecções podais associadas à laminite em vacas leiteiras**

4
5 **Concentration of inorganic elements in the corneal tissue of the hoof and its relationship**
6 **with foot problems associated with laminitis in dairy cows**

7
8 Autor¹

9
10 **Resumo**

11 O objetivo deste trabalho foi avaliar as concentrações de minerais no tecido córneo de vacas
12 leiteiras da raça Holandês saudáveis e com afecções podais associadas à laminite. Foram
13 utilizados 21 bovinos, fêmeas, multíparas, da raça Holandês, com produção média de 24 litros
14 de leite/dia, submetidas a manejo semi extensivo de alimentação. Os animais foram avaliados
15 quanto ao seu escore de locomoção e divididos em dois grupos, (EL) acima de dois,
16 apresentando lesões associadas à laminite (vacas com laminite - VCL) e EL igual a zero (vacas
17 sem laminite - VSL). Foi realizada uma coleta de tecido córneo com aproximadamente 30 mm²
18 de área da região látero-lateral da muralha do casco, a partir destas amostras foi realizada
19 análise de Cálcio, Fósforo, Zinco e Magnésio. Foi realizada coleta de sangue para análise dos
20 níveis de cálcio. Os animais do grupo VCL apresentaram níveis de magnésio menores
21 (P=0,008), já com o cálcio foi observado aproximação da significância (P=0,06) para menores
22 concentrações desse mineral quando comparado às vacas sadias (VSL) apesar de todos os
23 animais serem normocalcêmicos. Os demais minerais avaliados não apresentaram diferença
24 entre grupos. Em conclusão, vacas com lesões associadas à laminite apresentam menores
25 concentrações de Magnésio no tecido córneo digital, sem variação nas concentrações de Fósforo
26 e Zinco. A relação entre lesões podais e os níveis de cálcio no tecido digital precisa ser avaliada
27 em novos estudos.

28 **Palavras-chave:** Bovinos, casco, macrominerais, microminerais, pododermatite asséptica.

29 **Abstract**

30 The locomotor system disorders have been increasingly cited as a source of great economic
31 losses in dairy farming. The bioavailability and retention of minerals by the body have been
32 reporting in scientific studies, showing the importance of these elements in the metabolism in
33 different systems, therefore the aim of this study was to evaluate the mineral concentrations in

¹ 2014.

34 the corneal tissue of healthy Holstein cows and cows with foot problems associated with
35 laminitis. 21 females of Holstein breed, multiparous cows, with average production of 24 liters
36 of milk day⁻¹, subjected to semi extensive management were used. The animals were evaluated
37 for their locomotion score and divided into two groups, (EL) above two, showing lesions
38 associated with laminitis (cows with laminitis - VCL) and EL zero (cows without laminitis -
39 VSL). It was performed one corneal tissue collection with about 30 mm² the lateral-lateral
40 region of the hoof wall, which from these samples was performed analysis of Calcium,
41 Phosphorus, Zinc and Magnesium. In conclusion, the concentration of magnesium in the digital
42 corneal tissue was lower in lame cows, while other minerals did not change between animals
43 with and without foot lesions associated with laminitis, however it was observed a significance
44 tendency in calcium levels.

45 **Key words:** Bovine, hoof, macrominerals, microminerals, pododermatitis aseptic.

46 **Introdução**

47

48 Afecções podais estão entre as enfermidades que mais afetam o bem-estar e a saúde
49 animal (TADICH et al., 2013), estimando-se prejuízos econômicos de até 40% em vacas
50 leiteiras (NICOLETTI, 2004). A incidência de doenças que causam claudicação em bovinos
51 aumentou nos últimos anos de tal modo que atualmente a claudicação é considerada um dos
52 principais problemas na bovinocultura de leite (BLOWEY, 2008), visto que vacas mancadas
53 diminuem o consumo de alimento, em virtude da dor e relutância à movimentação, e podem
54 apresentar perda na produção de leite de até 1,5kg dia⁻¹ (WARNICK et al., 2001) ou entre 5 e
55 20% na produção de leite por lactação (SILVA et al., 2006).

56 Existe um amplo consenso de que a maioria das lesões clínicas do sistema locomotor são
57 resultado, ou estão relacionadas, com a má qualidade do casco (ANDRIEU, 2008), sendo a
58 nutrição um fator diretamente relacionado com a qualidade da epiderme do tecido córneo podal
59 e, por conseguinte, com a ocorrência de afecções digitais em rebanhos bovinos (PILACHAI et.
60 al., 2013). O desenvolvimento e a qualidade de formação da cápsula do casco são afetados por
61 deficiências nutricionais e por condições ambientais desfavoráveis, possibilitando maior
62 desgaste da sola e, conseqüentemente, tornando-o mais suscetível à ocorrência de lesões digitais
63 (TOMLINSON et al., 2004). Entretanto, pouco se sabe sobre a função de alguns macro e
64 microminerais no processo de queratinização desse tecido.

65 A capacidade do casco em suportar as condições ambientais depende principalmente de
66 suas propriedades físicas (dureza, resistência e viscoelasticidade) que são determinadas pela sua
67 composição química (BAGGOTT et al., 1988; WINKLER et al., 2012). Seguindo nesse
68 contexto, acredita-se que, a concentração de minerais está diretamente associada à integridade
69 dos tecidos queratinizados, portanto, possivelmente, interferindo na qualidade do tecido, com
70 possibilidade de conseqüências clínicas ao estojo córneo.

71 A biodisponibilidade e retenção de minerais pelo organismo têm sido demonstrada em
72 estudos científicos, relatando a importância desses elementos no metabolismo em distintos
73 sistemas, sendo esses envolvidos em processos bioquímicos, hormonais, oxidativos e
74 enzimáticos (ANDRIEU, 2008). Há relatos que citam a importância de zinco, cálcio, magnésio
75 e fósforo, por exemplo, na produção leiteira e fertilidade de bovinos, porém ainda são escassos
76 os estudos que associam os efeitos desses macro e micro elementos na integridade do casco
77 (KELLOGG et al., 2004; SICILIANO-JONES et al., 2008).

78 Ainda, em algumas afecções podais ocorre ausência completa da síntese química ou
79 alterações na ligação de queratina e proteínas estruturais do casco com resultante deterioração
80 da organização macromolecular, juntamente com alteração da força mecânica de movimento do
81 dígito ao solo (HENDRY et al., 1997; WINKLER et al., 2012).

82 Assim, apesar de grandes avanços na pesquisa nos últimos anos, a fisiopatologia
83 envolvendo a ocorrência de enfermidades locomotoras em bovinos leiteiros permanece não
84 completamente esclarecida, tendo em vista que, provavelmente, eventos inflamatórios e
85 metabólicos possam estar influenciando a concentração de elementos inorgânicos,
86 desequilibrando a homeosíntese de formação e integridade do casco.

87 O presente estudo teve por objetivo avaliar as concentrações de minerais no tecido córneo
88 de vacas leiteiras da raça Holandês saudáveis e com afecções podais associadas à laminite.

89

90 **Material e Métodos**

91

92 Neste estudo foram utilizados 21 bovinos, fêmeas, multíparas, da raça Holandês, com
93 produção média de 24 litros de leite dia⁻¹, submetidas a manejo semi extensivo de alimentação.
94 Os animais foram avaliados quanto ao seu escore de locomoção, considerando uma escala de
95 zero a quatro, onde zero representa ausência de anormalidades de andadura e quatro,
96 claudicação grave (WINCKLER; WILLEN, 2001). Após, foram divididos em dois grupos,
97 sendo onze vacas com escore de locomoção (EL) acima de dois, apresentando lesões associadas
98 à laminite (vacas com laminite - VCL) e dez vacas saudáveis (vacas sem lesões associadas à
99 laminite - VSL), apresentando EL igual a zero. No exame clínico específico do sistema
100 locomotor, todos os animais do grupo VCL apresentaram lesões na porção distal do sistema
101 podal (casco).

102 Foi realizada uma coleta de tecido córneo com aproximadamente 30 mm² de área de
103 acordo com a metodologia de Baggott et al. (1988), com no mínimo três gramas de amostra, da
104 região látero-lateral da muralha do casco. A amostra foi coletada da unha lesionada nos animais
105 do grupo VCL e, aleatoriamente, nas vacas do grupo VSL, conforme Figura 1, com rineta
106 “Loop”. A partir destas amostras foi realizada análise de micro e macrominerais, de acordo com
107 a metodologia para avaliação de minerais do tecido córneo (AOAC, 13^o, 1980), para
108 determinação dos níveis de Cálcio, Fósforo, Zinco e Magnésio.

109 No mesmo momento das coletas de amostra de casco, também foram realizadas coletas
110 de sangue, através de punção do complexo artério-venoso coccígeo, com sistema *vacutainer*
111 em tubos sem anticoagulante. Após as amostras foram centrifugadas para posterior análise de
112 Cálcio total, por método colorimétrico em espectrofotômetro.

113 A análise estatística foi realizada pelo programa Statistix 8.0, através do teste de
114 Wilcoxon e correlação de Pearson entre os minerais de vacas com e sem lesões podais.

115

116 **Resultados e Discussão**

117 As lesões de maior ocorrência nos animais avaliados (Tabela 1) foram úlcera de sola
118 (25%), doença da linha branca (20%), hemorragia de sola (15%) e linhas de estresse (15%),
119 resultados relativamente semelhantes ao verificado por Falcão (2010), onde linhas de estresse
120 foi a anormalidade de muralha do casco mais incidente, seguida de doença da linha branca e
121 hemorragia de sola.

122 A doença da linha branca é a enfermidade mais comumente associada à laminite
123 subclínica (GREENOUGH, 2007), manifestando vínculo a outras complicações como:
124 abscessos, separação da sola, fissura de muralha, alargamento e hemorragia de sola
125 (MÜLLING, 2002), as quais são decorrentes de alterações na qualidade do estrato córneo e na
126 espessura da linha branca no casco (MÜLLING, 2002).

127 Comparando-se os resultados obtidos para as concentrações de minerais do tecido córneo
128 dos cascos das vacas deste estudo, foi observada diferença entre grupos apenas nas
129 concentrações de Magnésio ($P=0,008$), fato não estabelecido para os minerais Cálcio, Fósforo e
130 Zinco ($P>0,05$) (Tabela 2).

131 As concentrações séricas de cálcio não diferiram entre os grupos VCL e VSL, sendo
132 $9,23\pm 1,2$ mg dL⁻¹ e $10,60\pm 1,3$ mg dL⁻¹, respectivamente ($P>0,05$), apresentando-se, ambos os
133 grupos, dentro dos valores de referência para a espécie (normocalcêmicos) (MARTINEZ et al.,
134 2012). Sabe-se que a diferenciação das células epidérmicas é muito sensível às alterações nos
135 níveis plasmáticos de cálcio. Em animais com hipocalcemia, Nocek (1997) e Mülling et. al.
136 (1999) verificaram tecidos córneos com deficiência na queratinização, por influencia do cálcio
137 na diferenciação das células epidermais. Killic (2007) avaliou o perfil mineral de vacas
138 claudicantes e saudáveis e também identificou animais normocalcêmicos, entretanto menores
139 concentrações séricas de fósforo e zinco foram determinadas em vacas claudicantes,
140 demonstrando a deficiência destes minerais não só no tecido córneo como também em níveis
141 séricos.

142 Nos animais do grupo VCL observou-se aproximação da significância ($P=0,06$) para
143 menores concentrações de cálcio comparado às vacas sadias (VSL) (Figura 2. a), apesar dos
144 níveis sanguíneos terem sido semelhantes ($P>0,05$). Segundo Mülling et al. (1999) há relação
145 entre a concentração de cálcio no tecido córneo e produção de queratinócitos, promovendo

146 ativação da enzima transglutaminase epidermal, que participa do processo de ligação entre as
147 fibras de queratina do envelope celular e diferenciação final das células epidérmicas.
148 Casagrande (2013) relatou que animais hipocalcêmicos apresentam maior desgaste da muralha
149 do casco do que os normocalcêmicos, evidenciando-se, assim, a interferência das concentrações
150 de cálcio no metabolismo podal. Especula-se que, a normocalcemia e a discreta deficiência do
151 Íon cálcio ($P=0,06$) no tecido córneo, possa estar relacionada à insuficiência circulatória no
152 tecido digital em vacas acometidas de laminite, que, associada as menores concentrações locais
153 de magnésio neste estudo ($P=0,008$), levando-se em consideração sua função de cofator
154 enzimático, contribuiria para a ocorrência das alterações podais encontradas.

155 As vacas do grupo VCL apresentaram menores concentrações de Magnésio no tecido
156 córneo do que as do grupo VSL ($P=0,008$). Até o momento, existem poucos registros científicos
157 enfatizando que concentrações de magnésio influenciam diretamente na formação do casco,
158 entretanto, sabe-se, da íntima relação que o magnésio exerce sobre a homeostase do cálcio,
159 apresentando relevância no processo de queratogênese (MÜLLING et al., 1999).

160 O magnésio possui um papel importante na homeostase do cálcio, afetando seu
161 metabolismo de duas formas principalmente. A primeira é reduzindo a secreção do
162 paratormônio e a segunda é reduzindo a sensibilidade dos tecidos a esse hormônio. Em
163 vacas com hipomagnesemia, mesmo desenvolvendo hipocalcemia, as concentrações do
164 paratormônio não subiram e sendo possível concluir que o magnésio é essencial pra a liberação
165 do paratormônio e também para a síntese de 1,25-dihidroxitamina D (LEAN et al., 2006).
166 A interferência da queda das concentrações de magnésio na sensibilidade dos tecidos ao
167 paratormônio ocorre porque ao se ligar ao seu receptor nos ossos e no rim ativa a
168 adenilciclase resultando na produção do segundo mensageiro AMP cíclico, já em outros
169 tecidos, o receptor do paratormônio ativa a fosfolipase C, que acarreta na formação dos
170 segundos mensageiros diacilglicerol e inositol 1,4,5-trifosfato (GOFF, 2004).

171 Na estrutura do casco, Mülling (2000) relata a importância da relação entre o complexo
172 Zinco e Cálcio. Neste estudo, vacas do grupo VCL apresentaram correlação negativa entre estes
173 minerais ($r=-0,71$; $P=0,02$), demonstrando que, animais com menores níveis de cálcio exibiram
174 maiores concentrações de zinco. Esta correlação negativa sugere que vacas claudicantes e com
175 lesões podem estar com déficit na diferenciação final das células epidérmicas do tecido córneo,
176 levando em consideração a interação entre esses minerais, onde o zinco participa no processo de
177 queratinização e o cálcio, na função de cornificação e diferenciação final das células
178 epidérmicas (MÜLLING et al., 1999). Portanto, tais resultados indicam que o processo de
179 cornificação, o qual é dependente de cálcio, deve estar prejudicado.

180 Embora não tenha sido observada diferença na concentração de zinco entre grupos
181 ($P=0,446$), tal mineral é um dos principais componentes nos processos de queratinização,
182 desempenhando um papel fundamental na formação das proteínas estruturais do casco

183 (MÜLLING, 2000). Vacas com concentrações insuficientes de zinco apresentam formação
184 deficiente de filamentos de queratina e diminuição no desenvolvimento dos queratinócitos
185 (TOMLINSON et al., 2004). Baggott (1988) relatou que, fêmeas bovinas claudicantes
186 apresentam menores concentrações de zinco do que vacas hígdas, além de possuírem tecido
187 córneo mais sensível, sugerindo deficiência de zinco ou insuficiência vascular. Várias hipóteses
188 têm sido discutidas quanto ao fornecimento de minerais na dieta, em sistemas de produção com
189 elevada incidência de problemas podais. Ballantine (2002), estudando vacas suplementadas com
190 fontes orgânicas de zinco identificou menores índices de distúrbios locomotores ligados ao
191 casco.

192 As concentrações de fósforo não foram diferentes entre grupos ($P=0,416$), assim como
193 PENEV (2012) não encontrou nenhuma relação entre a dureza do casco e concentração deste
194 macroelemento no tecido córneo, apesar de Baggott (1988) ter relacionado maior resistência da
195 muralha do casco em animais com maiores concentrações de fósforo na região. Casagrande
196 (2013) concluiu que vacas com elevadas concentrações séricas de fósforo exibiam cascos mais
197 saudáveis e resistentes, estando relacionados à maior síntese de queratina.

198 As análises das concentrações de minerais no tecido córneo de vacas leiteiras podem ser
199 consideradas índices objetivos para avaliação do metabolismo, saúde e resistência podal
200 (PENEV et al., 2013). Certas alterações encontradas no perfil mineral dos animais avaliados
201 neste estudo, devem ser melhor elucidadas, pois assim como relatou Baggott (1988) deve-se
202 considerar não somente alterações nas concentrações minerais, como também distúrbios
203 celulares, alterações patológicas, má absorção destes elementos na dieta ou até mesmo
204 transtornos no metabolismo. É relevante considerar a interferência de outras variáveis integradas
205 a este contexto, como o ambiente, manejo, nutrição, conformação, fase de lactação, faixa etária,
206 entre outros, tendo em vista seus efeitos agressivos a integridade do casco (FALCÃO, 2010).

207 Um fator importante a ser considerado na constituição de minerais do casco é a capacidade
208 higroscópica do tecido córneo podal. Higuchi et al. (2009) ressalta a possibilidade de absorção
209 não somente da água do solo para o casco, mas, também, de outros elementos que o constituem,
210 interferindo na variação da concentração de macro e microelementos neste tecido, que pode ser
211 influenciado pela sazonalidade, pluviosidade e sistema de manejo adotado (MAUCHLE et al.,
212 2008).

213 Assim, a concentração de Magnésio no tecido córneo digital foi inferior nas vacas com
214 claudicação e afecções podais. Os minerais Cálcio, Zinco e Fósforo não variaram em animais
215 com ou sem lesões podais associadas à laminite, contudo correlação negativa entre as
216 concentrações de Zinco e Cálcio no tecido digital foi observada.

217 E apesar das concentrações de cálcio sérico não terem variado entre os grupos VCL e
218 VSL, resultado oposto às concentrações no casco, estudos futuros envolvendo essas relações e a
219 interação desses componentes sistêmicos com o tecido digital precisam ser explorados,

220 considerando o nível metabólico do animal, perfil mineral sérico, nível nutricional e grau de
221 comprometimento digital.

222

223 **Agradecimentos**

224 Os autores agradecem à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
225 (CAPES) à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), ao
226 Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo apoio
227 financeiro e à Granja 4 irmãos pela disponibilidade da execução do projeto.

228

229 **Referências Bibliográficas**

230

231 ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. *Official methods of*
232 *analysis*. 13.ed. Washington, 1980.

233

234 ANDRIEU, S. Is there a role for organic trace element supplement in transition cow health? *The*
235 *Veterinary Journal*, London, v. 176, p. 77-83, 2008.

236

237 BAGGOTT, D. G.; BUNCH, K. J.; GILL, K. R. Variations in some inorganic components and
238 physical properties of claw keratin associated with claw disease in the british friesland cow.
239 *British Veterinary Journal*, London, v. 144, n. 6, p. 534-542, 1988.

240

241 BALLANTINE, H. T.; SOCHA, M. T.; TOMLINSON, D. J.; JOHNSON, A. B.; FIELDING,
242 A. S.; SHEARER, J. K., AND VAN AMSTEL, S. R. Effect of feeding complexed zinc,
243 manganese, copper and cobalt to late gestation and lactating dairy cows on claw integrity,
244 reproduction and lactation performance. *The Professional Animal Scientist*, Champaign, v.8,
245 p.211–218, 2002.

246

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

249

250 CASAGRANDE, F. P. *Perfil metabólico e mineral de vacas no período peri-parto: qualidade e*
251 *conformação dos cascos*. 2013. 125f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Curso de Pós-
252 graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais.

253

254 FALCÃO, H. M. *Lesões na junção derme-epiderme do casco de vacas de aptidão leiteira de*
255 *descarte com e sem sinais clínicos de laminite*. 2010. 74f. Dissertação (Mestrado em Medicina e
256 Cirurgia Veterinárias), Universidade Federal de Minas Gerais.

- 257
258 GOFF, J. P. Macromineral disorders of the transition cow. *The Veterinary Clinics of North*
259 *America-Food Animal Practice*, Oklahoma, v. 20, n. 3, p. 471-494, 2004.
260
- 261 GREENOUGH P. R.; VERMUNT, J. J. Evaluation of subclinical laminitis in a dairy herd and
262 observations on associated nutritional and management factors. *The Veterinary Record*, London,
263 v. 128, p. 11-17, 1991.
264
- 265 GREENOUGH, P.R. *Bovine laminitis and lameness: a hands-on approach*. Philadelphia:
266 Elsevier, 311p, 2007.
267
- 268 HENDRY, K. A.; MACCALLUM, A. J.; KNIGHT, C. H. AND WILDE, C. J. Laminitis in the
269 dairy cow: A cell biological approach. *Journal of Dairy Research*, Cambridge, v. 64, p.475–
270 486, 1997.
271
- 272 HIGUCHI, H.; KURUMADO, H; MORI, M.; DEGAWA, A.; FUJISAWA, H.; KUWANO, A.;
273 NAGAHATA, H. Effects of ammonia and hydrogen sulfide on physical and biochemical
274 properties of the clawhorn of Holstein cows. *The Canadian Journal of Veterinary Research*,
275 Ottawa, v. 73, p.15-20, 2009.
276
- 277 KELLOGG, D. W.; TOMLINSON, D. J.; SOCHA, M. T. AND JOHNSON, A. B. Effect of
278 feeding zinc methionine complex on milk production and somatic cell count of dairy cattle. *The*
279 *Professional Animal Scientist*, Champaign, v. 20, p. 295–301, 2004.
280
- 281 LEAN, I. J.; DeGARIS, P. J.; McNEIL, D. M.; BLOCK, E. Hypocalcemia in dairy cows:
282 meta analysis and dietary cation anion difference theory revisited. *Journal of Dairy*
283 *Science*, Missouri, v. 89, n. 2, p. 669–684, 2006.
284
- 285 MARTINEZ, N.; RISCO, C. A.; LIMA, F. S. ; BISINOTTO, R. S.; GRECO, L. F.;RIBEIRO,
286 E. S.; MAUNSELL, F.; GALVÃO, K.; SANTOS, J. E. P. Evaluation of peripartal calcium
287 status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing
288 uterine disease. *Journal of Dairy Science*, Missouri, v. 95, n.12, p. 7158-7172, 2012.
289
- 290 MAUCHLE, U.; CARVALHO, A.U.; ALZAMORA FILHO, F.; FERREIRA, P.M.; FACURY
291 FILHO, E.J.; CAVALCANTE, M. Pinto Efeito da sazonalidade sobre a ocorrência de lesões
292 podais em vacas leiteiras. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, Salvador, v.9, p.109-
293 116, 2008.

294

295 MÜLLING, C.; BRAGULLA, H.; REESE, S. How structures in bovine hoof epidermis are
296 influenced by nutritional factors. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, Berlin, v. 28, p. 103–108,
297 1999.

298

299 MÜLLING, C. The use of nutritional factors in prevention of claw diseases-Biotin as an
300 example for nutritional influences on formation and quality of hoof horn. In: 11th Int.
301 Symposium on Disorders of the Ruminant Digit. Anais Parma, Italy, p. 78-80, 2000.

302

303 MÜLLING, C.K.W. Theories on the pathogenesis of white line disease – an anatomical
304 perspective. In: International symposium on lameness in ruminants, 12., 2002, Orlando:
305 *Proceedings of the 12th International Symposium on Lameness in Ruminants*, 2002, p.90-98.

306

307 NOCEK, E. N. Bovine acidosis: implications on laminitis. *Journal of Dairy Science*, Missouri,
308 v. 80, n. 5, p. 1005-1028, 1997.

309

310 KILLIC, N.; CEYLAN, A.; SERIN, I.; GÖKBULUT, C. Possible interaction between lameness,
311 fertility, some minerals, and vitamin E in dairy cows. *Bulletin-Veterinary Institute Pulawy*,
312 Pulawy, v. 51, n.1, p. 425-429, 2007.

313

314 NICOLETTI, J.L.M. *Manual de Podologia Bovina*. Barueri: Manole, 2004, 126p.

315

316 PENEV, T.; ILIEV, A.; MITEVA, C. H.; MITEV, Y.; VALKOVA, P.; UZUNOVA, K.
317 Investigation of manure-induced physicochemical changes of the claw horn in dairy cattle.
318 *Journal of The Faculty of Veterinary Medicine Istanbul University*, Istanbul, v. 49, p. 41-52,
319 2013.

320

321 PILACHAI, R.; SCHONEWILLE, J. T.H.; THAMRONGYIOSWITTAYAKUL, C.;
322 AIUMLAMAI, S; WACHIRAPAKORN, C.; EVERTS, H.; HENDRIKS, W.H. Diet factors and
323 subclinical laminitis score in lactating cows of smallholder dairy farms in Thailand. *Livestock*
324 *Science*, Foulum, v. 155, p. 197-204, 2013.

325

326 SICILIANO-JONES, J.L.; SOCHA, M.T.; TOMLINSON, D.J.; DeFRAIN, J.M. Effect of trace
327 mineral source on lactation performance, claw integrity, and fertility of dairy cattle. *Journal of*
328 *Dairy Science*, Missouri, v. 91, n. 5, p. 1985-1995, 2008.

329

- 330 SILVA, L. A.F.; FIORAVANTI, M.C.S.; TRINDADE, B.R.; SILVA, O.C.; EURIDES, D.;
 331 CUNHA, P.H. J.; SILVA, L.M.; MOURA, M.I. Enfermidades digitais em vacas de aptidão
 332 leiteira: associação com mastite clínica, metrites e aspectos epidemiológicos. *Pesquisa*
 333 *Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 24, n. 4, p. 217-222, 2004b.
- 334
- 335 TADICH, N; TEJEDA, C.; BASTIAS, S.; ROSENFELD, C.; GREE, L.E. Nociceptive
 336 threshold, blood constituents and physiological values in 213 cows with locomotion scores
 337 ranging from normal to severy lame. *The Veterinary Journal*, London, v. 197, p. 401-405, 2013.
- 338
- 339 TOMLINSON, D.J.; MÜLLING, C.H; FAKLER, T.M. Invited Review: Formation of keratins
 340 in the bovine claw: Roles of hormones, minerals, and vitamins in functional claw integrity.
 341 *Journal of Dairy Science*, Missouri, v. 87, p. 797-809, 2004.
- 342
- 343 WARNICK; L.D.; JANSSEN D.; GUARD, C.L.; GRÖHN, Y.T. The effect of lameness on
 344 milk production in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, Missouri, v. 84, p.1988-1997, 2001.
- 345
- 346 WINKLER, B.; MARGERISON, J.K. Mechanical properties of the bovine claw horn during
 347 lactation. *Journal of Dairy Science*, Missouri, v. 95, p. 1714-1728, 2012.
- 348
- 349 WINCKLER, C.; WILLEN, S. The reliability and repeatability of a lameness scoring system for
 350 use as an indicator of welfare in dairy cattle. *Acta Agriculture Scandinavia*, London, n.30,
 351 p.103-107, 2001.

352
 353
 354
 355

Tabela 1. Lesões e ocorrência (%) encontradas em vacas leiteiras com lesões associadas à laminite.

Lesões	Número de observações	Porcentagem (%)
Úlcera de sola	5	25%
Doença da linha branca	4	20%
Hemorragia de sola	3	15%
Linhas de estresse	3	15%
Úlcera de pinça	2	10%
Casco em tesoura	1	5%
Abscesso	1	5%
Casco achinelado	1	5%
Total	20	100%

356 **Fonte:** Elaboração dos autores
 357

358 **Tabela 2.** Concentração de minerais (mg Kg⁻¹) no tecido córneo (\pm desvio padrão) de vacas
 359 com e sem laminite (VCL: Vacas com laminite; VSL: vacas sem laminite).

360

VCL	VSL	Valor de P
-----	-----	------------

Cálcio	8,5±0,44	13,7±0,76	0,06
Zinco	12,0±5,45	10,0±2,57	0,41
Magnésio	7,5±0,55 ^b	14,8±0,26 ^a	0,008
Fósforo	9,9±1,37	12,3±0,72	0,41

361

Fonte: Elaboração dos autores