

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**

**CAMPUS DE JABOTICABAL**

**EXPRESSÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RECEPTORES  
VANILÓIDES TRPV1 NA DERMATITE DIGITAL BOVINA**

Yuri da Silva Bonacin

Médico Veterinário

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**

**CAMPUS DE JABOTICABAL**

**EXPRESSÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RECEPTORES  
VANILÓIDES TRPV1 NA DERMATITE DIGITAL BOVINA**

Yuri da Silva Bonacin

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Marques

Coorientador: Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Cirurgia Veterinária.

**2017**

B697e Bonacin, Yuri da Silva  
Expressão e quantificação de receptores vaniloides TRPV1 na dermatite digital bovina / Yuri da Silva Bonacin. -- Jaboticabal, 2017  
xi, 68 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017  
Orientador: José Antonio Marques  
Co-orientador: Sérgio Britto Garcia  
Banca examinadora: Deborah Penteadó Martins Dias, Paulo  
Alécio Canola  
Bibliografia

1. Bovino. 2. Dor. 3. Vaniloide. 4. Claudicação. 5. Leite. I. Título. II.  
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:617:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –  
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

# CERTIFICADO DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EXPRESSÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FIBRAS TRPV1 NA DERMATITE DIGITAL BOVINA

AUTOR: YURI DA SILVA BONACIN

ORIENTADOR: JOSÉ ANTONIO MARQUES

COORIENTADOR: SÉRGIO BRITTO GARCIA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. JOSÉ ANTONIO MARQUES  
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

  
Profa. Dra. DEBORAH PENTEADO MARTINS DIAS  
Departamento de Cirurgia Veterinária / Centro Universitário Barão de Mauá - Ribeirão Preto/SP

  
Prof. Dr. PAULO ALÉSCIO CANOLA  
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 21 de fevereiro de 2017

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**YURI DA SILVA BONACIN** – nascido em Santa Rosa de Viterbo /SP, em 1º de setembro de 1989, filho de Alvaro Antonio Bonacin e Carla Maria da Silva Bonacin. Ingressou no curso de Medicina Veterinária em 2008, pela Universidade Federal do Paraná, *campus* Palotina, recebendo o título de Médico Veterinário em 2012. Conclui o Programa de Aprimoramento Profissional em Medicina Veterinária e Saúde Pública, na área de Clínica Cirúrgica e Anestesiologia de Grandes Animais, junto ao Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel", com início em fevereiro de 2013 até fevereiro de 2015. Ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Unesp), bolsista CAPES, sob orientação do Prof. Dr. José Antonio Marques e coorientação do Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia. Atualmente pleiteia uma vaga no Programa de Doutorado em Cirurgia Veterinária, pela mesma Universidade.

*“Tudo que está no plano da realidade já foi sonho um dia.”*

— Leonardo da Vinci

*Dedico,*

*A Deus por ter iluminado o meu caminho até aqui.*

*Aos meus pais Carla e Álvaro por todo o apoio e suporte durante toda a  
minha vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço especialmente aos meus pais Carla e Alvaro, pela determinação e luta na minha formação pessoal e profissional, por sempre acreditarem no meu potencial e terem me apoiado sempre que foi preciso. Agradeço também a minha irmã Nabila pelas longas conversas e pelo amor fraterno.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. José Antonio Marques, por me acolher e me acompanhar desde o meu Estágio Curricular Obrigatório (2012), pelas conversas de apoio tanto profissional quanto pessoal. Pela ajuda na organização das ideias e execução do projeto.

Ao Prof. Dr. Sergio Britto Garcia por aceitar participar do projeto como coorientador, bem como pela grande ajuda e disposição na realização da parte prática e teórica, cedendo tempo e o espaço físico laboratorial, imprescindíveis para a confecção deste trabalho.

À Universidade Estadual Paulista – UNESP, campus de Jaboticabal, pela oportunidade da realização de um programa de pós-graduação e o Centro de Medicina Legal (CEMEL), pertencente à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (USP), pela disposição de espaço físico e funcionários capacitados.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

À Letti Agrindus S/A Bela Vista em Descalvado, em especial ao colega Médico Veterinário Carlos Alberto, pela disponibilidade dos animais, que foram parte fundamental na realização do trabalho.

A Samara Beretta pelo companheirismo e ajuda nas horas difíceis.



## SUMÁRIO

<b>CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....</b>	<b>iii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
2.1 Dermatite Digital Bovina.....	3
2.2 Capsaicina.....	7
2.3 Receptores de potencial transitório.....	9
2.4 Receptor vaniloide do tipo 1 (TRPV1).....	11
2.5 Receptores TRPV1 e dor.....	12
2.6 Receptores TRPV1 e doenças da pele.....	16
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
3.1 Objetivo Geral.....	17
3.2 Objetivos específicos.....	17
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
4.1. Comitê de Ética e Bem-Estar Animal.....	17
4.2. Infra-estrutura.....	18
4.3. Critério de escolha da propriedade.....	18
4.4. Animais e grupos experimentais.....	18
4.5 Colheita de amostras de tecido dérmico.....	20
4.6 Localização anatômica e mensuração das lesões.....	20
4.7 Exame Histológico.....	21
4.8 Exame Imunohistoquímico.....	21
4.9 Contagem de fibras TRPV1 imunomarcadas.....	22
4.10 Fatores de risco.....	22
4.11 Análise Estatística.....	23

<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>23</b>
5.1. Diagnóstico da DDB.....	23
5.2. Localização anatômica das lesões .....	25
5.3. Mensuração das lesões .....	25
5.4 Fatores de Risco.....	29
5.5 Exame Imunohistoquímico.....	30
5.6 Expressão de fibras TRPV1.....	31
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>39</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>40</b>
<b>9. APÊNDICE.....</b>	<b>49</b>

# CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal



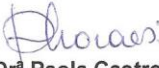
## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "**Classificações macroscópicas e microscópicas da dermatite digital bovina**", protocolo nº 20067/15, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Antonio Marques, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião extraordinária de 06 de novembro de 2015.

Vigência do Projeto	05/11/2015 a 28/02/2017
Espécie / Linhagem	Bovina/Leiteira
Nº de animais	20 (vinte)
Peso / Idade	Indefinidos/Adultos
Sexo	Fêmeas
Origem	Propriedades particulares

Jaboticabal, 06 de novembro de 2015.

  
**Profª Drª Paola Castro Moraes**  
Coordenadora – CEUA

## **EXPRESSÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RECEPTORES VANILÓIDES TRPV1 NA DERMATITE DIGITAL BOVINA**

**RESUMO** - A Dermatite Digital Bovina (DDB) constitui uma das principais causas de graus elevados de claudicação em bovinos leiteiros, em função da dor que estes animais aparentam frente ao estímulo nociceptivo. A hiperalgesia em alguns casos de dor crônica está relacionada à expressão exacerbada de fibras dos receptores vaniloides TRPV1, podendo haver forte correlação com casos crônicos da DDB. No presente estudo foram utilizados 15 bovinos, fêmeas, da raça Holandesa Preto e Branco, com idades de 2 a 7 anos, em lactação com pico médio de 47,85 L, mantidos em regime “free-stall”. Durante o casqueamento realizado na propriedade, as lesões da DDB foram identificadas e divididas em quatro grupos, referentes aos quatro estágios da doença (inicial M1, clássico M2, intermediário M3 e crônico M4). Foram coletadas biópsias por meio de “punch” cutâneo (4mm). Além das lesões foram coletadas amostras de pele sadia de cada animal. Priori às biópsias realizou-se a dimensionamento das lesões, para média comparativa entre os estágios. Os fatores predisponentes ao aparecimento de lesões (idade, número de partos e pico de lactação) foram considerados. As biópsias foram processadas em laboratório e colocadas frente à reação imunológica com anticorpos anti-TRPV1 (Chemicon -USA). Posteriormente as fibras imuno-marcadas nos quatro grupos e pele sadia foram contabilizadas e comparadas. As dimensões das lesões foram analisadas pelo método estatístico descritivo e possuíam média de comprimento e largura no estágio M1 de  $5,60\text{mm}\pm 3,20$  x  $4,4\pm 1,34\text{mm}$ , M2 de  $12,60\pm 6,46\text{mm}$  x  $14,4\pm 8,87\text{mm}$ , M3 de  $21,60\pm 3,36\text{mm}$  x  $17,20\pm 6,61\text{mm}$  e M4 de  $21,60\pm 3,36\text{mm}$  x  $24,57\pm 7,32\text{mm}$ . Com relação à espessura apresentaram média em M1 de  $1,80\pm 1,09\text{mm}$ , M2 de  $6,20\pm 2,16\text{mm}$ , M3 de  $7,40\pm 6,54\text{mm}$  e M4 de  $8,85\pm 4,14\text{mm}$ . Os resultados referentes aos fatores predisponentes foram analisados separadamente com o número de lesões utilizando-se Correlação de Pearson ( $p < 0,05$ ). Houve apenas correlação direta entre o aumento de lesões com o maior número de partos. Os valores da contagem das fibras TPV1 foram analisados pela escala logarítmica, havendo aumento do número de fibras e diferença significativa entre o grupo M4 (estágio crônico da DDB) e os outros grupos.

**Palavras-chave:** bovino, claudicação, dor, leite, vaniloide

## **VANILLOID RECEPTOR TRPV1 EXPRESSION AND QUANTIFICATION ON BOVINE DIGITAL DERMATITIS**

**ABSTRACT** – The Bovine Digital Dermatitis (BDD) is one of the main cause on high claudication levels at the dairy cattle, as a result of the pain that appear in those animal front of the nociceptive stimulus. Hyperalgesia in some chronic pain cases is related to the exacerbated expression of vanilloid TRPV1 fibers, and may have a role on the chronic cases of BDD. In the present study, 15 Black and White Holstein cow was used, aged 2 to 7 years old, during lactation with mean peak of 47.85L, kept in the free-stall under the same diet. BDD lesions were identified and divided into 4 stages of the disease (initial M1, classic M2, intermediate M3 and chronic M4), which skin are collected by dermal punch (4mm). In addition to the lesions, healthy skin samples were collected from each animal. Prior to the biopsies, the lesion dimensions were taken, for comparative average between the stages. Predisposing factors to the lesions appearance (age, number of births and lactation peak) were considered. The biopsies were processed at the laboratory and reacted with anti-TRPV1 antibodies (Chemicon -USA). The immuno-marked fibers in the four groups and healthy skin were counted and compared. The lesion dimensions were analyzed by descriptive statistical method and had a M1 mean length/ width on M1 of 5,60mm±3,20 x 4,4±1,34mm, M2 of 12,60±6,46mm x 14,4±8,87mm, M3 of 21,60±3,36mm x 17,20±6,61mm and M4 of 21,60±3,36mm x 24,57±7,32mm. The thickness mean value in M1 of 1.80 ± 1.09mm, M2 of 6.20 ± 2.16mm, M3 of 7.40 ± 6.54mm and M4 of 8.85 ± 4.14mm. The predisposing factors results were analyzed separately with the number of lesions by Pearson Correlation statistic method ( $p < 0.05$ ). There was difference between more lesion and birth numbers. TRPV1 fiber counts were analyzed by logarithmic scale ( $p < 0.05$ ), with a significant difference between the M4 group (chronic stage of DDB) and the other groups.

**Key words:** bovine, claudication, pain, milk, vanilloid

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATP – Trifosfato de adenosina

A $\beta$  - Fibras Beta mielinizadas

A $\delta$  - Fibras Delta mielinizadas

Ca<sup>2+</sup> - Cálcio

cm - Centímetros

DDB - Dermatite Digital Bovina

kg/dia – quilograma por dia

L – Litro

Max – Valor Máximo

Min – Valor mínimo

mL – Mililitros

mm – Milímetros

ms - Milissegundos

NADA - Dopamina N-araquidonoil

°C – Graus Celsius

PBS - Solução-tampão de fosfato

PGE2 – Prostaglandina E2

PGI2 - Prostaciclina

pH – Potencial Hidrogeniônico

RTX – Resiniferatoxina

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

TRP - Receptor de Potencial Transitório

TRPA1- Proteína de Trasmembrana Ankyryn

TRPMLs - Receptores de Potencial Transitório mucolipinos

TRPMs - Receptores de Potencial Transitório Longos

TRPN - Receptores de Potencial Transitório NompC

TRPPs - Receptores de Potencial Transitório Policistinos

TRPV1 - Receptor de Potencial Transitório Vanilóide do tipo 1.

TRPVs - Receptores de Potencial Transitório Vanilóides

VR1 – Receptor Vanilóide do tipo 1

µm – Micrômetro

## LISTA DE TABELAS

Página

<b>Tabela 1.</b> Localização anatômica e contagem das lesões da Dermatite Digital Bovina em 15 animais da Raça Holandesa, positivos para a doença, com a distribuição das lesões nos membros torácicos e pélvicos, demonstrando a prevalência através de análise estatística descritiva.....	25
<b>Tabela 2.</b> Médias ( $\pm$ desvio padrão) em milímetros e mediana (min-max) do comprimento de lesões da Dermatite Digital Bovina em 15 animais da raça Holandesa, dimensionadas por paquímetro manual, distribuídas de acordo com o estágio da lesão (M1, M2, M3 e M4), sendo M1 as lesões iniciais, M2 as lesões Clássicas, M3 o estágio intermediário e M4 as lesões crônicas .....	26
<b>Tabela 3.</b> Médias ( $\pm$ desvio padrão) em milímetros e mediana (min-max) da largura de lesões da Dermatite Digital Bovina em 15 animais da raça Holandesa, dimensionadas por paquímetro manual, distribuídas de acordo com o estágio da lesão (M1, M2, M3 e M4), sendo M1 as lesões iniciais, M2 as lesões Clássicas, M3 o estágio intermediário e M4 as lesões crônicas .....	27
<b>Tabela 4.</b> Médias ( $\pm$ desvio padrão) em milímetros e mediana (min-max) da espessura de lesões da Dermatite Digital Bovina em 15 animais da raça Holandesa, dimensionadas por paquímetro manual, distribuídas de acordo com o estágio da lesão (M1, M2, M3 e M4), sendo M1 as lesões iniciais, M2 as lesões Clássicas, M3 o estágio intermediário e M4 as lesões crônicas .....	27
<b>Tabela 5.</b> Relação entre o número de lesões, partos, pico de lactação e idade dos 15 animais da raça Holandesa, mantidos em regime de criação <i>free stall</i> , em propriedade da cidade de Descalvado – SP, avaliados quanto a presença da Dermatite Digital Bovina .....	29
<b>Tabela 6.</b> Médias ( $\pm$ desvio padrão) e mediana (min-max) dos Fatores de risco (partos, pico de lactação atual e idade) relacionados ao aparecimento de lesões da Dermatite Digital Bovina .....	29



<b>Tabela 7.</b> Subdivisões dos fatores de risco (partos, pico de lactação atual e idade) relacionados ao aparecimento de lesões da Dermatite Digital Bovina, com a porcentagem de animais alocados em cada grupo .....	30
<b>Tabela 8.</b> Contagem média de fibras imuno-marcadas TRPV1 em amostras de DDB divididas nos quatro estágios da doença e grupo controle, realizada em vinte campos microscópicos por amostra.....	32
<b>Tabela 9.</b> Valores da média/desvio padrão da contagem de fibras imuno-marcadas TRPV1 de amostras colhidas de lesões da Dermatite Digital bovina, em 15 animais da raça Holandesa, divididos em cinco grupos experimentais: amostras de pele sadias (S), (M1, M2, M3 e M4), sendo M1 as lesões iniciais, M2 as lesões Clássicas, M3 o estágio intermediário e M4 as lesões crônicas.....	32
<b>Tabela 10.</b> Dimensões (comprimento, largura e espessura) das lesões de Dermatite Digital Bovina em 15 animais da raça Holandesa, dimensionadas por paquímetro manual, distribuídas de acordo com o estágio da lesão (M1, M2, M3 e M4), sendo M1 as lesões iniciais, M2 as lesões Clássicas, M3 o estágio intermediário e M4 as lesões crônicas.....	51

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Estrutura dos canais de receptores de potencial transitório, ilustrando os domínios que transpõe as membranas intra e extracelular (S1-S6), com atenção à região do poro (P) e os grupos funcionais intracelulares: carboxila (C) e N-terminal (N). Fonte: Adaptado de CLAPHAM et al., 2001 .....	10
<b>Figura 2.</b> Imagem fotográfica de lesões da DDB, indicadas pela seta azul. (A) Vista plantar do espaço interdigital do membro pélvico esquerdo de bovino da raça Holandesa, apresentando estágio inicial da DDB, com lesão M1; (B) Vista palmar do espaço interdigital do membro torácico esquerdo de bovino da raça Holandesa, apresentando lesão ulcerada, característica do estágio clássico de lesão M2; (C) Vista plantar do espaço interdigital do membro torácico direito de bovino da raça Holandesa, apresentando estágio intermediário da DDB, onde é possível a visualização de uma crosta cobrindo a lesão, característica de estágio M3; (D) Vista plantar do espaço interdigital do membro pélvico direito de bovino da raça Holandesa, com lesão hiperqueratinizada, apresentando pelos, condizente com o estágio crônico M4. Fonte: Propriedade Leiteira localizada no município de Descalvado, SP, Brasil.....	24
<b>Figura 3.</b> Médias em milímetros e desvio padrão de lesões da Dermatite Digital Bovina em 15 animais da raça Holandesa, dimensionadas por paquímetro manual, representadas no eixo Y e distribuídas no eixo X de acordo com o comprimento, largura e espessura, agrupadas pelo estágio das lesões (M1, M2, M3 e M4), sendo M1 as lesões iniciais, M2 as lesões Clássicas, M3 o estágio intermediário e M4 as lesões crônicas. a, b, c Diferem estatisticamente de M1 .....	28
<b>Figura 4.</b> Amostras de pele bovina sadia, imuno-marcadas para fibras TRPV1 (setas amarelas) de lesões da Dermatite Digital Bovina, realizada em microscópio óptico na lente objetiva de 100X, em 15 animais da raça Holandesa. (S) mostra as fibras imunomarcadas no grupo controle, com amostras de pele sadias. (M2) mostra as fibras TRPV1 imunomarcadas no grupo de lesões clássicas e ulcerativas da Dermatite Digital Bovina. (M4) mostra as fibras TRPV1 imunomarcadas no grupo de lesões crônicas da Dermatite	

Digital Bovina. Fonte: Centro de Medicina Legal da Universidade de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil .....31

**Figura 5.** Valores médios da contagem de fibras TRPV1 imuno-marcadas nos quatro estágios da Dermatite Digital Bovina, em amostras colhidas de 15 animais da raça Holandesa, expressas em gráfico de linhas. Demonstrando as amostras de tecido sadio (a), estágio M1 com lesões iniciais (b), M2 com lesões Clássicas (c), M3 com estágio intermediário (d) e M4 com lesões crônicas (e).....33

## 1. INTRODUÇÃO

O estudo de receptores vaniloides transitórios do tipo 1 (TRPV1), demonstram sua forte interação com o processo de transmissão da dor. Estes são ativados por muitas substâncias externas, dentre elas a capsaicina, que constitui o principal componente das pimentas conhecidas por sua picância (CATERINA et al., 1997). Porém, podem ser ativados por outras substâncias, tal como produtos da lipoxigenase (leucotrieno B4), ATP, prostaglandinas (PGE2, PGI2), histamina, proteases (SULK; STEINHOFF, 2015). Assim, acredita-se que os receptores TRPV1 constituam importante mecanismo modulador da dor. Por meio de métodos de imunohistoquímica, foi possível identificar expressão significativa destes receptores em pacientes que sofriam de hiperalgesia (EHNIS-PÉREZ et al., 2016).

Os elevados graus de claudicação nos animais acometidos pela DDB, constituem um dos maiores problemas na pecuária leiteira (BARKEMA et al., 1994; RADOSTITS et al., 2006; KRULL et al., 2016). A medida que os animais são mantidos em regime fechado de estabulação, os custos de produção aumentam e o surgimento de doenças pode interferir diretamente na receita produzida pelas propriedades leiteiras. As afecções podais são o maior problema encontrado nas propriedades e conseqüentemente geram os maiores gastos. (BARKEMA et al., 1994).

As perdas relacionadas à produção leiteira estão diretamente relacionadas com o grau e a presença de claudicação nesses animais (BARKEMA et al., 1994; WARNICK et al., 2001; GREEN et al., 2002, BICALHO et al., 2007). Em estudo realizado na Holanda por Bruijnjs e colaboradores (2010), estimou-se que o gasto médio por ano com afecções podais, em uma propriedade com 65 animais, é de U\$4.899 (U\$ 75/vaca). Independente da presença ou não de sinais clínicos, estimou-se que 44% dos custos eram relacionados à perda na produção leiteira e que a DDB era responsável pela maior quantia relacionada aos gastos, estimando-se um gasto anual de U\$1.517.

Quando analisamos as grandes perdas econômica da doença e a hiperalgesia demonstrada, pode existir forte interação da sintomatologia clínica com a maior expressão de receptores TRPV1. Tal expressão constitui um importante avanço na

melhoria do bem-estar animal, diminuição de gastos e uma alternativa promissora para possíveis novos tratamentos, além de ajudar na caracterização da patogenia da DDB, a qual ainda não foi elucidada completamente.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Dermatite Digital Bovina

As afecções dos cascos de bovinos aumentaram ao longo dos anos, com a introdução de métodos criatórios e de técnicas de alimentação intensivas. O crescimento das perdas econômicas imputáveis às afecções podais deve ser levado em consideração. As principais consequências são: diminuição da produção leiteira, queda de peso, aumento do intervalo entre partos, retardamento no crescimento, reformas de instalações precoces e gastos com honorários veterinários (DIRKSEN; STOBER, 1981, BARKEMA et al., 1994).

Dentre as afecções podais dos ruminantes associadas às perdas econômicas expressivas, destaca-se a DDB. As perdas ligadas à produção leiteira estão diretamente relacionadas com o grau e a presença de claudicação nesses animais (BARKEMA et al., 1994; WARNICK et al., 2001; GREEN et al., 2002, BICALHO et al., 2007). A avaliação da claudicação é realizada por método visual e classificada em escores. Nem sempre é possível o acompanhamento rotineiro desses animais nas propriedades, interferindo na maioria dos estudos realizados (WARNICK et al., 2001).

A DDB foi descrita primeiramente na Itália no ano de 1974 por Cheli e Mortellaro. Posteriormente, em 1980, Rhebun e colaboradores, nos Estados Unidos, descreveram a doença em vacas de aptidão leiteira, como um papiloma interdigital sensível à palpação digital ocasionando elevados graus de claudicação, queda na produção de leite, diminuição dos índices reprodutivos e perda de peso. A afecção foi descrita como relato de caso no Simpósio de desordens em dígitos de bovinos, como aparecimento de uma região hiperêmica e eczema úmido nas regiões planta/palmar e dorsal do espaço interdigital (WEAVER et al., 1981). No Brasil, a DDB foi citada inicialmente em um periódico de boas práticas de manejo, como sendo necrose dos talões e tecido cutâneo interdigital, causada pelo acúmulo de estrume e urina nos estábulos (DIRKSEN; STOBER, 1981).

O relato mais preciso da enfermidade, ocorreu em 1988, em estudo de um rebanho de 13762 animais, avaliado por Silveira e colaboradores (1988), onde

descreveram a doença como tumor de sola. No ano de 1992, em estudo realizado sobre a incidência de afecções podais em bovinos de corte, observou-se a doença em dois animais, em um total de 1695. Ambos eram garrotes abatidos, que pela idade poderiam ainda não ter desenvolvido a doença. O regime de criação era extensivo, desta maneira as condições ambientais propícias para a disseminação da doença, não estavam presentes (RIBEIRO et al., 1992).

A introdução de animais novos na propriedade é tida como uma das principais causas de disseminação da doença. Existem relatos como os de Nutter e Moffitt (1990), no qual a introdução de animais em uma propriedade, sem a eficiente detecção da presença da dermatite digital, ocasionou aumento de 80% dos casos de animais positivos em algumas semanas.

O envolvimento de cepas da classe espiroqueta, do gênero *Treponema* são as mais descritas na literatura como sendo a causa da doença (GUARD, 2008). A contaminação por *Treponema*, pode ter origem via oral ou rumenal. As espiroquetas ganham acesso à pele por meio de trauma, causando necrose e inflamação. A dermatite digital é tida como a principal lesão de pele que leva à claudicação no gado de leite, sendo responsável por perdas econômicas aos criadores e comprometendo o bem-estar animal individual (DEMIRKAN et al., 1999). Pesquisas demonstraram que a presença de cepas de *Treponema* em outras lesões podais que não cicatrizam, dentre elas a necrose do dígito, doença da linha branca e úlceras de sola, caracterizando infecções polimicrobianas (EVANS et al., 2011).

Atualmente em um experimento realizado no Brasil, com extração de DNA e PCR de amostras de tecido lesionado e coleta de líquido rumenal. Foram encontrados cinco filotipos de *Treponema* (*T. denticola*, *T. putidum*, *T. médium*, *T. vincentii*, e *T. phagedenis*) dando forte embasamento aos estudos iniciais e constituindo avanço importante na epidemiologia da doença no Brasil (NASCIMENTO et al., 2015).

Alguns estudos relatam a possível correlação entre a DDB e a espiroqueta causadora da doença de Lyme, *Borrelia burgdorferi*. A suspeita surgiu a partir da observação de bovinos, que após regime intensivo de inverno, eram soltos no pasto e aumentavam o escore ou começam a apresentar claudicação. A partir dessas observações, foram realizados estudos sorológicos desses animais e encontrou-se

grandes níveis de anticorpos para *B. burgdorferi*, principalmente em animais positivos para DDB. Os estudos ainda relataram que os níveis séricos aumentavam na época que estes animais eram mantidos em regime de pasto, provavelmente pelo contato com o carrapato transmissor da doença, porém níveis altos foram encontrados em propriedades as quais não haviam infestação pelos parasitas. As amostras positivas de *B. burgdorferi* foram encontradas na urina de vacas com aptidão leiteira, constituindo forte indicio de outro agente etiológico (BLOWEY et al., 1994; LEFEBVRE, 2013).

As lesões são descritas como crescimento atípico de uma massa, que quase exclusivamente envolve a porção central dos bulbos dos cascos, podendo estender ao sulco axial. Ocasionalmente, lesões encontram-se elevadas e de 3 a 4 cm de diâmetro, de aparência acinzentada com áreas ulceradas de cor vermelha, com pelos negros e brilhantes inseridos em sua superfície. A progressão dessas lesões resulta em necrose, com infiltração do tecido córneo nos bulbos do casco (HANNA et al., 1994). Em alguns animais ocorre visualização da marcante separação do casco e das laminas sensitivas, se iniciando a partir da lesão inicial (NUTTER; MOFFITT, 1990). Essas lesões no casco estão presentes em aproximadamente 25% dos animais, em sua maioria animais adultos (HANNA et al., 1994).

As lesões características são divididas em quatro estágios (DÖPFER, 1997). A importância da classificação desses estágios se dá pelo fato de estudos recentes terem reportado que além da dermatite digital ser de causa polimicrobiana, não há nenhum componente fúngico ou viral significativo nas lesões. O adicional é que há mudança na microbiota bacteriana, no casco bovino, conforme a lesão vai se cronificando e evoluindo pelos quatro estágios. Porém, ainda são necessários mais estudos para identificar o papel que cada uma destas bactérias desempenha na progressão da doença, a fim de criar novas estratégias de prevenção dirigidas a patógenos específicos (KRULL et al., 2014).

A descrição de Döpfer e colaboradores (1997) incluía prévio ao estágio da DDB, o prefixo M, em homenagem à Mortellaro. A fase inicial (M1), contemplava lesões com área granulomatosa circunscrita, 0,5 a 4 cm de diâmetro, que se encontra na superfície do epitélio ou até 2 mm abaixo dele. A fase seguinte (M2) foi descrita como



ulceração “clássica”, ocorrendo próximo à banda coronária do casco, afetando pele e tecido córneo, de até 7 cm de diâmetro, com presença de tecido de granulação infiltrado a mais de 2 mm abaixo do nível do epitélio. O processo de reparação tecidual se inicia na fase intermediária (M3), onde foi possível observar as lesões cobertas por uma crosta. NA fase crônica (M4), ocorreram alterações da pele próxima à banda coronária, podendo ocorrer na situação endêmica, a qual existe histórico de suspeita da doença. As lesões cutâneas apresentaram hiperqueratose e aspecto proliferativo.

O diagnóstico da DDB é baseado na inspeção visual dos cascos, principalmente em membros pélvicos, em busca de lesões circunscritas características (READ; WALKER, 1988; BERRY et al., 2004). As lesões devem ser classificadas segundo os graus descritos na literatura, já que podem apresentar diferentes estágios de acometimento (DOPFER et al., 1997).

A epiderme das biopsias coletadas de lesões da DDB mostra acantose localizada com hiperplasia queratinocítica. As projeções parecidas com dedos são originadas de queratinócitos inflados, necróticos ou queratinizados, com grande número de neutrófilos, células necróticas e colônias de bactérias em outras zonas (HANNA et al., 1994; BORGMANN et al., 1996). As camadas externas mostram invasões por colônias de bactérias, onde se encontram microcorpúsculos intraepidermais. A derme superficial tem uma mistura de células inflamatórias e sinais de congestão. Espiroquetas podem ser vistas em projeções tanto necróticas, quanto nas proliferações do tecido epidermal externo, enquanto outras bactérias se limitam às camadas necróticas. As espiroquetas são projetadas perpendiculares às camadas da epiderme e aparentemente invadem as células. A derme papilar tem presença de trombos de fibrina e hemorragia. A derme profunda apresenta-se congesta. Existe infiltrado perivascular e perianexial com linfócitos e células plasmáticas ou uma mistura de populações de eosinófilos, neutrófilos e células plasmáticas. A coloração de gram confirma a presença de espiroquetas (BORGMANN et al., 1996). Ainda com o uso da microscopia de campo escuro, é possível se observar organismos espirais em suspensões de amostras (WALKER et al., 1995).

Alguns fatores predisõem ao aparecimento de lesões da DDB, tal como a idade dos animais. Em estudos realizados com controle e características clínicas da doença,

constatou-se maior incidência em fêmeas primíparas do que em animais com mais de uma cria e mais velhos. Esta predisposição ocorre possivelmente pela troca abrupta de ambiente e demanda metabólica da primeira lactação, antes e depois do parto. Acredita-se que a diminuição da incidência da DDB conforme as parições seguintes, se dá pelo desenvolvimento de imunidade, podendo ocorrer recidivas (READ; WALKER, 1998).

O estágio de lactação também influencia no aparecimento de lesões, já que vacas secas recebem dieta composta por mais fibras, produzindo fezes mais secas e mantendo assim, um ambiente menos úmido. Animais em lactação recebem uma dieta mais calórica e produzem fezes mais pastosas, além do fato de permanecerem em maior densidade populacional (MURRAY et al., 2002). Animais com os pés mantidos em ambiente continuamente úmido tem maior chance de desenvolver a DDB, além do fato de ser um forte indicio de as lesões ocorrerem sempre em local característico (espaço interdigital) (READ; WALKER, 1998).

Quanto ao tratamento da afecção, a aparente importância das bactérias na patogenia da doença, faz com que a primeira atitude a ser tomada seja a redução da infecção bacteriana. Uma estratégia importante para o sucesso no controle da doença, se baseia em três pontos: terapia antimicrobiana sistêmica, tratamento tópico individual e uso de pedilúvio para todo o grupo de animais (LAVEN; LOGUE, 2004).

## **2.2 Capsaicina**

Os estudos dos receptores TRPV1, vem constituindo um grande avanço na área da medicina humana ligada à neurociência, principalmente ajudando a elucidar os mecanismos do sistema nervoso sensorial (CATERINA et al., 1997; MALMBERG; BLEY, 2005). Os estudos iniciais a respeito da capsaicina datam de 1850, onde extrato alcóolico de pimenta era usado como analgésico no tratamento de queimaduras e prurido em extremidades, porém ainda não havia se isolado o princípio ativo (capsaicina) (TURNBULL, 1850). O princípio ativo é derivado de plantas do gênero *Capsicum*, pertencendo ao grupo de substâncias denominadas capsaicinoides, encontrado principalmente nas pimentas fortes, conhecidas pelo seu gosto picante ao

paladar. Foi isolado apenas no ano de 1846 (TRESH, 1846). Existem outros constituintes das pimentas que também conferem o sabor picante, porém apenas estudos com a capsaicina demonstram o valor terapêutico da substância. Algumas pimentas possuem mais picância que outras, podendo assim variar a concentração de capsaicina (KRAJEWSKA, POWERS, 1988; SOUZA, ROSSI, 2014). A sua estrutura molecular se assemelha a de algumas substâncias exógenas, como exemplo da resiniferatoxina (RTX), derivada de plantas do gênero *euphorbia*, a qual também possui o grupamento homovanilil e demonstra ter efeito semelhante, porém com concentrações menores. Assim, todos os compostos que possuem este grupamento, são descritos como vanilóides. Alguns antagonistas são conhecidos, tal como a capsazepina e o corante vermelho de rutênio, porém não inibem exclusivamente os receptores vanilóides, portanto não possuem amplo uso (SZALLASI, BLUMBERG, 1990; BEVAN et al., 1992).

Devido ao uso de medicamentos contendo esta substância na sua composição, para fins medicinais, estudos realizados ao longo dos anos provaram a eficácia no tratamento de diversas afecções. A ação da capsaicina como anestésico local é um dos principais avanços na neurociência, sendo assim ela pode atuar no bloqueio da transmissão dos sinais, a nível dos nociceptores, interrompendo a propagação do estímulo da dor (CATERINA et al., 1997; BINSHTOK et al., 2007). Estudos iniciais realizados na derme de ratos e humanos comprovaram que, mesmo não havendo inervação da derme, ou mesmo após a administração de anestésico local, ocorre reação inflamatória (mudança de coloração da derme e aumento de temperatura), no local de contato com substâncias irritantes (óleo de mostarda e trafuril). Na derme previamente dessensibilizada com capsaicina, não ocorreu nenhuma formação de resposta inflamatória, contribuindo para a investigação de outra via inflamatória além da via sensitiva por reflexos axonais (JANCKSÓ et al., 1968). Esta via foi descrita posteriormente por receptores, que são ativados por substâncias endógenas bem como pelos extremos de temperatura (altas e baixas temperaturas), alterações de pH e substâncias exógenas como a capsaicina (CATERINA et al., 1997, HUANG et al., 2002).

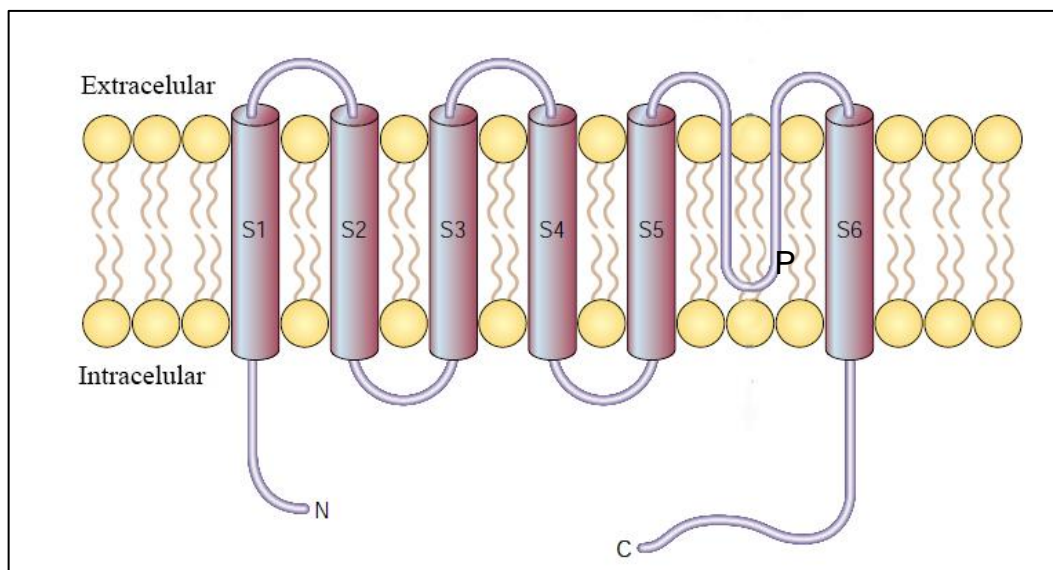
O efeito neurotóxico da capsaicina se deve à sua predileção pela destruição mecânica dos nociceptores primários aferentes, fazendo com que haja denervação

do local, porém há morte celular muito grande, podendo causar mutações nos canais iônicos e células (CATERINA et al., 1997). As mutações em canais iônicos constituem importante papel na excitabilidade e função dos nociceptores (BENNETTE; WOODS, 2014).

### **2.3 Receptores de potencial transitório**

Os receptores de potencial transitório, foram descritos pela primeira vez no ano de 1969 por Cosens e Manning, os quais estudavam um gene mutante na popularmente conhecida como “mosca-da-fruta”, *Drosophila melanogaster*. O estudo foi realizado com uso de eletroretinograma, mantendo as moscas na presença de luminosidade e retirando após um período, avaliou-se a retina, a qual demorava a se adaptar à foto estimulação, surgindo a teoria de que o gene mutante causava despolarização dos receptores normais (COSENS, MANNING, 1969). A teoria foi posteriormente provada por estudos com genoma das moscas, classificando o gene mutante como uma membrana proteica integral, denominada Receptor de Potencial Transitório (TRP) (MONTELL, RUBIN, 1989).

Estruturalmente os canais TRPs possuem sete domínios hidrofóbicos (Figura 1), dos quais seis atravessam a membrana (S1 ao S6) e o sétimo, junto com os grupos funcionais carboxila (C) e N-terminal (N) está presente no meio intracelular. A região do poro (P), porção permeável da membrana, está localizada entre os domínios S5 e S6 (CLAPHAM et al., 2001).



**Figura 1.** Estrutura dos canais de receptores de potencial transitório, ilustrando os domínios que transpõe as membranas intra e extracelular (S1-S6), com atenção à região do poro (P) e os grupos funcionais intracelulares: carboxila (C) e N-terminal (N). Fonte: Adaptado de CLAPHAM et al., 2001.

Os canais TRP são canais iônicos os quais possuem uma transmembrana formada por poros, que permite os íons de atravessarem estas membranas biológicas. Esses canais possuem duas características fundamentais no seu funcionamento: a capacidade de regular a abertura e fechamento desses poros e a seletividade para alguns íons. A permeabilidade dos canais TRP ao  $\text{Ca}^{2+}$ , tal como foi descrito inicialmente por Caterina e colaboradores (1997) faz com que sejam agrupados como canais de cátions (OWSIANIK et al., 2006). Essa permeabilidade da membrana dos canais iônicos foi estudada com o uso das *Drosophilas*, onde houve ativação desses canais após a diminuição da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  nos compartimentos citoplasmáticos, constituindo assim um canal de cálcio independente de voltagem (WES et al., 1995).

A distribuição dos TRP nos mamíferos é ampla em todos os tecidos, assim cada célula pode conter um ou mais canais. Estes canais são ativados por um número grande de substâncias, tanto endógenas como exógenas, além de estímulo da temperatura, forças mecânicas, íons de cálcio livres nas células, dentre outras. Assim pode-se dizer que eles participam de quase todas as funções vitais, bem como podem

modular inúmeros mecanismos regulatórios de enfermidades (OWSIANIK et al., 2006; CATERINA, 2015).

Nos mamíferos, os receptores TRPs compreendem uma grande família de proteínas com canais iônicos, do quais o número de componentes só é menor do que a família de canais de potássio voltagem-dependentes. Nesses, são reconhecidos aproximadamente trinta canais, divididos em sete grandes subgrupos: canais TRP clássicos (TRPCs), receptores vanilóides (TRPVs). TRP longos (TRPMs), mucolipinos (TRPMLs), policistinos (TRPPs), proteína de trasmembrana ankyryn 1 (TRPA1) e NompC (TRPN) (CLAPHAM et al., 2005; WU, et al., 2010; CATERINA, 2015)..

Além dos grandes grupos, os canais do grupo dos vanilóides (TRPV) foram amplamente estudados. Observou-se que este grupo é dividido em seis isoformas, TRPV1 ao TRPV6, sendo o TRPV1 o mais estudado até a atualidade (BAYLIE; BRAYDEN, 2011). Os estudos com estes canais provam cada vez mais a sua relação com os sentidos dos seres vivos, desde o paladar, olfato, audição, sensações frente a estímulos mecânicos e sensação térmica (MONTELL, 2005).

#### **2.4 Receptor vaniloide do tipo 1 (TRPV1)**

Os receptores vaniloides do tipo 1 (VR1), foram descritos primeiramente em 1997, por CATERINA e colaboradores, os quais relatam por meio de ensaio realizado com a clonagem desses receptores, que estes possuem pequenos neurônios com gânglios sensoriais, já que foram encontrados no nervo trigêmeo e em gânglios da raiz dorsal medular de ratos. Receptores vaniloides são uma espécie de sensor de temperatura, assim quando há aumento na temperatura ambiente, há inflamação local ou mesmo em resposta ao estresse, no caso dos animais, eles ativam um canal iônico proteico, que gera uma sensação de ardência captada pelo ser vivo como dor. A nomenclatura dos receptores vem da inclusão dos receptores VR1 na subfamília dos Receptores de Potencial Transitório (TRP), os quais controlam o influxo do cálcio extracelular, dependente da diminuição do cálcio intracelular, já que os VR1 supostamente são fechados pela interação difusa de pequenas moléculas de cálcio

(CATERINA et al., 1997). Atualmente a descrição de TRPV1 é: canais iônicos controlados por ligantes (BENNETTE, WOODS, 2014).

A subfamília dos TRPV é dividida em seis membros, subdivididos em dois grupos, de acordo com a sequência homóloga, similaridades funcionais e seletividade de  $Ca^{2+}$  em: V1, V2, V3, V4 e V5, V6. O receptor TRPV1 é o mais estudado dentre todos e a subfamília está cada vez maior com os avanços nas pesquisas (CATERINA, JULIUS, 2001; CLAPHAM et al., 2005).

Além da localização nas células neuronais, os TRPV1 também são expressos em outros tecidos, incluindo a pele e células do sistema imune, constituindo assim função essencial na manutenção da homeostase corporal (SULK; STEINHOFF, 2015).

Inicialmente, os estudos realizados com *D. menegaster*, sugeriam que os receptores eram ativados pela luz (COSENS, MANNING, 1969), porém foi provado alguns anos depois a interação de cátions na modulação do estímulo luminoso e a ativação dos receptores em situações de temperatura extremas ( $>43^{\circ}C$ ) e pH  $<6$  (CATERINA et al., 1997; BENNETT; WOODS, 2014). Em experimento com uso de ratos mutantes, nos quais não havia expressão de TRPV1, quando submetidos à variações de temperatura, os resultados encontrados demonstraram que estes animais tiveram alterações comportamentais, a hipótese testada foi que sem os receptores estes animais não sentiriam a mudança, porém ainda houve pequeno estímulo, provando que este é um sistema heterogêneo, com múltiplos mecanismos de transdução, com maior participação de TRPV1 (CATERINA et al., 2000).

## **2.5 Receptores TRPV1 e dor**

A dor é descrita como sensação desagradável, localizada em alguma parte do corpo. A indução da dor pode ocorrer por vários motivos, tal como trauma mecânico, exposição a agentes químicos irritantes, temperaturas extremas, além da dor emocional, relatada também em animais (RATHMELL; FIELDS, 2015). Segundo a Associação Internacional do Estudos da Dor (IASP), a dor é definida como “uma experiência sensitiva e emocional associada ao dano tecidual real ou potencial ou à descrição desses danos” (PAGURA, 2009).

A classificação da dor é feita em dois tipos: aguda e crônica. A dor aguda representa importante mecanismo de defesa do organismo, já que sinaliza uma possível lesão, ou mesmo uma lesão já instalada, produzindo reações de defesa naturais (fuga ou retirada do agente causal). Já a dor crônica é caracterizada por reações musculoesqueléticas e psico-comportamentais, as quais realizam incapacidade nas repercussões bio-psicossociais desfavoráveis (TEIXEIRA, 2009).

A dor se inicia geralmente pela ativação de receptores sensitivos, nas estruturas somáticas ou viscerais, descritos como nociceptores, os quais captam os estímulos externos, pelas fibras nervosas do sistema nervoso periférico (SNP) e transformam em potenciais de ação, que por sua vez transmitem a “dor” ao sistema nervoso central (SNC) (TEIXEIRA, 2009; GOLD; GEBARTH, 2010). Esses receptores são descritos como nociceptores (TOMINAGA et al., 1998) e estão presentes no gânglio das raízes dorsais e nos forames vertebrais. Os nervos periféricos são constituídos por axônios de três diferentes classes de neurônios: aferentes sensoriais primários, neurônios motores e neurônios pós-ganglionares simpáticos (RATHMELL; FIELDS, 2013). Nos mamíferos, todas as sensações e processos relacionados à nocicepção, quando o organismo é colocado frente à estímulos tal como: mecânicos, químicos ou térmicos, ocorrem predominantemente nas terminações nervosas periféricas, compostas por axônios de neurônios aferentes primários de pequeno diâmetro fibras (RATHMELL; FIELDS, 2013; TODD, 2016).

Receptores TRPV1 possuem uma integração molecular multivariada, assim atuam no sistema sensorial, particularmente nas reações ligada à dor (MONTELL, 2005).

Existem duas ramificações do axônio, uma se projeta centralmente para a medula espinhal e a outra inerva pele, músculos, vísceras e outros tecidos. Os axônios são divididos ainda quanto à sua velocidade de condução e espessura em fibras muito finas e desmielinizadas, denominadas Fibras C e fibras mielinizadas de maior diâmetro (A $\beta$ ) e menor diâmetro (A $\delta$ ). Nociceptores mielinizados (A $\beta$  e A $\delta$ ) transmitem dor de rápida duração e aguda, enquanto as fibras C transmitem a dor de longa duração e difusa devido à sua espessura (RATHMELL; FIELDS, 2013; TODD, 2016). Os nociceptores A $\delta$  (velocidade de 4-30 m/s) são modalidade específicos



(unimodais) e atuam na detecção de estímulos térmicos aplicados na pele, músculos e articulações. As fibras C (0,5 -2 m/s) respondem ao estímulo nociceptivo frente aos estímulos térmicos, mecânicos e químicos (multimodal) (JULIUS; BASBAUM, 2001).

O sistema sensorial nociceptivo difere dos outros sistemas em inúmeras características. Dentre elas a necessidade de possuírem um aparato de transdução diverso e ao mesmo tempo contemplarem mecanismos de excitação diferentes (ativação pela capsaicina, ativação pelo calor, etc). Atuam na modulação das células e fazendo modificações fisiológicas frente aos estímulos (JULIUS; BASBAUM, 2001).

Os estudos iniciais a respeito de nocicepção, foram realizados com invertebrados, os quais não expressam dor, porém possuem mecanismos capazes de detectarem estímulos nocivos ao organismo e conseguem contornar estes problemas. Assim os estudos utilizando a genética na cascata evolutiva animal, ajudaram a identificar os estímulos nociceptivos e entender com melhor clareza o comportamento animal, funcionando como ótima ferramenta no controle e identificação da dor nos animais (JULIUS; BASBAUM, 2001). Os animais reagem a alguns estímulos considerados dolorosos com a interpretação das reações nociceptivas e tem reflexos que são interpretados por nós como a dor propriamente dita (LAHUNTA; GLASS, 2009).

Após a condução do estímulo doloroso pelos nociceptores, a mesma é transmitida até a raiz dorsal e gânglio trigêmeo (BENNETTE; WOODS, 2014). No corno dorsal da medula espinhal, há uma organização das estruturas em lâminas, as quais se ligam aos neurônios espinhais. A lâmina I está diretamente relacionada aos nociceptores A $\delta$  e fibras C, as III e IV recebem inervação de fibras A $\beta$  e a lâmina V é povoada por fibras C, A $\delta$  e A $\beta$  (LATRÉMOLIÈRE, 2016). Esta junção de lâminas conduz o estímulo ao trato espinotalâmico e ao tálamo. Ocorre a partir de então a modulação da dor, onde há a percepção sobre o local da dor e sua intensidade (VANDERAH, 2007).

A dor inflamatória é iniciada após a lesão ou inflamação tecidual e é caracterizada pela hipersensibilidade no local da lesão e tecidos adjacentes. Sua modulação pelos canais iônicos, tal como TRPV1, ocorre rapidamente. Conjuntamente um mecanismo de gatilho é ativado, fazendo com que haja também a

liberação de mediadores inflamatórios que irão migrar ao local inflamado. Os potenciais dos TRPV1 são expressos em todos os tipos de dor (JULIUS; BASBAUM, 2001). A maior percepção dolorosa pode ocorrer pela ativação destes receptores por substâncias exógenas como a capsaicina e também por produtos da lipoxigenase (leucotrieno B4), ATP, prostaglandinas (PGE2, PGI2), histamina, proteases. Outras substâncias que compõe as doenças inflamatórias também podem sensibilizar os receptores, constituindo assim um importante fator na hiperalgesia anti-inflamatória (SULK; STEINHOFF, 2015).

Estudos atuais focam na presença da dor crônica, onde pode existir uma ligação direta entre mudanças na conformação dos canais iônicos podendo causar alterações na modulação da dor. Tais mudanças podem ocorrer em resposta à traumas mecânicos, alterando os níveis de severidade e persistência da dor. Este polimorfismo pode ocorrer tanto em canais iônicos voltagem dependente, quanto em canais iônicos voltagem independente (BENNETTE; WOODS, 2014).

Além da dor crônica, existe também uma expressão exacerbada de TRPV1 em pacientes onde é detectada hiperalgesia. Esta síndrome é descrita como um aumento na sensibilidade da dor, frente a um estímulo nociceptivo. Em algumas doenças que causam inflamação local, como a DDB, os animais respondem ao estímulo mecânico, mesmo que este seja leve. A este mecanismo da-se o nome de Hiperalgesia Mecânica Estática (BARON; BINDER, WASNER, 2010).

Em revisão realizada por Martins e colaboradores (2014), são pontuados vários motivos que provam a forte interação de TRPV1 com o cérebro. Apesar de marcações realizadas na massa encefálica demonstrarem baixas quantidades de TRPV1, esse local demonstra que eles são ativados por substâncias endógenas, indo além da ativação por calor ou pH apenas. Ainda, a descoberta no ano de 2004 da dopamina N-araquidonoil (NADA), a qual é um importante agonista TRPV1 e pode ser encontrada em grandes quantidades no cérebro, reforça ainda mais a interação ente os vanilóides e o SNC (MARTINS; TAVARES; MORGADO, 2014).

## 2.6 Receptores TRPV1 e doenças da pele

A pele possui em sua constituição, fibras TRPV1 que ajudam na homeostase, nocicepção cutânea, inflamação neurogênica e na função biológica pilosebácea (GOPINATH et al.,2005). Os estudos descrevendo algumas enfermidades de pele, bem como a quantificação e expressão de TRPV1, estão sendo realizados com frequência em humanos, onde se busca principalmente uma correlação entre a sensação de dor e essas fibras (GOPINATH et al.,2005)

A hipersensibilidade de pele é uma síndrome, a qual ocorre em humanos, cursando com a presença da sensação de queimaduras, ardência e prurido, ocasionadas por fatores físicos (radiação ultravioleta, temperatura), químicos (cremes, pomadas) ou psicológicos (estresse e ansiedade). Todos estes mecanismos desencadeados, são resultados da maior expressão de TRPV1, mesmo com a pele ileso, compondo um importante avanço nas dermatites, tanto em humanos quanto em animais (EHNIS-PÉREZ et al., 2016). Em outro experimento realizado em humanos, a expressão de TRPV1, em todas as camadas da pele da região mamária, é maior em pacientes do sexo feminino, que possuem sensibilidade e dor nas mamas, durante o período menstrual, do que em pacientes que não tem sensação nenhuma de dor, provando cada vez mais a importância do TRPV1 (GOPINATH et al.,2005).

As marcadas reações fisiológicas que ocorrem na pele após os estímulos supracitados, tal como o eritema e aumento do fluxo sanguíneo, são fortes indícios de da interação do TRPV1 na vasodilatação (SULK, STEINHOFF, 2015). Estas alterações possivelmente ocorrem da expressão de TRPV1 em células de músculos lisos, células endoteliais e nervos perivasculares, evidenciando a ativação polimodal e resposta direta aos estímulos locais (BAYLIE; BRAYDEN,2011).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Quantificar e identificar a expressão de fibras TRPV1 em amostras teciduais colhidas de feridas de animais com Dermatite Digital Bovina, realizar a comparação com tecido sadio, além de correlacionar o número de fibras com o estágio da doença e o quadro de hiperalgesia apresentado pelos animais.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Descrever as características morfológicas macroscópicas da DDB em vacas da raça Holandesa nos quatro estágios da doença e sua distribuição anatômica.
- Realizar a imuno-marcação de fibras TRPV1 em amostras de lesões da DDB, colhidas através de biópsia, bem como a quantificação das fibras, comparando os valores encontrados entre os quatro estágios da doença.

### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1. Comitê de Ética e Bem-Estar Animal**

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus Jaboticabal, sob o número de protocolo 20067/15.

## **4.2. Infra-estrutura**

O estudo foi realizado inicialmente em uma propriedade de alta produção leiteira, localizada na região Centro-Leste do estado de São Paulo.

A segunda parte do estudo foi realizada na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), no Centro de Medicina Legal (CEMEL), localizada em Ribeirão Preto, SP.

## **4.3. Critério de escolha da propriedade**

A propriedade rural escolhida para realização da colheita de amostras é uma das maiores produtoras de leite do país, localizada na região Centro-Leste do Estado de São Paulo, uma importante bacia leiteira paulista. A granja atualmente possui o maior rebanho leiteiro registrado, da Raça Holandesa, do Brasil. Os animais são mantidos em regime de estabulação do tipo *free-stall* e produzem em média 32 Litros de leite/ cabeça/dia (três ordenhas) com rebanho atual de 1600 animais em lactação. A escolha da propriedade se deve ao fato da mesma apresentar uma grande concentração de animais e, portanto, uma alta incidência de afecções podais.

## **4.4. Animais e grupos experimentais**

Para a realização do estudo, foram utilizados 15 bovinos, provenientes de uma propriedade particular, produtora de leite. Todos os animais eram fêmeas da Raça Holandesa Preto e Branco, com idades variando entre 2 e 7 anos, primíparas e pluríparas, com pico médio de lactação de 47,85 Kg/dia. Os animais eram mantidos em regime de estabulação do tipo *free-stall*. A propriedade possui atualmente 1600 animais em lactação, porém o estudo foi amostral. A seleção dos animais ocorreu de acordo com a presença de lesões macroscópicas, características da DDB, variando o número de amostras colhidas, já que o mesmo animal pode apresentar mais de uma

lesão. Os animais foram mantidos na propriedade, alterando-se assim, minimamente a rotina implementada no manejo diário do rebanho.

O diagnóstico da DDB foi realizado por meio de inspeção visual, no tronco de contenção pneumático da propriedade. A caracterização das lesões ocorreu conforme descrição feita por DÖPFER (1997).

M1- Fase inicial da dermatite digital com uma área granulomatosa circunscrita, 0,5 a 4 cm de diâmetro, que se encontra na superfície do epitélio ou até 2 mm abaixo dele.

M2 - Fase da ulceração “clássica”, ocorrendo próximo a banda coronária do casco, afetando pele e tecido córneo, de até 7 cm de diâmetro, com presença de tecido de granulação infiltrado à mais de 2 mm abaixo do nível do epitélio.

M3 - Clássica ulceração da dermatite digital em processo de cicatrização, coberta por uma crosta.

M4 - Alteração da pele próxima à banda coronária, podendo ser observada na situação endêmica, a qual existe um histórico de suspeita da doença. As lesões cutâneas apresentam hiperqueratose e aspecto proliferativo.

Os dados foram pontuados em uma ficha para afecções podais (apêndice 1), a qual descrevia a localização anatômica das lesões, bem como o tamanho e características morfológicas visuais.

Foram utilizados no experimento 15 animais, os quais foram selecionados e divididos em quatro grupos, de acordo com os quatro estágios da doença (M1, M2, M3 e M4). Incluiu-se um quinto grupo considerado controle, com uma amostra de pele colhida próximas à lesão em cada animal. Formando assim cinco grupos experimentais, estudados separadamente. A divisão dos animais nos grupos não foi homogênea, já que um mesmo animal possuía uma ou mais lesões de diferentes estágios da doença, portanto era colocado em mais de um grupo.

#### **4.5 Colheita de amostras de tecido dérmico**

O tecido foi colhido por meio de biopsias nos locais de lesões características da DDB, preconizando-se as localizadas entre os bulbos dos cascos, na região palmar/plantar. Para a realização do procedimento, foi realizada a limpeza da região palmar/plantar dos cascos, com uso de escova de cerdas a fim de retirar todo material orgânico depositado nos cascos, realizando posteriormente a irrigação com uso de solução salina estéril (pH 7,4) e secagem com papel toalha descartável conforme descrito por EVANS et al., (2008).

Utilizou-se um “punch” para biópsia cutânea de 4 mm, estéril, o qual era inserido no centro das lesões, obtendo-se amostras da epiderme, derme e hipoderme, segundo ZINICOLA et al. (2015). As amostras foram acondicionadas em tubos de ensaio, estéreis, com tampa, previamente preenchidos com 7 mL de formalina a 10% (tamponada na semana das coletas) e identificados, a fim da realização da fixação das amostras.

Foram colhidas quatro amostras de cada estágio da doença em diferentes animais, além de, uma amostra por animal de tecido sadio, totalizando 15 animais e 33 amostras. Os animais foram identificados individualmente em fichas individuais (apêndice 1) e nomeados de A1 a A15. As amostras de tecidos sadios foram identificadas de S1 a S15, já as amostras de lesões foram classificadas como M1, M2, M3, M4.

Após a colheita realizou-se curativo local com uso de gaze estéril e bandagem realizada com uso de atadura de crepom estéril e impermeabilizada com fita adesiva Silver Tape.

#### **4.6 Localização anatômica e mensuração das lesões**

As localizações anatômicas das lesões foram anotadas na Ficha de Afecções Podais (Apêndice 1) e posteriormente transcritas para uma tabela.

A mensuração das lesões foi realizada com uso de paquímetro manual, antes da coleta das biópsias. As mensurações, em milímetros (mm), foram transcritas para a Ficha de Afecções Podais na ordem de comprimento x largura x espessura.

#### **4.7 Exame Histológico**

Depois de fixadas em solução de formalina à 10%, as amostras foram submetidas à desidratação em álcool em diferentes concentrações, desde 70% até o álcool absoluto. Os materiais foram submetidos a banhos de xilol 100%. Assim, os tecidos processados foram incluídos em parafina para a realização dos cortes histológicos e confecção das lâminas. Através de um micrótomo rotativo, os blocos de parafina contendo as amostras de DDB foram cortados a uma espessura de 4 µm (micrômetros), aderidos às lâminas silanizadas e levados à estufa aquecida a 60°C para otimização da adesão do material na lâmina. Anteriormente à técnica de imunohistoquímica e coloração por Hematoxilina e Eosina, as lâminas foram desparafinizadas e hidratadas. A recuperação antigênica do material foi realizada através de método físico-químico, por exposição do material à vaporização em solução-tampão de citrato, com o pH 6,0.

#### **4.8 Exame Imunohistoquímico**

A técnica de imunohistoquímica foi realizada em cortes histológicos transversais de lesões da DDB, aquecidos a 60°C durante 75 minutos. Para a marcação dos cortes histológicos, estes foram aderidos a lâminas sinalizadas, desparafinizados em xilol e hidratados em concentrações decrescentes de etanol até água. A recuperação antigênica foi realizada em tampão citrato pH 6,0 por 20 minutos. Foi utilizado Peróxido de hidrogênio a 3% sobre as lâminas. O soro normal de cavalo diluído em solução-tampão de fosfato (PBS) pH 7,4 (PBS) foi utilizado, em uma concentração de 10%. Entre cada etapa as lâminas foram lavadas três vezes com PBS. As lâminas foram incubadas com seu respectivo anticorpo primário de ratos, anti



TRPV1<sup>1</sup>, em câmara úmida e escura, durante 2 horas. Após lavagem, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário biotilado (conjugado com biotina) durante 30 minutos e, após nova lavagem, foram incubadas com polímero conjugado também por 30 minutos. As lâminas, então, receberam solução reagente contendo o cromógeno DAB (3,3'- diaminobenzidina), durante 1 a 3 minutos, até o aparecimento de precipitado de coloração marrom. Todos os reagentes foram disponibilizados com PicTure™ Max PolymerDetection Kit, para auxiliar na fixação. As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris diluída por cerca de 1 minuto, desidratadas e diafanizadas novamente. Para montagem das lâminas, utilizou-se o meio Entellan<sup>3</sup>.

#### 4.9 Contagem de fibras TRPV1 imunomarcadas

A leitura das lâminas foi realizada com uso de microscópio óptico Axiostar *plus*<sup>4</sup> utilizando-se óleo de imersão na lente objetiva de 100x. A contagem das fibras TRPV1 imuno-marcadas foi realizada em 20 campos por cada amostra de DDB e os valores das médias transcritos para um quadro. A captura de imagens foi realizada com a câmera acoplada ao microscópio.

#### 4.10 Fatores de risco

Foram analisados alguns fatores de risco relacionados ao desenvolvimento da DDB e suas possíveis interações com o número de lesões em cada classe animal. Os fatores foram: pico de lactação atual ao dia de coleta das amostras, idade dos animais e número de partos. A dieta dos animais não foi contabilizada já que se tratavam de vacas em lactação e, portanto, consumindo o mesmo alimento.

---

<sup>1</sup> Anticorpo anti TRPV1, Chemicon -USA

<sup>2</sup> PicTure™ Max PolymerDetection Kit, Invitrogen, UK

<sup>3</sup> Meio para montagem de lâminas Entellan, ® Merckur- Alemanha

<sup>4</sup> Microscópio óptico Axiostar *plus*, Zeiss – Alemanha

#### 4.11 Análise Estatística

Para análise estatística das fibras TPV1 imunomarcadas, os dados referentes aos cinco grupos (S, M1, M2, M3, M4) foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade, as variáveis que não passaram no teste foram submetidas à escala logarítmica [  $\log(\text{ob.}+1)$  ], post hoc Teste de Tukey (  $P= 7,12 \times 10^{-9}$  ). Os dados obtidos que contemplam a relação entre o número de lesões encontrados e as variáveis: idade dos animais, pico de lactação e produção atual de leite, foram avaliados pela Análise de Correlação de Pearson ( $p < 0,05$ ). Os animais foram divididos em subgrupos quanto aos fatores de risco, nos quais realizou-se análise estatística descritiva. As dimensões de lesões encontradas nos diferentes estágios da DDB foram submetidas ao teste de normalidade e comparadas entre os grupos (M1, M2, M3 M4), pelas médias apresentadas, utilizando-se o Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os valores da Largura foram transformados na escala logarítmica [  $\log(\text{obs}+1)$  ] e submetidos ao teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os dados obtidos foram analisados pelo programa estatístico SigmaPlot, versão 12 para Windows.

### 5. RESULTADOS

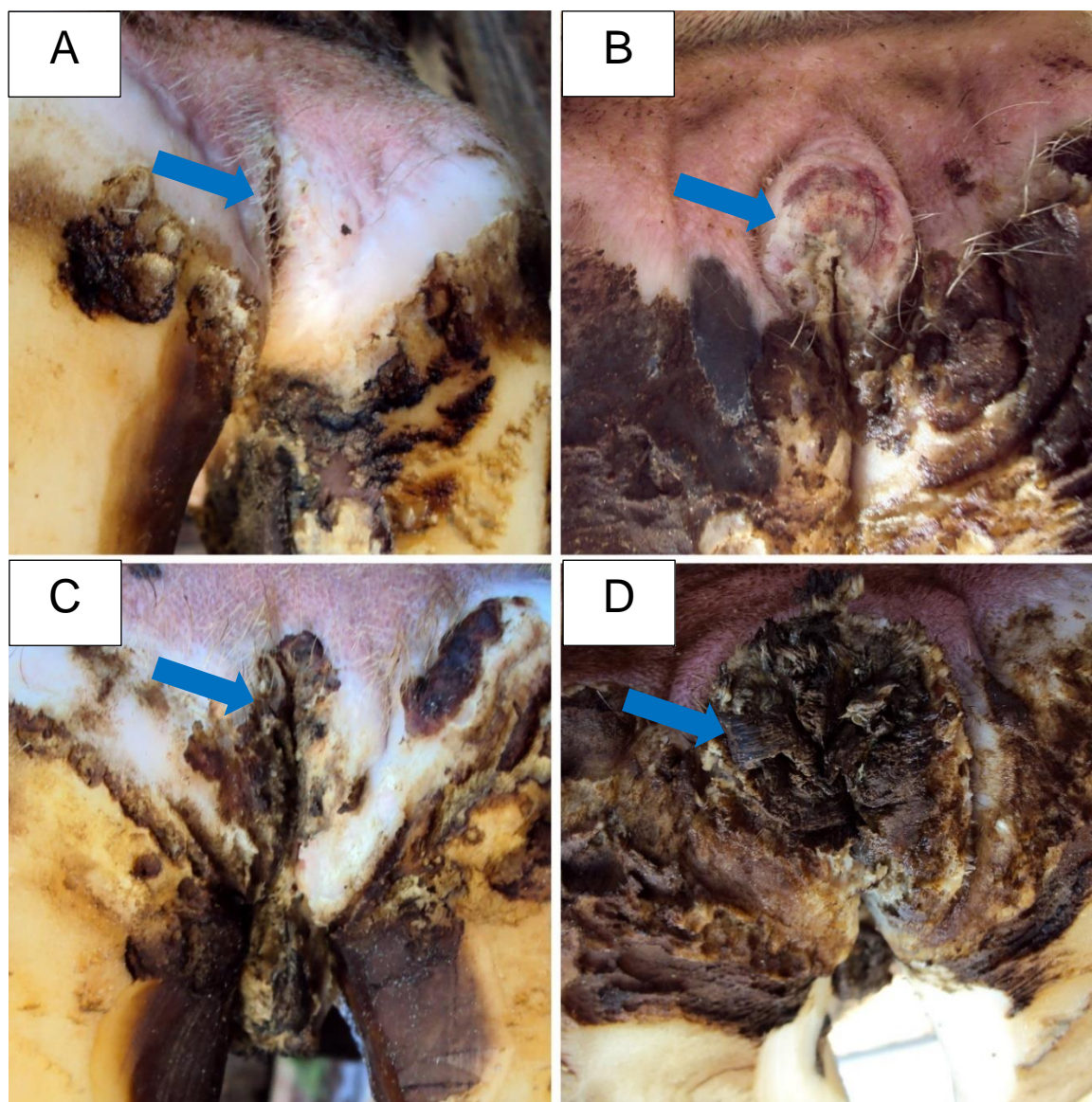
Os resultados deste estudo estão descritos em tabelas, contendo as médias e respectivos desvios padrão.

#### 5.1. Diagnóstico da DDB

As lesões foram identificadas por meio de registro fotográfico (Figura 2). Onde é possível a visualização dos estágios: Inicial (M1), Clássico (M2), Intermediário (M3) e Crônico (M4).

---

<sup>5</sup> SigmaPlot, versão 12<sup>2</sup>(Systat Software Inc -USA) para Windows



**Figura 2.** Imagem fotográfica de lesões da DDB, indicadas pela seta azul. (A) Vista plantar do espaço interdigital do membro pélvico esquerdo de bovino da raça Holandesa, apresentando estágio inicial da DDB, com lesão M1; (B) Vista palmar do espaço interdigital do membro torácico esquerdo de bovino da raça Holandesa, apresentando lesão ulcerada, característica do estágio clássico de lesão M2; (C) Vista plantar do espaço interdigital do membro torácico direito de bovino da raça Holandesa, apresentando estágio intermediário da DDB, onde é possível a visualização de uma crosta cobrindo a lesão, característica de estágio M3; (D) Vista plantar do espaço interdigital do membro pélvico direito de bovino da raça Holandesa, com lesão hiperqueratinizada, apresentando pelos, condizente com o estágio crônico M4. Fonte: Propriedade Leiteira localizada no município de Descalvado, SP, Brasil.

## 5.2. Localização anatômica das lesões

Foram avaliados 15 animais, dos quais registrou-se 25 lesões nos diferentes estágios. Observou-se (Tabela 1) que o local anatômico predominante foi o membro pélvico, com 17 lesões (68%), na região plantar. Houve uma notificação maior de animais acometidos no membro direito, com 5 lesões (27,77% dos animais), seguida pela menor frequência no membro esquerdo com 4 (22,22% dos animais) e os que possuíam lesões em ambos os membros (22,22% dos animais).

As lesões em membro torácico foram minoria, contando com apenas 8 (32%). A maior parte dos animais foram acometidos bilateralmente (16,66%), seguida pelos animais que possuíam lesões no membro direito (11,11% dos animais).

**Tabela 1.** Localização anatômica e contagem das lesões da Dermatite Digital Bovina em 15 animais da Raça Holandesa, positivos para a doença, com a distribuição das lesões nos membros torácicos e pélvicos, demonstrando a prevalência através de análise estatística descritiva.

Localização anatômica	Animais		Lesões da DDB	
	n	%	n	%
<b>Membro Torácico</b>	<b>5</b>	<b>27,77</b>	<b>8</b>	<b>32</b>
- direito	2	11,11	2	8
- esquerdo	0	0	0	0
<b>Membro Pélvico</b>	<b>13</b>	<b>72,22</b>	<b>17</b>	<b>68</b>
- direito	5	27,77	5	20
- esquerdo	4	22,22	4	16

## 5.3. Mensuração das lesões

As medidas das lesões encontram-se descritas na Tabela 2 e as respectivas médias ( $\pm$  desvio padrão) e mediana do comprimento, largura e espessura nas Tabelas 3,4 e 5.

As médias encontradas, por mensuração com paquímetro manual, para lesões de fase inicial da DDB (M1) foram de 5,6mm de comprimento x 4,4mm de largura x 1,8mm de espessura. As lesões encontradas nesse estágio da doença podem variar de medidas, assumindo os valores de: 3 a 10mm de comprimento, 3 a 6mm de largura e 1 a 3mm de espessura. Verificou-se que as dimensões ( $\bar{x}$ ) encontradas na segunda fase da DDB (M2) foram: 12,6mm de comprimento x 14,4mm de largura x 6,2mm de espessura. As medidas podem variar de 8 a 24mm de comprimento, 8 a 30mm de largura e 5 a 10 mm de espessura. Na terceira fase da doença (M3) os valores ( $\bar{x}$ ) encontrados foram: 21,6mm de comprimento x 17,2mm de largura x 7,4mm de espessura e os valores variam de 16 a 25mm, 20 a 27mm e 4 a 19mm sucessivamente. Já na fase crônica da doença (M4) obteve-se ( $\bar{x}$ ) 30mm de comprimento x 20mm de largura x 9mm de espessura, podendo variar de 6-47mm, 19 a 35mm e 3 a 15mm.

**Tabela 2.** Médias ( $\pm$  desvio padrão) em milímetros e mediana (min-max) do comprimento de lesões da Dermatite Digital Bovina em 15 animais da raça Holandesa, dimensionadas por paquímetro manual, distribuídas de acordo com o estágio da lesão (M1, M2, M3 e M4), sendo M1 as lesões iniciais, M2 as lesões Clássicas, M3 o estágio intermediário e M4 as lesões crônicas.

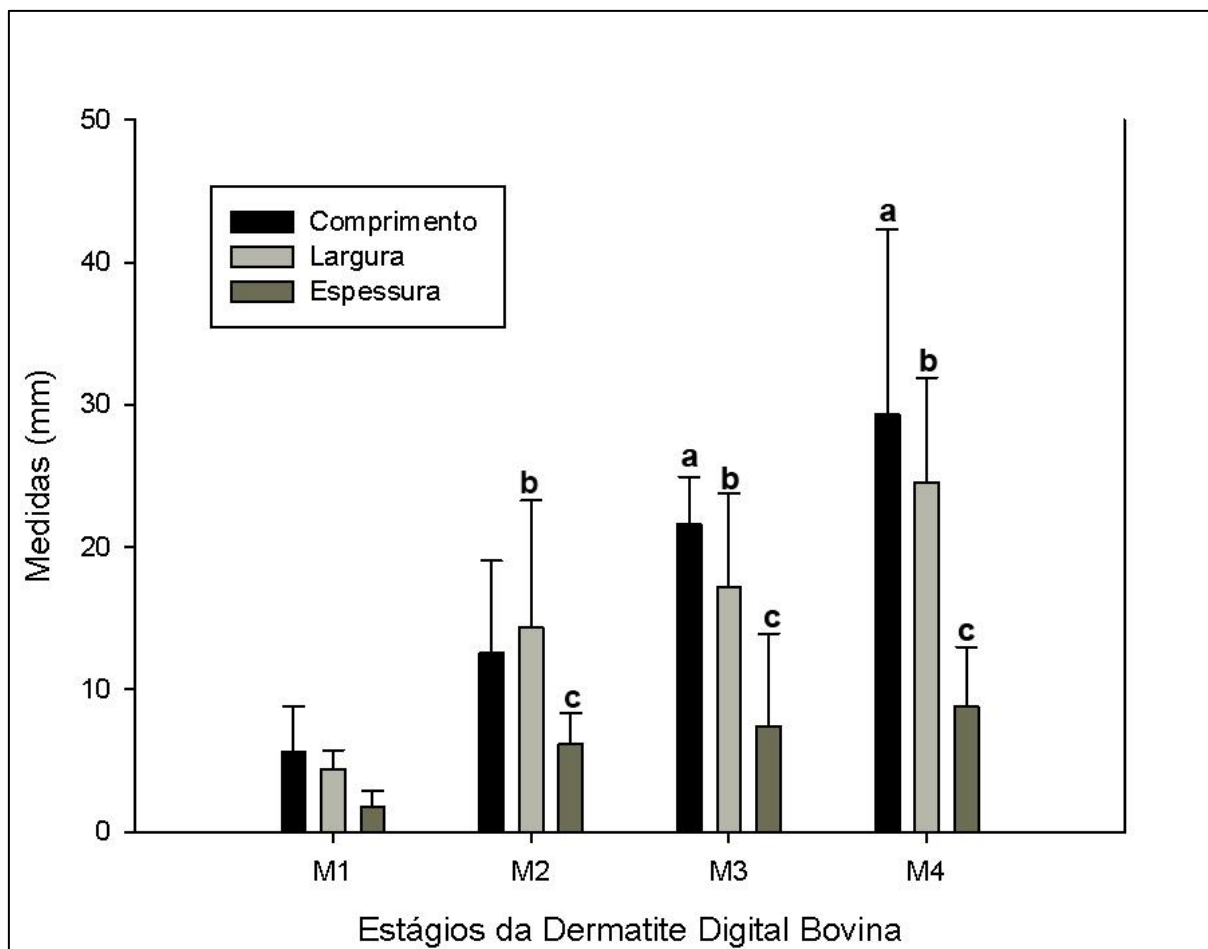
Estágio	Número de amostras	$\bar{x} \pm \sigma$ do comprimento (mm)	Mediana (min-max)
M1	5	5,60 $\pm$ 3,20	4 (3-10)
M2	5	12,60 $\pm$ 6,46	10 (8-24)
M3	5	21,60 $\pm$ 3,36	22 (16-25)
M4	7	29,28 $\pm$ 13	30 (6-47)

**Tabela 3.** Médias ( $\pm$  desvio padrão) em milímetros e mediana (min-max) da largura de lesões da Dermatite Digital Bovina em 15 animais da raça Holandesa, dimensionadas por paquímetro manual, distribuídas de acordo com o estágio da lesão (M1, M2, M3 e M4), sendo M1 as lesões iniciais, M2 as lesões Clássicas, M3 o estágio intermediário e M4 as lesões crônicas.

<b>Estágio</b>	<b>Número de amostras</b>	<b><math>\bar{x} \pm \sigma</math> da largura (mm)</b>	<b>Mediana (min-max)</b>
M1	5	4,40 $\pm$ 1,34	5 (3-6)
M2	5	14,40 $\pm$ 8,87	12 (8-30)
M3	5	17,20 $\pm$ 6,61	16 (10-27)
M4	7	24,57 $\pm$ 7,32	20 (19-35)

**Tabela 4.** Médias ( $\pm$  desvio padrão) em milímetros e mediana (min-max) da espessura de lesões da Dermatite Digital Bovina em 15 animais da raça Holandesa, dimensionadas por paquímetro manual, distribuídas de acordo com o estágio da lesão (M1, M2, M3 e M4), sendo M1 as lesões iniciais, M2 as lesões Clássicas, M3 o estágio intermediário e M4 as lesões crônicas.

<b>Estágio</b>	<b>Número de amostras</b>	<b><math>\bar{x} \pm \sigma</math> da espessura (mm)</b>	<b>Mediana (min-max)</b>
M1	5	1,80 $\pm$ 1,09	1 (1-3)
M2	5	6,20 $\pm$ 2,16	5 (5-10)
M3	5	7,40 $\pm$ 6,54	4 (4-19)
M4	7	8,85 $\pm$ 4,14	9 (3-15)



**Figura 3.** Médias em milímetros e desvio padrão de lesões da Dermatite Digital Bovina em 15 animais da raça Holandesa, dimensionadas por paquímetro manual, representadas no eixo Y e distribuídas no eixo X de acordo com o comprimento, largura e espessura, agrupadas pelo estágio das lesões (M1, M2, M3 e M4), sendo M1 as lesões iniciais, M2 as lesões Clássicas, M3 o estágio intermediário e M4 as lesões crônicas. <sup>a, b, c</sup> Diferem estatisticamente de M1.

Através da análise estatística, encontrou-se diferença ( $P < 0,05$ ) entre o estágio M1 e M3, M1 e M4, observando-se o comprimento. As observações da largura e espessura demonstraram diferença entre M1 e todos os outros estágios.

## 5.4 Fatores de Risco

Os fatores de risco foram divididos em grupos (número de partos, pico de lactação atual e idade) e comparados com o número de lesões que cada animal apresentou. Os valores encontrados à campo foram expressos na Tabela 6 e posteriormente divididos em subgrupos (Tabela 7).

**Tabela 5.** Relação entre o número de lesões, partos, pico de lactação e idade dos 15 animais da raça Holandesa, mantidos em regime de criação *free stall*, em propriedade da cidade de Descalvado – SP, avaliados quanto a presença da Dermatite Digital Bovina.

Animal	Número de lesões	Número de partos	Pico de lactação (kg)	Idade
1	2	4	53,71	7
2	1	4	32,21	7
3	2	2	48,17	6
4	1	3	61,01	6
5	1	2	51,43	5
6	1	2	59,16	4
7	1	2	54,79	4
8	1	1	47,18	4
9	1	2	46,78	4
10	4	2	54,35	4
11	2	1	44,47	4
12	2	1	42,70	3
13	1	1	47,73	3
14	1	1	45,57	3
15	1	1	28,49	2

**Tabela 6.** Médias ( $\pm$  desvio padrão) e mediana (min-max) dos Fatores de risco (partos, pico de lactação atual e idade) relacionados ao aparecimento de lesões da Dermatite Digital Bovina.

Grupo	Animais	$\bar{x} \pm \sigma$	Mediana (min-max)
Lesões	15	1,46 $\pm$ 0,83	1 (1-4)
Número de Partos	15	1,93 $\pm$ 1,03*	2* (1-4)
Pico de lactação	15	47,85 $\pm$ 8,87	47,73 (28,49-61,01)
Idade	15	4,40 $\pm$ 1,50	4 (2-7)

\* Difere estatisticamente do “número de lesões”. Análise de Correlação de Pearson ( $p < 0,05$ )



Após a Análise de Correlação de Pearson ( $P < 0,05$ ), houve relação entre o aumento de número de lesões em cada animal e o número de partos, isto é, quanto mais partos maior o número de lesões. Não houve correlação significativa ( $P > 0,05$ ) entre o pico de lactação dos animais e o aparecimento de lesões. Também não houve correlação entre o maior número de lesões e a idade ( $P > 0,05$ ).

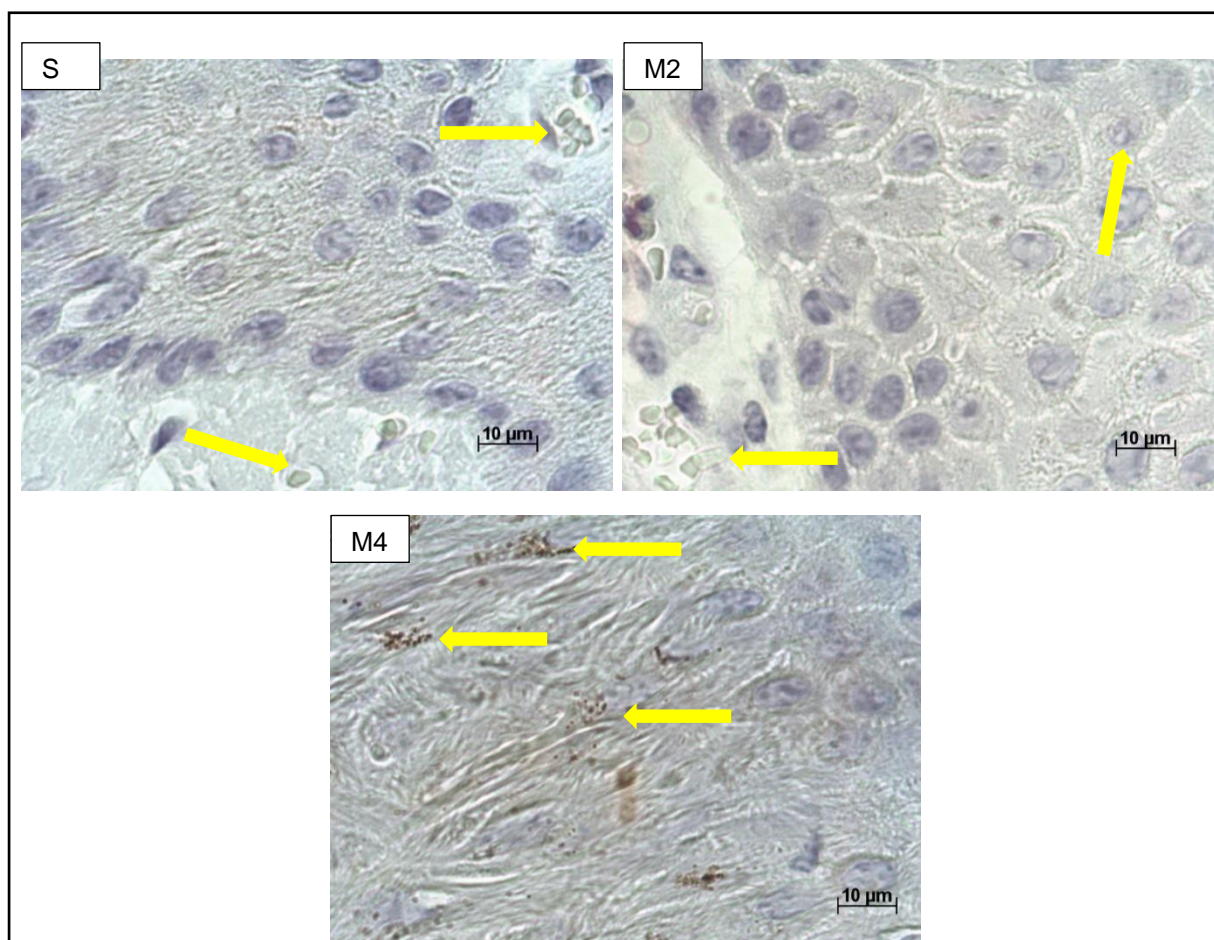
**Tabela 7.** Subdivisões dos fatores de risco (partos, pico de lactação atual e idade) relacionados ao aparecimento de lesões da Dermatite Digital Bovina, com a porcentagem de animais alocados em cada grupo.

Fatores de risco	Categorias	Número de animais	DDB positivos (%)
Partos	1	6	40
	2	6	40
	$\geq 3$	3	20
Pico de lactação atual (kg)	$\leq 32$	2	13,3
	$> 32$	13	86,7
Idade dos animais (anos)	2	1	6,7
	3	3	20
	4	6	40
	$\geq 5$	5	33,3

Através da análise estatística descritiva realizada nos subgrupos dos Fatores de risco, é possível evidenciar que as distribuições dos animais nos grupos de 1 ou 2 anos (6 e 6 animais respectivamente) são maiores em relação aos animais com 3 anos ou mais. Na análise da média de produção leiteira/dia da propriedade (32kg), os animais foram distribuídos em dois grupos, onde os que se encontraram acima da média constituíram 86,7% dos 15 animais avaliados. Houve distribuição entre as idades em 4 grupos distintos (2, 3, 4 e de 5 anos ou mais) e uma maior distribuição dos animais no grupo de 4 anos, contemplando 40% dos animais avaliados.

## 5.5 Exame Imunohistoquímico

As imagens microscópicas das fibras TRPV1 imuno-marcadas nos diferentes estágios da DDB estão demonstradas abaixo pela Figura 4. É possível notar a pouca distribuição de fibras na amostra de pele sadia (S) e o aumento significativo do estágio crônico (M4) em relação aos demais.



**Figura 4..** Amostras de pele bovina sadia, imuno-marcadas para fibras TRPV1 (setas amarelas) de lesões da Dermatite Digital Bovina, realizada em microscópio óptico na lente objetiva de 100X, em 15 animais da raça Holandesa. (S) mostra as fibras imunomarcadas no grupo controle, com amostras de pele sadias. (M2) mostra as fibras TRPV1 imunomarcadas no grupo de lesões clássicas e ulcerativas da Dermatite Digital Bovina. (M4) mostra as fibras TRPV1 imunomarcadas no grupo de lesões crônicas da Dermatite Digital Bovina. Fonte: Centro de Medicina Legal da Universidade de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

### 5.6 Expressão de fibras TRPV1

As fibras TRPV1 imuno-marcadas foram contabilizadas em 20 campos microscópicos por amostra e as médias das contagens foram expressas na Tabela 9.

**Tabela 8.** Contagem média de fibras imuno-marcadas TRPV1 em amostras de DDB divididas nos quatro estágios da doença e grupo controle, realizada em vinte campos microscópicos por amostra.

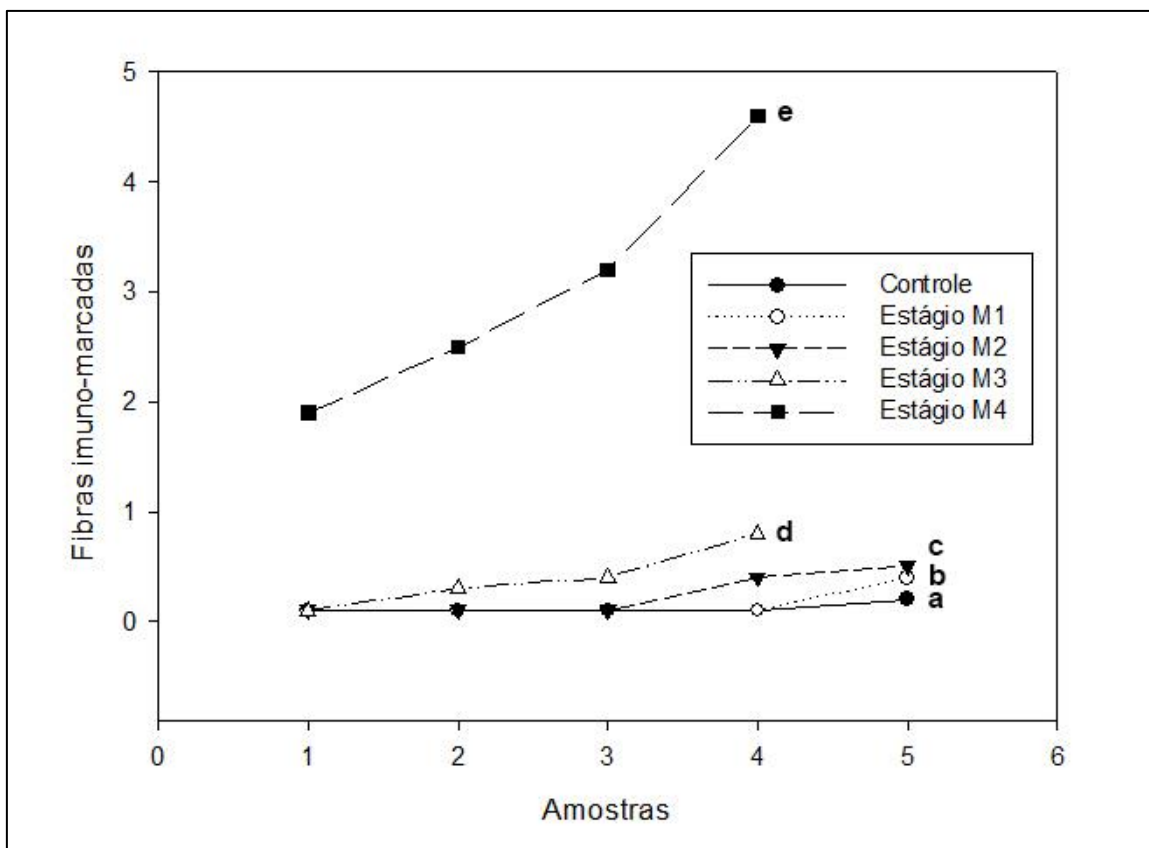
<b>Grupo</b>	<b>Amostras (Número de fibras)</b>				
S	1 (0,1)	2 (0,1)	3 (0,1)	4 (0,2)	5 (0,1)
M1	1 (0,1)	2 (0,1)	3 (0,1)	4 (0,4)	5 (0,1)
M2	1 (0,1)	2 (0,4)	3 (0,1)	4 (0,1)	5 (0,5)
M3	1 (0,4)	2 (0,8)	3 (0,3)	4 (0,1)	5 -
M4	1 (3,2)	2 (4,6)	3 (1,9)	4 (2,5)	5 -

Houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre o estágio M4 (crônico) da DDB e todos os outros estágios da doença incluindo o grupo controle, o qual continha amostras de pele sadia, demonstrados na tabela 9. As diferenças podem ser evidenciadas pela Figura 5 a qual contém um gráfico de distribuição das médias das fibras imuno-marcadas.

**Tabela 9.** Valores da média/desvio padrão da contagem de fibras imuno-marcadas TRPV1 de amostras colhidas de lesões da Dermatite Digital bovina, em 15 animais da raça Holandesa, divididos em cinco grupos experimentais: amostras de pele sadias (S), (M1, M2, M3 e M4), sendo M1 as lesões iniciais, M2 as lesões Clássicas, M3 o estágio intermediário e M4 as lesões crônicas.

<b>Grupo</b>	<b>Número de Animais</b>	<b>Média/ Desvio Padrão</b>
S	5	0,12/ 0,04*
M1	5	0,16/ 0,13*
M2	5	0,24/ 0,19*
M3	4	0,40/ 0,29*
M4	4	3,05/ 1,16

\* Diferem estatisticamente do Grupo M4. Teste de Tukey na escala logarítmica ( $p < 0,05$ ).



**Figura 5.** Valores médios da contagem de fibras TRPV1 imuno-marcadas nos quatro estágios da Dermatite Digital Bovina, em amostras colhidas de 15 animais da raça Holandesa, expressas em gráfico de linhas. Demonstrando as amostras de tecido sadio (a), estágio M1 com lesões iniciais (b), M2 com lesões Clássicas (c), M3 com estágio intermediário (d) e M4 com lesões crônicas (e).

## 6. DISCUSSÃO

A distribuição anatômica das lesões de DDB encontradas no estudo relatam a maior ocorrência nas regiões plantares dos membros pélvicos. A incidência nos referidos membros foi de 68% contra 32% nos membros torácicos. Em estudos sobre o controle da DDB, Nutter e Moffitt (1990) e Tomasella et al. (2014) relatam que a ocorrência da doença em membros pélvicos foi de 85% e 87,5%, representando, portanto, valores similares aos valores encontrados no presente estudo. Em outro estudo, Read e Walker (1998) descreveram que 13% dos animais possuíam lesões em membro torácico, o que corrobora com os valores encontrados de 27,77% dos animais acometidos. A maior incidência das lesões nos membros pélvicos pode ser justificada pela higiene do local onde estes animais eram mantidos. Os animais eram mantidos em sistema de piso composto de cimento, havendo remoção diária dos dejetos por meio de equipamento automatizado, porém este sistema deixava parte dos dejetos acumular onde os animais em lactação permaneciam o maior período do dia. A literatura cita que o piso de cimento contribui para um maior desgaste dos cascos de membros pélvicos e isto predispõe à maior incidência da DDB (SOMERS et al., 2003), principalmente quando se compara este sistema ao piso ripado (SOMERS et al., 2005). O maior contato dos membros pélvicos com as fezes e urina (MURRAY et al., 2002), onde pode se encontrar os possíveis agentes etiológicos da doença (NASCIMENTO et al., 2015) pode justificar a predileção por estes membros. Outro importante fator é a permeabilidade da pele, que aumenta quando os membros locomotores são mantidos em contato com lama e matéria orgânica por mais de 24h, favorecendo a colonização bacteriana (PALMER et al., 2013). O membro pélvico mais acometido foi o direito, representando 27,7% dos registros totais, porém estes valores são baixos comparados a outro experimento, o qual encontrou valores de 55,6% (RABELO et al., 2013). Em contrapartida, outro experimento com afecções podais em bovinos leiteiros, demonstraram que as lesões em membro pélvico direito representaram 23% da casuística, enquanto no esquerdo 64% (MURRAY et al., 2002). A provável causa do baixo índice de representatividade do membro direito foi o número reduzido de animais utilizadas no presente experimento. Existem teorias que relacionam a alta incidência de lesões em membros pélvicos direitos, com a posição

de descanso dos animais no *free-stall*, permanecendo em decúbito esternal com o membro direito em contato com o piso, causando um possível comprometimento vascular que predispõe a lesões. Outros fatores não foram contabilizados, tal como o ângulo dos cascos e as características morfológicas dos membros traseiros, o que poderiam incrementar o estudo (GRENOUGHT, 2007; ONYIRO et al., 2008; RABELO et al., 2013).

A mensuração das dimensões (comprimento x largura x espessura) nas lesões de DDB foi realizada com uso de paquímetro manual, uma ferramenta de alta confiabilidade. A falta de valores referenciais quanto ao comprimento, largura e espessura de lesões ovais, justifica a importância das mensurações realizadas no presente trabalho, visto que os dados presentes na literatura se baseiam apenas em lesões circulares. Os valores obtidos, foram divididos nos quatro estágios clássicos da DDB, descritos por Döpfer et al. (1997). No estágio inicial M1, as médias encontradas nas lesões de 5,6mm de comprimento x 4,4mm de largura x 1,8 mm de espessura, estavam de acordo com os dados presentes na literatura, porém as descrições encontradas se referem apenas ao diâmetro das lesões, não havendo valores fixos para as outras medidas. As médias encontradas para a fase M2 foram de 12,6mm de comprimento x 14,4mm de largura x 6,2mm de espessura, diminuindo amplamente da média descrita por Döpfer e colaboradores (1997), o qual cita valores maiores que 70mm para lesões de M2 até M4. Em valores extraídos de experimento realizado por Holzauer e colaboradores (2008), a média descrita é de 20 – 40mm, aumentando pouco em relação ao nosso estudo. No estágio M3 as médias foram 21,6mm de comprimento x 17,2mm de largura x 7,4mm de espessura, corroboradas com o intervalo de valores de 20 - 40mm para estágio entre M3 até M4, descritos por Holzauer e colaboradores (2008). O estágio crônico M4 possuía os valores médios 30mm de comprimento x 20 mm de largura x 9 mm de espessura, também de acordo com os valores encontrados. Através da análise estatística, foi possível encontrar diferenças significativas apenas entre alguns grupos. As medidas de largura e espessura diferem entre M1 e todos os outros estágios da DDB (M2, M3 e M4), já o comprimento difere apenas entre M1 e os estágios M3 e M4). Não foram encontrados argumentos na literatura que justificassem o crescimento das lesões nos estágios M2, M3, porém a hiperqueratose descrita no estágio M4 (Döpfer et al. 1997) pode ser

utilizada como justificativa apenas neste estágio. Entretanto, para comprovar esta afirmação seriam necessários mais estudos, levando-se em consideração variáveis biológicas de cada animal, as quais poderiam predispor a esta hiperqueratose progressiva (MUMBA et al., 1999; HOLZHAUER et al., 2008; GOMEZ et al., 2015).

Dados referentes a quantidade de lesões encontradas em cada animal, tal como o número de partos, pico de lactação atual e idade, foram correlacionados. Estes dados foram coletados para que mesmo com poucos animais, fosse possível uma detecção e comparação dos valores encontrados com a literatura nacional e internacional, a fim de atualizar os dados existentes.

Quando correlacionado o número de lesões por animal com o número de partos, houve relação estatística significativa ( $p < 0,05$ ), isto é, conforme o número de partos aumenta, os animais estão predispostos a ter mais lesões da DDB. Alguns autores refutam os dados do presente estudo, através de experimentos que descrevem a maior incidência de lesões em fêmeas primíparas, relacionadas à possível grande mudança metabólica no peri-parto e pós-parto, além da troca de ambiente, já que estes animais em lactação serão em regime de estabulação *free-stall* (FRANKENA et al., 1991; RODRÍGUEZ-LAINZ et al., 1996, SOMERS et al., 2005, BERRY, 2015). Possivelmente os valores diferem da literatura consultada, devido ao baixo número de animais incluídos no estudo.

Considerando a idade dos animais que participaram do experimento, observamos que não existe correlação significativa ( $p < 0,05$ ) entre o maior número de lesões e idades avançadas. Na literatura disponível, alguns experimentos retratam a possível imunidade adquirida nos animais, frente ao processo infeccioso, podendo evitar a reinfecção (READ; WALKER, 1998), porém as altas taxas de recidiva podem anular esta hipótese (KLITGAARD et al., 2008). Por outro lado, alguns estudos mais atuais relatam que em animais convalescentes existe uma baixa taxa de anticorpos, sugerindo que alguns animais possuem imunodeficiência frente a este processo infeccioso ou mesmo que esta imunidade adquirida possa ser fraca (TROTT et al., 2003, ELLIOTT et al., 2007; ZUERNER et al., 2007). Estes resultados corroboram com os encontrados neste estudo e reforçam a hipótese de que pode existir diferença na resposta imunológica individual dos animais.

A produção leiteira de cada animal também é um importante fator. Vacas secas possuem comprovadamente menor chance de possuírem lesões de DDB, devido ao fato de serem mantidas em regime de confinamento extensivo, onde os cascos não têm contato recorrente com fezes e lama contaminados, além do fato de a dieta de vacas secas possuírem em sua composição, maior parte de fibras, produzindo desta maneira fezes mais secas (READ; WALKER, 1998, MURRAY et al., 2002; NASCIMENTO et al., 2015; ZINICOLA et al., 2015). Holzhauer et al., (2006) relatam que possivelmente devido à demanda energética a qual estes animais sofrem no pico de lactação (de 30 até 70 Kg de leite), exista maior incidência de DDB de acordo com o que foi obtido por alguns autores (FRANKENA et al., 1991; ARGAEZ-RODRIGUES et al., 1997; PALMER; O`CONNELL, 2015), onde vacas que produziam mais leite tinham mais lesões de DDB. Além da DDB, outras afecções podais também apresentam maior incidência em animais com alto picos de lactação (DELUYKER et al., 1990). Os resultados encontrados no presente experimento, não demonstram correlação entre o maior número de lesões e a maior produção leiteira. Não foram encontrados resultados na literatura que pudessem comprovar a hipótese testada, porém os animais utilizados no experimento possuíam diversos estágios de lactação, portanto nem todos haviam atingido o pico máximo de lactação durante o período de aleitamento, contribuindo desta maneira, para uma possível superestimação dos valores.

As fibras TRPV1 foram o principal alvo do presente estudo, onde foram registradas a sua expressão e realizada quantificação. Desde o primeiro relato das fibras em 1997 por Caterina et al., houve grandes avanço a respeito da importância desta via que possivelmente causa uma excitação das vias aferentes primárias, causando resposta exagerada à dor, aumentando a condução dolorosa (TOMINAGA et al., 1998; GHILARDI et al., 2000). Porém não existem muitos relatos na literatura de estudos com animais de companhia e nenhum estudo em animais de produção.

O início de estudos abordando este tema aliado ao diagnóstico de doenças que causam dor hiperálgica, norteando também pesquisas com uso de substâncias, tal como os capsaicinoides no auxílio ao tratamento (TURNBULL, 1850; SOUZA, ROSSI, 2014) são um importante método de melhora no bem-estar animal. Assim a DDB por se tratar de uma afecção podal, a qual causa uma marcada dor hiperálgica



(WEAVER et al., 1981; READ; WALKER, 1998; EVANS et al., 2011; SULLIVAN et al., 2015), foi a escolhida para a realização do presente estudo. Em experimento realizado com osteosarcoma em ratos, houve uma maior expressão destas fibras e conseqüentemente da dor expressada por estes animais (BROWN et al., 2005). Outro experimento realizado em cães demonstra que a dor causada pelo câncer atinge limiares extremamente altos, chegando ao ponto de ser refratária ao uso de qualquer substância analgésica. Desta maneira, existe a forte correlação da presença destas fibras com a dor (KARAI et al., 2004). Estes estudos corroboram com os valores encontrados no presente trabalho, onde a quantificação das fibras TRPV1 nos quatro estágios da DDB (M1,M2,M3 e M4) e nas amostras de pele sadias (S), demonstram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) destas fibras no estágio crônico M4 em relação aos outros grupos experimentais. Neste estudo não foi quantificada a reação ao estímulo doloroso nestes animais. Porém, a marcada dor hiperálgica que os animais acometidos pela DDB apresentam no estágio crônico (M4) da doença (WEAVER et al., 1981; READ; DÖPFER et al.,1997; WALKER, 1998; EVANS et al., 2011; SULLIVAN et al., 2015), pode possuir o mesmo mecanismo de ação descrito em cães com doenças crônicas (KARAI et al., 2004; GHUILARD et al., 2005), constituindo assim uma descoberta importante na transmissão dolorosa da DDB e abrindo caminho para novos tratamentos da dor. Não foi encontrado valores numéricos na literatura consultada para comparação, portanto o estudo serve de base para posteriores quantificações de TRPV1 em bovinos.

## 7. CONCLUSÃO

Conclui-se que através do método imunohistoquímico, foi possível identificar a presença de receptores TRPV1 em amostras de pele sadia e de lesões da Dermatite Digital Bovina, bem como realizar a contagem destas fibras e comparar entre os diferentes grupos experimentais. Através da comparação entre os 4 estágios da DDB (M1, M2, M3 e M4), foi possível evidenciar um aumento significativo das fibras TRPV1 no estágio crônico (M4) da doença, sustentando a hipótese de que este aumento possa estar relacionado à hiperalgesia presente nos animais acometidos.

## 8. REFERÊNCIAS

ARGÁEZ-RODRIGUEZ, F.J.; HIRD, D.W.; HERNÁNDEZ DE ANDA, J.; READ, D.H.; RODRÍGUEZ-LAINZ, A. Papillomatous digital dermatitis on a commercial dairy farm in Mexicali, Mexico: incidence and effect on reproduction and milk production. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 32 (3-4), p. 275-286, 1997.

BARHEMA, H. W.; WESTRIK, J. D.; VAN KEULEN, K. A. S.; SCHUKKEN, Y. H.; BRAND, A. The effects of lameness on reproductive performance, milk production and culling in Dutch dairy farms. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v.20, p.249–259, 1994.

BARON R.; BINDER A.; WASNER G. Neuropathic pain: assessment, understanding and treatment. **Lancet Neurology**, London, v.9, p. 807–819, 2010.

BAYLIE, R.L.; BRAYDEN, J.E.; TRPV channels and vascular function. **Acta Physiologica**, Malden, v.203, n.1, p. 99-116, 2011.

BENNETT, D. L.; WOODS, C. G. Painful and painless channelopathies. **Lancet Neurology**, London, v.13, p.587–99, 2014.

BERRY, S.L.; Digital Dermatitis (Papillomatous Digital Dermatitis, Hairy Heel Warts, Foot Warts), **Veterinary Clinics Of North America: Food Animal Pract**, Philadelphia, v.17, n.1, p.129-141, 2015.

BERRY, S.L.; ERTZE, R.A.; READ, D.H.; HIRD, D.W. Field evaluation of prophylactic and therapeutic effects of a vaccine against (papillomatous) digital dermatitis of dairy cattle in two California dairies. In: **13th International Symposium on Ruminant Lameness**, Maribor, Slovenia, p.30–137, 2004.

BEVAN S.; HOTH, S.; HUGHES, G.; JAMES, I.F.; RANG, H.P.; WALPOLE, C.S.; YEATS, J.C. Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. **British Journal of Pharmacology**, Malden, v.107, p.544–552, 1992.

BICALHO, R. C.; CHEONG, S. H.; CRAMER, G.; GUARD, C. L. Association between visual locomotion score and an automated locomotion score in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign v.90, n.10, p.3294–3300, 2007.

BINDER, A.; MAY, D.; BARON, R.; MAIER, C.; TÖLLE, T.R.; TREEDE, R.D.; BERTHELE, A.; FALTRACO, F.; FLOR, H.; GIERTHMÜHLEN, J.; HAENISCH, S.; HUGE, V.; MAGERL, W.; MAIHÖFNER, C.; RICHTER, H.; ROLKE, R.; SCHERENS, A.; ÜÇEYLER, N.; UFER, M.; WASNER, G.; ZHU, J., CASCORBI, I. Transient receptor potential channel polymorphisms are associated with the somatosensory function in neuropathic pain patients. **PLoS One**, Chicago, v.6: e17387, 2011.

BINSHTOK, A.M.; BEAN, B.P., WOOLF, C.J. Inhibition of nociceptors by TRPV1-mediated entry of impermeant sodium channel blockers. *Nature*, London, v.449, n.7162, p. 607-610, 2007.

BLOWEY, R. W.; CARTER, S. D.; WHITE, A. G.; BARNES, A. *Borrelia burgdorferi* infections in UK cattle: a possible association with digital dermatitis. **Veterinary Record**, London, v.135, n.24, p.577–578, 1994.

BORGMANN, I. E. ; BAILEY, J. ; CLARK, E. G. Spirochete-associated bovine digital dermatitis. **The Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v.37, n.1, p.35-37, 1996.

BROWN, D.C. ; IADAROLA, M.J. ; PERKOWSKI, S.Z. ; HARDEM, E. ; SHOFER, F. ; LASZLO, K.J., OLAH, Z. ; MANNES, A.J.. Physiologic and antinociceptive effects of intrathecal resiniferatoxin in a canine bone cancer model. **Anesthesiology**, Philadelphia, v.103, p.1052–9, 2005.

CATERINA, M. J. An Introduction to Transient Receptor Potential Ion Channels and Their Roles in Disease, in: SZALLASI, A. **TRP Channels as Therapeutic Targets, from Basic Science to Clinical Use**, 1<sup>st</sup> ed. London: Elsevier, 2015, p. 2-10.

CATERINA, M.J.; JULIUS, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. **Annual Review of Neuroscience**, Palo Alto, v. 24, p. 487-517, 2001.

CATERINA, M.J.; LEFFLER, A.; MALMBERG, A.B.; MARTIN, W.J.; TRAFTON, J.; PETERSEN-ZEITZ, K.R.; KOLTZENBURG, M.; BASBAUM, A.; JULIUS, D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. **Science**, Washington, v.288, n.5464, p.306-313, 2000.

CATERINA, M.J.; SCHUMACHER, M.A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T.A.; LEVINE, J.D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, London, v.389, p.816-824, 1997.

CHELI, R.; MORTELLARO, C.M. La dermatite digitale del bovino. In: **Proceedings of the 8th International Meeting on Diseases of cattle**, Milan, Italy, p.208–213, 1974. Clapham, D.; Runnels, L.; STRUBING, C. The TRP ion channel family. **Nature Reviews Neuroscience**, London, v.2, p.387–396, 2001.

CLAPHAM, D.E.; JULIUS, D.; MONTELL, C.; SCHULTZ, G. International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Transient Receptor Potential Channels, **Pharmacological Reviews**, Bethesda December 1, v. 57, n.4, p.427-450, 2005.

CLAPHAM, D.E.; RUNNELS, L.W.; STRUBING, C. The TRP ion channel family. **Nature Reviews Neuroscience**, London, v.2, p.387-396, 2001.

COSENS, D.J.; MANNING, A. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. **Nature**, London, v.224, p.285-287, 1969.

DELUYKER, H.A.; GAY, J.M.; WEAVER, L.D.; AZARI, A.S. Change of milk yield with clinical diseases for a high producing dairy herd. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.74, n.2, p. 436-445, 1991.

DEMIRKAN, I; WALKER, R. L.; MURRAY, R. D.; BLOWEY, R. W.; CARTER, S. D. Serological Evidence of Spirochaetal Infections Associated With Digital Dermatitis in Dairy Cattle. **Veterinary Journal**, London, v.157, n.1, p. 69-77, 1999.

DIRKSEN, G.; STOBER, E.M. As afecções dos cascos dos bovinos: melhor prevenir que curar. **Revista a Hora Veterinária**, Porto Alegre, v.1, n.3, p. 3-18, 1981.

DOPFER, D; KOOPMANS, A; MEIJER, F. A.; SZAKÁLL, I; SCHUKKEN, Y. H.; KLEE, W.; BOSMA, R. B.; CORNELISSE, J. L.; VAN-ASTEN, A. J.; Histological and bacteriological evaluation of digital dermatitis in cattle, with special reference to spirochaetes and *Campylobacter faecalis*. **Veterinary Record**, London v.140 n.24, p. 620-623, 1997.

EHNIS-PÉREZ, A.; TORRES-ÁLVAREZ, B.; CORTÉS-GARCÍA, D.; HERNÁNDEZ-BLANCO, D.; FUENTES-AHUMADA, C.; CASTANEDO-CÁZARES, J.P. Relationship between transient receptor potential vanilloid-1 expression and the intensity of sensitive skin symptoms **Journal of Cosmetic Dermatology**, Malden, v.15, p.231–237, 2016.

ELLIOTT, M.K.; ALT, D.P.; ZUERNER, R. L.; Lesion Formation and Antibody Response Induced by Papillomatous Digital Dermatitis-Associated Spirochetes in a Murine Abscess Model. **Infections and Imunity**, Washington, v. 75, p. 4400-4408, 2007.

EVANS, N. J.; BLOWEY, R. W.; TIMOFTE, D.; ISHERWOOD, D. R.; BROWN, J. M.; MURRAY, R.; PATON, R. J.; CARTER, S. D. Association between bovine digital dermatitis treponemes and a range of 'non-healing' bovine hoof disorders. **Veterinary Record**, London, v. 168, n.8, p. 214, 2011.

FRANKENA, K.; STASSEN, E.N.; NOORDHUIZEN, J.P.; GOELEMA, J.O.; SCHIPPER, J.; SMELT, H.; ROMKEMA, H. Prevalence of lameness and risk indicators for dermatitis digitalis (Mortellaro disease) during pasturing and housing of dairy cattle. **Proceedings of a meeting - Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine**, Denmark, p. 107-118, 1991.

GOLD, M.S.; GEBHART, G.F., Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. **Nature Medicine**, New York, November, v.16, n.11, p.1248–1257, 2010.

GOMEZ ,A.; COOK, N.B.;RIEMAN ,J.; DUNBAR, K.A.; COOLEY, K.E.; SOCHA, M.T.; DÖPFER, D. The effect of digital dermatitis on hoof conformation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.98, p.927-936, 2015.

GOPINATH, P.; WAN, E.; HOLDCROFT, A.; FACER, P.; DAVIS, J.B.; SMITH, G.D.; BOUNTRA, C.; ANAND, P. Increased capsaicin receptor TRPV1 in skin nerve fibres and related vanilloid receptors TRPV3 and TRPV4 in keratinocytes in human breast pain. **BMC Womens's Health**, v.5, n.2, p.1-10.

GREEN, L. E.; HEDGES, V. J.; SCHUKKEN, Y. H.; BLOWEY, R. W.; PACKINGTON, A. J. The impact of clinical lameness on the milk yield of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, p. 2250–2256, 2002.

GREENOUGH, P.R. **Bovine Laminitis and Lameness - A hands-on Approach**, 1<sup>st</sup> ed., Saunders Elsevier, Philadelphia, 2007.

GUARD, C. Musculoskeletal Disorders, in: DIVERS, T. J. & PEEK, S. F. **Rebhun's diseases of dairy cattle**, 2<sup>nd</sup> ed. Saunders Elsevier, St. Louis, 2008, p. 473 – 476.

GHILARDI, J.R.; RÖHRICH, H.; LINDSAY, T.H.; SEVCIK, M.A.; SCHWEI, M.J.; KUBOTA, K.; HALVORSON, K.G.; POBLETE, J.; CHAPLAN, S.R.; DUBIN, A.E.; CARRUTHERS, N.I.; SWANSON, D.; KUSKOWSKI, M.; FLORES, C.M.; JULIUS, D.; MANTYH, P.W. Selective Blockade of the Capsaicin Receptor TRPV1 Attenuates Bone Cancer Pain. **Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 25, n.12, p. 3126-3131, 2005.

HANNA, P.; LOFSTEDT, J.; DUIVENVOORDEN, P. Papillomatous digital dermatitis in a Canadian dairy herd. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v.35, n.9, p.657, 1994.

HOLZHAUER, M.; HARDENBERG, C.; BARTELS, C.J.; FRANKENA, K. Herd- and cow-level prevalence of digital dermatitis in the Netherlands and associated risk factors. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.89, n.2, p.580-588, 2006.

HOLZHAUER, M.; BARTELS, C.J.M.; DÖPFER, D.; VAN SCHAİK, G.; Clinical course of digital dermatitis lesions in an endemically infected herd without preventive herd strategies. **The Veterinary Journal**, London, v.177, p. 222-230, 2008.

HUANG, S.M.; BISOGNO, T.; TREVISANI, M.; AL-HAYANI, A.; FEZZA, L.F.; TOGNETTO, M.; PETROS, T.J.; KREY, J.F.; CHU, C.J.; MILLER, J.D.; DAVIES, S.N.; GEPPETTI, P.; WALKER, J.M.; DI MARZO, V. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.99, n.12, p.8400-8405, 2002.

JANCSÓ, N.; JANCSÓ-GÁBOR, A.; SZOLCSÁNYI, J. The role of sensory nerve endings in neurogenic inflammation induced in human skin and in the eye and paw of the rat. **British Journal of Pharmacology**, Malden, v.33, p.32–41, 1968.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I., Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, London v. 413, p. 203–210, 2001.

KARAI, L.; BROWN, D.C.; MANNES, A.J.; CONNELLY, S.T.; BROWN, J.; GANDAL, M.; WELLISCH, O.M.; NEUBERT, J.K.; OLAH, Z.; IADAROLA, M.J. Deletion of vanilloid receptor 1-expressing primary afferent neurons for pain control. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v.113, n.9, p. 1344-1352, 2004.

KLITGAARD, K.; BOYE, M.; CAPION, N.; JENSEN, T.K.; Evidence of Multiple Treponema Phylotypes Involved in Bovine Digital Dermatitis as Shown by 16S rRNA Gene Analysis and Fluorescence In Situ Hybridization *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v.80, n.14, p. 4427-4432, 2014.

KRAJEWSKA, A. M.; POWERS, J. J. Sensory Properties of Naturally Occurring Capsaicinoids. **Journal of Food Science**, Malden, v. 53, p. 902–905, 1988.

KRULL, A.C.; COOPER, V.L.; COATNEY, J.W.; SHEARER, J.K.; GORDEN, P.J.; PLUMMER, P.J. A Highly Effective Protocol for the Rapid and Consistent Induction of Digital Dermatitis in Holstein Calves. **PLoS One**, Chicago, v.11, n.4, e0154481, 2016.

KRULL, A.C.; SHEARER, J.K.; GORDEN, P.J.; COOPER, V.L.; PHILLIPS, G.J.; PLUMMER, P.J. Deep sequencing analysis reveals temporal microbiota changes associated with development of bovine digital dermatitis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 82, p.3359–3373, 2014.

LAHUNTA, A.; GLASS, E. General Sensory Systems: General Proprioception and General Somatic Afferent, in: LAHUNTA, A.; GLASS, E. **Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology** 3th ed, St. Louis, Saunders, 2009, p.221-242.

LATRÉMOLIÈRE, A. Spinal plasticity of the nociceptive system: the role of central sensitization in chronic pain states. In: BATTAGLIA, A.A. **An Introduction to Pain and its Relation to Nervous System Disorders**, Hoboken, Willey, 2016, p. 35-87.

LAVEN, R.; LOGUE, D.N. Treatment strategies for digital dermatitis for the UK. **Veterinary Journal**, London, v. 171, n.1, p.79-88, 2004.

LEFEBVRE, R.B. Spiral-curved organism. In: HIRSH, D.C.; MACLACHLAN, N.J.; WALKER, R.L. **Veterinary Microbiology**, 3th ed., Ames, Wiley-Blackwell, 2013, p.179-183.

MALMBERG, A. B.; BLEY, K. R. **Turning up the heat on pain: TRPV1 receptors in pain and inflammation**, 1<sup>st</sup> ed., Basel, Birkhauser Verlag, p.IX, 2005.

MARTINS, D.; TAVARES, I., MORGADO, C. “Hotheaded”: The role OF TRPV1 in brain functions. **Neuropharmacology**, Coventry, v.85, p. 151–157, 2014.

MONTELL C. The TRP superfamily of cation channels. **Science Signaling**, Washington, v.22. p.re3, 2005.

MONTELL, C; RUBIN, G.M.; Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. **Neuron**, Cambridge, v.2. p. 1313-1323, 1989.

MUMBA, T.; DÖPFER, D.; KRUITWAGEN, C.; DREHER, M.; GAASTRA, W. AND VAN DER ZEIJST, B.A.M.; Detection of Spirochetes by Polymerase Chain Reaction and its Relation to the Course of Digital Dermatitis after Local Antibiotic Treatment in Dairy Cattle. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v.46, p.117-126, 1999.

MURRAY, R.D.; DOWNHAM, D.Y.; DEMIRKAN, I.; CARTER, S.D. Some relationships between spirochaete infections and digital dermatitis in four UK dairy herds. **Research in Veterinary Science**, London, v.73, p.223–230, 2002.

NASCIMENTO, L.V.; MAUERWERK, M.T.; SANTOS, C.L.; BARROS FILHO, I.R.D.; JÚNIOR, E. H. B.; SOTOMAIOR, C.S.; MADEIRA, H.M.F.; OLLHOFF, R.D. Treponemes detected in digital dermatitis lesions in Brazilian dairy cattle and possible host reservoirs of infection. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 53, p.1935–1937, 2015.

NUTTER, W. T.; MOFFITT, J. A. Digital dermatitis control. **Veterinary Record**, London, v.126, n.8, p. 200-201, 1990.

ONYIRO, M.O.; ANDREWS, J.L.; BROTHERSTONE, S. Genetic parameters for digital dermatitis and correlations with locomotion, production, fertility traits, and longevity in Holstein-Friesian dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 91, p. 4037-4046, 2008.  
OWSIANIK, G.; TALAVERA, K.; VOETS, T.; NILIUS, B. Permeation and selectivity of TRP channels. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v.68, p.685–717, 2006.

PAGURA, J.R. Taxonomia da dor. In: NETO, O.A.; COSTA, C.M.C.; SIQUEIRA, J.T.T.; TEIXEIRA, M.J. **Dor: princípios e prática**, 1ªed., Porto Alegre: Artemed; 2009, p.91-93.

PALMER, M.A.; DONNELLY, R.F.; GARLAND, M.J.; MAJITHIYA, R.; O'CONNELL, N.E. The effect of slurry on skin permeability to methylene blue dye in dairy cows with and without a history of digital dermatitis. **Animal**, France, v.7, n.10, p.1731-1737, 2013.

PALMER, M.A.; O'CONNELL, N.E. Digital Dermatitis in Dairy Cows: A Review of Risk Factors and Potential Sources of Between-Animal Variation in Susceptibility, **Animals (Basel)**, Switzerland, v.5, n.3, p. 512-535, 2015.

PHILLIPS, K.; CLAUW, D.J. Central pain mechanisms in chronic pain states-maybe it is all in their head. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, Washington, v.25, n.2. p. 141-154, 2011.

RABELO, R.E.; VULCANI, V.A.S.; DE SANT'ANA, F.J.F.; LIMA, C.R.O.; RABBERS, A.S.; HELRIGEL, P.A.; DIAS, M. Influence of different digital diseases in



lameness of dairy cows in southwest of the state of Goiás. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 20, n.4, p.198-203, 2013.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W.; CONSTABLE, P.D. Diseases associated with bacteria, in: "**Veterinary medicine. A textbook of the diseases of cattle, sheep, goats, pigs and horses**, 10 th ed., New York, Saunders, 2006, p. 1066-1070.

RATHMELL, J.P; FIELDS, H.L., Pain: pathophysiology and management. In: LONGO, D.L.; KASPER, D.L.; JAMESON, J.L.; FAUCI, A.S.; HAUSER, S.L.; LOSCALZO, J. **Harrison's Neurology in Clinical Medicine**, 3<sup>rd</sup> ed. McGraw-Hill Education, 2013, p. 40-51.

READ, D. H.; WALKER, R. L. Papillomatous digital dermatitis footwarts in California dairy cattle: clinical and gross pathological findings. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v.10, p.67–76, 1998.

REBHUN, W.C.; PAYNE, R.M.; KING, J.M.; WOLFE, M.; BERG, S. Interdigital papillomatosis in dairy cattle. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Chicago, v.177, p.437–446, 1980.

RIBEIRO, P.N.; BORGES, J.R.; MÁRSICO, F.; PITOMBO, C.A. Incidência de afecções podais em bovinos no Estado do Rio de Janeiro. **Arquivo da Escola de Medicina Veterinária UFBA**, Salvador, v.15, n.1, p.28-33, 1992.

RODRÍGUEZ-LAINZ, A.; HIRD, D.W.; CARPENTER, T.E.; READ, D.H. Case-control study of papillomatous digital dermatitis in southern California dairy farms. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 28, p. 117-131, 1996.

SILVEIRA, J.B.; MENECELLI, A.A.; ANDRADE, E.F.; MATHIAS, L.A. Levantamento epidemiológico das principais afecções podais em bovinos no município de Votuporanga-SP. **Ciência Veterinária**, Jaboticabal, v.2, p.18-19, 1988.

SOMERS, J. G. C. J.; FRANKENA, K.; NOORDHUIZEN-STASSEN, E. N.; METZ, J. H. M.; Prevalence of claw disorders in Dutch dairy cows exposed to several floor systems. **Journal of Dairy Science**, Champagne, v. 86, p. 2082–2093, 2003.

SOMERS, J. G. C. J.; FRANKENA, K.; NOORDHUIZEN-STASSEN, E. N.; METZ, J. H. M. Risk factors for digital dermatitis in dairy cows kept in cubicle houses in The Netherlands. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 71(1-2), p. 11–21, 2005.

SOUZA, P. T., ROSSI, A. V., DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA INDIRETA DE CAPSAICINOIDES EM PIMENTAS *Capsicum* A PARTIR DA REAÇÃO COM O COMPLEXO DE Co (II) COM 4-(2-PIRIDILAZO) RESORCINOL. **Química Nova**, São Paulo, v.37, p.631-631, 2014.

SULLIVAN, L.E.; EVANS, N.J.; BLOWEY, R.W.; GROVE-WHITE, D.H.; CLEGG, S.R.; DUNCAN, J.S.; CARTER, S.D. A molecular epidemiology of treponemes in beef cattle digital dermatitis lesions and comparative analyses with sheep contagious ovine digital dermatitis and dairy cattle digital dermatitis lesions. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.178, n.1-2, p. 77-87, 2015.

SULK, M.; STEINHOFF, M. Role of TRP Channels in Skin Diseases, in: **Szallasi, A. TRP Channels as Therapeutic Targets From Basic Science to Clinical Use**, London, Elsevier, 2015, p.293-321.

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P.M. Resiniferatoxin and its analogue provide novel insights into the pharmacology of the vanilloid (capsaicin) receptors. **Life Sciences**, Amsterdam, v.47, p.1399-1408, 1990.

TEIXEIRA, M.J., Fisiopatologia Da dor. In: NETO, O.A.; COSTA, C.M.C.; SIQUEIRA, J.T.T.; TEIXEIRA, M.J. **Dor: princípios e prática**. Porto Alegre: Artemed; 2009. p.145-156.

THRESH, L.T. Isolation of capsaicin. **Pharmaceutical Journal**, London, v.6., p.941, 1846.

TOMASELLA, T.E.; FILHO, L.C.N.; AFFONSO, M.Z.; JUNIOR, F.B.; SILVA, L.C.; OKANO, W.; Prevalência e classificações de lesões podais em bovinos leiteiros na região de Belo Horizonte-MG. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, Ceará, v.8, n.1, p.115 - 128, 2014.

TOOD, A.J. Anatomy on pain pathways. In: BATTAGLIA, A.A. **An Introduction to Pain and its Relation to Nervous System Disorders**, Hoboken, Willey, 2016, p. 13-33.

TOMINAGA, M.; CATERINA, M.J.; MALMBERG, A.B.; ROSEN, T.A.; GILBERT, H.; SKINNER, K.; RAUMANN, B.E.; BASBAUM, A.I.; JULIUS, D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron**, Cambridge, v.21, p.531-543, 1998.

TROTT, D.J.; MOELLER, M.R.; ZUERNER, R.I.; GOLF, J.P.; WATERS, W.R.; ALT, D.P.; WALKER, R.I.; WANNEMUEHLER, M.J. Characterization of *Treponema phagedenis*-Like Spirochetes Isolated from Papillomatous Digital Dermatitis Lesions in Dairy Cattle, **Journal of Clinical Microbiology**, Washington v. 41, n.6, p.2522-2529, 2003.

TURNBULL, A. Tincture of capsaicin as a remedy for chilblains and toothache. **Dublin Free Press**, Dublin, v.1, p.95-96, 1850.

VANDERAH, T. W. Pathophysiology of pain. **Medical Clinics of North America**, Oxford, v. 91, p. 1 -12, 2007.

WALKER R. L.; READ D. H.; LORETZ K. J.; NORDHAUSEN R.W. Spirochetes isolated from dairy cattle with papillomatous digital dermatitis and interdigital dermatitis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.47, p.343-355, 1995.

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

WEAVER, A.D.; ANDERSSON, L.; DE LAISTRE BANTING, A.; DEMERZIS, P. N.; KNEZEVIC, P. F.; PETERSE D. J.; SANKOVIC, F. Review of disorders of the ruminants digits with proposals for anatomical and pathological terminology and recording. **Veterinary Record**, London, v.108, p.117-120, 1981.

WES, P.D.; CHEVESICH, J.; JEROMIN, A.; ROSENBERG, C.; STETTEN, G.; MONTELL, C. TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.92, p. 9652-9656, 1995.

WU, L.J.; SWEET, T.B.; CLAPHAM, D.E. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. **Pharmacological Reviews**, Bethesda, v.62, p.381-404, 2010.

ZINICOLA, M; LIMA, F.; LIMA, S.; MACHADO, V.; GOMEZ, M.; DÖPFER, D.; GUARD, C.; BICALHO R. Altered Microbiomes in Bovine Digital Dermatitis Lesions, and the Gut as a Pathogen Reservoir. **PLoS One**, v. 10 (3) p. e0120504, 2015.

ZUERNER, R.L.; HEIDARI, M.; ELLIOTT, M.K.; ALT, D.P.; NEILL, J.D. Papillomatous digital dermatitis spirochetes suppress the bovine macrophage innate immune response. **Veterinary Microbiology**, v. 125, p. 256–264, 2007.

## 9. APÊNDICE

Ficha clínica para afecções podais.

### FICHA CLÍNICA PARA LESÕES PODAIS

Propriedade: _____	Município: _____
Proprietário: _____	Data: _____
Animal: _____	Raça: _____
Idade: _____	Sexo: M( ) F( )
Peso corporal: _____	Escore corporal: _____
Nascimento: _____	Data da parição: _____
Nº Partos: _____	
Produção de Leite: _____	Categoria: _____
Data (I.A.): _____	
Observações: _____	

#### Exame clínico do sistema locomotor:

I. Inspeção: \_\_\_\_\_

- Escore de claudicação: 1 ( ) 2 ( ) 3 ( ) 4 ( ) 5 ( )

Escore de claudicação	Alterações
Escore 1 (normal)	Ausência de anormalidades de postura ou deambulação.
Escore 2 (claudicação leve)	Em estação tem ausência de anormalidades na postura. Dorso levemente arqueado quando deambulam.
Escore 3 (claudicação moderada)	Dorso arqueado quando em estação e na deambulação. Caminha com um ou mais membros a passos curtos. No membro contralateral ao que claudica, pode haver um leve desgaste dos cascos.
Escore 4 (claudicação)	Dorso arqueado quando em estação e na deambulação. Caminha com “um passo de cada vez”, poupando um ou mais membros. No membro contralateral ao que claudica pode haver severo desgaste dos cascos.
Escore 5 (claudicação severa)	Dorso extremamente arqueado em estação e na deambulação. Inabilidade ou relutância extrema em colocar o peso sobre um ou mais membros.

#### II- Achados clínicos:

Inspeção: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Palpação: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Percussão: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

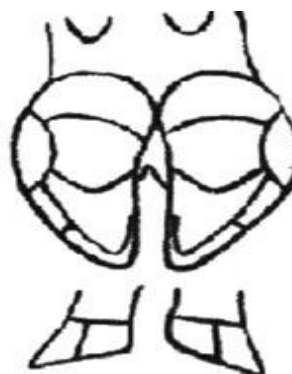
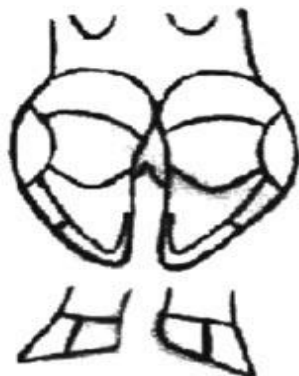
\_\_\_\_\_

**III-Diagnóstico:**

---

---

---

**IV- Localização das lesões:****TORÁCICO ESQUERDO****TORÁCICO DIREITO****PÉLVICO ESQUERDO****PÉLVICO DIREITO**

**Tabela 10.** Dimensões (comprimento, largura e espessura) das lesões de Dermatite Digital Bovina em 15 animais da raça Holandesa, dimensionadas por paquímetro manual, distribuídas de acordo com o estágio da lesão (M1, M2, M3 e M4), sendo M1 as lesões iniciais, M2 as lesões Clássicas, M3 o estágio intermediário e M4 as lesões crônicas.

Estágios da DDB	Medidas (mm)		
	Comprimento	Largura	Espessura
M1	8	5	3
	3	3	1
	10	6	3
	3	5	1
	4	3	1
M2	10	12	6
	10	10	5
	24	30	10
	8	8	5
	11	12	5
M3	16	13	4
	23	10	4
	22	16	19
	25	20	4
	22	27	6
M4	23	20	3
	28	20	11
	31	19	9
	6	19	6
	30	24	6
	47	35	12
	40	35	15