

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

ANDRÉIA BORGES APPELT

**DUREZA E HISTOLOGIA DA PAREDE DO CASCO BOVINO E
BUBALINO**

(Hardness and histology of cattle and buffalo claw horn)

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2015

ANDRÉIA BORGES APPELT

**DUREZA E HISTOLOGIA DA PAREDE DO CASCO BOVINO E
BUBALINO**

(Hardness and histology of cattle and buffalo claw horn)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Saúde, Tecnologia e Produção Animal, da Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Rüdiger Daniel Ollhoff

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2015



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Câmpus São José dos Pinhais

PUCPR
GRUPO MARISTA

**ATA Nº 0072 E PARECER FINAL DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM CIÊNCIA ANIMAL DA ALUNA ANDRÉIA BORGES APPELT SCHNITZLER**

Aos vinte e seis dias do mês de maio do ano de dois mil e quinze, às 13:30 horas, realizou-se no anfiteatro do Mestrado em Ciência Animal da Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, localizada na Rodovia 376 – Km 14 – São José dos Pinhais - PR, a sessão pública de defesa da Dissertação da mestranda Andréia Borges Appelt Schnitzler, intitulada: **“DUREZA E HISTOLOGIA DA PAREDE DO CASCO BOVINO E BUBALINO”**. A mestranda concluiu os créditos exigidos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, segundo os registros constantes na secretaria do Programa. Os trabalhos foram conduzidos pelo Professor orientador e Presidente da banca, Dr. Rüdiger Daniel Ollhoff (PUCPR), auxiliado pelos Professores Doutores Fabio Celidonio Pogliani (FMVZ-USP) e Jair Rodini Engracia Filho (PUCPR). Procedeu-se à exposição da Dissertação, seguida de sua arguição pública e defesa. Encerrada a fase, os examinadores expediram o parecer final sobre a Dissertação, que nos termos do Artigo 53 do Regulamento deste Programa de Pós-Graduação, foi considerada Aprovada.

Prof. Dr. Rüdiger Daniel Ollhoff (Presidente)

Assinatura Rüdiger Daniel Ollhoff

Prof. Dr. Fabio Celidonio Pogliani (FMVZ-USP)

Assinatura Fabio Celidonio Pogliani

Prof. Dr. Jair Rodini Engracia Filho (PUCPR)

Assinatura Jair Rodini Engracia Filho

Proclamado o resultado, o Presidente da Banca Examinadora encerrou os trabalhos, e para que tudo conste, eu, Caroline Nocera Bertton, confiro e assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora.

São José dos Pinhais, 26 de maio de 2015.

Renata Ernland Freitas de Macedo

Profa. Dra. Renata Ernland Freitas de Macedo

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Caroline Nocera Bertton

Caroline Nocera Bertton

Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS.....	VII
FORMATO DA DISSERTAÇÃO.....	VIII
RESUMO GERAL.....	IX
ABSTRACT.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XII
LISTA DE FIGURAS.....	XIV
CAPÍTULO 1	
1 INTRODUÇÃO GERAL	01
CAPÍTULO 2	
2 REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1 ANATOMIA MACROSCÓPICA DO CASCO	05
2.2 O ESTOJO CÓRNEO	06
2.2.1 Função do estojo córneo.....	08
2.2.2 Composição química do estojo córneo	09
2.2.3 Estrutura microscópica	10
2.2.3.1 Epiderme.....	10
2.2.3.2 Derme	12
2.2.3.3 Tecido subcutâneo	12
2.2.4 Histologia do estojo córneo.....	13
2.2.5 Fatores que influenciam o estojo córneo	15
2.2.5.1 Fatores externos de influência sobre o estojo córneo	16
2.2.5.1.1. Fatores ambientais	16
2.2.5.2 Fatores internos, inerentes ao animal, de influência sobre o estojo córneo	17
2.2.5.2.1 Nutrição	17

2.2.5.2.2 Genética	19
2.2.6 Dureza do estojo córneo	20
2.3 CONCLUSÃO.....	23
CAPÍTULO 3	
RESUMO	24
ABSTRACT	25
3 INTRODUÇÃO.....	26
3. 1 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1.1 Teste de dureza	30
3.1.2 Análise histológica	32
3.2 RESULTADOS.....	35
3.2.1 Teste de dureza	35
3.2.2 Análise histológica	38
3.2.3 Teste de dureza x análise histológica	39
3.3 DISCUSSÃO	44
3.3.1 Teste de dureza	44
3.3.2 Análise histológica	47
3.4 CONCLUSÃO	50
4. CONCLUSÃO GERAL	51
REFERÊNCIAS	52

Ao meu pai Harley e minha querida mãe Sirlei, por serem os alicerces fundamentais para a minha formação pessoal e profissional, e ao meu marido por todo carinho, compreensão e apoio incansáveis durante todos esses anos.

AGRADECIMENTOS

Com muito carinho agradeço a vocês, pai e mãe, pela dedicação, amor e carinho despendido durante toda minha vida. Essas palavras tentam expressar o amor e a gratidão que sinto e devo a vocês. Obrigada por tudo.

Ao meu marido, Klaus, que esteve presente durante todo o tempo de realização do mestrado, sempre trazendo palavras de apoio, perseverança e força. Você foi fundamental nesse momento da minha vida. Amo muito você.

Agradeço de todo o coração a todos os meus familiares, pois sempre me acompanharam e por isso tornaram-se insubstituíveis.

Aos verdadeiros amigos: TÁCILA, Marcos e Ricardo, pelo apoio, carinho e companheirismo. Aos meus queridos amigos e colegas de trabalho e, principalmente, o Dr. Claudinei Augusto e a professora Cristina Santos Sotomaior, por todos os conselhos, apoio e carinho durante todo o tempo de realização do mestrado.

Agradeço de forma especial ao meu orientador, professor Rüdiger Daniel Ollhoff, pelo profissionalismo expresso durante a orientação, por todo apoio e dedicação e por representar exemplo de responsabilidade e competência. Obrigada por ter me ajudado quando eu mais precisei, serei sempre grata por isso.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Sobretudo, gostaria de agradecer a Deus, por iluminar meus passos, pela saúde daqueles que amo e, principalmente, por oportunizar o convívio com pessoas tão especiais.

FORMATO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação é composta por capítulos.

O capítulo 1 apresenta uma introdução geral dos objetivos do estudo desta dissertação.

O capítulo 2 trata de uma revisão de literatura sobre o casco bovino e bubalino contemplando, também, tópicos específicos sobre o estojo córneo.

O capítulo 3 apresenta a pesquisa propriamente dita e os dados histológicos e de dureza obtidos.

O capítulo 4 finaliza esta dissertação com conclusão geral deste trabalho com sugestões para estudos futuros.

As referências de todos os capítulos se encontram em lista única ao final da dissertação.

RESUMO GERAL

As afecções do locomotor distal no bovino estão entre as três economicamente maiores causas de problemas em bovinos leiteiros juntamente com problemas reprodutivos e mastite. Um estojo córneo saudável é fundamental para prevenir prejuízos. Com o objetivo de obter dados nacionais sobre características biomecânicas de dureza do casco bovino e bubalino e realizar exame histológico para avaliação dos túbulos córneos, foram colhidas amostras da unha lateral do membro pélvico esquerdo de 78 animais sadios de ambos os sexos, logo após o abate, sendo 29 amostras de bovinos Nelore, 22 amostras de bovinos da raça Holandesa e 27 amostras de bubalinos Murrah. Foram retirados fragmentos de 1,5x5 cm da parede abaxial destes cascos para que servissem de corpo de prova na avaliação de microdureza Knoop. De cada grupo (Holandesa, Nelore e Murrah) sete amostras foram avaliadas histologicamente com coloração padrão de hematoxilina eosina. A mensuração da microdureza foi realizada em um microdurômetro, utilizando quatro diferentes cargas (10 gf, 25 gf, 50 gf e 100 gf) e expressada em dureza Knoop (HK). Para bovinos da raça Nelore obteve-se a média de 17,52HK, para bovinos da raça Holandesa de 17,08HK e para búfalos de 17,15HK, não havendo diferença significativa de microdureza entre as diferentes raças/espécies avaliadas ($P < 0,05$). Outros fatores como sexo e peso dos animais não influenciaram a microdureza ($P < 0,05$). Encontrou-se nas diferentes espécies um mínimo de 55 para um máximo de 154,4 microtúbulos por mm^2 . A distância entre os túbulos variou de 42,6 a 105,9 μm , o diâmetro entre 28,92 a 87,36 μm e a área entre 154,05 a 2433,44 μm^2 . Em relação à quantidade de túbulos córneos, assim como para as variáveis, diâmetro, área do túbulo e distância entre os túbulos não houve diferença estatística significativa entre os três grupos avaliados no presente estudo ($P < 0,05$). Obtiveram-se dados quantitativos sobre a microdureza Knoop e os microtúbulos em um mesmo estojo córneo de bovinos da raça Nelore e da raça Holandesa e de bubalinos Murrah. Os dados obtidos permitem concluir que variações na dureza do estojo córneo do casco de ruminantes saudáveis dependem predominantemente de fatores extrínsecos ao animal. A metodologia utilizada permitirá a avaliação do casco de ruminantes em futuros estudos sob diferentes condições fisiológicas e de saúde.

Palavras-chave: Estojo córneo. Bovino. Bubalino. Microdureza. Túbulos córneos.

ABSTRACT

The disorders of the distal locomotor system in cattle are among the three leading causes of economic losses in dairy cattle together with mastitis and reproductive problems. A healthy claw horn is essential to prevent damage. In order to obtain national data on cattle and buffalo claw horn hardness and evaluate the horn tubules, the lateral claw of the left pelvic limb of 78 healthy animals were evaluated, 29 samples from Nelore cattle, 22 samples of Holstein cattle and 27 samples of Murrah buffaloes were collected immediately after slaughter. Fragments of 1,5x5 cm were removed from the abaxial side of the claw wall to be tested for Knoop microhardness. From each group (Holstein, Nelore and Murrah) seven samples were histologically analyzed with hematoxylin eosin staining. The measurement of hardness was performed with four different loads (10 gf, 25 gf, 50 gf and 100 gf) and expressed in Knoop hardness (HK). The measurements for Nelore cattle were at average 17.52 HK, Holstein cattle 17.08 HK and buffaloes 17.15 HK, with no significant difference ($P<0,05$). There were no significant differences with regard to sex or weight of the animals ($P<0,05$). A minimum of 55 to a maximum of 154.4 microtubules per mm^2 were found in the different species. The distance between the tubules ranged from 42.6 to 105.9 μm , the diameter from 28.92 to 87.36 μm and the area between them from 154.05 to 2433.44 μm^2 . Regarding the amount of corneal tubules and also the diameter, the tubule area and the distance between the tubules there was no significant difference among the three groups in the present study ($P<0,05$). Quantitative data on the Knoop microhardness and the microtubules were obtained in the claw horn of Nelore and Holstein cattle and Murrah buffalo. The measured data allow to conclude, that variations of the hardness of the claw horn of healthy ruminants depends predominantly on external factors to the animal. The applied methodology could be used in future studies to evaluate different physiological and health conditions of the ruminant claw.

Keywords: Hoof. Cattle. Buffalo. Microhardness. Horn tubules.

LISTA DE ABREVIATURAS

ECC	Escore de Condição Corporal
gf	Gramma-força
HK	Dureza Knoop (Hardness Knoop)
HE	Hematoxilina Eosina
Kgf	Quilograma-força

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Média dos valores obtidos de Microdureza Knoop - HK em relação à raça/espécie dos animais de acordo com as cargas estáticas de 10, 25, 50 e 100 gf empregadas no microdurômetro.....	35
Tabela 2. Média dos valores obtidos de Microdureza Knoop HK em relação ao sexo dos animais, sem separação entre diferentes raças/espécies, de acordo com as cargas estáticas de 10, 25, 50 e 100 gf empregadas no microdurômetro.....	36
Tabela 3. Média dos valores obtidos de Microdureza Knoop HK em relação ao sexo dos bovinos da raça Holandesa (n=22), de acordo com as cargas estáticas de 10, 25, 50 e 100 gf empregadas no microdurômetro.....	36

Tabela 4.	Média dos valores obtidos de Microdureza Knoop HK em relação ao sexo dos bovinos da raça Nelore (n=29), de acordo com as cargas estáticas de 10, 25, 50 e 100 gf empregadas no microdurômetro	37
Tabela 5.	Média dos valores obtidos de Microdureza Knoop HK em relação ao sexo dos bubalinos da raça Murrah (n=27), de acordo com as cargas estáticas de 10, 25, 50 e 100 gf empregadas no microdurômetro.....	37
Tabela 6.	Média dos valores obtidos de Microdureza Knoop HK em relação a diferentes faixas de peso dos animais, sem separação entre diferentes raças/espécies, de acordo com as cargas estáticas de 10, 25, 50 e 100 gf empregadas no microdurômetro.....	38
Tabela 7.	Médias e desvio-padrão da quantidade de túbulos ($/3 \times 10^5 \mu\text{m}^2$), distância (μm) entre túbulos, diâmetro (μm) e área (μm^2) do túbulo córneo do estojo córneo de acordo com as diferentes raças/espécies.....	39
Tabela 8.	Correlação de Pearson entre a microdureza com diferentes cargas e a análise histológica dos microtúbulos em amostras de parede do casco de grandes ruminantes (bovinos e bubalinos, n=21).....	40
Tabela 9.	Correlação de Pearson entre a microdureza com diferentes cargas e a análise histológica dos microtúbulos em amostras de parede do casco de bovinos da raça Holandesa (n=7).....	41
Tabela 10.	Correlação de Pearson entre a microdureza com diferentes cargas e a análise histológica dos microtúbulos em amostras de parede do casco de bovinos da raça Nelore (n=7).....	42
Tabela 11.	Correlação de Pearson entre a microdureza com diferentes cargas e a análise histológica dos microtúbulos em amostras de parede do casco de bubalinos da raça Murrah (n=7).....	43

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estruturas internas do dígito bovino segundo Greenough et al. (2007).....	05
Figura 2. Dígitos bovinos de membro torácico direito em vista dorsal e com unha lateral serrada ao meio, mostrando o estojo córneo e suas estruturas anatômicas externas e internas.....	07
Figura 3. Histologia do casco esquematizado segundo Pollitt (2004).....	14
Figura 4. Representação da região, da unha do membro posterior esquerdo, que foi utilizada para confecção do corpo de prova.....	29
Figura 5. Representação da pirâmide Knoop e da impressão deixada no corpo de prova, segundo CIMM.....	30

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO GERAL

Com aproximadamente 208 milhões de bovinos, segundo a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (ABIEC), o Brasil tem o maior rebanho comercial do mundo. O custo de produção do bovino brasileiro se situa dentre os mais baixos do mundo, o que traz uma grande vantagem competitiva (ABIEC, 2014). Além disso, desde 2004 o Brasil assumiu a liderança nas exportações, com um quinto da carne comercializada internacionalmente e vendas em mais de 180 países (ABIEC, 2014).

O rebanho bovino brasileiro é composto por dois segmentos econômicos distintos: a cadeia produtiva da carne e a do leite. A presença dessas atividades em todos os estados brasileiros aliada ao rendimento bruto da produção dos dois segmentos, estimado em R\$ 67 bilhões, evidenciam a importância econômica e social da bovinocultura em nosso país (BRASIL, 2014).

A bubalinocultura no Brasil conta com rebanho estimado em mais de um milhão de animais (BRASIL, 2014). À semelhança da bovinocultura, proporciona força de trabalho e produção de carne e de leite à população humana.

As enfermidades do casco bovino constituem um conjunto de afecções causadoras de grandes perdas produtivas, reprodutivas, de saúde e, conseqüentemente, econômicas mundiais. Embora as enfermidades digitais acometam mais bovinos de aptidão leiteira (Ferreira et al., 2004; Cruz et al., 2011), o problema também pode ocorrer em gado de corte, especialmente em animais confinados (Cunha et al., 2002; Nagaraja e Lechtenberg, 2007).

As afecções do locomotor distal no bovino representam a terceira causa de problemas em bovinos leiteiros mais importantes economicamente, depois de problemas reprodutivos e de glândulas mamárias (Miller e Dorn, 1990). Kossaibati e Esslemont (1997) responsabilizaram a mastite e a claudicação como as maiores perdas na criação de bovinos de leite quanto ao aspecto sanitário, respondendo por 38% e 27% respectivamente, dos custos de saúde.

Atualmente há grande riqueza de evidências em todo o mundo sobre os impactos dos problemas locomotores na produção de leite. Diferentes estudos têm demonstrado que problemas locomotores tem um impacto negativo sobre a produção de leite, na Europa, como, por exemplo, na Bulgária (Mitev et al., 2011), Finlândia (Rajala-Schultz et al., 1999), França (Coulon et al., 1996), Hungria (Gudaj et al., 2012), Suécia (Pavlenko et al., 2011), Reino Unido (Green et al., 2002; Amory et al., 2008; Onyiro et al., 2008; Archer et al., 2010; Reader et al., 2011), na Ásia em Israel (Yeruham et al., 2000) e Japão (Higuchi e Nagahata, 2001), na América do Norte nos EUA (Faust et al., 2001; Hernandez et al., 2002, 2005; Juarez et al., 2003; Bicalho et al., 2008;) e também na América do Sul no Chile (Green et al., 2010).

Os problemas de casco resultam em diminuição do desempenho, mensurados em vários parâmetros como: diminuição da ingestão de alimentos, diminuição do peso corpóreo, diminuição da fertilidade, diminuição da produção (carne e leite), aumento do intervalo entre partos, aumento da taxa de abate com condenação total ou parcial da carcaça, aumento do custo veterinário, aumento da demanda de trabalho para o manejo e tratamento do gado com problemas de casco (Greenough e Weaver, 1997; Greenough, 2007).

No Brasil, Borges et al. (1995) verificaram o custo no tratamento de enfermidades podais em vacas de leite, em valores atualizados, de mais de 600 reais. Além disso, as enfermidades podais são responsáveis diretas ou indiretas pelo descarte ou óbito precoce de vacas de leite no Brasil (Ollhoff et al., 2008).

O aspecto econômico não é o único problema decorrente das enfermidades digitais dos bovinos, uma vez que essas doenças quase sempre são acompanhadas por dor e, conseqüentemente, claudicação em graus variados. Essa situação, pelo desconforto desencadeado nos animais, tem sido considerada um dos maiores problemas relacionados ao bem estar animal nos bovinos (Molento e Bond, 2008; Flower e Weary, 2009).

A importância clínica da conformação do aparelho locomotor distal dos bovinos deve-se à sua relação com a claudicação, a longevidade e a produtividade dos bovinos no rebanho (Vermunt e Greenough, 1995).

Cerca de 90% das enfermidades locomotoras estão localizadas no casco (Murray et al., 1996). Segundo Meredith e Guy (1996), as técnicas de diagnóstico, tratamentos e prognósticos das enfermidades dos dígitos dos bovinos são melhores aplicadas quando se conhece a anatomia e fisiologia das extremidades dos membros locomotores.

O objetivo da presente dissertação foi realizar a avaliação de algumas propriedades, como dureza e quantidade de microtúbulos, do estojo córneo tanto de bovinos quanto de bubalinos para a geração de conhecimento basilar dentro da grande área de podologia de ruminantes, até agora inexistente na ciência nacional.

CAPÍTULO 2

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ANATOMIA MACROSCÓPICA DO CASCO

O conhecimento da anatomia do dígito é essencial para o entendimento de suas alterações (Greenough, 2007). O casco bovino e bubalino é constituído por um estojo córneo (cápsula do casco), formado por tecido epidérmico queratinizado sendo dividido em partes de acordo com sua localização, função e constituição (Figura 1). São elas: muralha ou parede do casco, talão, sola, bulbo do talão, linha branca e pinça (Toussaint Raven, 1989).

Os membros locomotores distais dos bovinos e bubalinos são formados por dedos separados ou dígitos funcionais, respectivamente III ou medial e IV ou lateral e os rudimentares, paradígitos II e V chamados também de “sobre-unhas” (Getty, 1981; Toussaint Raven, 1989).

Os dígitos III e IV são compostos por estruturas ósseas e tecido mole envoltos por tegumento modificado queratinizado denominado estojo córneo digital ou casco. As estruturas alojadas no interior do casco são: metade distal da falange média, falange distal, articulação interfalangeana distal, osso sesamóide distal, porção terminal do tendão flexor digital profundo, que se insere no tubérculo flexor da terceira falange, porção terminal do tendão extensor, que se insere no processo extensor da terceira falange e bursa do navicular, que se situa entre o osso sesamóide distal e o tendão flexor digital profundo (Bragulla et al., 2004).

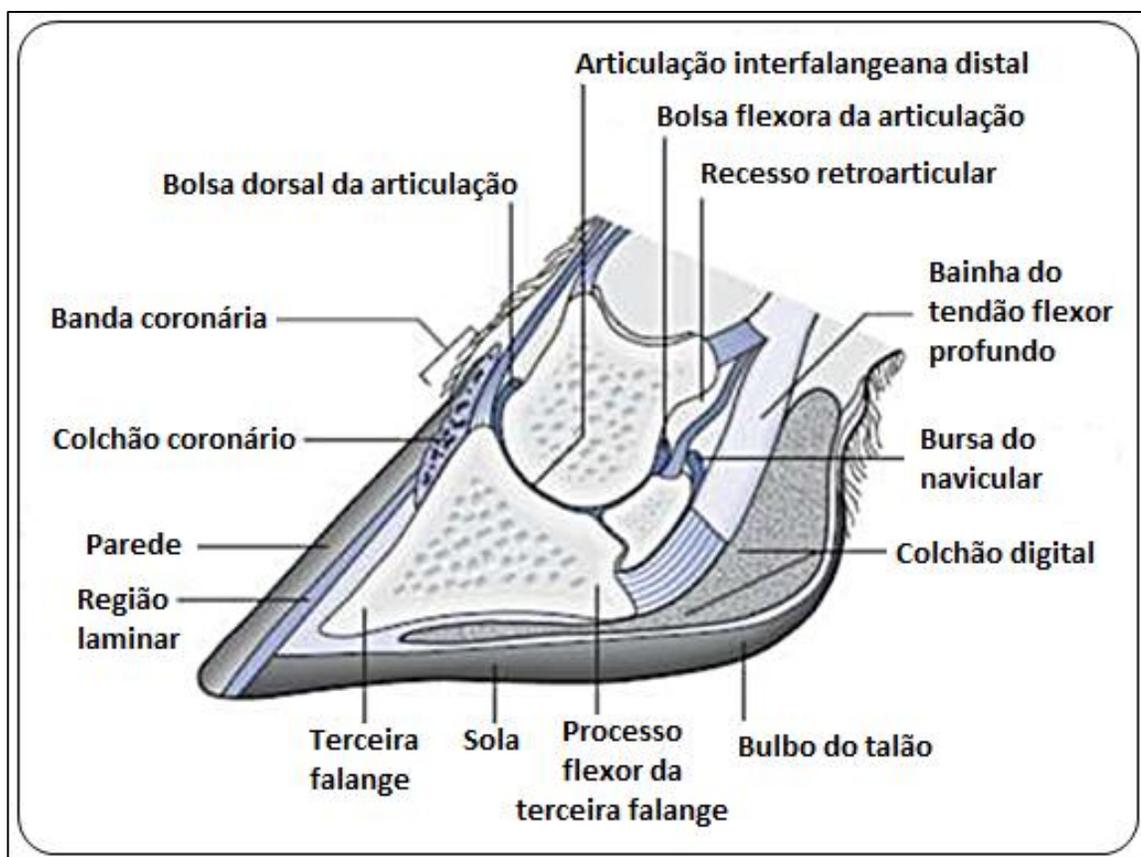


Figura 1: Estruturas internas do dígito bovino segundo Greenough et al. (2007).

Cada dígito bovino é composto por três tipos de tecido: a epiderme, a derme e tecido subcutâneo. A epiderme é queratinizada e a derme, também chamada de córion, é uma estrutura altamente vascularizada que tem como função a nutrição do casco. Por último, o tecido subcutâneo que forma a almofada digital (Rebhun e Guard, 1999).

Entre os dígitos de cada membro se situa o espaço interdigital. Voltado para esse espaço, cada dígito possui uma porção axial de formato côncavo e oposto a esta, uma porção abaxial de formato convexo. As porções, axial e abaxial se encontram na margem dorsal. A sola do dígito é plana, descama constantemente mantendo uma pequena concavidade voltada axialmente, que não recebe impacto de imediato na locomoção sob condições ideais. Caudalmente à sola se situa o talão do dígito e, em seu interior, encontra-se uma estrutura essencial para o amortecimento de impacto, o colchão digital (Bragulla et al., 2004).

A irrigação sanguínea ocorre principalmente pela artéria digital palmar comum III no membro torácico e, no membro pélvico, a artéria equivalente é a digital plantar comum III (Monte e Galotta, 2006).

No membro torácico, a face palmar dos dígitos recebe nervos provenientes do nervo mediano e ramo palmar do nervo ulnar. Na face dorsal, os nervos provêm do ramo superficial do nervo radial e do ramo dorsal do nervo ulnar. No membro pélvico, os nervos da face plantar dos dígitos são ramos do nervo tibial e, na face dorsal, os nervos provêm do nervo fibular superficial e profundo (Bragulla et al., 2004).

Enfermidades metabólicas tais como acidose láctica ruminal, laminites e carências de certos nutrientes, podem promover alterações na qualidade e no crescimento dos cascos, através de modificações temporárias do tecido primordial germinativo deste tegumento, na lâmina coriônica, no estrato basal do perióplio e na coroa do casco. A presença de tecido córneo de má qualidade constitui um fator predisponente para o desenvolvimento de outros processos infecciosos ou degenerativos futuros, que irão gerar claudicação nos bovinos acometidos (Ollhoff e Ortolani, 2001).

Os tecidos internos do locomotor distal bovino estão, em sua maioria, protegidos pelo estojo córneo. A inspeção do estojo córneo pode fornecer importantes informações a respeito do manejo nutricional e histórico clínico recente de um bovino (Greenough e Weaver, 1997).

Apesar de apresentar um dígito maior e a coloração via de regra negra, o casco bubalino não difere fundamentalmente do bovino (Túlio, 2006; Campos, 2012).

2.2. O ESTOJO CÓRNEO

O casco é composto por três camadas: epiderme, derme e subcútis (Figura 2). O estojo córneo é composto pela epiderme formada por células vivas na camada mais interna e espessa camada de células mortas queratinizadas mais externamente (Greenough, 2007).

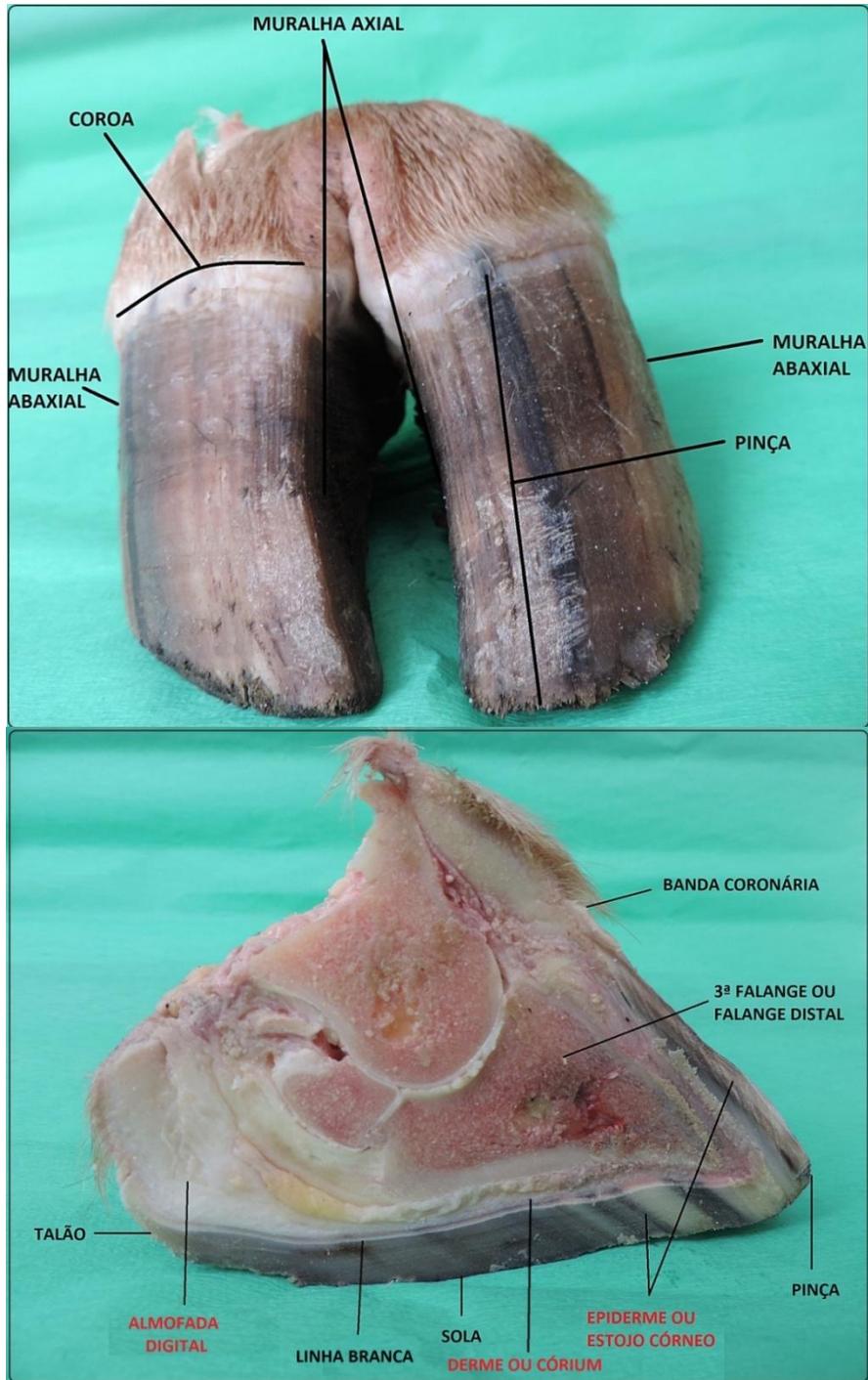


Figura 2: Dígito bovino de membro torácico direito em vista dorsal e com unha lateral serrada longitudinalmente, mostrando o estojo córneo e suas estruturas anatômicas externas e internas.

O estojo córneo é a continuação epidérmica da pele abaixo da banda coronária (Toussaint Raven, 1989; Greenough, 1997), estendendo-se nas suas faces axiais e abaxiais até a superfície de apoio sendo chamado de parede do casco. O estojo córneo é rígido e atua como um protetor das camadas internas e também como dissipador da força exercida pelo peso da vaca, do corpo para o chão. O tecido córneo do casco tem diferentes graus de dureza, variando com o local em ordem crescente de dureza há a linha branca, talão, sola e muralha (Toussaint Raven, 1989).

A parede da unha é dividida em superfície lateral ou lado abaxial, superfície medial ou lado axial e parede dorsal (Toussaint Raven, 1989). A superfície medial é pequena, fina e sustenta o peso corporal somente em seu terço mais cranial; une-se ao bulbo axialmente em seu terço caudal e encontra a superfície dorsal na flexura dorsal. A superfície dorsal une-se à superfície lateral de forma contínua, a qual encontra o bulbo a poucos centímetros de seu término caudal (Toussaint Raven, 1989; Budras, 2003).

Em continuidade com a parede do casco encontra-se na face palmar/plantar a sola, menos resistente e mais flexível que a parede, constituindo outra estrutura epidérmica diferenciada cuja junção com a parede é realizada por meio da linha branca (Van Amstel e Shearer, 2001). O talão, estrutura epidérmica no extremo caudal do casco, conecta-se à parede axial e abaxial. Ventralmente, o talão une-se à sola. A substância córnea dos talões é fina, flexível e possui como função proteger a almofada plantar, que é o amortecedor no momento do impacto do peso (Bicalho et al., 2009).

2.2.1. Função do estojo córneo

A finalidade do estojo córneo é proteger o córion e estruturas subjacentes contra lesões físicas, químicas e biológicas, além de transmitir as forças de tração e dissipar as forças de concussão que ocorrem quando os dígitos entram em contato com o solo (Budras, 2003; Ferreira et al., 2005).

Todas as estruturas que formam o membro locomotor distal têm a função de dar suporte e distribuir, assim como amortecer, o peso do animal, absorver o impacto que representa o apoio do corpo no solo e permitir a locomoção (Toussaint Raven, 1989; Acuña, 2004).

2.2.2 Composição química do estojo córneo

O tecido córneo é produzido pelos queratinócitos da epiderme em um processo especializado conhecido como queratinização. A camada de derme da pele e sua capacidade de fornecer os nutrientes necessários, junto com uma exposição hormonal, modulam e controlam a diferenciação celular na epiderme, incluindo a formação de queratina (Fraser e Macrae, 1980). Quando o fornecimento de nutrientes para as células formadoras de queratina do casco é comprometido ou completamente interrompido, um tecido queratinizado inferior, isto é, um casco de qualidade inferior é produzido, o que pode levar a um aumento da susceptibilidade a distúrbios (Mülling et al., 1999).

Dentro de um processo de nutrição adequado via difusão pelos vasos sanguíneos da derme subjacente, a formação de proteínas de queratina é parte de um processo sistemático de diferenciação celular que transforma células epidérmicas vivas altamente funcionais em células cornificadas, isto é, em células estruturalmente estáveis mas sem atividade metabólica (Mülling, 2000).

Os nutrientes requeridos para uma queratinização normal são: aminoácidos, especialmente aqueles que contêm enxofre tais como a cisteína, histidina e metionina (Ward e Lundgren, 1954; Ekfalck et al., 1985), ácidos graxos (Wertz e Downing, 1982), tais como ácido linoléico e ácido araquidônico, minerais, em particular o cálcio (Rice e Green, 1979; Heenen et al., 1992), também micro-minerais como o zinco, e vitaminas, em particular a biotina (Buffa et al., 1992; Comben et al., 1984; Whitehead, 1988).

A estabilidade estrutural do tecido córneo é resultante dos complexos formados entre a queratina e os aminoácidos metionina, histidina, lisina e arginina, bem como água, macro e microelementos e uma pequena quantidade de gordura (Dyce et al., 1997). Minerais e vitaminas desempenham importantes papéis na produção e manutenção da saúde dos tecidos queratinizados (Mülling et al., 1999). Aumentar a biodisponibilidade de minerais melhora a sua utilização e, portanto, pode ajudar a melhorar a integridade dos tecidos queratinizados (Ballantine et al., 2002).

Os queratinócitos da camada basal da epiderme produzem dois tipos de queratinas protéicas: proteínas filamentosas e proteínas de filamento associadas. As últimas são caracterizadas por seu alto conteúdo de cisteína. A estabilidade estrutural

do tecido córneo é resultado dos complexos queratina-proteína feitos possivelmente pelas ligações dissulfetos entre os resíduos de cisteína. O material de cobertura de membrana é produzido pelos queratinócitos da camada espinhal da epiderme. Este material consiste de glicoproteínas e lipídios complexos e podem ser considerados como uma “argamassa” (Mülling, 1993). As porções glicoprotéicas do material de cobertura de membrana são necessárias para a ligação das células do tecido córneo, e os lipídios são componentes importantes como barreiras de permeabilidade, necessária para manter a hidratação do tecido córneo, apropriada, nas condições ambientais às quais esse está exposto (Coffman et al., 1970).

Estudos recentes de Tolboll et al. (2012) conseguiram aplicar técnicas proteômicas em tecidos adjacentes ao estojo córneo (pele da coroa do casco, derme e camada lamelar), descrevendo em maior detalhamento bioquímico estas estruturas. Ao estojo córneo, no entanto, não foram aplicadas estas técnicas, o que contribuiria para a elucidação de suas características próprias.

2.2.3. Estrutura microscópica

Os tecidos que compõem o dígito se interrelacionam e se complementam no desempenho de suas funções. Isto vale também para as estruturas microscópicas que compõem o estojo córneo. Epiderme, derme e tecido subcutâneo estão intimamente ligados e são interdependentes. Em todas as regiões do casco, há sempre uma epiderme viva separada da derme subjacente por uma membrana basal. Nessa área de transição podem ocorrer alterações importantes no dígito bovino (Greenough, 2007).

2.2.3.1. Epiderme

A epiderme divide-se em: estrato basal, estrato germinativo e estrato córneo. Este último ainda se subdivide em: estrato externo, estrato médio e estrato interno ou lamelar. O estrato interno é formado por lâminas epidérmicas e corneais, enquanto o estrato médio é composto por túbulos córneos e pela substância córnea intertubular (Pollitt, 2004).

A camada germinativa da epiderme e o córion têm uma relação íntima, por consequência, qualquer lesão numa destas estruturas conduz a alterações na outra. A epiderme é avascular, sendo que os queratinócitos da camada germinativa dependem do suprimento sanguíneo da derme (córion) para obtenção de oxigênio e nutrientes. Esta difusão sanguínea pode ser interrompida o que conduz à produção de um tecido córneo de baixa qualidade (Dyce et al., 1997).

Externamente, verificam-se na epiderme ou tecido córneo, estruturas que adquirem nome próprio (Dyce et al., 1997), como o bordo coronário ou coroa, parede ou muralha, sola, talão e linha branca. Todas estas estruturas, do ponto de vista microscópico, possuem em sua epiderme tanto células da membrana basal, espinhal e granulosa quanto células de tecido queratinizado intertubulares e os túbulos de queratina compostos pela medula dos túbulos e sua camada cortical. No entanto, a quantidade destas e, em especial, a quantidade de pontes de sulfidril e de dissulfetos, varia de acordo com a sua localização (Mülling, 1993).

O cemento intercelular, também chamado de material de revestimento de membrana é produzido na camada espinhal média e exocitado para o espaço intercelular. O cemento é formado por glicoproteínas e lipídios complexos como glicofosfolipídios e acilglicosilceramidas. A função principal do cemento na epiderme é estabilizar a adesão celular, isto é, unir firmemente as células córneas umas as outras, dando estabilidade mecânica ao tecido. A adesão celular é garantida pela presença dos desmossomos que formam uma ponte entre duas células vizinhas, por onde se conectam os filamentos intermediários, formando uma estrutura de grande força tensora. Sua estrutura é composta de várias proteínas de ancoramento intracelular (placoglobina e desmoplaquina) que é responsável pela conexão do citoesqueleto às proteínas de adesão transmembrana (desmogleina e desmocolina), que pertencem à família das caderinas (Alberts et al., 2002).

Distúrbios na síntese do cemento resultam em alterações na sua composição, levando a perda parcial ou total de sua função e, conseqüentemente, a separação das células e mudanças biomecânicas (Budras et al., 1998).

A cápsula do estojo córneo é dividida em perióplio, partes tubulares e lamelares. Na parte mais proximal do casco há a coroa do casco, que é constituída por uma

derme especializada, que faz a junção da pele com a muralha do casco. Essa região é chamada de limbo ou perióplio. Abaixo dela há o coxim coronariano. Na parte caudal, há a modificação da coroa, dando origem ao bulbo do talão (Toussaint Raven, 1989). A linha branca é o tecido mais macio do estojo córneo e faz a ligação da parede com a sola.

Lesões na linha branca podem favorecer a entrada de microrganismos. A sola é a região que fica em contato com o solo na porção cranial entre a parede axial e abaxial e em sua porção média ao lado da parede abaxial (Kümper, 1997).

A sola compõe-se de tecido córneo tubular e intertubular, produzido pelo estrato germinativo, apresentando consistência mais macia e menos resistente que o tecido córneo da parede (Greenough et al., 1981).

2.2.3.2. Derme

A derme, também chamada de córion ou pododerma, possui vasos sanguíneos e nervos. É constituída por uma camada reticular mais profunda e uma camada mais superficial da qual se originam papilas que se projetam de diferentes formas, dependendo do segmento do casco. A membrana basal e epiderme viva recobrem a derme e formam um molde exato. O segmento da parede se diferencia nesse aspecto. A camada mais superficial da derme forma diversas lâminas paralelas por entre as quais se projetam lâminas epidermais (Mülling e Budras, 2003).

A derme ou córion divide-se em três partes: A parte coronariana ou perióplio ocupa um espaço restrito, sendo formada por papilas vascularizadas que se orientam em direção à superfície do solo. A parte parietal ou tubular localiza-se imediatamente abaixo da derme coronariana e a derme lamelar é predominantemente vascular e tem muitas fibras reticulares densas que ligam a parede dos vasos à falange distal (Dyce et al., 1997).

2.2.3.3. Tecido subcutâneo

O tecido subcutâneo ou sub-cutis é abundante no bulbo ou talão, apresentando-se como uma densa camada de tecido fibroelástico. O bulbo tem uma importante função de amortização dos impactos e, quando é pressionado durante a distribuição de

peso, expande-se axial- e abaxialmente, transferindo as forças para a parede do casco. Quando ocorrem alterações na estrutura do talão ou quando há reduzidas forças de tensão, a absorção do impacto pelo bulbo fica claramente comprometida (Dyce et al., 1997; Acuña, 2004; Bicalho et al., 2009).

2.2.4 Histologia do estojo córneo

Histologicamente, a pele digital dos bovinos é constituída por uma porção epitelial e uma porção conjuntiva denominada derme, a qual se encontra envolvida por um denso arranjo celular, denominado estrato basal da epiderme. A epiderme, por sua vez, é formada essencialmente de um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, apresentando várias camadas sobrepostas, da derme em direção à superfície externa (Tomlinson et al., 2004).

A formação do tecido córneo (cornificação da epiderme) é resultado da proliferação, diferenciação celular e queratinização das células. É um processo dinâmico de diferenciação de células epidermais. Esse processo é caracterizado por alta taxa de síntese de queratina e de cemento intercelular pelas células epidermais. O processo inicia-se com a divisão mitótica das células na camada basal e termina com a queratinização das células no fim dos seus ciclos na camada espinal. O tecido epidérmico é mantido pelo equilíbrio da proliferação de células na camada basal e pela queratinização das células durante a cornificação nas camadas superiores (Tomlinson et al., 2004).

O processo de diferenciação das células epidermais é chamado queratinização. O acúmulo intenso desta queratina leva a diferenciação terminal chamada de cornificação. As células queratinizadas possuem organelas especializadas para alta produção de proteína, sendo que, na camada basal elas iniciam a produção da queratina e o aumento intensivo ocorre nas camadas seguintes (Budras et al., 1998; Bergsten e Mülling, 2004).

As estruturas internas do casco são a epiderme, o córion (derme) e a hipoderme (subcutâneo). A epiderme é composta pelos estratos externo, médio e interno (germinativo), não contém vasos e nervos e está localizada superficialmente ao córion (Greenough et al., 1981; Weaver et al., 1981; Toussaint Raven, 1985). O estrato interno

é formado por lâminas epidérmicas e corneais, enquanto o estrato médio é composto por túbulos córneos e pela substância córnea intertubular (Figura 3) (Pollitt, 2004). A sola do casco compõe-se de tecido córneo tubular e intertubular, produzido pelo estrato germinativo. Este tecido reveste a papila do córion da sola e é de consistência mais macia e menos resistente que o tecido córneo da parede (Greenough et al., 1981). A epiderme é formada por células vivas da camada basal e as células queratinizadas da camada córnea (Budras et al.,1998).

O córion é vascularizado e atua como camada nutritiva e estabilizadora para a epiderme, mas não produz o tecido córneo por si mesmo (Budras et al.,1998). As regiões do córion são denominadas perióplio, coronário, laminar e córion da sola. A hipoderme consiste de tecido conjuntivo colagenoso e adiposo (Guenther, 1978; Pollitt, 2004).

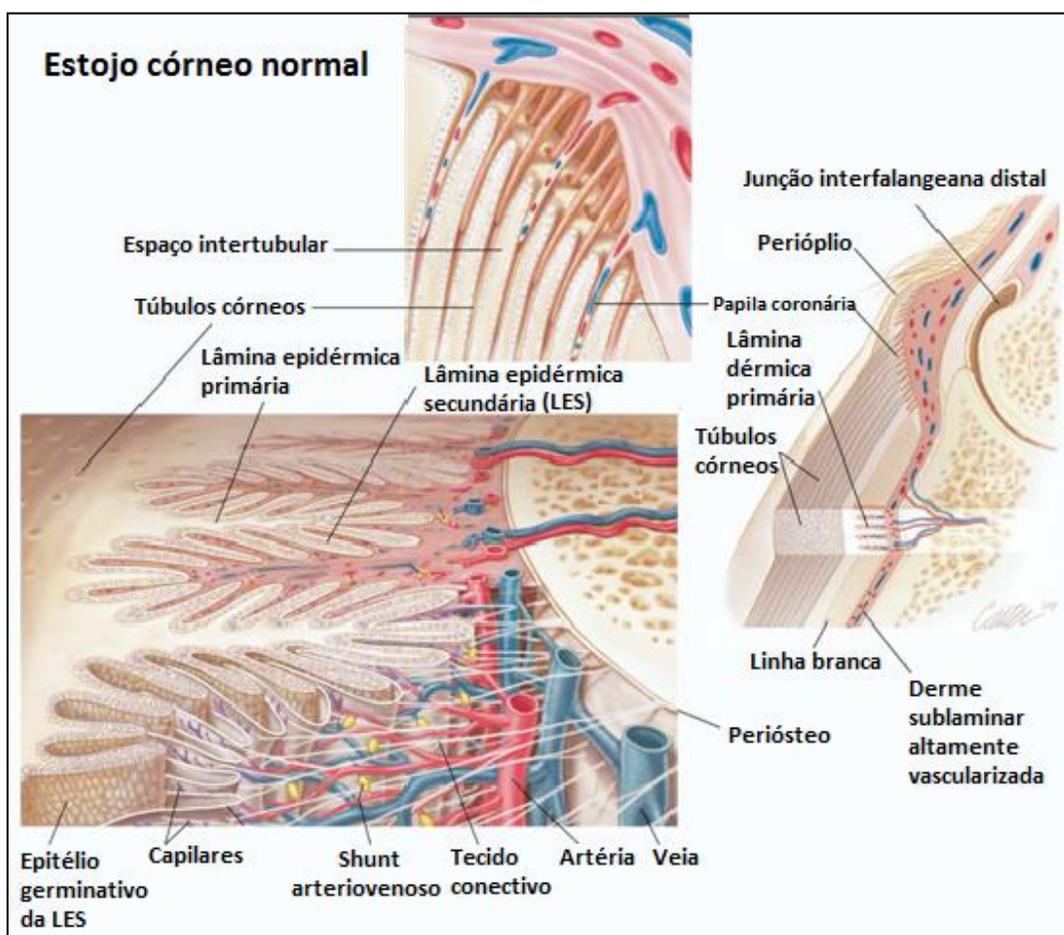


Figura 3: Histologia do casco esquematizado segundo Pollitt (2004).

As propriedades mecânicas do tecido córneo sofrem influência principalmente da formação das células queratinizadas, da arquitetura geral destas e da estrutura, de disposição e quantidade dos túbulos queratínicos na epiderme de sua conexão através do cimento intercelular (Mülling, 1993).

As características do estojo córneo são dependentes do número de túbulos por unidade de área e o teor de água, minerais e proteínas (Borderas et al., 2004). Por outro lado, o piso, ou seja, o meio ambiente interfere diretamente no diâmetro e na razão medula para córtex dos túbulos, sendo que ambos decrescem em condições de piso duro (Lendner et al., 2004) o que, segundo os autores, determinaria um estojo córneo de pior qualidade.

O número de túbulos por unidade de área pode afetar a dureza do casco desde que o material intertubular possa absorver mais umidade com menos túbulos por mm². A parede externa do casco tem mais túbulos quando comparada com a sola e os mesmos representam a dureza do casco (Van Amstel e Shearer, 2006).

Dessas estruturas, o tecido córneo pode ser comparado a uma parede de tijolos, onde as células córneas agem como os tijolos e o cimento intercelular como a argamassa (Budras et al., 1998).

Os lipídios do cimento estabelecem uma barreira permeável no espaço intercelular. Essa barreira protege as células da perda excessiva de água, bem como de uma excessiva hidratação que poderiam alterar completamente as propriedades do tecido córneo, situação que predispõe aos distúrbios dos cascos (Budras et al., 1998; Budras e Mülling, 1998). Higuchi et al. (2005) verificaram que as ceramidas, os principais lipídios do estojo córneo, são mais presentes em estojo córneo saudável e evitam a penetração de água no casco bovino.

2.2.5. Fatores que influenciam o estojo córneo

Diferentes fatores têm sido responsabilizados por influenciar o estojo córneo das extremidades distais dos membros locomotores, tais como: nutrição, predisposição genética, meio ambiente, manejo, estresse, traumatismos, estação do ano, idade, umidade, sistema de criação, enfermidades do aparelho reprodutor e da glândula

mamária e deficiência de micro-elementos (Dirksen e Stöber, 1981; Nocek, 1993; Richardson, 1996).

2.2.5.1. Fatores externos de influência sobre o estojo córneo

2.2.5.1.1. Fatores ambientais

A influência ambiental sobre o estojo córneo é secundária, isto é, altera as características estruturais já existentes na unha, alterando, portanto a qualidade córnea. A umidade ambiental, por exemplo, influencia a dureza do estojo córneo (Budras et al., 1998) e o seu desgaste (Rosenberger et al., 1993).

A resistência do tecido córneo do casco às adversidades ambientais depende de sua dureza, que influencia a taxa de desgaste e erosão do tecido córneo (Vermunt e Greenough, 1995). Os bovinos são originários dos pastos nativos e terrenos irregulares da Europa. Esse ambiente proporcionava o desgaste e crescimento das unhas em níveis semelhantes, mantendo-as naturalmente equilibradas (Burgi, 1998). O próprio ato do casqueamento, ou seja, um desgaste induzido estimula o crescimento do estojo córneo (Ollhoff e Ortolani, 2001).

Fatores externos influenciam a qualidade do estojo córneo, desta maneira substâncias como esterco e urina podem destruir a substância cimentante das lipoproteínas ao redor das células do casco, reduzindo, assim, a qualidade do casco (Nocek et al., 2000). Segundo Phillips e Morris (2001) vacas em sistema de confinamento movimentam-se menos que as vacas a pasto e essa diferença pode aumentar se o animal sente dificuldades em se locomover devido à grande presença de excrementos no chão da instalação. A menor taxa de locomoção leva a uma menor perfusão sangüínea e pior nutrição do estojo córneo (Phillips e Morris, 2001). Más condições de higiene, acúmulo de fezes e urina, umidade, clima, estações do ano, sistema de criação onde os animais encontram-se, manejo, condições de estresse, traumatismos, tipo de piso, são apontados como os principais fatores ambientais capazes de alterar o estojo córneo para pior (Nicoletti, 2003; Dias, 2004). Esses fatores comprometem a barreira física do casco, favorecendo o estabelecimento e desenvolvimento dos agentes envolvidos nas enfermidades (Nicoletti, 2003).

O tipo de piso no qual os animais estão expostos é um fator importante que influencia na qualidade do estojo córneo, especialmente em interação com outros fatores de risco (Holzhauer et al., 2008; Cook e Nordlund, 2009). Pisos muito ásperos como o de concreto, empregado nas instalações de grandes propriedades leiteiras, desgastam excessivamente o tecido córneo do casco, que pode superar o crescimento (Cook et al., 2004; Mülling et al., 2006).

O estojo córneo necessita de umidade para manter a elasticidade enquanto que, em condições muito secas, a parede pode sofrer rachaduras, situação pouco comum no sistema de criação intensivo, com acúmulo de fezes mais pastosas, chorume ou lama. Em condições de pasto, os cascos limpam-se mecanicamente, portanto, o pasto é o ambiente que normalmente causa menos alterações no estrato córneo (Bergsten, 2004).

O ambiente para o repouso em decúbito é outro aspecto importante. Um ambiente confortável para a vaca significa espaço suficiente para deitar e uma cobertura adequada de piso, como areia ou palha. Ressalta-se que em um ambiente confortável, vacas podem passar de 12 a 15 horas diárias deitadas (Bergsten, 2003). O repouso em decúbito favorece a ruminação e a circulação sanguínea nas extremidades distais dos membros, considerados fatores benéficos para a saúde dos dígitos (Mülling et al., 2006; Greenough, 2007).

Segundo Manske (2002) a superfície ideal para manter a saúde do aparelho locomotor distal bovino deve ser um piso resistente, higiênico e que proporcione o equilíbrio entre crescimento e desgaste dos cascos.

2.2.5.2 Fatores internos, inerentes ao animal, de influência sobre o estojo córneo

2.2.5.2.1. Nutrição

A qualidade das unhas é diretamente proporcional à produção do tecido córneo e sua resistência (Vermunt e Greenough, 1995). Distúrbios nutricionais ou metabólicos, que causem uma diminuição do aporte de nutrientes ao casco, seja por alteração circulatória ou alimentar, provocam uma diminuição da qualidade do estojo córneo, ocorrendo à formação de tecido de qualidade inferior (Mülling et al. 1999).

O casco é composto de aminoácidos, água, macro (cálcio, fósforo) e micro-minerais (cobre, enxofre, cobalto, molibdênio e zinco) e pequena quantidade de tecido adiposo. Em relação aos micro-minerais, destacam-se o cobre e o zinco, que além de atuarem como componentes essenciais de vários sistemas enzimáticos são elementos fundamentais na síntese de queratina para a produção e manutenção da integridade dos cascos (Nicoletti, 2003).

O zinco foi identificado como mineral fundamental no processo de queratinização (Smart e Cymbaluk, 1997; Mülling et al., 1999; Mülling, 2000), baseado nas suas funções de catalisador de enzimas como a RNA transferase, formação de proteínas estruturais filamentosas e regulador do processo de queratinização (Cousins, 1996). O zinco usado diariamente na ração de bovinos tem dois efeitos benéficos nos cascos, sendo o primeiro, o aumento da resistência da epiderme; e o segundo, impedir a contínua penetração de microorganismos infecciosos, pela melhora do processo de cicatrização da pele, após a infecção (Toussaint Raven, 1989). O zinco é necessário para a incorporação da cistina na queratina (Moynahan, 1981). Carência de micro-elementos, como o cobre (Cu) e o zinco (Zn) e de vitamina E e selênio (Se) são considerados fatores de risco redução da qualidade do estojo córneo (Sagués, 1995).

A biotina foi primeiramente descoberta como uma vitamina essencial para o funcionamento normal da pele (Bonjour, 1984). A biotina ou vitamina H é uma vitamina do complexo B, hidrossolúvel considerada um nutriente essencial na síntese e lipogênese da queratina. Alguns autores têm descrito que a biotina influencia a proliferação e a diferenciação da epiderme, também necessários para a queratinização normal (Hedges et al., 2001; Hoblet e Weiss, 2001; Pöttsch et al. 2003; Vermunt, 2004).

Muitos estudos comprovam que a suplementação de biotina é efetiva para a melhora da qualidade do casco em bovinos leiteiros (Midla et al., 1998; Campbell et al. 2000; Fitzgerald et al. 2000; Hedges et al. 2001; Lischer et al., 2002).

Segundo Higuchi et al. (2003), trabalhando com bovinos Holandeses, o estojo córneo dos animais suplementados com biotina por dez meses apresentou-se com maior dureza e com menor teor de umidade quando comparado com o grupo controle. Porém nesta pesquisa, não se observou diferença significativa na micromorfologia do

estojo córneo entre os grupos controle e o suplementado com biotina, supondo-se que dez meses de suplementação são suficientes para reduzir o teor de umidade aumentando a dureza do estojo córneo, mas não suficientes para causar alterações histológicas no mesmo.

Cascos de má qualidade podem ser evitados de diferentes formas: mantendo-se o animal adequadamente exercitado, o que normaliza o fluxo sanguíneo do dígito e, conseqüentemente, de toda a estrutura do casco; mantendo-se a hidratação ideal do estojo córneo (45% de umidade na sua camada interna e 15-20% na sua camada externa), através de suplementação oral com biotina, o que segundo Buffa et al. (1992) ocasiona melhores taxas de crescimento e dureza ao casco equino. Também o uso de óleos de origem animal (lanolina e óleo de peixe, por exemplo) foi benéfico como auxiliar na hidratação do casco equino (Stashak et al., 2006). O uso de óleos de maneira comercial em cascos bovinos é desconhecido.

2.2.5.2.2. Genética

Segundo Politiek et al. (1986), o melhoramento genético pode ser um fator importante para a melhoria da qualidade do rebanho no que concerne à podologia.

A conformação dos cascos e pernas, além do tamanho corporal, pode determinar maior ou menor carga sobre uma ou mais unhas e, por consequência, acentuar os problemas advindos de lesões mecânicas internas (Toussaint Raven, 1989, Kümper, 1997).

Segundo Distl (1990), a qualidade do estojo córneo na pecuária pode ser definida pelas medidas do estojo córneo, que mostram altas correlações genéticas para ocorrência de distúrbios de casco e perda econômica. A herdabilidade e variação genética aditiva dos distúrbios e medidas do estojo córneo são altas o suficiente para fornecer espaço para a seleção. As medidas morfológicas do estojo córneo são as características mais úteis para o melhoramento genético da qualidade do estojo córneo em um programa de teste de progênie.

Segundo Peterse (1992), o número de túbulos, a espessura da parede, a composição química e a cor do casco são fatores determinantes para a resistência do casco. E conclui que os cascos de cor escura, com maior número de túbulos e com

parede mais espessa, são os mais resistentes. Acrescenta-se o fato de o estojo córneo ser composto por queratina, uma proteína ligada por pontes sulfídicas. As regiões do casco com maior número de pontes são também as mais resistentes (Mülling, 1993). Também as disposições dos feixes de queratina de forma organizada na parede do casco e de forma aleatória na linha branca contribuem para uma maior ou menor resistência, respectivamente, do estojo córneo (Kempson e Logue, 1993). Apesar de Vermunt e Greenough (1995) em uma revisão afirmarem, que não parece haver influência da cor do casco sobre sua qualidade, Nicoletti (2003), afirma que a pigmentação do casco é uma característica racial e que os cascos claros ou não pigmentados têm menor resistência que os cascos escuros ou pigmentados, e seriam, portanto, mais suscetíveis a lesões. Trabalhando com uma mesma raça e avaliando somente a pigmentação, Sogstad et al. (2011) observaram um menor número de hemorragias de sola e de ocorrência de doença da linha branca em casco escuro, sem associações com outras afecções do casco.

Para Toussaint Raven (1985), o local constituído de túbulos e tecido córneo intertubular incompletamente queratinizados, produzido pelo estrato germinativo das lâminas epidérmicas, será mais macio.

A questão racial também é considerada como fator, sendo que as raças taurinas, especialmente a Holandesa, são consideradas mais propensas a lesões do casco que as raças zebuínas (Borges, 2002). Vacas mestiças Indubrasil apresentaram taxas intermediárias de lesões do casco (Silveira et al., 2009).

2.2.6.Dureza do estojo córneo

A arquitetura do estojo córneo é determinada pela formação da superfície da derme subjacente (Kempson e Logue, 1993; Mülling et al., 1999). A derme não só proporciona suporte mecânico, nutrientes e oxigênio, mas também determina a composição celular do casco.

A substância córnea é produzida pelas papilas dérmicas do córion, que empurram as células córneas formando os túbulos córneos. A substância córnea intertubular gera-se entre as papilas (Acuña, 2003). De outra forma a parede do casco consiste, portanto, em um aglomerado de túbulos córneos, cimentados entre si por

substância intertubular. A cornificação é o processo pelo qual a parede adquire a dureza e a resistência que lhe são características (Acuña, 2003; Bergsten e Mülling, 2004).

A resistência mecânica e a qualidade do casco estão diretamente relacionadas com as dimensões de túbulos, ou seja, o diâmetro e proporção medula/córtex e, por conseguinte, o arranjo e relação espacial das células tubulares, intertubulares, e laminares (Mülling et al., 1999).

A qualidade do casco é determinada em grande medida pelo número dos túbulos por unidade de área (Politiek et al., 1986). Menos túbulos por mm^2 significa que mais umidade pode ser absorvida pelo material intertubular. A densidade aproximada de túbulos no casco é de 80 túbulos/ mm^2 na parede do casco, diminuindo para 20 túbulos/ mm^2 na área central da sola, sendo a parede a parte mais forte do casco. Não há túbulos na linha branca (Van Amstel e Shearer, 2006).

Após o processo da cornificação, o nível de hidratação é o que possui a maior influência sobre aspectos biomecânicos do estojo córneo possibilitando uma maior adaptabilidade em diferentes partes da unha (Mülling, 1993; Franck et al., 2006).

A dureza do casco depende do teor de umidade do corno (Dietz e Prietz, 1981). Martig et al. (1980) e Naumann (1984) encontraram uma relação inversa entre dureza e conteúdo de água do casco. A dureza diminuiu com o aumento do teor de umidade. Dietz e Prietz (1981) sugeriram que o teor de água esteja relacionado com a micro arquitetura e composição bioquímica do casco.

A maior parte da água é absorvida nas primeiras 24 horas de contato, sendo que à medida que aumenta a absorção de água, a dureza diminui (Borderas et al. 2004). A dureza aumenta em sentido vertical (mais duro quanto mais próximo à coroa) e em sentido cranial (mais mole no talão e vai aumentando na dureza em direção à pinça), o que Hinterhofer et al.(2005) relacionaram com a diferença em matéria seca nestas regiões. Esta relação com a água foi inclusive verificada mais recentemente no tecido córneo dos cornos de búfalos e bovinos (Zhang et al. 2013). Apesar destas evidências, Hinterhofer et al. (2007) estudando a elasticidade do estojo córneo do casco bovino saudável e laminítico consideraram este fator de saúde mais importante nas alterações da qualidade do casco do que o conteúdo de água.

Além da água, outros componentes químicos, principalmente compostos amoniacais e ácidos encontrados no chorume são capazes de diminuir a dureza e a elasticidade do estojo córneo de bovinos da raça Holandesa. Este efeito é decorrente do rompimento da camada de ceramida que recobre o estojo córneo e solubilização de proteínas, principalmente a citoqueratina 10, proteína do citoesqueleto de maior ocorrência do estrato córneo (Higuchi et al., 2009). Tanto a amônia (NH₃) quanto o sulfeto de hidrogênio (H₂S) são capazes de solubilizar de 20 a 40 vezes mais citoqueratina 10 do que a água (Higuchi et al., 2009).

A dureza do estojo córneo pode ser medida *in vivo* e *ex vivo*, em peças obtidas geralmente de abatedouro. O método de mensuração *ex vivo* é mais utilizado pela facilidade de execução e menor periculosidade. Entre algumas mensurações realizadas, Mülling (1993) conseguiu obter o valor de dureza de 25,7 N/mm² em uma média de 10 amostras da parede do casco. Como os estudos que abordam a dureza do casco empregaram grande variedade de metodologia com diferentes unidades de dureza, os resultados obtidos representam uma grande dificuldade para fins de comparação. Exemplos de tais estudos foram os de Borderas et al. (2004) com dureza em média de 69 D, Hinterhofer et al. (2005) com dureza shore D entre 52,2 e 63,9 D; Winkler e Margerison (2012) com resistência pontual de 8,53 N e 7,33 N, respectivamente na sola e na linha branca. Zhang et al. (2013) apesar de não trabalharem com casco bovino e bubalino, encontraram grande variação na microdureza do corno de bubalinos e bovinos em uma escala de Vickers utilizada.

Ressalte-se que na literatura consultada, com exceção de Zhang et al. (2013) que utilizaram o tecido queratinizado do corno bubalino, nenhuma outra referência com relação à dureza do tecido córneo bubalino foi encontrada.

2.3. CONCLUSÃO

Entre fatores externos e internos que melhoram a qualidade do estojo córneo, prevalecem os internos. Entre os fatores internos levantados, o manejo nutricional é um dos mais importantes pontos focais na tentativa de melhorar a qualidade do estojo córneo e, até mesmo do casco como um todo. A nutrição correta do estojo córneo no entanto somente ocorrerá em animais com a saúde intacta, garantindo o fluxo sanguíneo ao estojo córneo através de exercícios diários e sem a interferência de fatores tóxicos (endotoxinas) liberados em processos inflamatórios ou infecciosos locais ou sistêmicos. Não foram encontrados estudos ressaltando particularidades estruturais sobre o casco e estojo córneo do búfalo doméstico.

CAPÍTULO 3

RESUMO

Um estojo córneo saudável é basilar para prevenir prejuízos, principalmente nas modernas criações intensivas de grandes ruminantes. Com o objetivo de obter dados nacionais sobre características biomecânicas de dureza do casco bovino e bubalino e realizar exame histológico para avaliação dos túbulos córneos, foram colhidas amostras da unha lateral do membro pélvico esquerdo de 78 animais sadios logo após o abate, sendo 29 amostras de bovinos Nelore, 22 fêmeas e 7 machos, 22 amostras de bovinos da raça Holandesa, sendo 12 fêmeas e 10 machos e 27 amostras de bubalinos Murrah, sendo 6 fêmeas e 21 machos. Foram retirados fragmentos de 1,5x5 cm da parede abaxial destes cascos para que servissem de corpo de prova nos testes biomecânicos. Esses fragmentos foram embutidos em resina acrílica, depois lixados e polidos obtendo-se uma textura superficial padrão. De cada grupo (Holandesa, Nelore, Murrah) sete amostras foram avaliadas histologicamente. As amostras foram cortadas em fragmentos com 2 a 4 mm de espessura. As amostras foram colocadas em tubos do tipo Falcon contendo 10 mL de solução de ácido nítrico a 15% para serem processadas seguindo técnica histológica padrão. A mensuração da microdureza foi realizada em um microdurômetro, utilizando quatro diferentes cargas (10 gf, 25 gf, 50 gf e 100 gf) e expressada em dureza Knoop (HK). Para bovinos da raça Nelore obteve-se em média de 17,52HK, bovinos da raça Holandesa de 17,08HK e búfalos de 17,15HK, não havendo diferença significativa de microdureza entre as diferentes raças/espécies avaliadas ($P < 0,05$). Não houve diferenças significativas com relação ao sexo e ao peso dos animais ($P < 0,05$). Encontrou-se nas diferentes espécies um mínimo de 55 para um máximo de 154,4 microtúbulos por mm^2 . A distância entre os túbulos variou de 42,6 a 105,9 μm , o diâmetro entre 28,92 a 87,36 μm e a área entre 154,05 a 2433,44 μm^2 . Em relação à quantidade de túbulos córneos, diâmetro, área do túbulo e distância entre os túbulos não houve diferença estatística significativa entre os três grupos avaliados ($P < 0,05$). Obtiveram-se dados quantitativos sobre a microdureza Knoop e os microtúbulos em um mesmo estojo córneo de bovinos da raça Nelore e da raça Holandesa e de bubalinos Murrah. Os dados obtidos permitem concluir que variações na dureza do estojo córneo do casco de ruminantes saudáveis dependem predominantemente de fatores extrínsecos ao animal. A metodologia utilizada permitirá a avaliação do casco de ruminantes em futuros estudos sob diferentes condições fisiológicas e de saúde.

Palavras-chave: Estojo córneo. Bovino. Bubalino. Microdureza. Túbulos córneos.

ABSTRACT

The disorders of the locomotor distal in cattle are among the three leading causes of economic losses in dairy cattle together with mastitis and reproductive problems. A healthy claw horn is essential to prevent damage. In order to obtain national data on cattle and buffalo horn hardness and evaluate the horn tubules, the lateral claw of the left pelvic limb of 78 healthy animals were evaluated. 29 samples from Nelore cattle, 22 females and 7 males, 22 samples of Holstein cattle, 12 females and 10 males and 27 samples of Murrah buffalo, 6 females and 21 males were collected immediately after slaughter. Fragments of 1,5x5 cm were removed from the abaxial side of the claw wall. These fragments were embedded in acrylic resin, then sanded and polished for hardness tests. From each group (Holstein, Nelore, Murrah) seven samples were histologically analyzed. Fragment samples of 2 to 4 mm thickness were placed in Falcon tubes containing 10 ml of nitric acid 15% solution for further histological processing. The measurement of hardness was performed with four different loads (10 gf, 25 gf, 50 gf and 100 gf) and expressed in Knoop hardness (HK). The measurements for Nelore cattle were at average 17.52 HK, Holstein cattle 17.08 HK and buffaloes 17.15 HK, with no significant difference ($P<0,05$). There were no significant differences with regard to sex or weight of the animals ($P<0,05$). A minimum of 55 to a maximum of 154.4 microtubules per mm^2 were found in the different species. The distance between the tubules ranged from 42.6 to 105.9 μm , the diameter from 28.92 to 87.36 μm and the area between them from 154.05 to 2433.44 μm^2 . Regarding the amount of corneal tubules and also the diameter, the tubule area and the distance between the tubules there was no significant difference among the three groups in the present study ($P<0,05$). Quantitative data on the Knoop microhardness and the microtubules were obtained in the claw horn of Nelore and Holstein cattle and Murrah buffalo. The measured data allow to conclude, that variation of the hardness of the claw horn of healthy ruminants depends predominantly on external factors to the animal. The applied methodology could be used in future studies to evaluate different physiological and health conditions of the ruminant claw.

Keywords: Hoof. Cattle. Buffalo. Microhardness. Horn tubules.

3. INTRODUÇÃO

A estrutura do estojo córneo bovino e, conseqüentemente, as suas propriedades mecânicas são determinadas por uma combinação de fatores, tais como a composição e ligação química de proteínas de queratina, filamentos de queratina e as proteínas de filamento associado, juntamente com a composição e quantidade do cimento intercelular e o arranjo dos túbulos córneos e o espaço intertubular (Mülling et al, 1994; Budras, 2003).

Distúrbios no estojo córneo do casco em bovinos causam problemas de bem estar animal e perdas econômicas em todo o mundo. A qualidade do estojo córneo é influenciada principalmente pela nutrição, alimentação, meio ambiente, manejo, alterações hormonais relacionadas ao parto, genética, assim como por processos patológicos como a laminite (Vermunt, 1995; Hinterhofer et al., 2007; Greenough, 2007).

Um estojo córneo de boa qualidade apresenta maior capacidade de resistir às forças mecânicas de ambientes com pisos duros e irregulares. Um estojo córneo mais duro pode apresentar maior capacidade de resistir às forças mecânicas e à umidade e, por conseguinte, ser mais resistente a distúrbios (Borderas et al., 2004).

Ao contrário do bovino, poucos são os estudos sobre o casco do bubalino. Raza et al. (1998) observaram, à semelhança do que acontece com o bovino, desgaste maior do casco sob piso de concreto quando comparado com animais mantidos sobre cama, no entanto, o crescimento não era afetado. Túlio (2006) verificou, quando comparado com o casco bovino (Holandesa e Jersey), maior desgaste e menor crescimento em búfalas Murrah. De Rosa et al. (2005), na Itália, relatam que o bubalino doméstico não apresenta problemas de casco, o mesmo observado nas condições de criação paranaenses (Martinez, 2014).

O desenvolvimento deste estudo justifica-se pela escassez de dados relacionados à anátomo-histologia dos cascos de bovinos das raças Holandesa e Nelore criados no Brasil, pela ausência de dados biomecânicos sobre o casco bovino e bubalino criados nas condições brasileiras e de dados relacionados à anátomo-histologia dos cascos de bubalinos da raça Murrah criados no Brasil, segundo literatura

consultada. Além disso, pelos prejuízos econômicos gerados por distúrbios que afetam o aparelho locomotor distal dos bovinos leiteiros e pela necessidade de geração de informações nacionais para orientação aos técnicos e médicos veterinários que trabalham com podologia bovina, em suas intervenções tanto de natureza profilática, como corretiva e curativa no membro distal bovino.

O principal objetivo deste trabalho foi mensurar a microdureza da parede abaxial do estojo córneo, dos cascos de bovinos da raça Holandesa e Nelore e de bubalinos da raça Murrah, e correlacionar com parâmetros histológicos deste mesmo tecido.

3.1 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado com amostras retiradas do estojo córneo do membro posterior esquerdo de bovinos das raças Holandesa e Nelore e de búfalos da raça Murrah, provenientes do Estado do Paraná. Os membros posteriores esquerdos, utilizados para obtenção das amostras, foram colhidos em abatedouro localizado no município de São José dos Pinhais - PR.

Os critérios de inclusão dos animais foram: bovinos da raça Holandesa (*Bos taurus taurus*), bovinos da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) e búfalos da raça Murrah (*Bubalus bubalis*) hígdidos, não claudicantes e sem apresentarem alterações visíveis no estojo córneo do membro posterior esquerdo.

Os critérios de exclusão dos animais foram: bovinos e bubalinos de outras raças, animais apresentando claudicação e animais apresentando alguma alteração visível em estojo córneo do membro posterior esquerdo.

Para a seleção dos animais e obtenção das amostras, visitava-se o abatedouro nos três dias da semana em que era realizado o abate. Inicialmente, no curral de espera dos animais, analisava-se a presença ou não dos animais cujas peças seriam, possivelmente, utilizadas no experimento (bovinos Holandeses, bovinos Nelores e bubalinos). Quando houvesse a presença destes, o abate dos mesmos era acompanhado, a fim de ser realizada a colheita do membro posterior esquerdo.

Todos os animais utilizados no estudo foram selecionados de acordo com os critérios de inclusão. A colheita do membro posterior esquerdo era realizada na linha de abate. Após a colheita do membro, as carcaças eram identificadas, individualmente, com fitas de cores diferentes para que pudessem ser reconhecidas ao passarem pela balança. O peso e sexo de cada animal eram anotados em ficha própria, bem como o município de procedência, sendo que todos os animais selecionados eram provenientes de municípios paranaenses.

Depois de colhidos e identificados, os membros eram transportados sob refrigeração em caixas de material isotérmico, contendo gelo reciclável, para o Laboratório de Patologia da Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), no campus de São José dos

Pinhais, onde fragmentos de aproximadamente 5 cm de comprimento por 1,5 cm de largura (Figura 4) foram cortados para serem posteriormente enviados ao Laboratório de Ensaio Não Destrutivo da PUCPR (campus Curitiba), onde foi realizada a prova biomecânica de dureza (dureza Knoop).

Fragmentos de cada amostra também foram colhidos e acondicionados em formol ácido-fórmico e, posteriormente, em ácido nítrico a 15%, para a realização das análises histológicas.

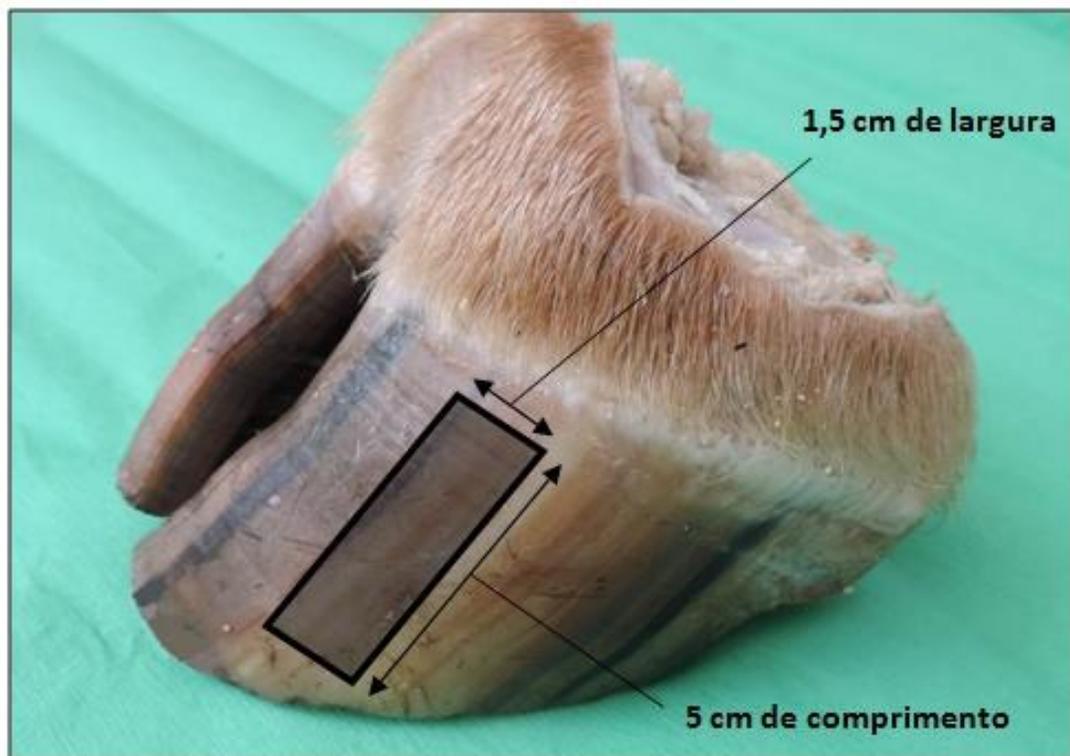


Figura 4: Representação da região, da unha do membro posterior esquerdo, que foi utilizada para confecção do corpo de prova.

Durante o período do experimento, foi colhido um total de 78 amostras, sendo 29 amostras de bovinos da raça Nelore, 22 fêmeas e 07 machos, 22 amostras de bovinos da raça Holandesa, sendo 12 fêmeas e 10 machos, e 27 amostras de bubalinos da raça Murrah, sendo 06 fêmeas e 21 machos.

3.1.1. Teste de dureza

A dureza Knoop é um teste de dureza de microimpressão, em que essa é determinada como a área produzida pela impressão causada por uma ponta de diamante, dividida pela carga utilizada para produzir a impressão na superfície avaliada. Assim, quanto maior a impressão produzida, menor a dureza. O teste foi desenvolvido por Frederick Knoop e seus colegas do National Bureau of Standards (hoje chamado National Institute of Standards and Technology - NIST) dos EUA em 1939, e é definido como padrão pela American Society for Testing and Materials - ASTM E384 (Standard Test Method for Knoop and Vickers Hardness of Materials) (ASTM, 2014).

A ponta Knoop produz uma impressão em forma de losango (Figura 5) com razão largura:comprimento igual a 1:7,1, sendo que a área é calculada a partir da diagonal maior. A amostra deve ter uma superfície plana e polida para permitir a visualização da marca e quanto melhor o polimento da amostra mais fácil a leitura das dimensões da impressão por meio de um microscópio acoplado ao equipamento.

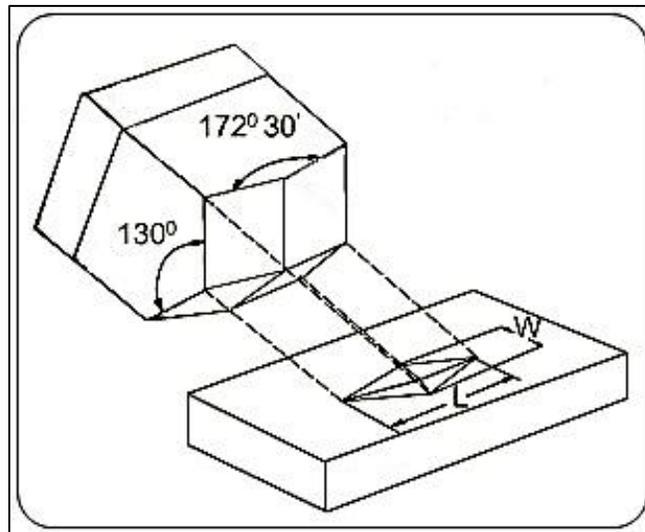


Figura 5: Representação da pirâmide Knoop e da impressão deixada no corpo de prova, adaptado de CIMM (2014).

As amostras destinadas ao teste biomecânico de dureza (Knoop) foram embutidas em resina acrílica em um equipamento específico (Struers LaboPress 1®)

para a confecção dos corpos de prova. Cada amostra foi embutida em resina de forma individual. A amostra era colocada em um compartimento específico adicionando-se, em seguida, resina acrílica, na proporção 1:2. O equipamento elevava a temperatura do compartimento, que continha a mistura amostra/resina, a 180°C e mantinha essa temperatura por 6 minutos, após isso, abria-se um registro de água fria para resfriar a amostra durante 4 minutos.

Para a realização do ensaio de microdureza, foi necessário que as superfícies das amostras estivessem planas e perpendiculares ao penetrador. Para isso, as superfícies dos corpos de prova, embutidos em resina acrílica, foram planificadas utilizando-se uma lixadeira Struers LaboPol-5[®], com lixas de granulações de 200, 320, 500, 800 e 1000, em velocidade constante de 300 rpm e refrigeradas com água.

O polimento final foi realizado em uma politriz elétrica rotativa Struers LaboPol-21[®] com discos de feltro associados à alumina, para padronizar a textura superficial e brilho dos corpos de prova.

Após a planificação e polimento, as amostras foram posicionadas em um microdurômetro Shimadzu Micro Hardness Tester[®] e um penetrador tipo Knoop foi aplicado com cargas estáticas de 10 gf, 25 gf, 50 gf e 100 gf, sendo o tempo de aplicação de cada carga de 10 segundos. Em cada corpo de prova foram realizadas cinco indentações para cada carga estática, com distância de no mínimo 60 µm.

As micro-impressões e, posteriormente, as mensurações da microdureza, foram realizadas por um único operador, treinado e habilitado.

Após cada penetração, a diagonal maior do losango formado foi mensurada com auxílio das barras verticais no monitor acoplado ao microdurômetro.

O resultado da microdureza Knoop (KH) foi obtido pela razão entre a carga aplicada no indentador P (kgf) e a área projetada não recuperada. Os valores obtidos, referentes ao tamanho da diagonal maior (L), foram transformados em HK (Dureza Knoop), automaticamente pelo equipamento, através da seguinte fórmula:

$$HK = CP \times P/L^2$$

Onde, HK corresponde a microdureza Knoop (HK), P a carga aplicada (kgf), L o comprimento da maior diagonal da impressão deixada pelo penetrador Knoop (mm) e CP a constante da área projetada (14,2).

As médias dos resultados de HK obtidas foram comparadas entre as diferentes raças/espécies, sexos e pesos dos animais. Para comparar os resultados entre os diferentes pesos, os animais foram separados em três faixas de peso: <310 kg; entre 310 e 410 kg e entre 410 e 610 kg.

As médias das cinco indentações em cada amostra foram calculadas e todos os dados foram submetidos à análise estatística por meio do software Statgraphics Centurion XVI (STATGRAPHICS, 2009, StatPoint Technologies Inc., Warrenton, VA). Os testes de normalidade dos resíduos foram realizados utilizando-se o Teste Shapiro-Wilk e para homogeneidade das variâncias utilizou-se o Teste de Levene. Dados que não preencheram os pressupostos para análise de variância, isto é, distribuição normal e homogeneidade da variância, foram transformados em conformidade e novamente analisados. Nas variáveis nas quais foi satisfeita a premissa de distribuição normal e a hipótese de homocedasticidade, utilizou-se a análise de variância ANOVA para testar igualdade de médias. Nos casos em que foi rejeitada a hipótese de igualdade de médias entre os grupos, optou-se por utilizar o teste paramétrico de Tukey, com nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

3.1.2. Análise histológica

Para análise histológica foram utilizadas 21 amostras da parede abaxial do estojo córneo, as quais foram divididas em três grupos (bovinos Holandeses, bovinos Nelores e bubalinos), sendo que cada grupo recebeu sete amostras. As amostras foram cortadas em fragmentos de 2 a 4 mm de espessura. Após o corte, as amostras foram submetidas à solução de ácido nítrico a 15%.

Para tanto, foram comparadas diferentes concentrações de ácido nítrico: 7,5%, 9% e 15%, sendo constatado que, para a desqueratinização e amolecimento necessários das amostras de estojo córneo, as soluções com concentração de 7,5% e 9% levavam período de três meses para amolecer as amostras, enquanto que a solução a 15% alterava a consistência das amostras em dois meses. Por esse motivo, concluiu-se que a solução de ácido nítrico na concentração de 15% seria a ideal para ser utilizada no experimento.

A consistência adequada para o processamento das amostras e preparo das lâminas histológicas, após os fragmentos de estojo córneo serem deixados imersos em soluções de ácido nítrico durante tempos controlados, foi determinada utilizando-se agulha com diâmetro de 0,25 mm. No momento em que a agulha ultrapassava a amostra com mínima resistência, iniciava-se o processamento.

As amostras foram colocadas em cassetes de plástico, devidamente identificadas e lavadas em água corrente por 48 horas. Após esse período, iniciava-se o processo de desidratação do material utilizando soluções com concentrações crescentes de etanol: 70%, 80%, 90% e absoluto.

Após essa etapa, iniciava-se o processo de diafanização (em que se retiram as impurezas da amostra tecidual deixando-a transparente) em solução de xilol I e xilol II, durante 15 minutos em cada solução para, em seguida, serem colocadas em soluções de parafinas I e II, por uma hora em cada. Após esta etapa, as amostras eram encobertas com parafina pura até a formação de um bloco e identificadas. Posteriormente os blocos eram cortados em fragmentos de 4 µm de espessura por meio de micrótomo. Ao final, as amostras eram dispostas em lâminas de vidro para serem coradas.

O processo de preparação para a coloração consistia em mergulhar as lâminas em xilol I e xilol II, por 30 minutos em cada, e reidratá-las com soluções de concentrações decrescentes de etanol absoluto, 95% e 70%.

O processo de coloração iniciava-se com a imersão das amostras no corante hematoxilina durante cinco minutos para, em seguida, serem lavadas retirando o excesso do corante. Após a hematoxilina, o corante eosina era disposto em contato com as amostras durante um minuto para, em seguida, serem lavadas novamente.

A etapa seguinte consistia em colocar as amostras coradas em soluções de concentrações crescentes de etanol (70%, 95% e absoluto) para desidratá-las. Na última etapa, era empregado xilol I durante 5 minutos e após isso retirado e então a amostra se encontrava pronta para receber uma lamínula, fixada na lâmina com o adesivo líquido Etelam[®]. Ao final deste processo, as lâminas podiam ser lidas em microscópio óptico.

As amostras foram analisadas com auxílio de microscópio Olympus[®], modelo BX61VS. As imagens foram captadas por meio de câmera digital, marca ALIED[®] e modelo Pike, acoplada ao microscópio, e digitalizadas com auxílio do software VS-ASW, Olympus[®].

A visualização e quantificação dos túbulos córneos foram realizadas em objetiva de 20x. Para a contagem dos túbulos foi padronizado um quadrado com área de $300.000 \mu\text{m}^2$, aproximadamente, e apenas os túbulos visualizados que se encontravam dentro dessa área foram contabilizados.

Além disso, as amostras foram visualizadas em objetiva de 40x para facilitar as mensurações do diâmetro ($d=2r$), das distâncias entre os túbulos e da área dos mesmos.

A área dos microtúbulos foi obtida por meio da seguinte fórmula:

$A (\text{área}) = \text{raio maior} \times \text{raio menor} \times \pi$ (considerado 3, para facilitar os cálculos).

Em cada fotografia, mensurou-se o raio maior e o raio menor de três microtúbulos, escolhidos aleatoriamente. Calculou-se a área de cada um e realizou-se a média das áreas ($A1+A2+A3/3$), assim obteve-se o resultado (área média) que foi utilizado na análise estatística.

Todas as amostras foram avaliadas em triplicatas e as médias dos resultados foram adotadas como unidades amostrais e, conseqüentemente, utilizadas na análise estatística.

Os dados foram submetidos à análise estatística por meio do software Statgraphics Centurion XVI (STATGRAPHICS, 2009, StatPoint Technologies Inc., Warrenton, VA). A análise seguiu os mesmos testes usados para a análise de dureza (capítulo 3.1.1.)

3.2.RESULTADOS

3.2.1.Teste de dureza

Os resultados obtidos refletem a análise das 78 amostras colhidas, sendo elas: 29 amostras de bovinos da raça Nelore - sendo 22 fêmeas e 07 machos; 22 amostras de bovinos da raça Holandesa - sendo 12 fêmeas e 10 machos e 27 amostras de bubalinos da raça Murrah - sendo 06 fêmeas e 21 machos. Os resultados encontrados estão dispostos nas tabelas subsequentes.

A maior média obtida de microdureza Knoop (HK) foi de 19,86 HK para a carga de 100 gf, no grupo dos bovinos da raça Nelore, enquanto que a menor média obtida de HK foi de 13,28 HK para a carga de 10 gf, no grupo dos bovinos da raça Holandesa. Ao comparar as médias dos valores obtidos de microdureza Knoop (HK), para as diferentes cargas aplicadas, não houve diferença estatística significativa entre as raças Holandesa, Nelore e Murrah (Tabela 1).

Tabela 1 - Média e desvio padrão dos valores obtidos de microdureza Knoop (HK) em relação à raça/espécie dos animais de acordo com as cargas estáticas de 10, 25, 50 e 100 gf empregadas no microdurômetro.

	Bovinos da raça Holandesa (n= 22)	Bovinos da raça Nelore (n= 29)	Bubalinos da raça Murrah (n= 27)	Valor de P
10gf	13,28 ^a ± 4,19	13,51 ^a ± 3,87	14,33 ^a ± 3,03	P= 0,5644
25gf	18,18 ^a ± 2,06	18,27 ^a ± 3,14	17,52 ^a ± 2,51	P= 0,5304
50gf	17,88 ^a ± 1,35	18,42 ^a ± 2,57	17,47 ^a ± 2,15	P= 0,2526
100gf	19,06 ^a ± 0,74	19,86 ^a ± 1,60	19,38 ^a ± 1,12	P= 0,0789

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Dentre as 78 amostras utilizadas no projeto, 51,3% foram obtidas de fêmeas e 48,7% de machos. Ao comparar as médias dos valores obtidos de microdureza Knoop (HK) para as diferentes cargas aplicadas, não houve diferença estatística significativa entre os sexos (Tabela 2).

Tabela 2 - Média e desvio-padrão dos valores obtidos de microdureza Knoop (HK) em relação ao sexo dos animais, sem separação entre raças/espécies, de acordo com as cargas estáticas de 10, 25, 50 e 100 gf empregadas no microdurômetro.

	Fêmeas (n= 40)	Machos (n= 38)	Valor de P
10gf	13,20 ^a ± 4,02	14,29 ^a ± 3,25	P= 0,1945
25gf	17,80 ^a ± 3,04	18,18 ^a ± 2,17	P= 0,5259
50gf	17,82 ^a ± 2,49	18,06 ^a ± 1,75	P= 0,6239
100gf	19,58 ^a ± 1,43	19,37 ^a ± 1,11	P= 0,4878

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Dentre as 22 amostras de bovinos da raça Holandesa utilizadas no projeto, 54,5% foram obtidas de fêmeas e 45,5% de machos. Ao comparar as médias dos valores obtidos de microdureza Knoop (HK) em relação ao sexo dos bovinos da raça Holandesa, não houve diferença estatística significativa entre os sexos, para as diferentes cargas aplicadas (Tabela 3).

Tabela 3 - Média e desvio-padrão dos valores obtidos de microdureza Knoop (HK) em relação ao sexo dos bovinos da raça Holandesa (n=22), de acordo com as cargas estáticas de 10, 25, 50 e 100 gf empregadas no microdurômetro.

Bovinos da raça Holandesa	Fêmeas (n= 12)	Machos (n= 10)	Valor de P
10 gf	13,61 ^a ± 4,51	12,88 ^a ± 3,98	P= 0,6920
25 gf	18,65 ^a ± 1,45	17,61 ^a ± 2,58	P= 0,2443
50 gf	17,93 ^a ± 1,24	17,83 ^a ± 1,53	P= 0,8717
100 gf	18,97 ^a ± 0,56	19,16 ^a ± 0,92	P= 0,5679

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Comparando as médias dos valores obtidos de microdureza Knoop (HK) em relação ao sexo dos bovinos da raça Nelore, não houve diferença estatística significativa entre os sexos, para as diferentes cargas aplicadas. Dentre as 29 amostras

de bovinos da raça Nelore utilizadas no projeto, 75,9% foram obtidas de fêmeas e 24,1% de machos (Tabela 4).

Tabela 4 - Média e desvio-padrão dos valores obtidos de microdureza Knoop (HK) em relação ao sexo dos bovinos da raça Nelore (n=29), de acordo com as cargas estáticas de 10, 25, 50 e 100 gf empregadas no microdurômetro.

Bovinos da raça Nelore	Fêmeas (n= 22)	Machos (n= 07)	Valor de P
10gf	13,15 ^a ± 4,11	14,64 ^a ± 2,99	P= 0,3830
25gf	17,80 ^a ± 3,33	19,77 ^a ± 1,96	P= 0,1502
50gf	18,16 ^a ± 2,73	19,23 ^a ± 1,97	P= 0,3461
100gf	19,97 ^a ± 1,73	19,52 ^a ± 1,15	P= 0,5213

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Dentre as 27 amostras de bubalinos da raça Murrah utilizadas no projeto, 22,2% foram obtidas de fêmeas e 77,8% de machos. Ao comparar as médias dos valores obtidos de microdureza Knoop (HK) em relação ao sexo dos bubalinos da raça Murrah, não houve diferença estatística significativa entre os sexos, para as diferentes cargas aplicadas (Tabela 5).

Tabela 5 - Média e desvio-padrão dos valores obtidos de microdureza Knoop (HK) em relação ao sexo dos bubalinos da raça Murrah (n=27), de acordo com as cargas estáticas de 10, 25, 50 e 100 gf empregadas no microdurômetro.

Bubalinos da raça Murrah	Fêmeas (n= 06)	Machos (n= 21)	Valor de P
10gf	12,56 ^a ± 3,12	14,84 ^a ± 2,89	P= 0,1066
25gf	16,10 ^a ± 3,97	17,93 ^a ± 1,86	P= 0,1181
50gf	16,36 ^a ± 3,26	17,78 ^a ± 1,69	P= 0,1566
100gf	19,17 ^a ± 0,58	19,42 ^a ± 1,22	P= 0,6589

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Comparando as médias dos valores obtidos de microdureza Knoop (HK), para as diferentes cargas aplicadas, houve diferença estatística significativa entre as diferentes faixas de peso dos animais somente para a carga de 100 gf. A maior média obtida de HK foi de 19,66 HK para a carga de 100 gf, na faixa de peso de <310 kg, enquanto que a menor média obtida de HK foi de 12,47 HK para a carga de 10 gf, na faixa de peso 510 a 610 kg (Tabela 6).

Tabela 6 - Média e desvio-padrão dos valores obtidos de microdureza Knoop (HK) em relação a diferentes faixas de peso dos animais, sem separação entre diferentes raças/espécies, de acordo com as cargas estáticas de 10, 25, 50 e 100 gf empregadas no microdurômetro.

	< 310 Kg (n= 19)	310 - 410 kg (n= 50)	410 - 610 Kg (n= 9)	Valor de P
10 gf	13,81 ^a ± 1,80	13,89 ^a ± 2,26	15,36 ^a ± 3,80	P=0,0897
25 gf	18,16 ^a ± 1,27	17,98 ^a ± 1,48	17,75 ^a ± 1,98	P=0,5740
50 gf	18,25 ^a ± 0,89	18,12 ^a ± 1,42	18,03 ^a ± 1,08	P=0,2045
100 gf	19,66 ^a ± 0,88	19,61 ^{ab} ± 0,96	18,67 ^b ± 0,17	P=0,0082

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey (P < 0,05).

3.2.2. Análise histológica

Os resultados obtidos refletem a análise das 21 amostras utilizadas, sendo elas:

7 amostras de bovinos da raça Nelore - sendo 6 fêmeas e 1 macho;

7 amostras de bovinos da raça Holandesa - sendo 3 fêmeas e 4 machos e

7 amostras de bubalinos da raça Murrah - sendo 1 fêmea e 6 machos.

Os resultados encontrados estão dispostos na Tabela 7:

Ao comparar as médias dos valores obtidos da quantidade de túbulos ($/3 \times 10^5 \mu\text{m}^2$), distância (μm) entre túbulos, diâmetro (μm) e área (μm^2) do túbulo córneo, não houve diferença estatística significativa entre as raças Holandesa, Nelore e Murrah

(Tabela 7). A tabela 7 foi mantida na unidade micrométrica, porém para fins de comparação com outros estudos, somente, a quantidade de túbulos em mm^2 pode ser obtida dividindo-se o valor por 0,3. Assim, obtêm-se para a raça Holandesa $95,47 \pm 37,87$ túbulos/ mm^2 , para a raça Nelore $80,77 \pm 14,37$ túbulos/ mm^2 e para bubalinos Murrah $108,27 \pm 31,77$ túbulos/ mm^2 .

Tabela 7: Médias e desvio-padrão da quantidade de túbulos ($/3 \times 10^5 \mu\text{m}^2$), distância (μm) entre túbulos, diâmetro (μm) e área (μm^2) do túbulo córneo do estojo córneo de acordo com as diferentes raças/espécies.

	Bovinos da raça Holandesa (n=7)	Bovinos da raça Nelore (n=7)	Bubalinos da raça Murrah (n=7)	Valor de P
Quantidade ($/3 \times 10^5 \mu\text{m}^2$)	$28,64^a \pm 11,36$	$24,23^a \pm 4,31$	$32,48^a \pm 9,53$	P=0,2501
Distância (μm)	$61,5^a \pm 21,18$	$71,67^a \pm 10,13$	$70,2^a \pm 19,65$	P=0,5214
Diâmetro (μm)	$46,79^a \pm 19,65$	$40,76^a \pm 8,90$	$37,27^a \pm 7,18$	P=0,4082
Área (μm^2)	$1292,93^a \pm 1110,27$	$751,5^a \pm 275,03$	$447,78^a \pm 225,48$	P=0,0853

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey (P < 0,05).

2.2.3. Teste de dureza x análise histológica

Os resultados abaixo refletem a correlação dos resultados das 21 amostras utilizadas para a análise histológica e para a mensuração da microdureza Knoop (HK), sendo elas:

7 amostras de bovinos da raça Nelore - sendo 6 fêmeas e 1 macho;

7 amostras de bovinos da raça Holandesa - sendo 3 fêmeas e 4 machos e

7 amostras de bubalinos da raça Murrah - sendo 1 fêmea e 6 machos.

Os resultados encontrados estão dispostos nas tabelas abaixo.

Na tabela 8 encontram-se os valores de microdureza HK, nas diferentes cargas, correlacionados com os valores obtidos na histologia para verificar a influência ou não da composição espacial (número, distância entre si, diâmetro e área) dos microtúbulos com a dureza. Não houve correlação significativa entre a dureza e os aspectos dos microtúbulos mensurados. Há correlação negativa entre quantidade de túbulos e distância e área, assim como há correlação positiva entre diâmetro e área.

Tabela 8: Correlação de Pearson entre a microdureza com diferentes cargas e a análise histológica dos microtúbulos em amostras de parede do casco de grandes ruminantes (bovinos e bubalinos, n=21).

	10 gf	25 gf	50 gf	100 gf	Quantidade de túbulos	Distância entre túbulos	Diâmetro dos túbulos	Área dos túbulos
10 gf		0,5838 (P=0,0055)	0,3034 (P=0,1812)	-0,4694 (P=0,0318)	0,4446 (P=0,0434)	-0,2173 (P=0,3440)	0,2463 (P=0,2818)	0,0166 (P=0,9430)
25 gf	0,5838 (P=0,0055)		0,8351 (P=0,0000)	-0,3424 (P=0,1287)	-0,0196 (P=0,9328)	-0,0947 (P=0,6830)	0,1641 (P=0,4773)	0,1682 (P=0,4661)
50 gf	0,3034 (P=0,1812)	0,8351 (P=0,0000)		-0,0877 (P=0,7055)	-0,1031 (P=0,6566)	0,0042 (P=0,9857)	-0,0712 (P=0,7592)	0,1454 (P=0,5293)
100 gf	-0,4694 (P=0,0318)	-0,3424 (P=0,1287)	-0,0877 (P=0,7055)		-0,2052 (P=0,3722)	0,1163 (P=0,6156)	-0,3649 (P=0,1039)	-0,3084 (P=0,1738)
Quantidade de túbulos	0,4446 (P=0,0434)	-0,0196 (P=0,9328)	-0,1031 (P=0,6566)	-0,2052 (P=0,3722)		-0,5942 (P=0,0045)	-0,1316 (P=0,5696)	-0,4525 (P=0,0394)
Distância entre túbulos	-0,2173 (P=0,3440)	-0,0947 (P=0,6830)	0,0042 (P=0,9857)	0,1163 (P=0,6156)	-0,5942 (P=0,0045)		-0,1733 (P=0,4525)	0,1158 (P=0,6173)
Diâmetro dos túbulos	0,2463 (P=0,2818)	0,1641 (P=0,4773)	-0,0712 (P=0,7592)	-0,3649 (P=0,1039)	-0,1316 (P=0,5696)	-0,1733 (P=0,4525)		0,7640 (P=0,0001)
Área dos túbulos	0,0166 (P=0,9430)	0,1682 (P=0,4661)	0,1454 (P=0,5293)	-0,3084 (P=0,1738)	-0,4525 (P=0,0394)	0,1158 (P=0,6173)	0,7640 (P=0,0001)	

Obs.: Dados originais transformados em log10.

Na tabela 9 encontram-se os valores de microdureza nas diferentes cargas correlacionados com os valores obtidos na histologia na raça Holandesa. Na raça Holandesa verificou-se uma correlação negativa na carga mais alta (100 gf) com o diâmetro do microtúbulo e igualmente uma correlação negativa entre quantidade de microtúbulos e a distância. À semelhança da tabela 8 pode-se verificar correlação positiva entre diâmetro e área.

Tabela 9: Correlação de Pearson entre a microdureza com diferentes cargas e a análise histológica dos microtúbulos em amostras de parede do casco de bovinos da raça Holandesa (n=7).

	10 gf	25 gf	50 gf	100 gf	Quantidade de túbulos	Distância entre túbulos	Diâmetro dos túbulos	Área dos túbulos
10 gf		0,6903 (P=0,0860)	0,1917 (P=0,6805)	-0,8750 (P=0,0099)	0,6172 (P=0,1398)	-0,7081 (P=0,0750)	0,4211 (P=0,3468)	0,1746 (P=0,7081)
25 gf	0,6903 (P=0,0860)		0,7128 (P=0,0722)	-0,4885 (P=0,2660)	0,3310 (P=0,4684)	-0,5485 (P=0,2023)	-0,0319 (P=0,9459)	-0,1791 (P=0,7008)
50 gf	0,1917 (P=0,6805)	0,7128 (P=0,0722)		0,0435 (P=0,9261)	0,0482 (P=0,9182)	0,0880 (P=0,8511)	-0,5281 (P=0,2231)	-0,3416 (P=0,4534)
100 gf	-0,8750 (P=0,0099)	-0,4885 (P=0,2660)	0,0435 (P=0,9261)		-0,3521 (P=0,4386)	0,5635 (P=0,1877)	-0,7842 (P=0,0368)	-0,6125 (P=0,1437)
Quantidade de túbulos	0,6172 (P=0,1398)	0,3310 (P=0,4684)	0,0482 (P=0,9182)	-0,3521 (P=0,4386)		-0,7607 (P=0,0471)	-0,0558 (P=0,9055)	-0,2845 (P=0,5364)
Distância entre túbulos	-0,7081 (P=0,0750)	-0,5485 (P=0,2023)	0,0880 (P=0,8511)	0,5635 (P=0,1877)	-0,7607 (P=0,0471)		-0,2863 (P=0,5337)	0,1398 (P=0,7650)
Diâmetro dos túbulos	0,4211 (P=0,3468)	-0,0319 (P=0,9459)	-0,5281 (P=0,2231)	-0,7842 (P=0,0368)	-0,0558 (P=0,9055)	-0,2863 (P=0,5337)		0,8610 (P=0,0128)
Área dos túbulos	0,1746 (P=0,7081)	-0,1791 (P=0,7008)	-0,3416 (P=0,4534)	-0,6125 (P=0,1437)	-0,2845 (P=0,5364)	0,1398 (P=0,7650)	0,8610 (P=0,0128)	

Obs.: Dados originais transformados em log10.

Na tabela 10 encontram-se os valores de microdureza nas diferentes cargas correlacionados com os valores obtidos na histologia na raça Nelore. Na raça Nelore não houve uma correlação significativa entre dados de carga e de histologia.

Tabela 10: Correlação de Pearson entre a microdureza com diferentes cargas e a análise histológica dos microtúbulos em amostras de parede do casco de bovinos da raça Nelore (n=7).

	10 gf	25 gf	50 gf	100 gf	Quantidade de túbulos	Distância entre os túbulos	Diâmetro dos túbulos	Área dos túbulos
10 gf		0,7019 (P=0,0787)	0,7252 (P=0,0652)	0,1604 (P=0,7312)	0,3697 (P=0,4144)	0,0790 (P=0,8663)	0,1805 (P=0,6985)	0,0052 (P=0,9911)
25 gf	0,7019 (P=0,0787)		0,9896 (P=0,0000)	0,7019 (P=0,0788)	0,2872 (P=0,5323)	-0,3379 (P=0,4585)	0,4035 (P=0,3693)	-0,0974 (P=0,8354)
50 gf	0,7252 (P=0,0652)	0,9896 (P=0,0000)		0,6218 (P=0,1360)	0,3174 (P=0,4879)	-0,3603 (P=0,4272)	0,4054 (P=0,3670)	-0,1226 (P=0,7935)
100 gf	0,1604 (P=0,7312)	0,7019 (P=0,0788)	0,6218 (P=0,1360)		-0,1688 (P=0,7174)	-0,0309 (P=0,9475)	0,0900 (P=0,8478)	-0,0292 (P=0,9504)
Quantidade de túbulos	0,3697 (P=0,4144)	0,2872 (P=0,5323)	0,3174 (P=0,4879)	-0,1688 (P=0,7174)		-0,4503 (P=0,3107)	0,0007 (P=0,9988)	-0,7372 (P=0,0587)
Distância entre os túbulos	0,0790 (P=0,8663)	-0,3379 (P=0,4585)	-0,3603 (P=0,4272)	-0,0309 (P=0,9475)	-0,4503 (P=0,3107)		-0,6787 (P=0,0937)	0,1664 (P=0,7214)
Diâmetro dos túbulos	0,1805 (P=0,6985)	0,4035 (P=0,3693)	0,4054 (P=0,3670)	0,0900 (P=0,8478)	0,0007 (P=0,9988)	-0,6787 (P=0,0937)		0,5332 (P=0,2178)
Área dos túbulos	0,0052 (P=0,9911)	-0,0974 (P=0,8354)	-0,1226 (P=0,7935)	-0,0292 (P=0,9504)	-0,7372 (P=0,0587)	0,1664 (P=0,7214)	0,5332 (P=0,2178)	

Obs.: Dados originais transformados em log₁₀.

Na tabela 11 encontram-se os valores de microdureza nas diferentes cargas correlacionados com os valores obtidos na histologia em bubalinos da raça Murrah. Na raça Murrah não houve uma correlação significativa entre dados de carga e de histologia.

Tabela 11: Correlação de Pearson entre a microdureza com diferentes cargas e a análise histológica dos microtúbulos em amostras de parede do casco de bubalinos da raça Murrah (n=7).

	10 gf	25 gf	50 gf	100 gf	Quantidade de túbulos	Distância entre os túbulos	Diâmetro dos túbulos	Área dos túbulos
10 gf		0,7504 (P=0,0520)	0,2028 (P=0,6628)	-0,9202 (P=0,0033)	0,3067 (P=0,5035)	0,2138 (P=0,6453)	0,1374 (P=0,7690)	-0,0333 (P=0,9435)
25 gf	0,7504 (P=0,0520)		0,7589 (P=0,0479)	-0,8362 (P=0,0190)	-0,0038 (P=0,9935)	0,1985 (P=0,6696)	0,2031 (P=0,6623)	0,4953 (P=0,2584)
50 gf	0,2028 (P=0,6628)	0,7589 (P=0,0479)		-0,3738 (P=0,4088)	-0,0763 (P=0,8709)	-0,1030 (P=0,8261)	0,0311 (P=0,9472)	0,7044 (P=0,0772)
100 gf	-0,9202 (P=0,0033)	-0,8362 (P=0,0190)	-0,3738 (P=0,4088)		-0,3535 (P=0,4367)	-0,1100 (P=0,8143)	-0,3087 (P=0,5006)	-0,1112 (P=0,8124)
Quantidade de túbulos	0,3067 (P=0,5035)	-0,0038 (P=0,9935)	-0,0763 (P=0,8709)	-0,3535 (P=0,4367)		-0,5797 (P=0,1725)	-0,2179 (P=0,6389)	-0,5209 (P=0,2306)
Distância entre os túbulos	0,2138 (P=0,6453)	0,1985 (P=0,6696)	-0,1030 (P=0,8261)	-0,1100 (P=0,8143)	-0,5797 (P=0,1725)		0,6179 (P=0,1392)	0,4872 (P=0,2675)
Diâmetro dos túbulos	0,1374 (P=0,7690)	0,2031 (P=0,6623)	0,0311 (P=0,9472)	-0,3087 (P=0,5006)	-0,2179 (P=0,6389)	0,6179 (P=0,1392)		0,5674 (P=0,1840)
Área dos túbulos	-0,0333 (P=0,9435)	0,4953 (P=0,2584)	0,7044 (P=0,0772)	-0,1112 (P=0,8124)	-0,5209 (P=0,2306)	0,4872 (P=0,2675)	0,5674 (P=0,1840)	

Obs.: Dados originais transformados em log10.

3.3.DISCUSSÃO

As características do estojo córneo do casco de grandes ruminantes dependem de fatores intrínsecos (genética, nutrição do tecido, características individuais do animal) e extrínsecos (umidade, contato com chorume e outras agressões) (Martig et al. 1980; Gregory 2004; Lendner et al. 2004; Hinterhofer et al. 2007). Com o intuito de contribuir para o entendimento das características do estojo córneo de grandes ruminantes criados no Paraná, avaliaram-se tanto cortes histológicos quanto a dureza de peças obtidas a partir do casco do membro pélvico de bovinos e bubalinos saudáveis abatidos em frigorífico da região metropolitana de Curitiba.

3.3.1. Teste de dureza

Apesar de existirem relatos empíricos, considerando tanto o casco de bovinos Nelore quanto o casco de bubalinos mais duros, principalmente quanto ao corte com ferramentas de apara do casco, os resultados aqui obtidos não amparam esta observação, dentro da metodologia empregada de microdureza Knoop.

A dureza é definida como a resistência de um material à deformação permanente por um objeto mais duro (Vincent, 1992). Tal mensuração é realizada através de um equipamento que mede o grau de resistência do material testado contra a penetração de um objeto. A profundidade de penetração diminui com o aumento da dureza (Vermunt e Greenough, 1995).

A dureza, como percebida pelos casqueadores, é muito mais sujeita à resistência do casco às ferramentas de corte, o que será dependente destas, do manuseio e da linha de corte, via de regra, mas não exclusivamente, perpendicular ao crescimento do estojo córneo e das fibras (coroa do casco em sentido à sola).

Outros autores sugerem possível correlação entre a pigmentação do casco e a dureza do mesmo (Guenther, 1978; Borges, 1998). A maioria dos cascos utilizados nesse trabalho, por serem de Nelore e de búfalos, eram pigmentados. Apesar de não ter sido considerada especificamente a pigmentação como variável, outros fatores expostos na sequência, talvez, possuam maior importância no que concerne à dureza.

Outro fator que no presente estudo foi mantido, dentro das condições do ensaio, constante e baixa foi a umidade do tecido córneo, apesar de poder ter havido pequena absorção no processo de lixamento. A umidade é fator importante para diminuir a dureza do estojo córneo (Dietz e Prietz 1981; Budras et al. 1998; Baillie et al. 2000, Higuchi et al. 2003, Hinterhofer et al. 2005). Apesar dos bubalinos procurarem por banhos para seu resfriamento, eles não são essenciais e nas modernas criações foram substituídos por outros meios de resfriamento, conseqüentemente, sem manter o casco por longos períodos na água (Napolitano et al. 2013). Portanto a experiência do casco parecer mais duro ao corte, tanto do Nelore quanto de bubalinos, pode também ser decorrente da origem destes animais de ambientes mais secos e menos expostos ao chorume o qual é capaz de inchar o casco (Gregory 2004) e de solubilizar as proteínas do mesmo (Higuchi et al. 2009), fragilizando-o.

Collins et al. (1998), Hinterhofer et al.(1998) e Baillie et al.(2000) demonstraram que o teor de umidade do casco afetou as medidas de dureza, elasticidade, rigidez à flexão e tenacidade à fratura do casco de diferentes espécies. As propriedades mecânicas de materiais queratinosos são fortemente influenciadas pelo seu estado de hidratação (Kitchener e Vincent, 1987), afetando as diferentes camadas estruturais do casco, fazendo aumentar o volume da matriz na qual as fibras de queratina estão incorporadas e penetrando no material intertubular. Baillie et al. (2000) verificaram que quando o teor de umidade da parede do casco bovino foi menor do que 10%, ocorreu uma transição de um comportamento dúctil para um comportamento mais frágil. O casco tornou-se mais rígido e mais resistente quando os níveis de hidratação diminuíram. Como as amostras foram preparadas de tal modo que a quantidade de água nestas permaneceu constante, possivelmente este fato influenciou na pequena variação na microdureza entre as raças e espécies.

Outra possibilidade para as diferenças encontradas empiricamente a campo e as mensurações de dureza objetivamente obtidas pode estar ligada ao teor lipídico do estojo córneo, não avaliado aqui. A capacidade de absorver mais ou menos água no casco saudável de grandes ruminantes parece estar mais relacionada com o teor de lipídios, especialmente das ceramidas, do que com a própria estrutura protéica das fibras de queratina (Higuchi et al. 2005). Estas mesmas ceramidas não aumentam a

dureza do estojo córneo somente por impedirem a entrada de umidade, mas também por contribuírem para a adesão intercelular dos queratinócitos, estando significativamente reduzidos em cascos laminíticos (Higuchi et al. 2005).

Segundo Van Amstel e Shearer (2006), quanto menor o número de túbulos de queratina maior seria a possibilidade de absorção de umidade no estojo córneo, diminuindo-se assim a dureza. Como não se obteve diferenças significativas no número de microtúbulos no tecido avaliado é provável que este não tenha influenciado as mensurações de dureza, o que foi comprovado quando não se obteve nenhuma correlação dos valores.

Houve diferença estatística significativa em relação ao peso dos animais para a maior carga utilizada (100 gf). Os animais menos pesados (< 310 Kg) apresentaram, nas condições experimentais, o casco mais duro do que os animais mais pesados (entre 410 Kg e 610 Kg). Isso, talvez, possa ser explicado devido ao fato dos animais mais pesados exercerem maior carga sobre o casco, necessitando, assim, de um casco menos duro e, possivelmente, mais elástico para evitar lesões como, por exemplo, fissuras. Segundo Franck et al (2006), a parede dorsal do casco é mais elástica que a parede abaxial, porém neste trabalho os autores não fizeram referência a dureza do casco e ao peso dos animais. Devem-se realizar mais estudos comparando a dureza e a elasticidade de um mesmo casco em relação ao peso do animal, para verificar se, por exemplo, é possível afirmar que quanto mais pesado é um animal, mais elástico e menos duro é o seu casco. Não existe na literatura consultada, estudos sobre relação direta entre o peso e a dureza do estojo córneo.

Não houve diferenças significativas na microdureza Knoop nas diferentes variáveis avaliadas, como o sexo, a raça/espécie e o peso dentro das demais cargas (10 gf, 25 gf e 50 gf) utilizadas. Como a obtenção das amostras obedeceu a regras relativamente rígidas, como o animal ser saudável e a amostra ser retirada sempre do mesmo local, pode-se concluir que o estojo córneo nesta localização em diferentes bovídeos e na subfamília Bovinae possui funções biomecânicas muito semelhantes e constantes.

Zhang et al. (2013) estudando o tecido córneo do corno de diferentes espécies da família Bovidae verificaram que, apesar de diferenças principalmente em

elasticidade, existem padrões de acordo com o local de retirada da amostra, o que pode ser confirmado por Abdullahi et al. (2014) avaliando somente cornos bovinos. No presente estudo o enfoque foi a comparação entre raças e espécies, procurando-se propositadamente não utilizar para fins comparativos outras regiões, como a sola e a linha branca, mais suscetíveis a traumas do que a parede do estojo córneo. Estas estruturas do estojo córneo com funcionalidade diversa, como a sola, a linha branca e o talão, possuem sabidamente dureza diferenciada para com a parede do casco (Mülling 1993; Winkler e Margerison 2012).

Outras estruturas, como por exemplo, o tecido adiposo, principalmente aquele abaixo do talão, influencia na dissipação do peso e na prevenção a lesões do casco (Bicalho et al. 2009) e portanto interage diretamente com o tecido queratinizado acima.

O método de Knoop foi o método selecionado para mensuração de microdureza neste trabalho, por ser o mais indicado para materiais frágeis, porque utiliza cargas menores do que as cargas utilizadas em outros métodos (por exemplo, método de Vickers). A utilização de cargas elevadas pode gerar um fissuramento intenso impedindo a leitura confiável das diagonais e, para facilitar a leitura e diminuir o fissuramento, a ponta Knoop foi a mais recomendada. Segundo Winchell (1945), uma penetração muito rasa é suficiente para produzir impressão longa o bastante para ser medida com precisão de 1%. A menor tendência ao microfissuramento da impressão Knoop em relação à Vickers foi também indicada por Rice et al. (1994).

Uma pequena variação na dureza na metodologia empregada pode ter ocorrido devido ao processo de lixamento com resfriamento com água e a própria umidade do ar. Esta exposição à umidade do meio ambiente pode, eventualmente, ter contribuído para valores de dureza diferentes entre camadas mais profundas e mais superficiais do corpo de prova.

3.3.2. Análise histológica

No processamento inicial, após a obtenção das amostras do estojo córneo, seria melhor inicialmente não ter colocado a amostra em formol ácido fórmico, pois se acredita que esta forma de desnaturação das proteínas contribui para uma maior resistência ao processo de desqueratinização que se seguiu. Sugere-se que as

amostras de estojo córneo para fins de análise histológica sejam imediatamente, após a colheita, colocadas na solução de ácido nítrico.

A solução de ácido nítrico na concentração de 15% utilizada no início do processo de desqueratinização do estojo córneo permitiu o processamento das amostras após dois meses. Mendonça et al. (2003), relataram a utilização de solução de ácido nítrico em concentração de 7,5%, a qual foi trocada quatro vezes ao dia durante quatro dias, totalizando 16 trocas e, a partir deste momento, os autores concluíram que as amostras apresentavam consistência que permitiria os cortes no micrótomo. Houve grande diferença em relação ao tempo de desqueratinização das amostras do tecido córneo das diferentes espécies quando comparado com o tempo determinado por Mendonça et al. (2003). Provavelmente, a maior duração e atraso no tempo de desqueratinização das amostras ocorreram devido a menor quantidade de trocas de solução de ácido, realizadas num mesmo dia, pois, no presente estudo, essas trocas ocorreram uma vez ao dia ao longo de dois meses. Conforme comentado anteriormente, a prévia fixação em formol ácido fórmico também pode ter contribuído para tanto.

Em relação à quantidade de túbulos córneos não houve diferença estatística entre as três raças/espécies avaliadas no presente estudo ($P=0,2501$).

Alguns autores sugerem que a quantidade de túbulos no estojo córneo está intimamente relacionada à dureza do mesmo (Van Amstel e Shearer, 2006; Pesce et al., 1992). As variáveis, diâmetro, área do túbulo e distância entre os túbulos foram observadas com auxílio de objetiva de 40x. Para essas variáveis não houve diferença estatística entre as raças/espécies do presente estudo, sendo $P=0,4082$, $P=0,0853$ e $P=0,5214$, respectivamente. Poderia se esperar que, por originarem-se de ambientes e regimes alimentares e nutricionais diferentes, pudessem ser observadas diferenças no aspecto histológico em especial na quantidade de microtúbulos (Mülling et al. 1999, Fitzgerald et al. 2000), mas caso ocorra esta influência em animais saudáveis, não se refletiu na análise histológica. As quantidades de microtúbulos encontradas foram semelhantes às encontradas por Mülling (1993) e Van Amstel e Shearer (2006).

Mendonça et al. (2003), trabalhando com bovinos taurinos (Holandês) e zebuínos (Gir), verificaram que a quantidade de túbulos córneos não varia entre essas

raças porém, relataram que os bovinos da raça Gir apresentam diâmetro maior dos túbulos córneos quando comparados aos da raça Holandesa e que o espaçamento entre os túbulos no bovino Holandês é maior do que os bovinos Gir. Também verificaram que ocorreu aumento do espaçamento entre os túbulos, em ambas as raças, com o passar da idade. No presente estudo todos os animais apresentavam-se com idade semelhante, portanto, não foi possível a comprovação desta observação.

Considerando que a raça Nelore é classificada como *Bos taurus indicus*, e a raça Gir também é classificada como *Bos taurus indicus*, seria esperada tal diferença entre o Nelore e o Holandês, tal como encontrado por Mendonça et al. (2003). Entretanto os valores mensurados não permitiram afirmar que existe esta diferença entre Nelore e Holandês.

Os animais, apesar de manejos diversos e provavelmente vindos de pisos igualmente diferenciados, não apresentaram diferenças no número de microtúbulos ao contrário do que observaram Lendner et al. (2004), que verificaram diminuição no número de microtúbulos em animais vindos de ambientes com pisos mais duros. Apesar de pouco provável, pelo sistema de manejo intensivo praticado em grande parte dos plantéis de bovinos de leite especializados no Paraná, os bovinos da raça Holandesa, por serem animais de descarte, podem ter permanecido no pasto nas últimas semanas antes do abate, ou, ainda, poderiam ser provenientes de sistema de manejo semi-intensivo, com uso regular de piquetes ou pastos e, portanto, as necessidades fisiológicas e funcionais impostas ao estojo córneo pelo meio ambiente seriam semelhantes entre as três raças.

É importante ressaltar que a literatura sobre aspectos morfológicos do casco de bovinos e, sobretudo, de bovídeos é escassa, restringindo a discussão dos resultados encontrados. Portanto, recomenda-se a realização de novos estudos, tanto no animal vivo considerando-se aspectos de fisiologia e saúde, quanto em peças correlacionando estados fisiológicos (momento da lactação, estado de saúde, idade entre outros) e outras partes de tecidos como a linha branca, a sola e o talão para elucidar cada vez mais como o estojo córneo saudável é formado e poderá ser estimulado a permanecer assim.

3.4. CONCLUSÃO

A microdureza Knoop (HK) obtida para bovinos da raça Nelore foi, em média, de 17,52HK, para bovinos da raça Holandesa de 17,08HK e para búfalos da raça Murrah de 17,15HK, não havendo diferenças estatísticas entre a microdureza da parede do casco de búfalos Murrah, bovinos da raça Nelore e de bovinos da raça Holandesa.

A microdureza em bovídeos domésticos saudáveis não foi alterada nem por raça nem por espécie, nem pelo peso dos animais sugerindo possíveis fatores externos ou ambientais como principais fatos influenciadores.

A análise dos dados histológicos dos túbulos córneos de bovinos da raça Nelore e Holandesa e de bubalinos da raça Murrah, igualmente não identificou diferenças entre as espécies avaliadas no presente estudo.

Não houve correlação entre os resultados obtidos de microdureza Knoop e os resultados obtidos na avaliação histológica da parede do estojo córneo de búfalos Murrah, bovinos da raça Nelore e de bovinos da raça Holandesa.

4. CONCLUSÃO GERAL

Mensurou-se a microdureza Knoop do casco de bovinos das raças Nelore e da raça Holandesa e de bubalinos da raça Murrah.

Nas condições experimentais, não houve diferenças estatísticas entre a microdureza da parede do casco de búfalos Murrah, bovinos da raça Nelore e de bovinos da raça Holandesa.

A análise histológica dos túbulos córneos de bovinos da raça Nelore e Holandesa e de bubalinos da raça Murrah, igualmente não identificou diferenças entre as espécies avaliadas no presente estudo, no que diz respeito à quantidade, área, diâmetro e distância dos túbulos córneos.

São necessários mais estudos a respeito da histologia dos túbulos córneos e da biomecânica do aparelho locomotor distal de bovinos e bubalinos criados nas condições nacionais.

Diferentes parâmetros fisiológicos da espécie bubalina e em especial do seu estojo córneo devem ser aprofundados, tendo em vista o rebanho significativo presente no Brasil e as habilidades que a espécie demonstra.

REFERÊNCIAS

ABIEC, Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne [Internet]. São Paulo; 2014. [citado 06 de agosto de 2014]. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/>

Abdullahi U, Salihi A, Baba Ali, A. Hardness behaviour of thermoplastic cattle horn using nanoindentation technique. *Asian journal of engineering and technology*. 2014; 2:168-174.

Acuña, R. Cojeras del bovino: fisiopatología y profilaxis. 1ª ed. Buenos Aires: Inter Médica; 2004.p. 139.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Fundamentos da Biologia Celular: Uma introdução à biologia molecular da célula*. Porto Alegre: Artmed, 2002.

American Society for Testing and Materials – ASTM [Internet]. West Conshohocken; 2014. [citado 22 de outubro de 2014]. Disponível em: <http://www.astm.org/>

Amory JR, Barker ZE, Wright JL, Mason SA, Blowey RW, Green LE. Associations between sole ulcer, white line disease and digital dermatitis and the milk yield of 1824 dairy cows on 30 dairy cow farms in England and Wales from February 2003 to November 2004. *Preventive Veterinary Medicine*. 2008; 83: 381–391.

Archer SC, Green MJ, Huxley JN. Association between milk yield and serial locomotion score assessments in UK dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2010; 93: 4045–4053.

Baillie C, Southam C, Buxton A, Pavan P. Structure and properties of bovine claw horn. *Advanced Composites Letters*. 2000; 9:101–113.

Ballantine HT, Socha MT, Tomlinson DJ, Johnson AB, Fielding AS, Shearer JK, Van Amstel SR. Effects of feeding complexed zinc, manganese, copper and cobalt to late gestation and lactating dairy cows on claw integrity, reproduction and lactation performance. *Professional Animal Scientist*. 2002; 18:211–218.

Banks WJ. *Applied Veterinary Histology*. St. Louis: Mosby. 1993; p. 527.

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

Bergsten C, Mülling C. Some reflections on research on bovine laminitis aspects of clinical and fundamental research. *Proceedings of the 13th International Symposium and 5th Conference on Lameness in Ruminants*; 2004 February 11-15; Maribor, Slovenija. p. 53-60.

Bergsten, C. Healthy feet requires cow comfort 24 hours. Proceedings of the 13th International Symposium and 5th Conference on Lameness in Ruminants; 2004 February 11-15; Maribor, Slovenia. p. 186-191.

Bicalho RC, Warnick LD, Guard CL. Strategies to analyze milk losses caused by diseases with potential incidence throughout the lactation: a lameness example. Journal of Dairy Science. 2008; 91:2653–2661.

Bicalho RC, Machado VS, Caixeta LS. Lameness in dairy cattle: A debilitating disease or a disease of debilitated cattle? A cross-sectional study of lameness prevalence and thickness of the digital cushion. Journal of Dairy Science. 2009; 92:3175-3184.

Boosman R, Koeman J. Histopathology of the bovine pododerma in relation to age and chronic laminitis. Journal Veterinary Medicine. 1989; 36:438-446.

Borderas TF, Pawluczuk B, De Passillé AM, Rushen J. Claw hardness of dairy cows: relationship to water content and claw lesions. Journal of Dairy Science. 2004; 87:2085-2093.

Borges JRJ, Santiago S, Silva N, Costa F, Pitombo CA. Custos do tratamento e descarte causado por doenças digitais em um rebanho bovino. Revista Brasileira de Ciência Veterinária. 1995; 2:23-26.

Borges JRJ, Garcia M. Guia Bayer de podologia bovina [Internet]. [Local desconhecido]; 2002 [Citado 06 de outubro de 2014]. Disponível em: <http://www.mgar.com.br>

Borges NC. Caracterização do fluido ruminal, dos parâmetros clínico-laboratoriais e de aspectos epidemiológicos de bovinos com pododermatite (Dissertação de Mestrado). Goiânia, GO: Universidade Federal de Goiás; 1998.

Bragulla H, Budras KD, Mülling C, Reese S, König HE. The digit. In: König HE, Liebich HG, editores. Veterinary Anatomy of Domestic Mammals. Stuttgart: Schattauer GmbH; 2004. p. 585-636.

Brasil, Ministério da Agricultura [Internet]. Brasil: Ministério da Agricultura; 2014 [citado 11 de agosto de 2014]. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>

Bonjour JP. Biotin. In: Rucker RB, Zemleni J, Suttie JW, McCormick DB, editores. Handbook of Vitamins. New York: CRC Press; 1984. p. 393-427.

Budras KD, Geyer H, Maierl J, Mülling C. Anatomy and structure of hoof horn. Proceedings of the 10th International Symposium on Lameness in Ruminants; 1998 September 7-10; Lucerne, Switzerland. p. 176-182.

Budras KD, Mülling C. Structure and function of the bovine claw. Proceedings of the 10th International Symposium on Lameness in Ruminants; 1998 September 7-10; Lucerne, Switzerland. p. 189-191.

Budras KD. Bovine Anatomy: An Illustrated Text. Schlütersche. 2003, p. 24-27.
Buffa EA, Van Den Berg SS, Verstraete FJ, Swart NG. Effect of dietary biotin supplement on equine hoof horn growth rate and hardness. Equine Veterinary Journal. 1992; 24:472-474.

Burgi K. Determine maintenance hoof trimming by observing movement. Proceedings of the 10th International Symposium on Lameness in Ruminants; 1998 September 7-10; Lucerne, Switzerland. p. 20-22.

Campbell JR, Greenough PR, Petrie L. The effect of dietary biotin supplementation on vertical fissures of the claw wall in beef cattle. Canadian Veterinary Journal. 2000; 41:690–694.

Campos SBS. Biometria dos dígitos de bovinos e bubalinos e possível relação com enfermidades podais (Dissertação mestrado). Goiânia, GO: Universidade Federal de Goiás; 2012. p. 48.

CIMM. Centro de informação metal mecânica [Internet]. [Citado 18 de novembro de 2014]. Disponível em: <http://www.cimm.com.br>

Coffman JR, Johnson JH, Finocchio EJ, Guffy MM. Biomechanics of pedal rotation in equine laminitis. Journal of the American Veterinary Medical Association. 1970; 156: 219-221.

Collins SN, Cope BC, Hopegood L, Latham RJ, Linford RG, Reilly JD. Stiffness as a function of moisture content in natural materials: Characterization of hoof horn samples. Journal of Materials Science. 1998; 33:5185–5191.

Collis VJ, Green LE, Blowey RW, Packington AJ, Bonser RHC. Testing white line strength in the dairy cow. Journal of Dairy Science. 2004; 87:2874-2880.

Comben N, Clark AM, Sutherland DJB. Clinical observations on the response of equine hoof defects to dietary supplementation with biotin. Veterinary Record. 1984; 115:642.

Cook NB, Nordlund KV. The influence on environment on dairy cow behavior, claw health and herd lameness dynamics. The Veterinary Journal. 2009; 179:360-369.

Cook NB, Nordlund KV, Oetzel GR. Environmental influences on claw horn lesions associated with laminitis and sub acute ruminal acidosis in dairy cows. Journal of Dairy Science. 2004; 87:36-46.

Corbellini CN. Fatores nutricionais de riesco para lãs afecciones podales. In: Jornada - Taller para veterináris. Enfermedades podales del bovino. Viernes; 1994. p.1-5.

Coulon JB, Lescourret F, Fonty A. Effect of foot lesions on milk production by dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 1996; 79, 44–49.

Cousins RJ. Zinc. In: Ziegler EE, Filer LJ, editors. *Present Knowledge in Nutrition*. 7th ed. Washington: Ilsi Press. 1996. p. 293-306.

Cruz CEF, Raymundo DL, Cerva C, Pavarini SP, Dalto AGC, Corbellini LG, Driemeier D. Records of performance and sanitary status from a dairy cattle herd in southern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2011; 31:1-9.

Cruz CEF, Driemeier D, Cerva C, Corbellini LG. Clinical and epidemiological aspects of bovine digital lesions in southern Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2001; 53:654-657.

Cunha PHJ, Pádua, JT, Silva LAF, Fioravanti MCS, Tamassia LFM, Matos JT. Predisposing factors to lameness at feedlot cattle during performance tests in Goiás, Brazil. *Anais eletrônicos [Internet] do XXII World Buiatrics Congress*; 18-23 de agosto de 2002; Hannover, Alemanha. [Citado 25 de outubro de 2014]. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wbc/wbc2002/251.pdf>

De Rosa G, Napolitano F, Grasso F, Pacelli C, Bordi A. On the development of a monitoring scheme of buffalo welfare at farm level. *Italian Journal of Animal Science*. 2005; 4:115-125.

Dias RS, Marques AP, Jr. Atlas - Casco em Bovinos. 2^a ed. São Paulo: Lemos Editorial; 2003. p. 67.

Dias S. Efeito das afecções de cascos sobre o comportamento no estro e desempenho reprodutivo de vacas leiteiras (Tese de Doutorado). São Paulo, SP: Universidade de São Paulo; 2004. p. 21-45.

Dietz O, Prietz G. Quality and status of cattle hoof horn. *Monatshefte für Veterinärmedizin*. 1981; 36:419-22.

Dirksen G, Stöber M. As afecções dos cascos dos bovinos. *A Hora Veterinária*. 1981; 1:13-17.

Distl O, Koorn DS, Mcdaniel BT. Claw traits in cattle breeding programs: report of the European Federation for Animal Science (EAAP) working group “claw quality” in cattle. *Livestock Production Science*. 1990; 25:1-13.

Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG. O membro posterior dos ruminantes. In: Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG, editores. Tratado de Anatomia Veterinária. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. p. 589-597.

Ekfalck A, Funkquist B, Jones B, Obel N. Incorporation of 35S-Cysteine in tissue fragments from the matrix of the bovine claw and effect on incorporation rate of adding blood serum fractions. *Journal of Veterinary Medicine*. 1985; 32:785-792.

Faust MA, Kinsel ML, Kirkpatrick MA. Characterizing biosecurity, health, and culling during dairy herd expansions. *Journal of Dairy Science*. 2001; 84:955-965.

Ferreira PMC, Carvalho AU, Facury EJ, Filho, Ferreira MG, Ferreira RG. Sistema locomotor dos ruminantes. Anais do II Simpósio Mineiro de Buiatria; 6-8 de outubro de 2005. Belo Horizonte, Brasil. p.40.

Ferreira PMC, Leite RC, Carvalho AU, Facury EJ, Filho, Souza RC, Ferreira MG. Custo e resultados do tratamento das sequelas de laminite bovina: relato de 112 casos em vacas em lactação no sistema *free stall*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2004; 56:589-594.

Fitzgerald T, Norton BW, Elliot R, Podlich H, Svendsen OL. The influence of long-term supplementation with biotin on the prevention of lameness in pasture fed dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2000; 83:338-344.

Flower FC, Weary DM. Gait assessment in dairy cattle. *Animal*. 2008; 3:87-95.

Frank A, Cocquyt G, Simeons P, DeBelie N. Biomechanical properties of bovine claw horn. *Biosystems Engineering*. 2006; 93:459-467.

Fraser RDB, Macrae TP. Molecular structure and mechanical properties of keratins. In: Vincent JF, Currey ED, editores. *The mechanical properties of biological materials*. Cambridge: Cambridge University Press. 1980.p. 211-246.

Getty R. Anatomia dos animais domésticos. 5ªed. Rio de Janeiro. Interamericana. 1981; 1:1134.

Green LE, Borkert J, Monti G, Tadich N. Associations between lesion specific lameness and the milk yield of 1635 dairy cows from seven herds in the Xth region of Chile and implications for management of lame dairy cows worldwide. *Animal Welfare*. 2010; 19:419-427.

Green LE, Hedges VJ, Schukken YH, Blowey RW, Packington AJ. The impact of clinical lameness on the milk yield of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2002; 85:2250-2256.

Greenough PR. Bovine laminitis and lameness: a Hands on Approach. St. Louis: Saunders Elsevier. 2007. p. 311.

Greenough PR, Callum F, Weaver AD. Lameness in cattle. 2^a ed. Bristol: Wright Sciencetechnica, 1981.

Greenough PR, Weaver AD. Lameness in cattle. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo: Saunders. 1997. p. 324.

Gregory NG. Swelling of cattle heel horn by urine. Australian Veterinary Journal. 2004; 82:161-164.

Groehn JA, Kaneene JB. Risk factors associated with lameness in lactating dairy cattle in Michigan. Preventive Veterinary Medicine. 1992; 14:77-85.

Gudaj R, Brydl E, Posta J, Komlosi I. Effect of lameness on milk production in Holstein-Friesian farms in Hungary. Allattenyésztes Takarmanyozas. 2012; 61:66–77.

Guenther M. Enfermedades de las pezuñas. Zaragoza: Acríbia. 1978. p. 174.

Gyorkos I, Kovacs K, Miezes M, Bader E, Nyakas I. Influence of digital dermatitis on milk production in dairy cows. Allattenyésztes Takarmanyozas. 1999; 48: 483-489.

Hedges J, Blowey RW, Packington AJ, O'Callaghan CJ, Green LEA. Longitudinal field trial of the effect of biotin on lameness in dairy cows. Journal of Dairy Science. 2001; 84:1969-1975.

Heenen M, Graef K, Galand P. Kinetics of calcium induced stratification of human keratinocytes in vitro. Cell Proliferation. 1992; 25:233-240.

Hernandez J, Shearer JK, Webb DW. Effect of lameness on milk yield in dairy cows. Journal of the American Veterinary Medical Association. 2002; 220, 640–644.

Hernandez JA, Garbarino EJ, Shearer JK, Risco CA, Thatcher WW. Comparison of milk yield in dairy cows with different degrees of lameness. Journal of the American Veterinary Medical Association. 2005; 227:1292–1296.

Higuchi H, Nagahata H. Relationship between serum biotin concentration and moisture content of the sole horn in cows with clinical laminitis or sound hooves. Veterinary Record. 2001; 148:209–210.

Higuchi H, Maeda T, Nakamura M, Kuwano A, Kawai K, Kasamatsu M, Nagahata H. Effects of biotin supplementation on serum biotin levels and physical properties of samples of solar horn of Holstein cows. Canadian Journal of Veterinary Research. 2004; 68(2):93-97.

Higuchi H, Nakamura M, Kuwano A, Kasamatsu M, Nagahata H. Quantities and types of ceramides and their relationships to physical properties of horn covering the claws of clinically normal cows and cows with subclinical laminitis. *The Canadian Journal of veterinary research*. 2005; 69:155-158.

Higuchi H, Kurumado H, Mori M, Degawa A, Fujisawa H, Kuwano A, Nagahata H. Effects of ammonia and hydrogen sulfide on physical and biochemical properties of the claw horn of Holstein cows. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. 2009; 73:15–20.

Hinterhofer C, Stanek Ch, Binder K. Elastic modulus of equine claw horn, tested in wall samples, sole samples and frog samples at varying levels of moisture. *Berliner und Münchenertierärztliche Wochenschrift*. 1998; 111:217–221.

Hinterhofer C, Zoscher M, Gabler C, Stanek C. The hardness of horn in different segments of the bovine claw. *Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift*. 2005; 118: 334–340.

Hinterhofer C, Apprich V, Ferguson JC, Stanek C. Modulus of elasticity and dry-matter content of bovine claw horn affected by the changes of chronic laminitis. *The Veterinary Journal*. 2007; 174: 605–609.

Hoblet KH, Weiss W. Metabolic hoof horn disease. *Veterinary Clinics of North America*. 2001; 17: 111-127.

Holzhauser M, Hardenberg C, Bartels CJM. Herd and cow level prevalence of sole ulcers in the Netherlands and associated-risk factors. *Preventive Veterinary Medicine*. 2008; 85: 125-135.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) [Internet]. Brasil: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2011. [citado 10 de agosto de 2014]. Disponível em www.ibge.gov.br

Juarez ST, Robinson PH, DePeters EJ, Price EO. Impact of lameness on behavior and productivity of lactating Holstein cows. *Applied Animal Behaviour Science*. 2003; 83: 1–14.

Kasapi MA, Gosline JM. Micromechanics of the equine claw wall: Optimizing crack control and material stiffness through modulation of the properties of keratin. *Journal of Experimental Biology*. 1999; 202:377–391.

Kempson SA, Logue DN. Ultrastructural observations of hoof horn from dairy cows: the structure of the white line. *The Veterinary Record*. 1993; 132: 499-502.

Kitchener A, Vincent JFV. Composite theory and the effect of water on the stiffness of horn keratin. *Journal of Materials Science*. 1987; 22:1385–1389.

Kossaibati MA, Esslemont RJ. The costs of production diseases in dairy herds in England. *The veterinary Journal*. 1997; 154:41-51.

Kümper H. Biomechanische Grundlagen einer funktionellen Klauenpflege beim Rind. *Der Praktische Tierarzt*. 1997; 10: 880-888.

Lischer C, Koller U, Geyer H, Mülling C, Schulze J, Ossent P. Effect of therapeutic dietary biotin on the healing of uncomplicated sole ulcers in dairy cattle — a double blinded controlled study. *Veterinary Journal*. 2002; 163:51–60.

Lendner G, Mülling C, Nebe U, Bergsten Ch, Magnusson Ch. Effect of Flooring Systems on Microarchitecture of the Bovine Hoof Horn. *Proceedings of XXV Congress of the European Association of Veterinary Anatomists (EAVA)*; 2004 July 28–31; Oslo, Noriega. p. 29-30.

Manske T. Hoof lesions and lameness in Swedish dairy cattle: prevalence, risk factors, effects of claw trimming and consequences for productivity (Tese de doutorado). Skara, Suécia: Swedish University of Agricultural Sciences (SLU); 2002.

Martig J, Leuenberger WP, Dozst M. Quality and alterations of bovine claws as a function of different variables. *Proceedings of the IIIrd International Symposium on Disorders of the Ruminant Digit*; 1980 October 1-5; Vienna, Austria. p. 40-55.

Martinez JL. Comunicação pessoal em visita na disciplina de Tópicos em Buiatria da pós-graduação em Ciência Animal da PUCPR ao Instituto Agrônômico do Paraná – IAPAR em 2014.

McDaniel BT, Verbeek B, Wilk JC, Everett RW, Keown JF. Relationships between hoof measures, stayabilities, reproduction and changes in milk yield from first to later lactations. *Journal of Dairy Science*. 1984; 67: 198-199.

Mendonça AC, Silva LAF, Fioravanti MCS, Moraes JOR, Almeida CF, Oliveira KS, Oliveira MP, Silva LM. Aspectos morfológicos dos dígitos de bovinos das raças Gir e Holandesa. *Ciência Animal Brasileira*. 2003; 4:53-60.

Meredith LM, Guy StJ. Clinical application of the bovine distal limb anatomy. *Agri-practice*. 1996; 17: 179.

Meyer K, Galbraith H. Claw dimensions and rates of growth and wear in Holsteins dairy cows before and after turn out to pasture to concrete cubicles and straw yards. *Proceedings of the 10th International Symposium on Lameness in Ruminants*; 1998 September 7-10; Lucerne, Switzerland. p. 49-50.

Midla LT, Hoblet KH, Weiss WP, Moeschberger ML. Supplemental dietary biotin for prevention of lesions associated with aseptic subclinical laminitis (pododermatitis aseptic diffuse) in primiparous cows. *American Journal of Veterinary Research*. 1998; 59:733–738.

Miller GY, Dorn CR. Costs of dairy cattle diseases to producers in Ohio. *Preventive Veterinary Medicine*. 1990; 8:171-182.

Mitev J, Gergovska Z, Miteva T, Penev T. Influence of lameness on daily milk yield, lactation curve and body condition score during lactation in Black and White cows. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 2011; 17: 704–711.

Molento CFM, Bond GB. Aspectos técnicos e éticos na produção de bovinos. *Ciência Veterinária nos Trópicos*. 2008; 11: 36-42.

Monte FN, Galotta J. Anatomía del pie bovino. Proceedings [on line] of 14th International Symposium and 6th Conference on Lameness in Ruminants; 2006 November 8-11; Colonia Del Sacramento, Uruguay. p. 120-123. [citado 15 de agosto de 2014]. Disponível em:
<http://www.ivis.org/proceedings/rumlameness/2006/Block7/Monte.pdf?LA=2>

Moynahan EJ. *Acrodermatitis enderpathica and the immunological role of zinc in Immunodermatology*. New York: Plenum Medical Book; 1981.

Mülling C. Struktur, Verhornung und Hornqualität in Ballen, Sohle und weisser Linie der Rinderklaue und ihre Bedeutung für Klauenerkrankungen (Dissertação de Mestrado). Berlin, Alemanha: Freie Universität Berlin; 1993. p. 285.

Mülling C. Theories on the pathogenesis of white line disease - an anatomical perspective. Proceedings [on line] of the 12th International Symposium on Lameness in Ruminants; 2002 January 9-13; Orlando, Florida. p. 90-98. [citado 14 de agosto de 2014]. Disponível em:
<http://www.ivis.org/proceedings/rumlameness/2002/state4/state4.pdf>.

Mülling C, Green L, Barker Z, Scaife J, Amory J, Speijers M. Risk factors associated with foot lameness in dairy cattle and a suggested approach for lameness reduction. Proceedings [on line] of the 24th World Buiatrics Congress; 2006 October 15-19; Nice, France. [citado 19 de setembro de 2014]. Disponível em:
<http://www.ivis.org/proceedings/wbc/wbc2006/Mülling2.pdf?LA=1>.

Mülling C, Greenough PR. Applied Physiopathology of the Foot. Proceedings [on line] of the 24th World Buiatrics Congress; 2006 October 15-19; Nice, France.[citado 19 de setembro de 2014]. Disponível em:
<http://www.ivis.org/proceedings/wbc/wbc2006/Mülling.pdf?LA=1>.

Mülling C. The use of nutritional factors in prevention of claw diseases-biotin as an example for nutritional influences on formation and quality of hoof horn. Proceedings of 11th International Symposium on Disorders of the Ruminant Digit; 2000 September 3–7; Parma: Italy. p. 78–80.

Mülling C, Bragulla H, Reese S. How structures in bovine hoof epidermis are influenced by nutritional factors. *Anatomy, Histology and Embryology*. 1999; 28: 103–108.

Mülling C, Budras KD. The Hoof. In: Budras KD, Habel RE, editores. *Bovine Anatomy*. Hannover: Schlutersche GmbH; 2003. p. 26-27.

Mülling C, Budras KD. Influence of environmental factors on horn quality of the bovine hoof. *Proceedings of the 10th International Symposium on Lameness in Ruminants*; 1998 September 7-10; Lucerne, Switzerland. p. 214-215.

Mülling C, Bragulla H, Budras KD, Reese S. Structural factors influencing horn quality and sites of predilection at the ground surface of the cattle hoof. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*. 1994; 136:49–57.

Murray RD, Downham DY, Clarkson MJ, Faull WB, Hughes JW, Manson FJ, Merrit JB, Russel WB, Suttherst YE, Ward WR. Epidemiology of lameness in dairy cattle: description and analysis of foot lesions. *Veterinary Record*. 1996; 138: 586-591.

Nagaraja TG, Lechtenberg KF. Acidosis in feedlot cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 2007; 23: 333-350.

Napolitano F, Pacelli C, Grasso F, Braghieri A, De Rosa G. The behaviour and welfare of buffaloes (*Bubalus bubalis*) in modern dairy enterprises. *Animal*. 2013; 7: 1704–1713.

Naumann J. Untersuchungen zur Hornqualität bei Rind und Pferd unter besonderer Berücksichtigung der anorganischen Zusammenstellung (Tese de Doutorado). Berlin, Alemanha: Humboldt Universität, 1984.

Nicoletti JLM. Manual de podologia bovina. Barueri: Editora Manole; 2003. p.126-130.

Nocek JE. Hoof care for dairy cattle. Fort Arkinson: W. D. Heard; 1993. p.32.

Nocek JE, Johnson AB, Socha MT. Digital characteristics of commercial dairy herds fed metal-specific amino acid complexes. *Journal of Dairy Science*. 2000; 83: 1553-1572.

Nordlund KV, Cook NB, Oetzel GR. Investigation strategies for laminitis problem. *Journal of Dairy Science*. 2004; 84: 27-35.

Nüske S, Scholz A, Förster M. The claws of heifers and bulls within the first two years of their lives – a contribution to the development of the horn capsule considering different breeding lines and genders. *Proceedings of the 13th International Symposium And 5th Conference on Lameness in Ruminants*; 2004 February 15th; Maribor, Slovenia. p. 73-75.

Ollhoff RD, Ortolani EL. Comparação do crescimento e do desgaste do casco em bovinos taurinos e zebuínos. *Ciência Rural*. 2001; 31: 67-71.

Ollhoff RD, Rogalskyb AD, Grebogić AM, Almeida R, Ostrensky A, Souza FP. Causas de descarte e óbito de bovinos leiteiros entre 2000-2006 em um rebanho de alta produção. *Revista Acadêmica: Ciências agrárias e ambientais*. 2008; 6: 381-387.

Onyiro OM, Offer J, Brotherstone S. Risk factors and milk yield losses associated with lameness in Holstein-Friesian dairy cattle. *Animal*. 2008; 2:1230–1237.

Patan B, Budras KD. Segment specificity of the equine claw - Part 2: Correlation of horn structure and mechanical physical horn properties in the different segments of the hoof. *Pferdeheilkunde*. 2003; 19:177–184.

Pavlenko A, Bergsten C, Ekesbo I, Kaart T, Aland A, Lidfors L. Influence of digital dermatitis and sole ulcer on dairy cow behavior and milk production. *Animal*. 2011; 5: 1259–1269.

Pesce L, Bonino J, Rinbaud E. Enfermidades podais de los ruminantes. Montevideo: Hemisfério Sur; 1992. p. 168.

Peterse DJ. Claw measurements as parameters for claw quality in dairy cattle. *Proceedings of the Vth International Symposium on Disorders of the Ruminant Digit*; 1986 August 24-25; Dublin, Ireland. p. 87-91.

Peterse DJ. Foot lameness. In: Andress H, Blowey RW, Boyd H, Eddy RG, editores. *Bovine medicine*. London: Blacwell Scientific; 1992. p. 353- 363.

Phillips CJC, Morris ID. The locomotion of dairy cows on floor surfaces with different frictional properties. *Journal of Dairy Science*. 2001; 84: 623-628.

Politek RD, Distl O, Fjeldaas T, Heeres J, McDaniel BT, Nielsen E, Peterse DJ, Reurink A, Strandberg P. Importance of claw quality in cattle; review and recommendations to achieve genetic improvement. Report of the EAAP working group on claw quality in cattle. *Livestock Production Science*. 1986; 15: 133-152.

Pollitt CC. Anatomy and Physiology of the Inner Hoof Wall. *Clinical techniques in Equine Practice*. 2004; 3: 3-21.

Pöttsch CJ, Collis VJ, Blowey RW, Packington AJ, Green LE. The impact of parity and duration of biotin supplementation on white line disease lameness in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 2003; 86: 2577-2582.

Radostits OM. Diseases of the musculoskeletal sistem. In: Radostits OM, editor. *Veterinary medicine*. St. Louis: Mosby/ Elsevier; 2005. p. 621-625/ 2007. p. 1064-1070.

Rajala-Schultz PJ, Grohn YT, McCulloch CE. Effects of milk fever, ketosis, and lameness on milk yield in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 1999; 82: 288–294.

Raza SH, Ahmad S, Anwar M, Khan ML. Effects of types of bedding on under and hoof health and behavior in Nili-Ravi buffaloes. Buffalo bulletin. 1998; 17: 14-16.

Reader JD, Green MJ, Kaler J, Mason SA, Green LE. Effect of mobility score on milk yield and activity in dairy cattle. Journal of Dairy Science. 2011; 94: 5045–5052.

Rebhun WC, Guard C. Enfermedades musculoesqueléticas. In: Rebhun WC, Guard C, editores. Enfermedades del Ganado Vacuno Lechero. Zaragoza: Editorial Acribia; 1999. p. 481-500.

Rice RH, Green HP. Presence in human epidermal cells of a soluble protein precursor of the cross-linked envelope: activation of the cross-linking by calcium ions. Cell. 1979; 18: 681-694.

Rice RW, Wu C, Borchelt F. Hardness-grain-size relations in ceramics. Journal of the American Ceramic Society. 1994; 77: 2539-53.

Richardson M. Mineral and vitamins for dairy cattle. Cooperative Extension Service. 1996

Rosenberger G, Dirksen G, Gründer HD, Stöber M. In: Rosenberger G, editor. Exame clínico dos bovinos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1993. p. 419.

Sagués AG. The biomechanics of weight bearing and its significance with lameness. Proceedings of the 12th International Symposium on Lameness in Ruminants; 2002 January 9-13; Orlando, USA. p. 117-121.

Sagués AG. Control de Cojeras en el Ganado Vacuno de Leche. Revista Bovis. 1995; p. 7-31.

Sampaio IBM. Estatística Aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: FEPMVZ; 2007. p. 264.

Shearer JK, Van Amstel SR, Benzaquen M, Shearer LC. Effect of season on claw disorders (including thin soles) in a large dairy in the southeastern region of the United States. Proceedings of the 14th Symposium on Lameness in Ruminants; 2006 November 8-11; Colonia Del Sacramento, Uruguay. p. 110-111.

Silveira JAS, Albernaz TT, Oliveira CMC, Duarte MD, Barbosa JD. Afecções podais em vacas da bacia leiteira de Rondon do Pará. Pesquisa Veterinaria Brasileira. 2009; 29:905-909.

Singh SS. Behavior of lame and normal dairy cows in cubicles and in a straw yard. Veterinary Record. 1994; 135: 251-253.

Smart M, Cymbaluk NF. Role of nutritional supplements in bovine lameness review of nutritional toxicities. In: Greenough PR, Weaver AD, editors. Lameness in Cattle. Philadelphia: W.B. Saunders; 1997. p.145-161.

Smit H, Verbeek B, Peterse DJ, Jansen J, McDaniel BT, Politiek RD. The effect of herd characteristics on claw disorders and claw measurements in Friesians. *Livestock Production Science*. 1986; 15: 1-9.

Sogstad AM, Fjeldaas T, Osteras O. Association of claw disorders with claw horn colour in Norwegian red cattle a cross sectional study of 2607 cows from 112 herds. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2011; 15: 53-59.

Somers JGCJ, Schouthen WGP, Frankena K, Noordhuizen-Satssen EN, Metz JHM. Development of claw traits and claw lesions in dairy cows kept on different floor systems. *Journal of Dairy Science*. 2005; 88: 110-120.

Stashak TS, Hill C, Klimesh R, Ovniec KG. Cuidados com os Cascos e Colocação de Ferraduras para Equilíbrio Natural. In: Stashak TS, editor. *Claudicação em equinos segundo Adams*. 5ªEd. São Paulo: Roca; 2006. p. 1015-1071.

Tolboll TH, Danscher AM, Andersen PH, Codrea MC, Bendixen E. Proteomics: a new tool in bovine claw disease research. *Veterinary Journal*. 2012; 193: 694-700.

Tomlinson DJ, Mülling C, Fakler TM. Invited review: formation of keratins in the bovine claw: roles of hormones, minerals and vitamins in functional claw integrity. *Journal of Dairy Science*. 2004; 87: 797-809.

Toussaint Raven E. Cattle footcare and claw trimming. Farming Press Books. 1989; p. 127.

Toussaint Raven E. The principles of the claw trimming. *Veterinary Clinics in North American Food Animal Practice*. 1985; 1: 93-108.

Túlio LM. Estudo biométrico do casco bovino e bubalino: avaliação de características anátomo-fisiológicas do casco sadio (Dissertação de Mestrado). Curitiba, PR: Universidade Federal do Paraná; 2006.

Van Amstel SR, Shearer JK. Abnormalities of hoof growth and development. *Veterinary Clinics of North America: food animal practice*. 2001; 17: 73-91.

Van Amstel S, Shearer J. *Manual for Treatment and Control of Lameness in Cattle*. 1ª Edição. Tennessee: Blackwell Publishing; 2006.

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*. 2002; 85: 1476-1481.

Van Der Tol PPJ, Metz JHM, Noordhuizen-Stassen EN, Back W, Braam CR, Weijs WA. The vertical ground reaction force and the pressure distribution on the claws of dairy cows while walking on a flat substrate. *Journal of Dairy Science*. 2003; 86: 2875-2883.

Vermunt JJ, Greenough PR. Structural characteristics of the bovine claw: horn growth and wear, horn hardness and claw conformation. *British Veterinary Journal*. 1995; 151: 157-180.

Vermunt JJ. Herd lameness – a review, major causal factors, and guidelines for prevention and control. Proceedings of the 13th International Symposium and 5th Conference on Lameness in Ruminants; 2004 February 11-15; Maribor, Slovenija. p. 3-18.

Vincent JFV. *Biomechanics – Materials: A Practical Approach*. Oxford: Oxford University Press; 1992.

Ward H, Lundgren HP. The formation, composition and properties of the keratin. *Advances in Protein Chemistry*. 1954; 9: 243-297.

Weaver AD, Anderson L, DeLaister-Banting A. Review of disorders of the ruminant digits with proposals for anatomical and pathological terminology and recording. *Veterinary Record*. 1981; 108: 117-120.

Wells SJ, Trent AM, Robinson RA. Individual cow factors associated with clinical lameness in dairy cows. Proceedings of the VIIth International Symposium on Disorders of the Ruminant Digit; 1992 June 21-25; Rebild, Denmark. p. 277.

Wertz PW, Downing D. Glycolipids in mammalian epidermis: Structure and function in the water barrier. *Science*. 1982; 217: 1261-1262.

Whitehead CC. *Biotin in der Tierernährung*. Hoffman-LaRoche: Grenzach-Wyhlen, 1988.

Winchell H. The Knoop microhardness tester as a mineralogical tool. *The American Mineralogist*. 1945; 30: 583-95.

Winkler B, Margerison JK. Mechanical properties of the bovine claw horn during lactation. *Journal of Dairy Science*. 2012; 95:1714–1728.

Yeruham I, Friedman S, Elad D, Perl S. Association between milk production, somatic cell count and bacterial dermatoses in three dairy cattle herds. *Australian Veterinary Journal*. 2000; 78: 250–253.

Zhang Q, Li C, Pan Y, Shan G, Cao P, He J, Lin Z, Ao N, Huang Y. Microstructure and mechanical properties of horns derived from three domestic bovines. *Materials Science and Engineering*. 2013; 33: 5036–5043.