

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**  
**(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

**TESE**

**Plasma Rico em Plaquetas Autólogo, com e sem Antibiótico, no Tratamento  
Intramamário de Secagem: Perfil de Biomarcadores da Saúde da Glândula  
Mamária na Lactação Subsequente**

**Rosângela Antunes Terra**

**2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA  
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

**PLASMA RICO EM PLAQUETAS AUTÓLOGO, COM E SEM  
ANTIBIÓTICO, NO TRATAMENTO INTRAMAMÁRIO DE SECAGEM:  
PERFIL DE BIOMARCADORES DA SAÚDE DA GLÂNDULA  
MAMÁRIA NA LACTAÇÃO SUBSEQUENTE**

**ROSÂNGELA ANTUNES TERRA**

*Sob a Orientação da Professora*  
**Rita de Cássia Campbell Machado Botteon**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Medicina Veterinária**, pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração Ciências Clínicas.

Seropédica, RJ  
Março de 2019

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

T323p

Terra, Rosângela Antunes , 1982-  
Plasma rico em plaquetas autólogo, com e sem  
antibiótico, no tratamento intramamário de secagem:  
perfil de biomarcadores da saúde da glândula mamária  
na lactação subsequente / Rosângela Antunes Terra. -  
2019.  
71 f. : il.

Orientadora: Rita de Cássia Campbell Machado  
Botteon. Tese(Doutorado). -- Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária, Área de Concentração Ciências  
Clínicas, 2019.

1. Mastite. 2. Bovinos. I. Botteon, Rita de Cássia  
Campbell Machado, 1964-, orient. II Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação  
em Medicina Veterinária, Área de Concentração Ciências  
Clínicas III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA  
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

**ROSÂNGELA ANTUNES TERRA**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, na área de Concentração em Ciências Clínicas.

TESE APROVADA EM 28/03/2019

---

Rita de Cássia Campbell Machado Botteon (Ph D) UFRRJ  
*Orientadora*

---

Carlos Alberto Sanches Pereira – *Dr. Sc.* UNIFOA

---

Cristiane Divan Baldani - *Dr. Sc.* UFRRJ

---

Maiara Garcia Blagitz Azevedo - *Dr. Sc.* UFFS

---

Michel José Sales Abdalla Helayel - *Dr. Sc.* UFF

Ao meu filho Dante, dedico.

*“Entre as coisas mais lindas que eu conheci  
Só reconheci suas cores belas  
Quando eu te vi”  
(Nando Reis)*

## AGRADECIMENTOS

Escrever estas páginas de agradecimentos é recapitular não só os últimos quatro anos, é ver como Deus sempre foi generoso comigo, colocando anjos no meu caminho. Posso dizer que estudar me salvou, em todos os sentidos, desde muito nova. Estudar mudou o meu destino. E entrar para o Doutorado, após perda recente do meu marido, me salvou novamente. Saí de uma depressão e enxerguei um novo sentido para a vida: “queria que meu filho se orgulhasse de mim”. E nesse meio tempo, passei num concurso público, mudei de cidade, assumi novos desafios, fiz novos amigos, mantive os de longa data. E a vida segue...Poder agradecer é maravilhoso, porque me dá a certeza de que não estamos sozinhos. E eu tenho tanto a agradecer!

Primeiro a Deus, por me abrir portas e por me fazer enxergar as oportunidades que aparecem em minha vida.

À minha família, especialmente ao meu pai e minha irmã Roseli, que sempre me incentivaram a seguir estudando. À família Terra, que me recebeu quando eu me casei e até hoje me dá força nas minhas decisões. Tenho orgulho de fazer parte desta família!

Ao meu filho Dante, por ser tão companheiro em tantas mudanças e entender, do jeitinho dele, a importância do Doutorado. E ainda ajudar nas coletas do experimento! Te amo, meu filho!

À minha querida orientadora Rita Botteon, a quem eu tenho o privilégio de chamar de amiga por quase duas décadas. Você foi um anjo em tantos momentos difíceis. Foi meu exemplo de profissional, de acreditar nos sonhos, de não desistir, de ser teimosa. Conte comigo sempre!

Aos meus amigos que me apoiaram direta ou indiretamente, me fazendo sorrir quando eu precisei, me renovando as forças para continuar na caminhada: Vera, Patrícia, Marcela, Pat, Cris, Denilson e tantos outros.

À UFRRJ, pela oportunidade de ingressar no PPGMV.

Ao IFRJ, por ter me acolhido como servidora e apoiado a conclusão do meu Doutorado.

Às minhas estagiárias e amigas queridas, sem elas seria impossível: Jéssica, Luzi, Anna Carla, vocês foram demais!

Aos colegas de laboratório da Rural que me ensinaram e me ajudaram em tantas análises, especialmente Bianca, Ana Paula e Andresa. E aos meninos da Microbiologia, muito obrigada!

Aos colegas da pós-graduação, que foram um grande presente nesta caminhada: Eduardo, Samara, Patrícia, Eliene, Janaína, Manoella e tantos outros!

Aos professores que me auxiliaram em tantos momentos de dúvidas e nas disciplinas.

Aos colegas do IFRJ, em especial à Allana, exemplo de organização e boa vontade!!! E à Gisele, que, em pouco tempo de casa, já virou uma grande parceira e amiga.

À fazenda Boa Liga, ao gerente Barão e aos meninos da ordenha, por terem me recebido com tanta paciência e sempre com um sorriso no rosto! Vocês foram essenciais para que o projeto acontecesse.

E, é claro, aos animais, que para mim não são apenas números, são vacas que chamo pelos nomes. A elas também devo gratidão pela brandura em tantas coletas e por darem sentido a este experimento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

**Muito obrigada!!!!!!!!!!!!!!!**

Quem tem um porquê  
enfrenta qualquer como.

**Viktor Frankl**

## RESUMO

TERRA, Rosângela Antunes. **Plasma rico em plaquetas autólogo, com e sem antibiótico, no tratamento intramamário de secagem: perfil de biomarcadores da saúde da glândula mamária na lactação subsequente**. 2019. 70f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária, Ciências Clínicas). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta da aplicação intramamária de Plasma Rico em Plaquetas (PRP) autólogo na interrupção da lactação e seu efeito na lactação subsequente, avaliando-se biomarcadores da saúde da glândula mamária. O PRP vem sendo utilizado com sucesso em várias áreas da medicina, com propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas, e seu uso *in loco* pode induzir uma resposta imune local na glândula mamária de bovinos e minimizar o uso de antibióticos. As unidades experimentais consistiram de 36 quartos mamários de nove vacas mestiças, sadias, gestantes, com mastite subclínica (MSC). Amostras de sangue e leite foram colhidas antes da secagem (A1), no dia do parto (D0) e aos 14,30 e 60 dias (D14, D30 e D60). Exame físico dos animais e diagnóstico de MSC foram feitos semanalmente. No último dia de ordenha, após esgotamento e antissepsia dos tetos (12 por tratamento -T), foram instituídas aplicações intramamárias: T1= antibiótico (ATB); T2 = PRP; T3 = PRP+ATB. Foram determinados das amostras de leite: contagem de células somáticas (CCS), composição, isolamento e amiloide A (MAA); e das amostras de sangue: hemograma, espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), haptoglobina (Hp), proteínas totais (PT). O delineamento foi inteiramente casualizado com arranjo em parcelas subdivididas. Os dados foram submetidos à análise de variância para medidas repetidas e as médias comparadas utilizando os testes de Tukey e Holm-Sidak (*Prism 5.0 ou SigmaPlot®*), com nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ). O método de obtenção do PRP foi eficiente, concentrando em quase 10 vezes a contagem plaquetária em relação ao sangue ( $290 \pm 40$  para  $2.477 \pm 500$  plaquetas/mL). Não houve diferença na CCS em A1 ( $p > 0,05$ ), sendo elevada em todos os grupos. Após o parto, a maior média de CCS foi verificada no D30 no T3, com diferença em relação ao T1. Em D60 as CCS foram semelhantes nos três T. Quanto à composição do leite houve diferença em A1, com menores teores de gordura no T2 e os três grupos diferiram em relação ao extrato seco total, extrato seco desengordurado e proteínas. Nas amostras colhidas antes da secagem, *Staphylococcus* não *aureus* foi o micro-organismo mais isolado, seguido de *Streptococcus spp.* MAA foi mais elevado antes do parto e não houve diferença entre os tratamentos, com médias condizentes com animais sadios. MAA apresentou correlação fraca positiva com CCS (0,280). Em relação ao hemograma, todos os constituintes do eritrograma, em todos os momentos e grupos mantiveram-se dentro do intervalo de normalidade para a espécie. Já na série branca, leucocitose foi observada no T1 (entre D0 e D30), no T2 (D0) e T3 (todos os momentos), com predominância de desvio à esquerda. PT e Hp foram semelhantes em todos os tratamentos, com PT um pouco acima dos valores de referência. Apesar de CCS mais alta em D30 no T2, os tratamentos foram equivalentes nos demais parâmetros avaliados, logo o PRP foi eficaz na manutenção da saúde da glândula mamária, podendo ser utilizado como alternativa ao antibiótico na secagem.

**Palavras-chave:** bovinos, mastite, amiloide A, haptoglobina

## ABSTRACT

TERRA, Rosângela Antunes. **Autologous platelet rich plasm, with and without antibiotics, in the intramammary drying cow therapy: biomarkers profile of the mammary gland's healthy at subsequent lactation.** 2019. 70f. Thesis (Doctor Science in Veterinary Medicine, Clinical Sciences). Institute of Veterinary, Federal University of Rio de Janeiro, Seropédica, 2019.

This study aimed to evaluate the response of the intramammary application of autologous PRP at interruption of lactation and its effect on subsequent lactation by evaluating biomarkers of mammary gland health. Platelet Rich Plasma (PRP) has been successfully used in many fields of medicine with anti-inflammatory and antimicrobial properties and in loco may induce a local immune response in the bovine mammary gland and minimize use of antibiotics. The experimental units consisted of 36 mammary quarters of nine healthy, pregnant, crossbred cows with subclinical mastitis (MSC). Samples of blood and milk were collected before drying (A1), on calving (D0) and at 14.30 and 60 days (D14, D30 and D60) after. Physical examination and diagnosis of MSC were done weekly. On the last day of milking, after empty and antisepsis of the teats (12 per treatment -T), intramammary applications were instituted: T1 = antibiotic (ATB); T2 = PRP; T3 = PRP + ATB. Milk samples were determined: somatic cell count (CCS), composition, isolation and amyloid A (MAA); and blood samples: blood count, thiobarbituric acid reactive species (TBARS), haptoglobin (Hp), total proteins (PT). The design was completely randomized with arrangement in subdivided plots. Data were submitted to analysis of variance for repeated measures and means were compared using the Tukey or Holm-Sidak tests (Prism 5.0 or SigmaPlot®), with a confidence level of 95% ( $p \leq 0.05$ ). The method of obtaining PRP was efficient, concentrating blood platelet counts almost 10 times ( $290 \pm 40$  for  $2477 \pm 500$  platelets / mL). There was no difference in CCS in A1 ( $p > 0.05$ ), being high in all groups. After calving, the highest CCS mean was verified in D30 in T3, with difference in relation to T1. In D60 the CCS were similar in the three T. Regarding the composition of the milk there was difference in A1, with lower fat contents in T2 and the three groups differed in relation to total dry extract, dry extract and protein. In the samples collected before drying, *Staphylococcus not aureus* was the most isolated microorganism, followed by *Streptococcus* spp. MAA was higher before calving and there was no difference between treatments, with averages consistent with healthy animals. MAA showed a weak positive correlation with CCS (0.280). Regarding the hemogram, all constituents of the erythrogram at all times and groups remained within the normal range for the species. In the white series, leukocytosis was observed in T1 (between D0 and D30), in T2 (D0) and T3 (all moments), with a predominance of left deviation. PT and Hp levels were similar in all treatments, with PT slightly above the reference values. Although higher CCS in D30 in T2, the treatments were equivalent in the other parameters evaluated, thus the PRP was effective in maintaining the health of the mammary gland and could be used as an alternative to the antibiotic for dry cow therapy.

**Keywords:** bovine, mastites, amyloid A, haptoglobin

## LISTA DE ABREVIACOES E SMBOLOS

°C - graus centıgrados (Escala Celsius de temperatura)  
A1 - Amostra 1  
AGP - Glicoprotena cida  $\alpha$ -1  
ATB – Antibıtico  
CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
CCS - Contagem de células somáticas  
céls – Células  
CEUA - Comissão de tica no uso de animais  
CHCM - Concentração de hemoglobina corpuscular média  
CLSI - Clinical & Laboratory Standards Institute  
CMT - *California Mastitis Test*  
CPDA-1 - citrato-fosfato-dextrose-adenina  
D0 - Dia 0  
D14 - Dia 14  
D30 - Dia 30  
D60 - Dia 60  
DMCV - Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária  
DNA - cido desoxirribonucleico  
EDTA - cido etilenodiaminotetracético  
EGF- Fator de crescimento epitelial  
ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimático  
ERO - Espécies reativas de oxigênio  
ESALQ/USP - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, da Universidade de São Paulo  
ESD - Extrato seco desengordurado  
EST % - Extrato seco total  
FC - Fatores de crescimento  
g – grama  
g/dL - grama por decilitro  
GSH - Glutathiona reduzida  
GSH-Px - Glutathiona-peroxidase  
GSH-Rd - Glutathiona-redutase  
HCM - Hemoglobina Corpuscular Média  
Hm - Hematimetria, hemácias, eritrócitos  
Hp – Haptoglobina  
HRP-Hp – Antígeno Hp  
IFN – interferons  
IFRJ - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro  
IGF - Fator de crescimento semelhante  insulina  
IL – Interleucina  
kDa - Kilodaltons  
LPC - Laboratório de Pesquisas Clínicas  
LXA 4- Lipoxina A4  
MAA – Amiloide A no leite (*Milk Amyloid A*)  
MAP-pig - Proteína principal de fase aguda  
MC- Mastite clínica

MDA – Malondialdeído  
mg – Miligramas  
mg/dL - Miligramas por decilitro  
min – minuto  
mL – Mililitros  
mm – Milímetro  
MSC - Mastite subclínica  
NETs - neutrophil extracellular traps  
ng – Nanogramas  
NK- Natural killer  
nm - Nanômetro  
NMC - National Mastitis Council  
PAF - Fator ativador de plaquetas  
PBS - Tampão fosfato-salino  
PDGF - Fator de crescimento derivado das plaquetas  
PF-4 - Fator de angiogênese e fator plaquetário 4  
pg – Picograma  
pH - Potencial Hidrogeniônico  
PMN - Polimorfonuclear(es)  
PPGMV – Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária  
PPP - Plasma pobre em plaquetas  
PRP - Plasma rico em plaquetas  
QM - Quarto mamário  
rpm - Rotações por minuto  
SAA - Amilóide A sérico (*Serum Amyloide A*)  
SOD - Superóxido-dismutase  
T1 - Tratamento 1  
T2 - Tratamento 2  
T3 – Tratamento 3  
TBA - ácido tiobarbitúrico  
TBARS - Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico  
TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa  
UFC - Unidades formadoras de colônia  
UFRRJ - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
UI - Unidades Internacionais  
VCM – fL - Volume Corpuscular Médio  
VEGF - Fator de crescimento endotelial-vascular  
VG – Volume Globular  
WMT - Wisconsin Mastitis Test  
x g - força gravitacional em centrifugações  
 $\mu$ g – Microgramas  
 $\mu$ L – microlitros  
 $\mu$ Mol - Micromol

## LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1:** Cânula descartável utilizada para aplicação intramamária de plasma rico em plaquetas ..... 12
- Figura 2:** Diluições seriadas da solução padrão do kit de ELISA para dosagem de Amiloide A em amostras de leite de vaca ..... 14
- Figura 3:** Diluições das soluções-padrão para análise de haptoglobina sérica bovina..... 16
- Figura 4:** Médias de contagem de células somáticas (CCS) do leite de quartos mamários de nove vacas submetidas aos tratamentos com antibiótico (T1, n=12), plasma rico em plaqueta (T2, n=10) e antibiótico e plasma rico em plaquetas (T3, n=10), com diferença no D30 no tratamento 2 ( $p \leq 0,05$ ) ..... 21
- Figura 5:** Médias Extrato seco total (EST %) e extrato seco desengordurado (ESD %) do leite de quartos mamários de 9 vacas submetidas a três tratamentos na secagem (Tratamento 1 = Antibiótico (ATB, n=12); Tratamento 2 = Plasma Rico em Plaquetas (PRP, n=10); Tratamento 3 = PRP + ATB(n=12)). Diferença nos três tratamentos na secagem e T2 apresentou maior EST em D30 ( $p \leq 0,05$ )..... 22
- Figura 6:** Médias de gordura % do leite de cada quarto mamário de 9 vacas submetidas a três tratamentos na secagem (Tratamento 1 = Antibiótico (ATB, n=12); Tratamento 2 = Plasma Rico em Plaquetas (PRP, n=10); Tratamento 3 = PRP + ATB(n=12)). O tratamento 2 apresentou menores teores de gordura que antes do parto e maiores em D14 e D30 ( $p \leq 0,05$ )..... 23
- Figura 7:** Médias de proteínas do leite (mg/dL) dos quartos mamários de 9 vacas submetidas a três tratamentos na secagem (Tratamento 1 = Antibiótico (ATB, n=12); Tratamento 2 = Plasma Rico em Plaquetas (PRP, n=10); Tratamento 3 = PRP + ATB(n=12)). Os três grupos diferiram na secagem ( $p \leq 0,05$ )..... 23
- Figura 8:** Médias de lactose do leite (mg/dL) de quartos mamários de 9 vacas submetidas a três tratamentos na secagem (Tratamento 1 = Antibiótico (ATB, n=12); Tratamento 2 = Plasma Rico em Plaquetas (PRP, n=10); Tratamento 3 = PRP + ATB(n=12)). Não houve diferença entre os tratamentos em nenhum momento de coleta ( $p > 0,05$ )..... 24
- Figura 9:** Curva padrão obtida através das densidades ópticas das soluções-padrão para dosagem de Amiloide A (Cloud-Clone Corp. SEA885Bo for Serum Amyloid A) ..... 27
- Figura 10:** Médias e desvio padrão de Amiloide A dosado do leite (MAA) de quartos mamários de 9 vacas submetidas a três tratamentos na secagem (Antibiótico (ATB); Plasma Rico em Plaquetas (PRP); PRP + ATB) ..... 28
- Figura 11:** Médias de leucometria absoluta sanguínea e Contagem de Células somáticas de vacas submetidas a diferentes tipos de tratamento na secagem (antibiótico ATB (T1); Plasma Rico em Plaquetas (T2); ATB + PRP (T3)). ..... 32
- Figura 12:** Proporção da leucometria absoluta no sangue e contagem de células somáticas de vacas submetidas a diferentes tipos de tratamento na secagem (antibiótico ATB (T1); Plasma Rico em Plaquetas (T2); ATB + PRP (T3)). ..... 32
- Figura 13:** Médias de TBARS no sangue (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico) na secagem e aos 14, 30 e 60 dias após o parto de vacas submetidas a três tratamentos na secagem (Tratamento 1 = Antibiótico (ATB); Tratamento 2 = Plasma Rico em Plaquetas (PRP); Tratamento 3 = PRP + ATB)..... 34

**Figura 14:** Curva padrão obtida através das densidades ópticas das soluções-padrão para dosagem de haptoglobina sérica bovina (Fine Test Bovine Hp ELISA kit EB0011) ..... 35

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Contagem de plaquetas (x 1000/mL) do sangue e Plasma Rico em Plaquetas (PRP) de seis vacas pertencentes ao plantel da Fazenda Boa Liga (Barra do Piraí-RJ). ..... 19
- Tabela 2:** Médias das contagens de células somáticas em (x 1000) de quartos mamários de 9 vacas, pertencentes ao plantel da Fazenda Boa Liga (Barra do Piraí-RJ), submetidas a três tratamentos na secagem (Antibiótico (ATB); Plasma Rico em Plaquetas (PRP); PRP + ATB). ..... 20
- Tabela 3:** Resultado qualitativo da cultura microbiológica do leite por quarto mamário de 9 vacas, pertencentes ao plantel da Fazenda Boa Liga (Barra do Piraí-RJ), submetidas a três tratamentos na secagem (Tratamento 1 = Antibiótico (ATB); Tratamento 2 = Plasma Rico em Plaquetas (PRP); Tratamento 3 = PRP + ATB)..... 24
- Tabela 4:** Resultado quantitativo da cultura microbiológica do leite por quarto mamário de 9 vacas, pertencentes ao plantel da Fazenda Boa Liga (Barra do Piraí-RJ), submetidas a três tratamentos na secagem (Tratamento 1 = Antibiótico (ATB); Tratamento 2 = Plasma Rico em Plaquetas (PRP); Tratamento 3 = PRP + ATB)..... 26
- Tabela 5:** Médias e desvio padrão de Amiloide A no leite de quartos mamários de 9 vacas pertencentes ao plantel da Fazenda Boa Liga (Barra do Piraí-RJ), submetidas a três tratamentos na secagem (Tratamento 1 = Antibiótico (ATB); Tratamento 2 = Plasma Rico em Plaquetas (PRP); Tratamento 3 = PRP + ATB)..... 27
- Tabela 6:** Valores médios da contagem de hemácias, hematócrito e concentração de hemoglobina em nove vacas mestiças (holandês x zebu), pertencentes ao plantel da Fazenda Boa Liga (Barra do Piraí-RJ), na interrupção da lactação (A1), ao parto (D0) e aos 14, 30 e 60 dias após o parto (D14, D30, D60) e valores de referência para a espécie (SMITH, 2006). ... 29
- Tabela 7:** Valores médios dos parâmetros hematimétricos volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) em nove vacas mestiças (holandês x zebu) na interrupção da lactação (A1), ao parto (D0) e aos 14, 30 e 60 dias após o parto (D14, D30, D60) e valores de referência (SMITH, 2006). ..... 29
- Tabela 8:** Valores médios de leucócitos totais e leucometria diferencial de nove vacas pertencentes ao plantel da Fazenda Boa Liga (Barra do Piraí-RJ), submetidas a três tratamentos intramamários na interrupção da lactação (A), ao parto (D0) e aos 14, 30 e 60 dias após o parto (D14, D30, D60) e valores de referência (SMITH, 2006)..... 30
- Tabela 9:** Médias e desvios padrões de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no sangue de nove vacas pertencentes ao plantel da Fazenda Boa Liga (Barra do Piraí-RJ), submetidas a três tratamentos intramamários na interrupção da lactação. .... 33
- Tabela 10:** Médias e desvios padrões de proteínas totais séricas de nove vacas pertencentes ao plantel da Fazenda Boa Liga (Barra do Piraí-RJ), submetidas a três tratamentos intramamários na interrupção da lactação. .... 34
- Tabela 11:** Médias e desvios padrões de haptoglobina sérica de nove vacas pertencentes ao plantel da Fazenda Boa Liga (Barra do Piraí-RJ), submetidas a três tratamentos intramamários na interrupção da lactação. .... 35

## LISTA DE QUADROS

|   |    |
|---|----|
| <b>Quadro 1</b> : Interpretação de resultados obtidos ao California Mastitis Test (CMT) e estimativa da contagem de células somáticas (CCS) no leite. ....  | 3  |
| <b>Quadro 2</b> : Tratamentos realizados no momento da secagem de vacas mestiças de um plantel leiteiro localizado em Barra do Piraí-RJ.....  | 11 |
| <b>Quadro 3</b> : Dias de coleta de amostras e análises que foram realizadas de 9 vacas, pertencentes ao plantel da Fazenda Boa Liga (Barra do Piraí-RJ), submetidas a três tratamentos na secagem (Antibiótico (ATB); Plasma Rico em Plaquetas (PRP); PRP + ATB). ....   | 13 |
| <b>Quadro 4</b> : Escores ao California Mastitis Test de quartos mamários de nove vacas, pertencentes ao plantel da Fazenda Boa Liga (Barra do Piraí-RJ), submetidas e grupos experimentais segundo o tratamento intramamário a que foram submetidos: antibiótico (ATB), Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e PRP + ATB. .... | 18 |

## SUMÁRIO

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b>  | <b>1</b>  |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO DE LITERATURA</b>                                   | <b>2</b>  |
| 2.1      | Mastite - Conceitos e Diagnóstico                              | 2         |
| 2.2      | Tratamento e Controle da Mastite – Importância do Período Seco | 3         |
| 2.3      | Imunidade da Glândula Mamária                                  | 5         |
| 2.4      | Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)              | 6         |
| 2.5      | Proteínas da Fase Aguda (PFAs)                                 | 7         |
| 2.6      | Plasma Rico em Plaquetas (PRP)                                 | 8         |
| <b>3</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b>                                      | <b>10</b> |
| 3.1      | Local e Manejo de Ordenha                                      | 10        |
| 3.2      | Animais  | 10        |
| 3.3      | Teste do Antibiótico de Vaca Seca                              | 11        |
| 3.4      | Interrupção da Lactação e Tratamentos Experimentais            | 11        |
| 3.5      | Obtenção de PRP  | 12        |
| 3.6      | Momentos de Coletas de Amostras                                | 12        |
| 3.7      | Análises do Leite  | 13        |
| 3.7.1    | Cultura e isolamento microbiano                                | 13        |
| 3.7.2    | Composição e contagem de células somáticas                     | 13        |
| 3.7.3    | Dosagem de Amiloide A  | 14        |
| 3.8      | Análises do Sangue   | 15        |
| 3.8.1    | Hemograma  | 15        |
| 3.8.2    | Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)              | 15        |
| 3.8.3    | Proteínas totais e haptoglobina sérica (Hp)                    | 16        |
| 3.9      | Delineamento experimental e análises estatísticas              | 17        |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                  | <b>18</b> |
| 4.1      | Índices de Mastite e Teste do Antibiótico de Vaca Seca         | 18        |
| 4.2      | Obtenção do PRP e Teste de Esterilidade                        | 19        |
| 4.3      | Amostras de Leite  | 20        |
| 4.3.1    | Contagem de células somáticas e composição                     | 20        |
| 4.3.2    | Cultura microbiológica   | 20        |
| 4.3.3    | Amiloide A   | 20        |
| 4.4      | Análises Sanguíneas  | 28        |
| 4.4.1    | Hemograma série vermelha                                       | 28        |
| 4.4.2    | Hemograma série branca   | 30        |
| 4.4.3    | TBARS  | 28        |
| 4.4.4    | Proteínas totais e haptoglobina                                | 34        |
| 4.5      | Considerações sobre o uso do PRP                               | 35        |
| <b>5</b> | <b>CONCLUSÕES</b>  | <b>37</b> |
| <b>6</b> | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                              | <b>38</b> |

# 1 INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa a quarta posição em produção de leite no mundo, tendo produzido 35 bilhões de litros em 2016 (EMBRAPA, 2017), porém, em termos de qualidade, nosso produto ainda está muito aquém do que é tecnicamente recomendável. Melhorar as condições da produção de leite, visando atingir o que é exigido pela legislação (Instrução Normativa N° 77/2018), requer um esforço diário de todos os envolvidos na cadeia produtiva. Para enfrentar este desafio, é primordial que haja um controle rigoroso e monitoramento constante da mastite, devido à sua múltipla etiologia, envolvimento de inúmeros patógenos e características específicas de cada propriedade. Somente através de maior conhecimento dos fatores que influenciam a susceptibilidade dos animais à enfermidade e como se dá a resposta imunológica para combater os micro-organismos, é possível avaliar os pontos críticos onde se pode intervir e reduzir a ocorrência de mastite, melhorando, assim, a qualidade do leite e dos derivados lácteos que chegam ao consumidor.

O período seco, compreendido entre a cessação das ordenhas e o início de uma nova lactação, é uma necessidade fisiológica para a vaca leiteira, preparando-a para a próxima lactação. Apesar de ser um momento propício para tratamento de infecções intramamárias subclínicas pré-existentes, alguns fatores afetam negativamente a resposta da glândula frente aos patógenos, como o aumento de pressão intramamária, muitas vezes com extravasamento de leite, associado à migração tardia de células de defesa e à demorada formação do tampão de queratina, aumentando, assim, o risco de infecção e desenvolvimento de mastite.

Apesar de ser usual a utilização de antibioticoterapia para vacas secas, existe uma preocupação em relação ao uso indiscriminado de antibióticos em animais de produção, devido, entre outros fatores, ao aumento de resistência bacteriana e à possibilidade de resíduos de antibióticos chegarem ao consumidor nos produtos lácteos. Já é defendido por alguns autores o uso seletivo da terapia, em que somente vacas com mastite receberiam a infusão intramamária. Neste contexto, estudos visando a utilização de imunomoduladores vêm sendo encorajados, com o intuito de atuar na magnitude e na cinética da resposta imune aos estímulos antigênicos e, assim, promover uma imunidade mais eficaz e duradoura frente aos micro-organismos causadores de mastite, com mínimo risco de toxicidade ou dano tecidual do hospedeiro.

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um hemoderivado que vem sendo utilizado com sucesso para estimular a regeneração de osso e tecido mole, além de possuir propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas. Já foi demonstrado que fatores de crescimento e também quimiocinas e citocinas, presentes no PRP, podem agir sinergicamente para aumentar a infiltração de neutrófilos e macrófagos e, desta forma, promover angiogênese, fibroplasia, deposição de matriz e, por último, reepitelização. Em testes *in vitro*, o PRP apresentou atividade inibitória do crescimento de micro-organismos, sugerindo que moléculas fisiológicas fornecidas *in loco* podem ser importantes no período de tempo necessário para a ativação da resposta imune inata.

A aplicação clínica do PRP em bovinos é ainda pouco estudada, mas resultados promissores já foram demonstrados em metrite e mastite. Devido às propriedades do PRP, acredita-se que seu uso intramamário pode induzir ao aumento da atividade imunológica local.

Os objetivos do presente trabalho foram verificar a resposta da glândula mamária à inoculação de PRP no momento da secagem, através do acompanhamento da lactação subsequente e análise de biomarcadores para mastite no leite e no sangue e, assim, propor uma alternativa de tratamento de vacas secas que dispense o uso de antibióticos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Mastite - Conceitos e Diagnóstico

Mastite é a inflamação da glândula mamária e caracteriza-se por redução ou perda da capacidade secretora da glândula mamária, alterações físicas, químicas e organolépticas do leite (ZAFALON et al., 2005) e alterações patológicas do tecido glandular (ZHAO; LACASSE, 2008). É a doença mais prevalente nos rebanhos leiteiros (LANGONI et al., 2011) e a principal causa do uso de antimicrobianos em vacas leiteiras adultas (POL; RUEGG, 2007).

Embora possa ter diversas causas (agentes químicos ou físicos, reações alérgicas, distúrbios metabólicos e traumas), a mastite bovina, na maioria dos casos, é de origem infecciosa (PHILPOT; NICKERSON, 2002), predominando as seguintes bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Corynebacterium bovis*, *Staphylococcus não aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* (gram-positivas). São também comuns as infecções por *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* e *Enterobacter* spp. (gram-negativas) (BANNERMAN, 2009; OLIVEIRA et al., 2009; MARTINS et al., 2010; LANGONI et al., 2011).

Os patógenos causadores de mastite são classificados epidemiologicamente em contagiosos, cujo principal habitat é a superfície da pele e tetos (transferidos de um animal para outro principalmente durante a ordenha) ou ambientais, os quais habitam preferencialmente o ambiente das vacas leiteiras e as mãos dos ordenadores (a infecção ocorre principalmente entre as ordenhas) (SOMMERHÄUSER et al., 2003).

A mastite contagiosa caracteriza-se por baixa incidência de casos clínicos, alta incidência de casos subclínicos, geralmente de longa duração ou crônica, apresentando alta contagem de células somáticas ou CCS (FONSECA; SANTOS, 2000), enquanto a mastite ambiental apresenta alta incidência de casos clínicos, geralmente de curta duração e dependendo da intensidade do quadro clínico pode resultar na morte da vaca (WENZ et al., 2001).

Os prejuízos decorrentes da mastite são elevados e variam de acordo a intensidade do processo inflamatório, com a prevalência da doença no rebanho, com a patogenicidade dos agentes envolvidos (LÓPEZ; GIRALDO E CARMONA, 2012), com o número e estágio de lactação (DETILLEUX, 2018) e nível de produção (HULTGREN; SVENSSON, 2009).

A possibilidade de veiculação aos consumidores, através do consumo de leite, de micro-organismos patogênicos ou suas toxinas é um problema de saúde pública (LANGONI, 2013). Adicionalmente, a presença de resíduos de antimicrobianos no leite tem sérias implicações na saúde pública, não somente pelo perigo potencial de causar reações alérgicas, mas também pela possível transferência de resistência a outros organismos (ASFAW; NEGASH, 2017).

A mastite pode se apresentar na forma clínica (MC), na qual há sintomas evidentes de sua ocorrência, ou na forma subclínica (MSC), em que, segundo Cullor et al. (1994), não se observam alterações macroscópicas no leite e não há sinais visíveis de inflamação do úbere. A enfermidade pode apresentar evolução superaguda, aguda, subaguda ou crônica (PHILPOT; NICKERSON, 2002).

O diagnóstico de MC é simples pelos métodos rotineiros de exame (inspeção, palpação e alterações do leite), podendo ocorrer edema, hipertermia, endurecimento e/ou hiperalgesia na glândula mamária, além da alteração das características do leite e pode ou não estar acompanhada de reações sistêmicas, como perda de apetite, apatia e às vezes, pode evoluir para o óbito (ROSENBERGER, 1993). O leite pode estar aquoso, conter grumos, fibrina, soro, sangue e pus (FONSECA; SANTOS, 2000). Vacas que apresentam MC não conseguem recuperar o seu potencial de produção na mesma lactação (BAR et al., 2007).

Nos casos de MSC a principal característica utilizada para o diagnóstico é o aumento na contagem de células somáticas (CCS), devido à maior migração de células de defesa para a glândula mamária (NICKERSON, 1994). Estas células estão normalmente presentes no leite de úberes sadios em número reduzido (entre 50 e 200 mil céls. /mL) e dependendo da severidade e extensão da infecção intramamária e do tipo de micro-organismo envolvido, a CCS pode variar de 200 a  $5.000 \times 10^3$  céls. /mL de leite (KITCHEN, 1981).

Para avaliar a CCS do leite, podem ser empregados testes diretos, como contagem microscópica direta em lâminas e contagem eletrônica; ou indiretos, como *California Mastitis Test* (CMT) e *Wisconsin Mastitis Test* (WMT) (OLIVIERA, 2013). Dentre estes, destaca-se o CMT, pela praticidade e a vantagem de poder ser empregado no momento da ordenha (SANTOS; FONSECA, 2007), e a contagem eletrônica, pela precisão da técnica.

A cultura bacteriana geralmente é feita em vacas selecionadas a partir da CCS ou de casos clínicos. A cultura de leite individual é utilizada na identificação das espécies bacterianas envolvidas no processo infeccioso (OLIVEIRA et al., 2013) e o antibiograma, sempre que possível, deve ser realizado a fim de confirmar o diagnóstico clínico e direcionar o uso de medidas específicas de controle (RUEGG, 2003).

O uso do CMT como método de diagnóstico da MSC tem sido questionado por ser subjetivo, já que os resultados são visuais e dependem do treinamento da pessoa que o realiza (SANTOS, 2013a), com possibilidade de resultados falso-positivos ou falso-negativos (RIBEIRO et al., 2003). Contudo, diferentes estudos (DELLA LIBERA et al., 2001, SARGEANT et al., 2001; BARBOSA et al., 2002; DELLA LIBERA et al., 2010) atestaram a sensibilidade do CMT em identificar quartos mamários com MSC ou sadios quando o resultado é interpretado como negativo ou positivo (qualquer reação positiva). Correlação positiva e significativa entre a CCS e o CMT tem sido relatada (JORGE et al., 2005; REYES et al., 2005), permitindo fazer uma correspondência aproximada do escore ao CMT e valores da CCS (RUEGG, 2003) (Quadro 1).

**Quadro 1** : Interpretação de resultados obtidos ao *California Mastitis Test* (CMT) e estimativa da contagem de células somáticas (CCS) no leite.

| <b>Escore no CMT</b> | <b>Interpretação</b>  | <b>CCS (céls. /mL)</b> |
|----------------------|---|------------------------|
| Negativo             | A mistura mantém-se líquida, sem evidência de precipitação.       | 0 – 200.000            |
| Traços               | Precipitado ligeiro que desaparece com o movimento contínuo.      | 200.000 – 500.000      |
| 1 (+)                | Formação de precipitado, mas nenhuma tendência à formação de gel. | 400.000 – 1.500.000    |
| 2 (++)               | A mistura engrossa imediatamente e move-se em direção do centro.  | 800.000 – 5.000.000    |
| 3 (+++)              | Formação grossa de gel e a superfície torna-se convexa no centro. | > 5.000.000            |

Adaptado de Ruegg (2003)

## 2.2 Tratamento e Controle da Mastite – Importância do Período Seco

Os casos de MC devem ser tratados imediatamente (LADEIRA, 2001) pela administração intramamária de antimicrobianos de amplo espectro (POL; RUEGG, 2007), geralmente por três dias consecutivos, após o esgotamento do quarto afetado (LADEIRA, 2001). Em casos agudos graves recomenda-se o tratamento sistêmico associado ao intramamário, por mais 24 horas após cessarem os sintomas, para garantia de cura clínica e microbiológica (RIBEIRO et al., 2016).

Tratamentos de maior duração foram associados com maiores chances de cura (KRÖMKER et al., 2010; KASRAVI et al., 2011; TRUCHETTI et al., 2014), porém os resultados são variáveis sendo necessário avaliar os custos e retornos econômicos para justificar seu uso. Falhas de tratamento são geralmente atribuídas à baixa eficácia da droga, porém podem estar relacionados a fatores individuais, ao patógeno, ou a droga utilizada (MORIN, 2004).

Os animais com MSC podem ser tratados durante a lactação ou preferencialmente no período seco. O tratamento da MSC durante a lactação não demonstrou aumentos significativos de produção ou benefícios econômicos (ZAFALON et al., 2005), apresentando resultados favoráveis apenas contra *Streptococcus agalactiae* (BLOWEY; EDMONDSON, 2010). Contudo, foram verificadas maiores taxas de cura bacteriológica (REIS et al., 2003; OLIVER et al., 2004). Pelo fato de a mastite ser uma doença multifatorial, envolvendo diversos agentes, em propriedades com características distintas e cada indivíduo poder responder de forma diferente frente ao micro-organismo, existe grande dificuldade na execução de programas de monitoramento da qualidade do leite. Para se obter sucesso no controle da mastite é preciso manter a taxa de infecção baixa ou reduzida, seja através da prevenção de novas infecções ou da eliminação de infecções pré-existentes. É imprescindível que o programa integre várias medidas, que devem ser estabelecidas simultaneamente (LADEIRA, 2001).

De acordo com Arcanjo et al. (2017), um programa eficaz de monitoramento e controle de mastite sobretudo contagiosa em rebanhos bovinos leiteiros deve envolver as seguintes práticas: 1) correta rotina de higiene do ordenhador e animal na ordenha; 2) tratamento de mastites clínicas durante a lactação com corretos procedimentos com o antibiótico intramamário; 3) utilização antibioterapia de secagem em todos os animais; 4) limpeza, manutenção e adequado funcionamento dos equipamentos de ordenha; 5) identificação, segregação e descarte de vacas cronicamente infectadas; e 6) manejo adequado do ambiente de permanência dos animais, tanto no requisito de higiene como de bem estar.

O período seco é considerado um momento crucial de atenção, pois as vacas estão extremamente susceptíveis à mastite, devido ao estresse causado pela interrupção da ordenha e por deixarem de receber cuidados diários de desinfecção dos tetos (SONDERGAARD et al., 2002), além do leite residual favorecer ao desenvolvimento microbiano (GREEN et al., 2002). É um período necessário para a melhoria do estado nutricional da vaca para a próxima lactação, além da regeneração e/ou reativação do epitélio secretor antes do início da próxima lactação e otimização das defesas da vaca contra patógenos causadores de mastites (SORDILLO, 2005).

A aplicação de antibiótico de longa ação em todos os quartos mamários no momento da secagem (ANDREWS et al., 2008), tem sido atualmente o foco dos programas de controle da mastite subclínica por promover a cura das infecções pré-existentes na secagem, além de prevenir a ocorrência de novas infecções (BHUTTO et al., 2010).

Usualmente, no último dia de lactação utiliza-se formulação específica para o período seco, no tratamento de mastites subclínicas ou profilática no caso dos tetos não infectados (BRADLEY; GREEN, 2001, BERRY; HILLERTON, 2002), com permanência do princípio medicamentoso por período maior de tempo na glândula mamária (GREEN et al., 2002). Desta forma, a terapia da vaca seca aumenta a exposição entre a bactéria e o antibiótico e, conseqüentemente, aumenta o potencial de desenvolvimento de resistência dos micro-organismos (SANTOS, 2013b), o que resulta em grande pressão para a redução do emprego de antibióticos de forma desnecessária (SANTOS, 2003). Batista et al. (2009) também destacaram que, muito frequentemente, ocorre refratariedade à terapia, mesmo nos casos de comprovada sensibilidade do agente etiológico ao antimicrobiano empregado.

Deve-se destacar que a migração tardia de células de defesa à glândula mamária e a demorada formação do tampão de queratina, substância que veda o canal do teto impedindo a invasão por patógenos, são fatores que aumentam o risco de aparecimento de mastite no período seco (SANTOS, 2003; PYÖRÄLÄ, 2008). Sendo assim, não basta utilizar antibiótico sem atuar

nestes fatores. Deve-se atentar ainda que, dependendo da produção de leite individual, o risco de mastite aumenta. Rajala-Schultz et al. (2005) demonstraram que uma diferença em produção de 12,5 kg para 17,5 kg de leite na secagem do animal pode aumentar o risco de infecção intramamária por bactérias ambientais em 77%.

O perfil de CCS antes da secagem e ao parto vem sendo utilizado para verificar a performance individual e de grupos no período seco (HENDERSON et al., 2016). No entanto, a eficiência das células, e não somente o número, deve ser pensada. Batista et al. (2009) evidenciaram menor índice de fagocitose com o uso de algumas formulações antimicrobianas comerciais (cefalônio anidro, gentamicina, benzilpenicilina procaína+naftilina e dihidroestreptomicina, cloxacilina benzatina) e, por esse motivo, recomendaram considerar, principalmente no caso em que são indicadas profilaticamente, as aplicações de medicamentos formulados para o período seco em animais não infectados, se esses não poderiam interferir negativamente no processo fisiológico de secagem, quando a fagocitose é fundamental. Além disso, apesar de haver um aumento acentuado nas CCS, onde neutrófilos e macrófagos são os tipos celulares predominantes, a capacidade para fagocitar e destruir os micro-organismos estão diminuídos devido à absorção indiscriminada dos componentes do leite (gordura e caseína) (SORDILLO, 2005).

### 2.3 Imunidade da Glândula Mamária

O sistema de defesa da glândula mamária compreende as barreiras externas (pele e canal do teto) e internas, nas quais fatores imunológicos inatos e adquiridos agem de forma coordenada (PEREYRA; DALLARD; CALVINHO, 2014), sendo determinantes para proteção ideal contra a enfermidade e resistência a novas infecções.

A resposta inata predomina durante os estágios iniciais da infecção e é ativada por numerosos estímulos, porém não é aumentada pela exposição repetida ao mesmo insulto (SORDILLO; SHAFER-WEAVER; DEROSA, 1997), sendo responsável por impedir a entrada e/ou colonização de micro-organismos (BUITENHUIS et al., 2011). É desempenhada, além das barreiras físicas do teto, por macrófagos, neutrófilos, células do tipo *natural killer* (NK) (SORDILLO; SHAFER-WEAVER; DEROSA, 1997), como também por alguns fatores solúveis (lactoferrina, lactoperoxidase, lisozimas, citocinas e complemento) (CARNEIRO et al., 2009). A resposta inata estimula a resposta imune adquirida tornando-a eficaz contra os diferentes tipos de patógenos (ABBAS et al., 2008).

A resposta imune específica ou adquirida é responsável por reconhecer fatores patogênicos e é mediada por anticorpos e várias populações linfóides e, devido à memória de certos linfócitos, pode ser aumentada pela exposição repetida a um patógeno (SORDILLO; SHAFER-WEAVER; DEROSA, 1997).

Na glândula mamária sadia, a celularidade é constituída por macrófagos, neutrófilos e linfócitos, com CCS geralmente menor que 200.000 células por mL de leite. A entrada de micro-organismos provoca o recrutamento quimiotático de polimorfonucleares, principalmente neutrófilos, da corrente sanguínea para o sítio da infecção (DELEO et al., 2009; FOSTER, 2009), resultando em um afluxo rápido de células para a glândula mamária (RIGBY; DELEO, 2012). A CCS aumenta, com predomínio de neutrófilos, seguidos por macrófagos e linfócitos e as células epiteliais permanecem inalteradas (PHILPOT; NICKERSON, 1991).

A incidência de mastite durante o período seco é um dos maiores problemas na bovinocultura leiteira (LESLIE; DINGWELL, 2002), pois vários fatores interferem negativamente para uma menor eficácia das defesas da glândula mamária neste período, como alterações endócrinas, estresse fisiológico e os desequilíbrios de energia (SORDILLO, 2005). Os leucócitos migram para a glândula dentro de uma semana após a secagem, mas não a protegem imediatamente (DINGWELL et al., 2004), devido, entre outros fatores, à absorção

indiscriminada de componentes do leite como gordura e caseína (SORDILLO, 2005). A formação do tampão de queratina é demorada. Estima-se que ocorra o selamento natural do teto em torno de uma a duas semanas após a interrupção da lactação (DINGWELL et al., 2004).

As concentrações de isotipos opsonizantes de imunoglobulinas e complemento também são muito baixas durante o início do período seco e podem contribuir para a diminuição das funções dos neutrófilos. Assim, a fagocitose pelos neutrófilos e macrófagos será mais eficiente quando a glândula mamária estiver totalmente involuída, por causa do aumento do número dessas células fagocíticas, concentrações inferiores de caseína e gordura, e concentrações mais elevadas de imunoglobulinas e complemento que irão reforçar as atividades bactericidas (SORDILLO, 2005).

Entender as interações complexas entre a patogênese de determinadas bactérias, as respostas do hospedeiro necessárias para eliminar os patógenos e as formas de melhorar a imunidade da glândula mamária antes que a doença seja estabelecida, são desafios atuais nas pesquisas para o controle da mastite. Neste contexto, a utilização de imunomoduladores pode ser interessante, visando promover uma imunidade mais eficaz e sustentada, com menor dano tecidual ou risco de toxicidade (SORDILLO; STREICHER, 2002), lembrando que no período seco a concentração de leucócitos é alta e o ambiente é mais favorável à sua função do que na glândula de lactação (PYÖRÄLÄ, 2008).

## **2.4 Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)**

Durante o processo de fagocitose de bactérias pelos leucócitos, principalmente neutrófilos e macrófagos, há um grande aumento do metabolismo oxidativo, a chamada explosão respiratória, cuja finalidade é proporcionar uma variedade de agentes oxidantes microbicidas. As características metabólicas da explosão respiratória são aumentos acentuados de consumo de oxigênio e produção de espécies reativas de oxigênio como radicais livres, superóxido, radicais peroxil e hidroxil e outros oxidantes não radicais como, peróxido de hidrogênio e oxigênio singlete e oxidação da glicose (TARGOWSKI, 1983).

O peróxido de hidrogênio é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa da reação que produz o radical hidroxila, capaz de atravessar camadas lipídicas e reagir com proteínas (GOLDEN; RAMDATH, 1987; BRAGA, 2010).

Radicais livres ou ERO estão envolvidos na destruição de micro-organismos e partículas estranhas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997) e também atuam como fatores de transcrição na sinalização intracelular, induzindo apoptose. Portanto, podem danificar células saudáveis em diversos tecidos (MILLER et al., 1993).

O acúmulo de peróxido de hidrogênio nos polimorfonucleares foi associado à redução da capacidade de destruição de patógenos. Para proteger-se dos danos causados pelas ERO, as células possuem um sistema de defesa que atua na eliminação do agente oxidante (vitamina E, glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase e glutathiona-peroxidase (GSH-Px)) ou no reparo da lesão ocorrida (ácido ascórbico, glutathiona-redutase (GSH-Rd) e GSHPx, entre outros) (BARRERA et al., 2008).

Evidências sugerem que o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica resultante estão envolvidos em numerosos estados patológicos, incluindo inflamação, aterosclerose, doenças neurodegenerativas e câncer. O envolvimento do estresse oxidativo na etiologia de certos transtornos comuns em vacas leiteiras é sugerido por reduções na incidência de retenção de placenta (HARRISOM; HANCOCK; CONRAD, 1984) e mastite (SMITH et al., 1984) quando os antioxidantes vitamina E e Selênio são suplementados.

O termo estresse oxidativo é frequentemente usado para descrever os desequilíbrios entre o desafio oxidativo e a capacidade de defesa antioxidante do organismo (MACHADO et al., 2009). Todos os componentes celulares são suscetíveis ao estresse oxidativo, porém a

membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na sua estrutura e permeabilidade (DIX; AIKENS, 1993).

Os produtos da peroxidação lipídica, principalmente aldeídos, como o malondialdeído (MDA, C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>), receberam muita atenção porque são mais reativos (BARRERA; PIZZIMENTI; DIANZANI, 2008) e podem ser utilizados como indicadores da ação dos radicais livres no organismo (ÖZGÜNER et al., 1999; DEL RIO et al., 2005).

O ensaio do ácido tiobarbitárico (TBA) é o método mais comumente usado para a determinação do MDA em fluidos biológicos. O MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar MDA-TBA na proporção 1:2, sendo os resultados expressos em termos de TBARS. A quantificação de MDA nos sistemas biológicos é um parâmetro importante para avaliação do estresse oxidativo celular (PILZ et al., 2000; SIM et al., 2003). Apesar de algumas considerações e limitações do método (JANERO; BURGHARDT, 1988), rapidez, facilidade de uso e custo tornam o ensaio de TBA o método mais utilizado para avaliação do estresse oxidativo.

## 2.5 Proteínas da Fase Aguda (PFAs)

Em resposta a vários estímulos que afetam a homeostasia do sistema imune, particularmente infecções, inflamações e transtornos metabólicos (MARTINEZ-SUBIELA et al., 2001) ocorre uma reação inflamatória não específica do hospedeiro, que tem como finalidade impedir a ação do patógeno e limitar o dano celular. Durante o desenvolvimento desta resposta são liberados citocinas e outros mediadores que iniciam alterações sistêmicas e localizadas além de alterações na concentração de algumas proteínas plasmáticas, chamadas proteínas de fase aguda (PFAs). Algumas proteínas têm sua secreção aumentada (PFAs positivas), enquanto outras sofrem redução em sua síntese e liberação para a corrente sanguínea (PFAs negativas) (KANEKO et al., 2008).

São mais de 30 PFAs identificadas, porém, nos bovinos, haptoglobina (Hp) e Amilóide A sérico (SAA) são consideradas as principais PFAs (MURATA et al., 2004), com aumento de mais de 10 vezes em sua concentração em resposta à inflamação. Glicoproteína ácida  $\alpha$ -1 (AGP) e proteína principal de fase aguda (MAP-pig) têm uma importância intermediária ( $\geq 2$ -10x), enquanto que fibrinogênio e ceruloplasmina podem apresentar um pequeno aumento (1,5-2x) (TIZARD, 2014). Na medicina veterinária a dosagem de PFAs como biomarcadores precoces de enfermidades tem sido crescente, acompanhando a tendência na medicina humana (SIMPLÍCIO et al., 2013).

Em bovinos, as PFAs com alta sensibilidade podem ser utilizadas no diagnóstico de processos inflamatórios e para discriminar entre condições agudas e crônicas (ECKERSALL et al., 2006). A SAA teve uma sensibilidade clínica máxima (100 por cento) na discriminação entre os casos agudos e crônicos e a Hp teve a especificidade clínica alta (76 por cento) (HORADAGODA et al., 1999).

Em vacas leiteiras, o monitoramento de PFAs tem sido útil para identificar situações subclínicas, particularmente em afecções mamárias (ECKERSALL et al., 2001; PETERSEN et al., 2004; NIELSEN et al., 2004; PYÖRÄLÄ et al., 2011). Diferenças significativas nas concentrações de PFAs foram encontradas no leite de vacas com mastite causada por diferentes patógenos. As maiores concentrações de Hp foram encontradas nos casos de mastite causada por *Escherichia coli* e *Trueperella pyogenes* e as concentrações mais baixas nas mastites causadas por estafilococos coagulase-negativos. Concentrações muito baixas de SAA foram encontradas no leite das vacas com mastite por *T. pyogenes*, em contraste com os causados por outros patógenos (PYÖRÄLÄ et al., 2011).

As PFAs no leite aumentaram significativamente com o aumento da CCS, sugerindo que elas podem ser indicadores da gravidade de uma infecção (NIELSEN et al., 2004). O SAA

é uma proteína de 15kDa, cuja função ainda não é totalmente esclarecida, porém desencadeia a produção de diversas citocinas inflamatórias. O SAA é quimiotático para neutrófilos, monócitos e linfócitos T e sua concentração é significativamente maior no leite de animais com mastite (TIZARD, 2014).

A Hp atua na inflamação como molécula ligante de ferro, um elemento essencial para várias funções metabólicas dos seres vivos. O Ferro é um dos micronutrientes mais limitantes do crescimento bacteriano, principalmente das espécies que o utilizam em enzimas da cadeia respiratória (LANKFORD, 1973). Durante a infecção, o patógeno usa ferro do hospedeiro para a sua sobrevivência e patogenicidade, portanto, a manutenção do nível de ferritina no plasma durante a infecção é um mecanismo de defesa do hospedeiro (HOFFBRAND et al., 2004). Durante a infecção, IL-1, TNF- $\alpha$  e citocinas podem induzir a síntese de ferritina e Hp indiretamente, aumentando a absorção de ferro pelos hepatócitos. A maior disponibilidade de ferro para macrófagos e aumento da síntese de ferritina desempenham papéis centrais no sequestro de ferro, tornando-o indisponível para bactérias, inibindo sua invasão e proliferação (HENTZE et al., 2004; SVOBODA et al., 2004). Hp também se liga à hemoglobina livre, prevenindo, assim, a oxidação de proteínas e lipídios (TIZARD, 2014).

Simplício et al. (2013) demonstraram aumentos significativos de fibrinogênio, Hp e ceruloplasmina em bovinos com mastite. Hussein et al. (2018) sugeriram que a medição de amiloide A no leite (MAA) para diagnosticar MSC é mais vantajoso do que CCS, pois esta proteína é indetectável no leite de animais sadios, não havendo outro fator que não a mastite para o aumento de sua concentração no leite. Já Jaeger et al. (2017) consideraram a dosagem de MAA através de ELISA uma valiosa adição aos instrumentos existentes no diagnóstico e controle da mastite, podendo, junto com a CCS ser um método de triagem nos programas de controle da infecção intramamária por *S. aureus*.

## 2.6 Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

Nos últimos 20 anos, o uso de concentrados de plaquetas tem ganhado popularidade área médica, como odontologia, cirurgia oral, ortopedia, medicina esportiva, dermatologia, oftalmologia e cirurgia plástica (DRAGO et al., 2013).

O PRP é um material autógeno obtido por meio da centrifugação de uma quantidade de sangue venoso do paciente (MELLO et al., 2006). As numerosas propriedades do PRP são atribuídas principalmente às plaquetas (GERRARD, 1988; KROLL; SCHAFER, 1989). Derivadas de megacariócitos, as plaquetas armazenam moléculas bioativas envolvidas em muitas funções biológicas, incluindo hemostasia, proliferação celular, formação de matriz extracelular, angiogênese, modelagem vascular, quimiotaxia e inflamação (BLAIR; FLAUMENHAFT, 2009; NURDEN, 2011).

Os fatores de crescimento e outros compostos bioativos presentes no PRP desempenham um importante papel na reparação de tecidos (ZARBOCK et al., 2006; PIETRZAK et al., 2007) e no estímulo dos mecanismos de defesa contra as infecções (YUAN et al., 2012).

Em relação à glândula mamária bovina, sabe-se que o aumento de CCS, especialmente neutrófilos, é um importante mecanismo de defesa contra infecções (BARBER; YANG, 1998). A interação de plaquetas com neutrófilos promove o recrutamento de mais neutrófilos e outros leucócitos ao tecido inflamatório, além disso, as plaquetas ativadas iniciam ou amplificam várias respostas de neutrófilos, incluindo fagocitose, produção de radicais de oxigênio e produção de armadilhas extracelulares dos neutrófilos (NETs – *neutrophil extracellular traps*) (LISMAN, 2018).

Além de citocinas secretadas pelas plaquetas, destacam-se alguns fatores de crescimento: fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF); fator de crescimento semelhante à insulina (IGF); fator de crescimento endotelial-vascular (VEGF); fator de

crescimento epitelial (EGF); fator de angiogênese e fator plaquetário 4 (PF-4) (FREYMILLER; AGHALOO, 2004) que estão presentes nos grânulos alfa do citoplasma das plaquetas. Estes fatores apresentam propriedades antibacterianas, regenerativas e inflamatórias (BOUDREAUX; CATALFAMO, 2010) e ainda promovem a potencialização da quimiotaxia, proliferação, diferenciação e secreção celular (FOSTER et al., 2009), atuando como amplificadores da resposta inflamatória aguda (WEISS; WARDROP, 2010). De fato, esses fatores de crescimento atuam sinergicamente para aumentar a infiltração de neutrófilos e macrófagos e promover a angiogênese, a fibroplasia, a deposição de matriz e, por fim, a reepitelização (ANITUA et al., 2004). Zalavary et al. (1996) demonstraram que a fagocitose e a produção de metabólitos de oxigênio por neutrófilos foram potencializadas pela presença de plaquetas.

O fator de ativação plaquetária liberado por macrófagos, PMN, plaquetas e células endoteliais aumenta a adesão celular e ativa as células endoteliais levando a um aumento da liberação de mediadores inflamatórios, influenciando a integridade funcional e estrutural da circulação (JAFFE, 1987) e a resposta inflamatória (FAJARDO, 1989; DAVIES; HAGEN, 1993). As células endoteliais também estão envolvidas na adesão de neutrófilos e monócitos, na indução da síntese de moléculas de adesão leucócito-endotélio e fator ativador de plaquetas (PAF), aumento da síntese e secreção de prostaglandinas e fator de crescimento derivado de plaquetas (BEVILACQUA et al., 1987; McMILLEN et al., 1993).

As plaquetas também estão envolvidas com a resolução da inflamação. As lipoxinas, moléculas lipídicas oriundas do ácido aracdônico, são moduladoras do processo inflamatório, pois atuam na diminuição da quimioatração dos neutrófilos para o local lesado, além de promover apoptose. Ademais, apresentam quimiotaxia para os monócitos que posteriormente se tornarão macrófagos nos tecidos, a fim de atuar na cicatrização e resolução da inflamação (BANNENBERG et al., 2005). Uma das principais rotas para a biossíntese da lipoxina A4 (LXA4) é a interação dos neutrófilos com as plaquetas nos vasos sanguíneos.

Marini et al. (2016) tiveram resultados positivos testando a capacidade do PRP *in vitro* para neutralizar a inflamação de células endometriais bovinas, demonstrando uma menor expressão de genes pró-inflamatórios. Marques (2014) demonstrou que o uso de PRP intramamário em vacas em lactação promoveu um aumento de leucócitos no sangue após duas horas da aplicação, sugerindo-se mobilização posterior para a glândula mamária.

Lange-Consiglio et al. (2014) e Evkuran Dal et al. (2019) demonstraram uma boa ação de concentrado plaquetário na resolução da resposta inflamatória da glândula mamária de bovinos. Os primeiros autores demonstraram maior eficácia associando-se antibiótico intramamário ao concentrado plaquetário, inclusive com menores índices de reincidência, além de mais eficaz que antibiótico quando utilizado isoladamente em casos de mastite crônica.

Abordagens não-antibióticas podem ser úteis para prevenir novas infecções durante o período seco, em rebanhos onde o risco de mastite ambiental é alto (PYÖRÄLÄ, 2008). Pelos efeitos do PRP no estímulo dos mecanismos de defesa contra as infecções, é provável que possa atuar de forma a induzir uma melhor resposta imunológica da glândula mamária durante o período seco, auxiliando no seu restabelecimento e preparação para a lactogênese subsequente.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) em reunião ordinária realizada em 17/10/2016, protocolada sob nº 7731180816.

#### 3.1 Local e Manejo de Ordenha

O estudo foi realizado de janeiro a julho de 2018 em uma propriedade leiteira localizada no Distrito de Dorândia, Barra do Piraí - RJ, no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia (IFRJ) – *Campus* Pinheiral e na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Os hemogramas foram realizados no laboratório Petnestic em Volta Redonda-RJ. Amostras de leite foram analisadas quanto à CCS e composição em laboratório da Rede Brasileira de Qualidade do Leite (Clínica do Leite, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, da Universidade de São Paulo - ESALQ/USP). O isolamento microbiano das amostras de leite foi realizado no Laboratório de Microbiologia do IFRJ. Os demais ensaios foram realizados no laboratório Multidisciplinar do IFRJ e no Laboratório de Pesquisas Clínicas (LPC) do Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária na UFRRJ.

Na propriedade utilizava-se ordenha mecânica e o número de vacas em lactação à época do experimento era de 83. O manejo pré-ordenha consistia de lavagem dos tetos com água clorada apenas se houvesse muita sujidade, descarte dos primeiros jatos diretamente no chão, imersão dos tetos em solução pré-dipping (1,7% de ácido láctico + 0,5% de peróxido de hidrogênio), secagem após 30 segundos com papel toalha (1 folha por teto) e colocação de ordenhadeira. Ao final da ordenha, os tetos eram desinfetados com solução pós-dipping à base de clorexidina 0,5% e os animais soltos ao pasto. Animais que necessitassem de descarte do leite (colostro ou tratamento com antibiótico) eram ordenhados com uma ordenhadeira independente, a qual direcionava o leite para um latão.

#### 3.2 Animais

Foram selecionadas, inicialmente, 15 vacas mestiças (holandês x zebu) ao final da lactação, com idade entre 4 e 8 anos, com escore de condição corporal entre 2,5 e 3,5 (escala de 1,0 a 5,0, conforme Wildman et al. (1982), pluríparas, gestantes, mantidas sob regime de pastejo, recebendo concentrado comercial de acordo com a produção de leite, além de mistura mineral completa e água sem restrição.

De todas as vacas foi feito exame físico da glândula mamária para verificar a ocorrência de MC, observando-se a presença de edema, sensibilidade dolorosa, calor, hiperemia, assimetria, além da textura, consistência e inspeção visual dos três primeiros jatos de leite colhido em caneca de fundo escuro (leite aguado, purulento, com grumos, fibrina ou sangue) no início da ordenha. A seguir, os tetos foram lavados quando apresentavam muita sujidade, sendo em seguida feita a antissepsia com solução pré-dipping, após 30 segundos foram secos com papel toalha (uma folha por teto) e realizado o CMT para verificar a existência de MSC. O resultado foi anotado em escores: negativo (-), suspeito (traços), positivo fraco (+), positivo (++) e fortemente positivo (+++), de acordo com Schalm e Noorlander (1957) e Ruegg (2003).

Nesta seleção inicial, foram eliminadas vacas com MC ou que apresentaram CMT negativo, sendo selecionadas aquelas com escore do CMT positivo ou fortemente positivo, que não haviam sido tratadas com antibiótico nos 30 dias antecedentes. As vacas selecionadas tiveram prenhez confirmada através de ultrassonografia retal (Aloka SSD 500 ®) e as datas de

parto foram previstas a partir da data de inseminação artificial. Ao final, foram selecionadas nove vacas que preencheram todos os critérios.

### 3.3 Teste do Antibiótico de Vaca Seca

Testou-se a eficácia dos princípios ativos contidos na formulação intramamária utilizada para tratamento de vacas secas<sup>1</sup>, por meio da cultura microbiológica e antibiograma de amostras aleatórias de leite de vacas reagentes ao CMT ou com mastite clínica, além de amostras dos dois tanques de expansão.

O leite foi colhido em frascos tipo falcon estéreis de 50 mL, após antissepsia do teto e eliminação dos primeiros jatos. O material foi armazenado em caixas isotérmicas contendo gelo e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia da UFRRJ.

Testes de sensibilidade a fármacos antibacterianos foram efetuados para amostras identificadas segundo o *National Mastitis Council* (NMC, 2004). As zonas de inibição do crescimento microbiano foram interpretadas de acordo com o CLSI (2018). A sensibilidade *in vitro* foi avaliada frente aos seguintes antibióticos: ampicilina (10µg), bacitracina (10UI), clindamicina (2µg), cefalexina (30µg), cefalotina (30µg), cefoperazone (75µg), espiramicina (100µg), enrofloxacina (5µg), gentamicina (10µg), neomicina (30µg), oxacilina (1µg), tetraciclina (30µg) e penicilina G (10U.I).

### 3.4 Interrupção da Lactação e Tratamentos Experimentais

A secagem dos animais ocorreu de forma intermitente, de acordo com a metodologia descrita por Santos (2003). No último dia de ordenha (início do período seco) foram instituídos três tratamentos em um total de 36 quartos mamários, sendo 12 quartos mamários por tratamento, conforme descrito no Quadro 2.

O tratamento 1 consistiu na infusão intramamária de antibiótico, considerado tratamento convencional, utilizando-se fórmula comercial rotineiramente aplicada na fazenda, cuja eficácia foi testada (item 3.3). No tratamento 2, os quartos mamários foram tratados com infusão intramamária de PRP, em um volume de 10 mL por quarto, utilizando-se cânulas intramamárias descartáveis, idênticas às utilizadas na aplicação de antibiótico (Quadro 2). Já no tratamento 3, cada quarto mamário recebeu infusão de PRP (10 mL), seguida de aplicação de antibiótico intramamário.

**Quadro 2:** Tratamentos realizados no momento da secagem de vacas mestiças de um plantel leiteiro localizado em Barra do Piraí-RJ

| Tratamentos | Anterior esquerdo | Anterior direito | Posterior esquerdo | Posterior direito | N | Total QM |
|-------------|-------------------|------------------|--------------------|-------------------|---|----------|
| 1           | ATB               | ATB              | ATB                | ATB               | 3 | 12       |
| 2           | PRP               | PRP              | PRP                | PRP               | 3 | 12       |
| 3           | PRP+ATB           | PRP+ATB          | PRP+ATB            | PRP+ATB           | 3 | 12       |

ATB=Antibiótico; PRP=Plasma rico em plaquetas; QM=Quartos mamários

As infusões foram precedidas de esgotamento total do úbere, antissepsia com álcool 70% e seguidas de massagem para melhor distribuição do produto na glândula e imersão dos tetos em solução *pós-dipping*. Os animais foram examinados uma vez por semana durante todo o período seco, a fim de se verificar possíveis sinais de mastite ou outras enfermidades.

<sup>1</sup> Mastijet Vaca Seca ® (benzilpenicilina G procaína; benzilpenicilina G potássica; sulfato de neomicina)



**Figura 1:** Cânula descartável utilizada para aplicação intramamária de plasma rico em plaquetas

### 3.5 Obtenção de PRP

No último dia de ordenha, o PRP foi obtido para infusão intramamária, conforme protocolo descrito por Marques et al. (2014). Foram utilizadas seis vacas para este procedimento, a fim de se obter PRP autólogo para os tratamentos 2 e 3.

Após antissepsia adequada da pele na região do pescoço, de cada animal foram coletados 450 mL de sangue em bolsa de transfusão contendo CPDA-1 (ácido cítrico, citrato de sódio, fosfato de sódio, dextrose e adenina) por punção venosa da jugular com cateter 16 G acoplado à bolsa, sendo constantemente homogeneizado. As bolsas foram acondicionadas em caixa isotérmica, sendo feita homogeneização periódica, até a chegada ao laboratório em torno de 20 min. Todo o manuseio do sangue foi realizado em capela de fluxo laminar e de forma estéril, sendo retiradas alíquotas de 15 mL em tubos tipo falcon estéreis para proceder às centrifugações.

Foram realizadas duas centrifugações, a primeira a 400g por 10 minutos, na qual descartou-se 50% do plasma da parte superior e a fração de hemácias, e a segunda centrifugação a 800g por 10 minutos, quando 75% do plasma sobrenadante foi descartado (plasma pobre em plaquetas), restando os 25% do plasma considerado PRP que foi acondicionado em frasco estéril e mantido em recipiente isotérmico contendo gelo até a aplicação intramamária. Neste processo, foram obtidos 40 mL de PRP de cada animal, objetivando-se a utilização de 10 mL em cada quarto mamário.

Foi feita contagem de plaquetas diluindo-se 10  $\mu$ L de PRP em 1990  $\mu$ L de Líquido de Brecher, procedendo-se ao preenchimento da câmara de Neubauer e, em seguida, deixando em repouso por 20 min em câmara úmida. Foram contadas plaquetas em cinco quadrados do retículo central, obtendo-se o número de plaquetas por mL através da multiplicação pela área, altura e diluição ( $n^{\circ}$  plaquetas  $\times 5 \times 10 \times 200 =$  plaquetas/ $\text{mm}^3$  sangue). Uma pequena alíquota foi enviada ao laboratório de microbiologia, para cultura e isolamento, visando a confirmar a esterilidade do hemoderivado.

### 3.6 Momentos de Coletas de Amostras

Na semana anterior à data prevista para realização da última ordenha, foram colhidas amostras de sangue e leite, denominadas amostras 1 (A1), para realização das análises descritas nos itens a seguir (3.7 e 3.8). Novas amostras foram colhidas no dia do parto (D0) e a seguir

aos 14, 30 e 60 dias após o parto (D14, D30 e D60, respectivamente). Um resumo das coletas está descrito no Quadro 3.

**Quadro 3:** Dias de coleta de amostras e análises que foram realizadas de 9 vacas, pertencentes ao plantel da Fazenda Boa Liga (Barra do Pirai-RJ), submetidas a três tratamentos na secagem (Antibiótico (ATB); Plasma Rico em Plaquetas (PRP); PRP + ATB).

| Dias em relação ao parto |                  | Secagem | 0 | 7 | 14 | 21 | 30 | 60 |
|--------------------------|------------------|---------|---|---|----|----|----|----|
| CMT/Exame físico         |                  | x       | x | x | x  | x  | x  | x  |
| Sangue                   | Haptoglobina     | x       | x |   | x  |    | x  | x  |
|                          | TBARS            | x       | x |   | x  |    | x  | x  |
|                          | Hemograma        | x       | x |   | x  |    | x  | x  |
|                          | Proteínas totais | x       | x |   | x  |    | x  | x  |
| Leite                    | Isolamento       | x       | x |   | x  |    | x  | x  |
|                          | CCS              | x       |   |   | x  |    | x  | x  |
|                          | Composição       | x       |   |   | x  |    | x  | x  |
|                          | Amiloide A       | x       | x |   | x  |    | x  | x  |

O leite foi colhido em dois frascos tipo falcon estéreis de 50 mL, após realização de CMT, precedida de antissepsia do teto e eliminação dos primeiros jatos, sendo um frasco destinado ao exame microbiológico e outro às demais análises, o qual foi dividido em alíquotas para cada uma delas, conforme a necessidade. O material foi armazenado em caixas isotérmicas contendo gelo até a chegada ao laboratório, que ocorreu em até uma hora.

Amostras de sangue foram colhidas por punção venosa da coccígea com agulha 21G após antissepsia, em 3 frascos de 4,0 mL contendo EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) e 1 frasco de 10 mL sem anticoagulante e acondicionadas em caixa isotérmica contendo gelo até o encaminhamento ao laboratório. Amostras colhidas sem anticoagulante e uma colhida com EDTA foram centrifugados a 3000 rpm por 20 min, para obtenção de soro e de plasma, respectivamente, sendo alíquotados em frascos criogênicos tipo *ependorf*, armazenados a 20 graus negativos para análises posteriores. Uma amostra foi encaminhada para realização de hemograma e a outra foi processada para determinação de TBARS.

### 3.7 Análises do Leite

#### 3.7.1 Cultura e isolamento microbiano

Alíquotas de leite foram incubadas a 37 °C por 8 horas para pré-enriquecimento, e posteriormente semeadas em Ágar sangue de carneiro 5% e Ágar MacConkey, sendo em seguida incubadas a 37 °C por 24 a 48 horas. As leituras foram realizadas com 24 e 48 horas de incubação, com a descrição da macromorfologia das colônias observadas. As colônias foram submetidas a provas bioquímicas e de diferenciação bacteriana quando em crescimento no ágar MacConkey (CHI et al., 2001). A micromorfologia foi avaliada por meio de esfregaço em lâmina e coloração de Gram. A identificação microbiológica foi realizada com base nas características morfológicas, bioquímicas e tintoriais de acordo com Quinn et al. (1994).

#### 3.7.2 Composição e contagem de células somáticas

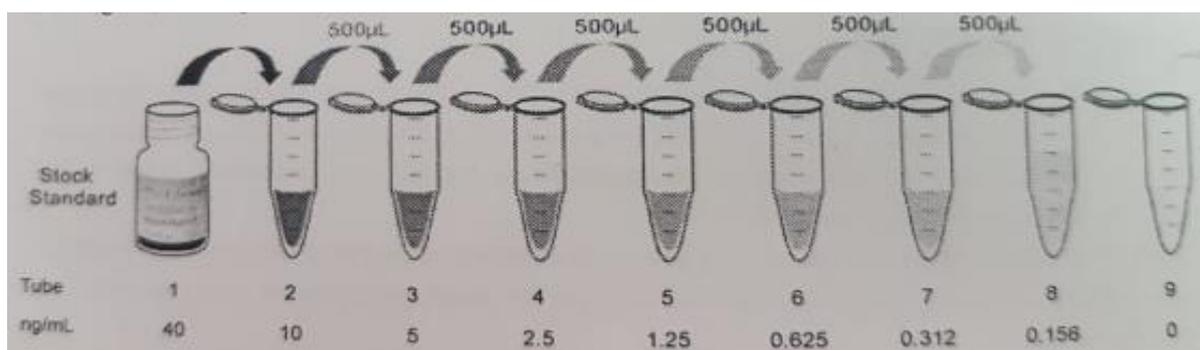
Alíquotas de 40 mL de leite foram acondicionadas em recipientes contendo o conservante bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanodiol na concentração de 8 mg do ingrediente ativo para cada 40 mL da amostra). Os frascos foram homogeneizados por inversão

por 10 vezes de forma suave e alocados em caixa de transporte específica, sendo, após 15 min, feita inversão da mesma por mais 10 vezes, para total diluição do conservante. Em seguida, as amostras foram encaminhadas por transportadora para o Laboratório da Rede Brasileira de Qualidade do Leite (Clínica do Leite, ESALQ/USP) para análises da composição (porcentagem de gordura, proteínas totais, lactose, sólidos totais e extrato seco desengordurado), por espectrofotometria no infravermelho, e CCS, por citometria de fluxo (células/mL), conforme descrito na legislação (BRASIL, 2018).

### 3.7.3 Dosagem de Amiloide A

Alíquotas de leite total foram congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  em frascos tipo falcon de 15 mL para posterior dosagem de Amiloide A no leite (MAA – *milk amyloid A*), através do Ensaio Imunoenzimático (ELISA) do tipo sanduíche, utilizando-se kit comercial para Amiloide A Sérico (SAA)<sup>2</sup>, seguindo recomendações do fabricante. O uso de kit para SAA em amostras de leite foi feito anteriormente por Gerardi et al. (2009) e a primeira descrição da técnica feita por McDonald et al. (1991).

Amostras foram diluídas em 1:50 (10  $\mu\text{L}$  da amostra em 490 mL de PBS), enquanto que o padrão foi reconstituído em solução específica, sendo feitas diluições seriadas a partir da solução estoque com concentração de 40 ng/mL (Figura 2), obtendo-se as seguintes concentrações de Amiloide A: 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156 e 0 ng/mL (branco).



**Figura 2:** Diluições seriadas da solução padrão do kit de ELISA para dosagem de Amiloide A em amostras de leite de vaca

Após o preparo das amostras e soluções-padrão, foram pipetados 100  $\mu\text{L}$  de cada amostra na placa, além das sete concentrações do padrão e do branco. A placa foi selada e incubada durante uma hora a  $37^{\circ}\text{C}$ . O líquido foi removido da placa, porém sem lavagem. Pipetou-se 100  $\mu\text{L}$  do Reagente A (anticorpo primário) em cada poço e novamente a placa foi selada e incubada a  $37^{\circ}\text{C}$  por uma hora. Em seguida, a solução foi aspirada e os poços foram lavados por três vezes com 350  $\mu\text{L}$  de solução de lavagem, deixando-se agir por 1-2 minutos. Após a última lavagem, toda solução foi removida por inversão da placa em papel absorvente. A próxima etapa consistiu na adição de 100  $\mu\text{L}$  do Reagente B (anticorpo secundário), seguida de incubação a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 min, após selar a placa. Após este processo foram feitas 5 lavagens, conforme já descrito, e adicionado 90  $\mu\text{L}$  de substrato em cada poço, incubando-se a  $37^{\circ}\text{C}$  por 10-20 min, protegendo-se a placa da luz com uma tampa plástica preta. Neste momento, a solução se tornou azulada. Então, 50  $\mu\text{L}$  de solução Stop foi acrescentada e o líquido ficou

<sup>2</sup> Cloud-Clone Corp. SEA885Bo for Serum Amyloid A (SAA)

amarelado. Após verificar a ausência de bolhas no líquido dos poços, foi feita leitura imediata de densidade óptica em leitor de ELISA a 450 nm<sup>3</sup>.

A partir dos resultados de densidade óptica, os valores obtidos das soluções-padrão foram submetidos ao software SigmaPlot®, para obtenção de curva padrão, em que a variável independente y foi representada pelas concentrações conhecidas e a variável dependente x correspondeu às absorvâncias. A partir da equação obtida, calculou-se as concentrações das amostras, multiplicando-se por 50, devido à diluição inicial.

### **3.8 Análises do Sangue**

#### **3.8.1 Hemograma**

Uma amostra de sangue colhida em tudo com EDTA foi enviada ao laboratório para realização de hemograma utilizando-se analisador automático<sup>4</sup> por impedância. Foram determinados a contagem de hemácias (células x 10<sup>6</sup>/μL), o volume globular (%), a dosagem de hemoglobina (g/dL), a leucometria (células x 10<sup>3</sup>/μL) e a contagem total de plaquetas (células/μL). A leucometria específica (contagem percentual de neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, monócitos e basófilos) foi avaliada em microscópio óptico em imersão com objetiva de 100x a partir de esfregaços do sangue total em superfície de lâminas coradas com coloração rápida (JAIN, 1993).

As determinações de Volume Corpuscular Médio (VCM – fL), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM - %) e Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) foram determinados pelo próprio aparelho considerando as contagens de hemácias, o hematócrito e a taxa de hemoglobina.

#### **3.8.2 Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

Amostras de sangue foram preparadas de acordo com Santos et al. (2014). Para obtenção do lisado de hemácias, procedeu-se à centrifugação de alíquotas<sup>5</sup> de 1,5 mL de sangue com EDTA em tubos tipo *ependorf*, por 10 minutos a 1000g sob temperatura de 4°C. Após descarte do sobrenadante (plasma e leucócitos), acrescentou-se solução de PBS correspondente ao dobro do volume do sedimento de hemácias, sendo feita inversão cuidadosa e nova centrifugação a 1000g por 3 minutos a 4°C, repetindo-se o procedimento por duas vezes consecutivas. A seguir, 100 μL do lavado de hemácias foi adicionado a 1900 μL de água ultrapura (Milli-Q) e armazenado em tubos criogênicos de 2,0 mL, os quais foram congelados.

A concentração de hemoglobina (em g/dL) utilizada como fator de referência para estimar as atividades enzimáticas de antioxidantes eritrocitários, foi determinada por espectrofotometria<sup>6</sup>, utilizando-se kit comercial<sup>7</sup> segundo a recomendação do fabricante. Para a determinação de TBARS utilizou-se o lisado de hemácias na proporção de 1:20. Desta solução, 1 mL foi pipetado em tubos plásticos de fundo cônico estéreis com capacidade de 15 mL acrescido de 1,0 mL de ácido sulfossalicílico a 3%. A mistura foi agitada em vórtex por 10 segundos, centrifugada a 1000g por 3 minutos e deixada em repouso por 15 minutos. Transcorrido o tempo, 500 μL do sobrenadante foram pipetados para tubos de ensaio e acrescidos 500 μL de solução de TBA 0,67%. Em seguida os tubos de ensaio foram agitados por 10 segundos em vórtex e incubados em banho-maria a 80°C por 30 minutos. Para a leitura

<sup>3</sup> Thermo Scientific – Multiskan GO

<sup>4</sup> Bc2800 Vet Mindray®

<sup>5</sup> SpinLab SL-5GR ®

<sup>6</sup> Biospectro

<sup>7</sup> Hemoglobina K023 Bioclin

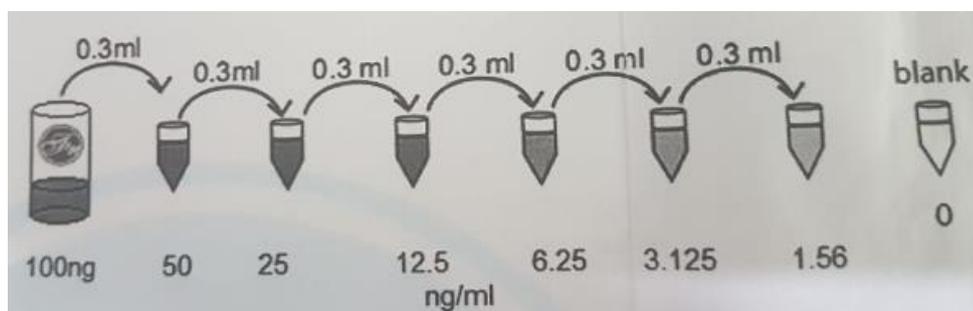
utilizou-se como padrão 500 µL água bidestilada deionizada, acrescida de 500 µL de solução de TBA a 0,67%.

Para mensurar a concentração de TBARS utilizou-se a seguinte equação:  $TBARS = ((D/0,149) \times 4) / Hb \times 1000$  (miliMol/g Hb), onde D corresponde ao valor da absorbância da amostra, 0,149 ao coeficiente de extinção do TBA (µMol) em 535nm, 4 à diluição do hemolisado (1:20), Hb à concentração de hemoglobina no hemolisado (g/dL) e 1000 ao fator de conversão de µMol (proveniente do coeficiente de extinção) para miliMol.

### 3.8.3 Proteínas totais e haptoglobina sérica (Hp)

Alíquotas de soro foram utilizadas para determinação de proteínas totais pelo método do biureto, através de kit comercial<sup>8</sup>. Foram pipetados em tubos de ensaio previamente identificados 50 µL da amostra ou padrão e 2,5 mL da solução de biureto, além do branco que consistiu somente desta última solução. Foi feita homogeneização e repouso por 10 min. A absorbância foi determinada a 545 nm, acertando o zero com o branco. O cálculo de proteínas totais em g/dL foi feito pela expressão:  $PT = Absorbância\ da\ amostra / Absorbância\ do\ padrão \times 4$  (concentração do padrão).

A dosagem de haptoglobina sérica se deu através da utilização do método ELISA-competitivo, utilizando-se kit comercial<sup>9</sup>. As amostras de soro foram diluídas na proporção 1:2 em solução de trabalho HRP-Hp, conforme orientação do fabricante, pois esperava-se baixa concentração de Hp nas amostras. As soluções-padrão também foram diluídas na solução de trabalho, conforme a Figura 3.



**Figura 3:** Diluições das soluções-padrão para análise de haptoglobina sérica bovina

Após realização de duas lavagens na placa de ELISA, foram pipetados 100 µL de soluções-padrão, amostras e branco em cada poço, a seguir foi feita incubação a 37° C por 45 minutos. Procedeu-se a cinco lavagens da placa com a solução de lavagem, em cada uma deixando-se agir por 1-2 minutos. Foram adicionados 90 µL do substrato, deixando-se a placa em câmara escura incubada a 37° C por 15-20 min. A solução *Stop* foi pipetada, sendo 50 µL em cada poço, e as densidades ópticas foram determinadas imediatamente a 450 nm<sup>10</sup>.

As absorbâncias das soluções-padrão foram utilizadas para determinação de curva padrão, através do software SigmaPlot®, onde a variável independente y foi representada pelas concentrações conhecidas e a variável dependente x correspondeu às absorbâncias. A partir da equação obtida, calculou-se as concentrações das amostras, multiplicando-se o valor pela diluição inicial.

<sup>8</sup> Proteínas totais monoreagente K031 Bioclin

<sup>9</sup> Fine Test Bovine HP ELISA kit EB0011

<sup>10</sup> Thermo Scientific – Multiskan GO

### 3.9 Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento foi inteiramente casualizado com arranjo em parcelas subdivididas, sendo cada quarto mamário uma unidade experimental, três tratamentos e as parcelas os momentos de coleta e avaliações (A1, D0, D14, D30 e D60).

A análise estatística foi efetuada utilizando-se os programas *Prism 5.0* (*GraphPad Prism*, California, EUA) e *SigmaPlot*®, empregando-se os testes de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade dos dados. Os dados referentes à CCS sofreram transformação logarítmica (log base 10) para atingir normalidade.

Para todas as variáveis foram determinados as médias e o desvio padrão. A avaliação entre os tratamentos nos diferentes tempos foi realizada por análise de variância para medidas repetidas e as médias foram comparadas utilizando-se os testes Tukey ou Holm-Sidak, a um nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Índices de Mastite e Teste do Antibiótico de Vaca Seca

No Quadro 4 encontram-se os resultados do CMT dos animais selecionados ao final de lactação e distribuição nos grupos experimentais. Pode-se verificar que haviam quartos mamários positivos e fortemente positivos nos três grupos.

**Quadro 4:** Escores ao *California Mastitis Test* de quartos mamários de nove vacas, pertencentes ao plantel da Fazenda Boa Liga (Barra do Piraí-RJ), submetidas e grupos experimentais segundo o tratamento intramamário a que foram submetidos: antibiótico (ATB), Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e PRP + ATB.

| Animal | Tratamento | Quartos mamários |     |     |     |
|--------|------------|------------------|-----|-----|-----|
|        |            | AE               | AD  | PE  | PD  |
| 1      | ATB        | ++               | +++ | ++  | ++  |
| 2      | ATB        | ++               | ++  | ++  | ++  |
| 3      | ATB        | +                | +++ | +   | +   |
| 4      | PRP        | +                | +   | ++  | ++  |
| 5      | PRP        | +++              | +++ | +++ | +++ |
| 6      | PRP        | ++               | +   | +   | +   |
| 7      | PRP+ATB    | +++              | +++ | +++ | +++ |
| 8      | PRP+ATB    | +                | +   | +   | +   |
| 9      | PRP+ATB    | ++               | ++  | +   | -   |

AE = Anterior esquerdo; AD = Anterior direito; PE = Posterior esquerdo; PD = Posterior direito

A porcentagem de vacas reagentes ao CMT no plantel foi de 63,85% (n=83; 53 reagentes), sendo afetados 38,85% dos quartos mamários (n=332 quartos; 129 reagentes), sendo 2,71 (n=9) acometidos por MC.

Em relação aos escores do CMT, 10,84% (n=36) dos quartos mamários apresentaram reação fraca positiva (+), 12,04% (n=40) reação positiva (++) e 13,25% (n=44) fortemente positiva (+++). Considerando os nove casos de MC (2,71%), o índice foi baixo quando comparado aos relatados por Bueno et al. (2002) na região de Pirassununga – SP (7,46%) e Martins et al. (2010) no estado do Mato Grosso (5,8%) e maior que o encontrado por Ribeiro et al. (2006) no sul do Rio Grande do Sul (1,2%) e por Oliveira et al. (2011) no Pará (1,3%).

Quanto à de MSC, Oliveira et al. (2011) diagnosticaram menor porcentagem de quartos positivos (6,6%), enquanto que índices superiores foram descritos por Bueno et al. (2002) na região de Pirassununga – SP (63,68%) e Martins et al. (2010) no Mato Grosso (65%), ao passo que Martins et al. (2006), ao analisarem a prevalência de mastite subclínica no rebanho de uma queijaria em Nossa Senhora do Livramento, MT, verificaram a presença da enfermidade em 74,2% dos animais analisados e um percentual de 44,3% de quartos mamários afetados pela forma subclínica, semelhante ao presente estudo.

Ribeiro et al. (2006) citaram que o correto controle de mastite deve atingir níveis de ocorrência inferiores a 1% do rebanho para a sua forma clínica e inferiores a 15% para as manifestações subclínicas. Portanto, a prevalência de mastite observada neste estudo está além dos índices considerados toleráveis para essa enfermidade e acima do verificado em outras regiões do Brasil.

Nesse contexto, é bem evidenciado que a alta prevalência da mastite está associada às más condições de higiene durante e após a ordenha (SANTOS; FONSECA, 2007; FERREIRA

et al., 2007; ZAFALON et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009; MOTA et al, 2012; CHAGAS et al., 2012; CUNHA et al., 2015). No conjunto, o manejo de ordenha e as medidas de higiene adotadas na propriedade eram satisfatórios, o que contribuiu para o pequeno número de casos clínicos.

O antibiótico para vacas secas utilizado na propriedade mostrou-se satisfatório em teste de sensibilidade *in vitro* realizado em amostras de vacas com MC e MSC, colhidas aleatoriamente. De 14 amostras coletadas, cinco foram provenientes de animais com histórico de MC que haviam sido tratadas anteriormente ou estavam em tratamento, o que justifica o fato de não terem sido isolados agentes bacterianos nestas amostras. Cinco amostras foram positivas à cultura, sendo os micro-organismos isolados: *Enterococcus faecalis*, *Corynebacterium* sp., *Streptococcus*  $\alpha$ -hemolítico e *Enterobacter aerogenes* e todos foram sensíveis a pelo menos um princípio ativo do produto utilizado. Amostras colhidas dos dois tanques de refrigeração, resultado da mistura do leite de todas as vacas em lactação do rebanho, foram analisadas como um indicador do conjunto dos agentes e sensibilidades apresentadas pelos micro-organismos prevalentes na propriedade, uma apresentou crescimento de ECN, também sensível aos princípios ativos contidos no produto utilizado nas vacas secas, e uma foi negativa.

#### 4.2 Obtenção do PRP e Teste de Esterilidade

Em relação à obtenção do PRP, o método manual descrito por Marques et al. (2014), com duas centrifugações de 10 min (400 e 800G), foi eficiente para concentração de plaquetas com resultados bastante semelhantes aos obtidos pelos autores.

Na Tabela 1, pode-se comparar a concentração plaquetária no PRP em relação ao sangue total. A média de plaquetas no sangue foi de  $290 \pm 40 \times 1000/\text{mL}$ , enquanto que no PRP a média foi  $2.477 \pm 500 \times 1000/\text{mL}$ , o que representa um valor aproximadamente 10 vezes maior no PRP que no sangue, uma condição importante para que o plasma concentrado possa ser considerado rico em plaquetas.

**Tabela 1:** Contagem de plaquetas ( $\times 1000/\text{mL}$ ) do sangue e Plasma Rico em Plaquetas (PRP) de seis vacas pertencentes ao plantel da Fazenda Boa Liga (Barra do Piraí-RJ).

| Animal                              | Plaquetas<br>( $\times 1000/\text{mL}$ ) |      | Porcentagem em relação ao<br>sangue |
|-------------------------------------|--|------|-------------------------------------|
|                                     | Sangue                                   | PRP  |                                     |
| 1                                   | 336                                      | 3290 | 979                                 |
| 2                                   | 368                                      | 2650 | 720                                 |
| 3                                   | 255                                      | 2870 | 1125                                |
| 4                                   | 347                                      | 2090 | 602                                 |
| 5                                   | 355                                      | 2510 | 707                                 |
| 6                                   | 330                                      | 3430 | 1039                                |
| Valores de referência (Smith, 2006) |  |      | 90 a 235                            |

De acordo com Marx (2004), para que o PRP seja considerado terapêutico é necessário um ganho em concentração de 300-400% em relação ao sangue. Este protocolo foi mais eficiente para a concentração de plaquetas bovinas do que o método de dupla centrifugação utilizado por López; Giraldo e Carmona (2012) e o resultado foi bastante semelhante ao obtido por Lange-Consiglio et al. (2015) também em bovinos. Em outras espécies, os resultados são variáveis, já que o tamanho e o peso das plaquetas, hemácias e leucócitos determinam o

protocolo mais efetivo para concentrar plaquetas em cada espécie (LÓPEZ; GIRALDO; CARMONA, 2012), sendo observadas menores concentrações plaquetárias em protocolos descritos para equinos (CARMONA et al., 2007; MAIA et al., 2009) e humanos (VENDRAMIN et al., 2006; 2009).

De todas as amostras de PRP obteve-se resultado negativo no cultivo microbiológico, confirmando as boas práticas na manipulação em laboratório que conservaram sua esterilidade, bem como a adequação do método para fins de utilização do PRP.

### 4.3 Amostras de Leite

#### 4.3.1 Contagem de células somáticas e composição

No dia do parto, dois animais do grupo tratado com PRP (T2) apresentaram cortes em um dos tetos, que resultaram em inflamação e risco de infecção da glândula mamária, sendo instituída antibioticoterapia intramamária. Por este motivo, estes quartos mamários foram retirados das análises, ficando os grupos com as seguintes unidades experimentais: T1 n=12, T2 n=10 e T3 n=12. Na média, a CCS das amostras de leite colhidas no dia secagem (A1) foi elevada em todos os grupos, sem diferença significativa entre os tratamentos ( $p>0,05$ ), conforme descrito na Tabela 2.

**Tabela 2:** Médias das contagens de células somáticas em ( $\times 1000$ ) de quartos mamários de 9 vacas, pertencentes ao plantel da Fazenda Boa Liga (Barra do Pirai-RJ), submetidas a três tratamentos na secagem (Antibiótico (ATB); Plasma Rico em Plaquetas (PRP); PRP + ATB).

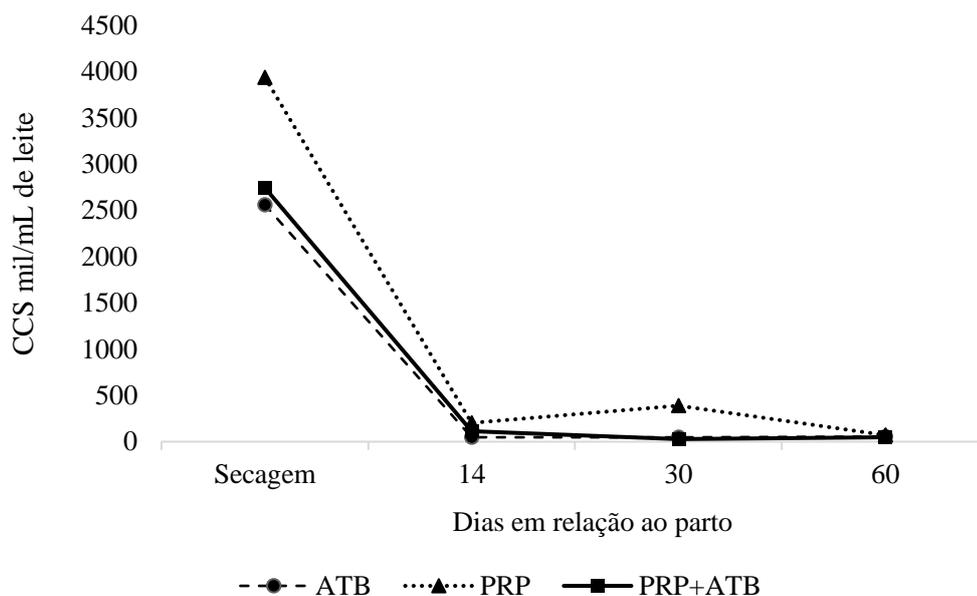
| Dia de coleta  | Tratamentos        |                    |                    |
|----------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                | ATB (n=12)         | PRP (n=10)         | ATB+PRP (n=12)     |
| <b>Secagem</b> | 2562 <sup>Aa</sup> | 3940 <sup>Aa</sup> | 2745 <sup>Aa</sup> |
| <b>14</b>      | 49 <sup>Ab</sup>   | 204 <sup>Ab</sup>  | 114 <sup>Ab</sup>  |
| <b>30</b>      | 47 <sup>Ab</sup>   | 389 <sup>Bb</sup>  | 28 <sup>Ab</sup>   |
| <b>60</b>      | 53 <sup>Ab</sup>   | 71 <sup>Ab</sup>   | 49 <sup>Ab</sup>   |

Médias seguidas de letras diferentes (maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas), diferem estatisticamente a um nível de confiança de 95% ( $p\leq 0,05$ )

Após o parto, a maior média de CCS foi verificada no D30, no grupo tratado com PRP, quando houve diferença em relação ao T1. A CCS menor que 100 mil células/mL de leite no T1 em todos os momentos é condizente com a reação negativa ao CMT e ausência de mastite subclínica nos animais deste grupo. No T2, a alta CCS indica reação inflamatória da glândula e MSC no D30 e remissão do processo no D60, apresentando CCS menor que 100.000 céls/mL.

O aumento da celularidade do leite na presença de agentes patogênicos ocorre devido à migração de leucócitos do sangue para o lúmen alveolar e está relacionado à patogenicidade do agente envolvido (SOUZA et al., 2009). Além da mastite, outros fatores, principalmente a fase da lactação, influenciam a CCS do leite. Desta forma, ao final da lactação era esperada uma alta CCS.

Nos três tratamentos, houve queda significativa da CCS pós-parto (Figura 4). Alta celularidade no periparto pode ser benéfica, pois, durante a colostrogênese, a suscetibilidade da glândula mamária a infecções aumenta à medida que o canal da teta começa a abrir e libera secreção mamária (OLIVER; SORDILLO, 1988), além de cessar o efeito protetor do antibiótico de vaca seca (OLIVER et al. 1990).



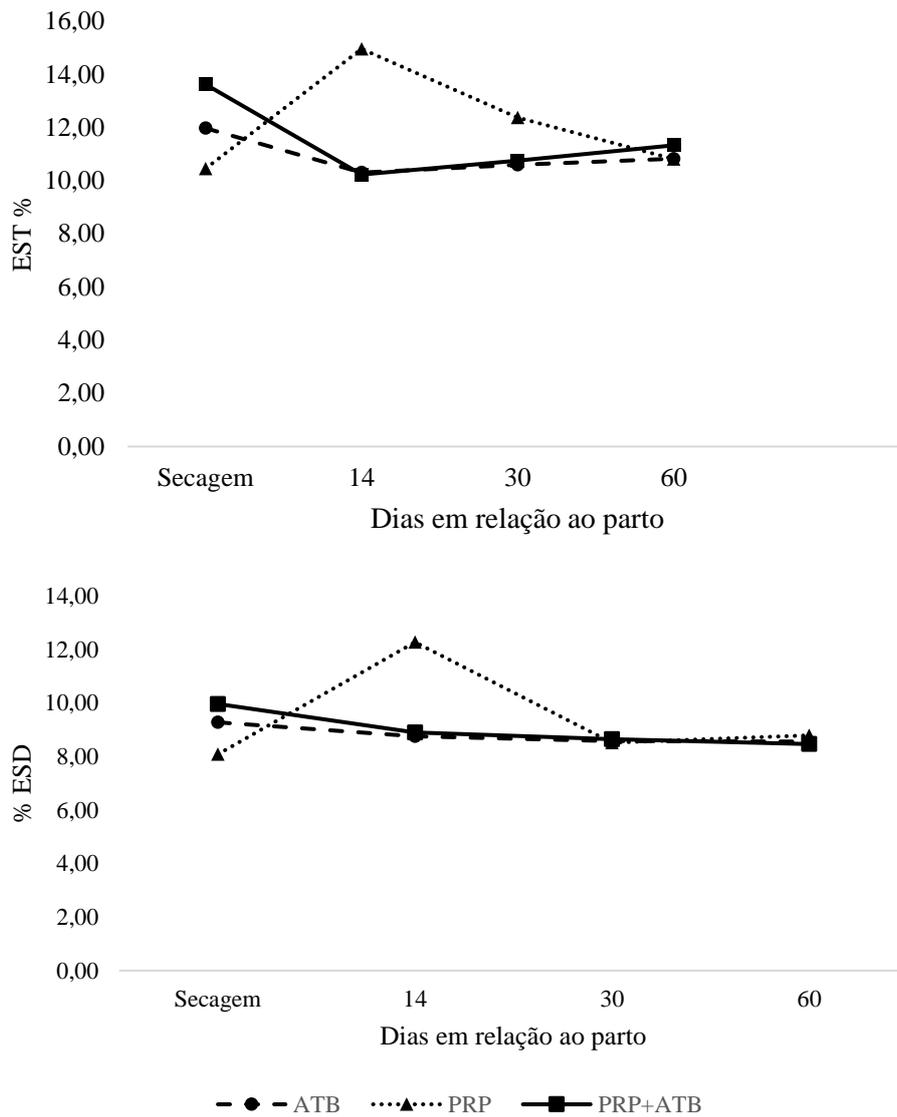
**Figura 4:** Médias de contagem de células somáticas (CCS) do leite de quartos mamários de nove vacas submetidas aos tratamentos com antibiótico (T1, n=12), plasma rico em plaqueta (T2, n=10) e antibiótico e plasma rico em plaquetas (T3, n=10), com diferença no D30 no tratamento 2 ( $p \leq 0,05$ )

Em relação à composição, houve diferença entre os tratamentos nas amostras de leite colhidas antes da secagem. O grupo T2 apresentou menores teores de gordura e os três grupos diferiram em relação ao EST, ESD e proteínas. Não houve diferença entre os tratamentos e dias de coleta em relação aos teores de lactose (Figuras 5, 6, 7 e 8).

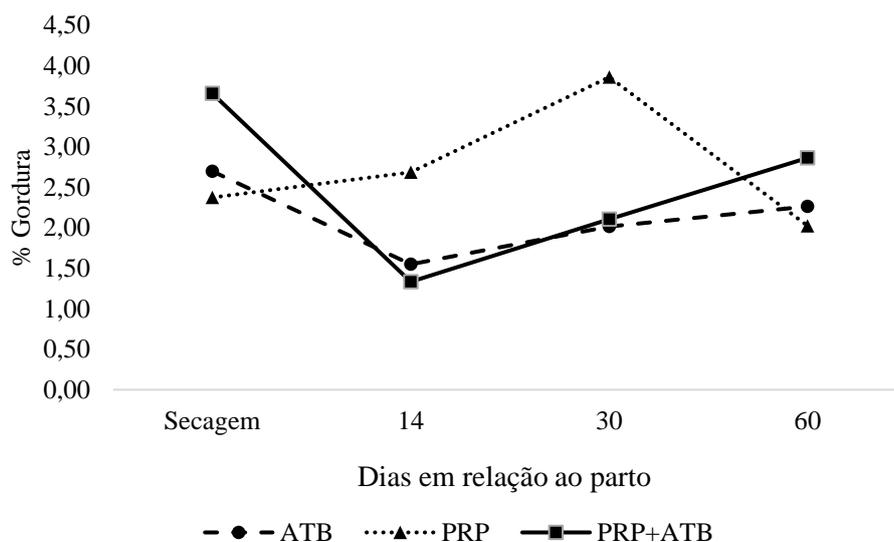
O leite de vaca possui em média 3,5% de proteínas, 3,8% de gordura, 5,0% de lactose, 0,7% de minerais (cinzas) e 87% de água. Os sólidos não gordurosos, que compreendem todos os elementos do leite menos a água e a gordura, representam, em média, 8,9% do total no leite (RAPACCI, 2000).

Infecções subclínicas crônicas, com maiores contagens de macrófagos, podem estar relacionadas a menores teores de gordura no leite, como evidenciados no T2 antes do parto. Azzara e Dimick (1985), estudando a atividade lipolítica de leucócitos presentes na glândula mamária, demonstraram que os macrófagos isolados apresentavam secreção de enzimas lipolíticas, enquanto neutrófilos e linfócitos não apresentavam esta característica. Porém, cabe ressaltar, que as coletas foram realizadas no início da ordenha, momento em que os teores de gordura são inferiores quando comparados ao leite total ou final da ordenha (SWENSON, 1996).

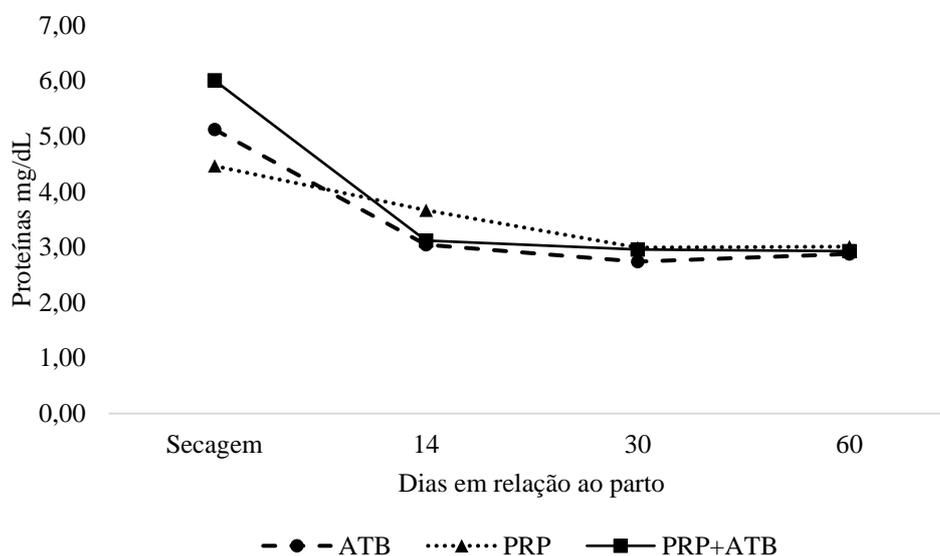
De acordo com Pyörälä (2003), a concentração de lactose no leite poderia ser utilizada como um indicador de mastite, já que claramente decresce durante a inflamação. Esta informação corrobora com as médias de CCS mais altas no tratamento 2, pois, apesar de não ter havido diferença significativa, a porcentagem do açúcar esteve um pouco abaixo no tratamento 2 nos dias 14 e 30, apresentando aumento no D60.



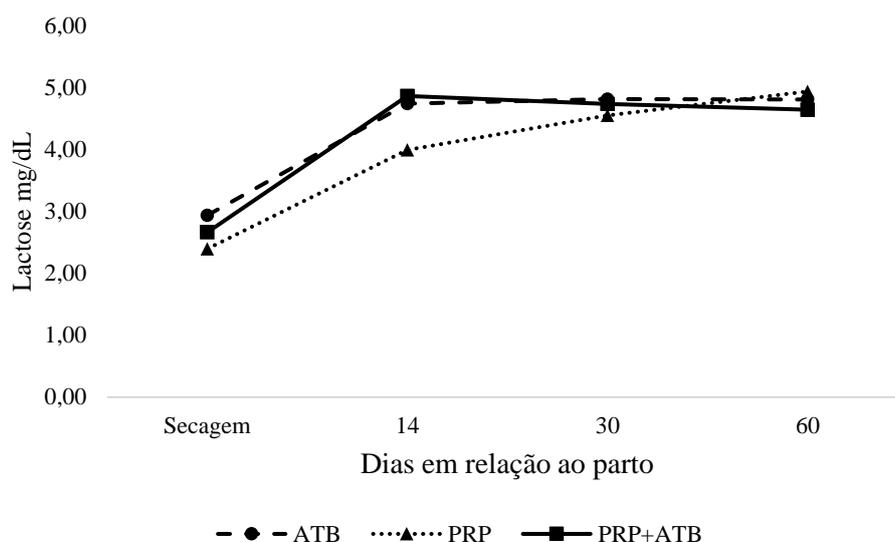
**Figura 5:** Médias Extrato seco total (EST %) e extrato seco desengordurado (ESD %) do leite de quartos mamários de 9 vacas submetidas a três tratamentos na secagem (Tratamento 1 = Antibiótico (ATB, n=12); Tratamento 2 = Plasma Rico em Plaquetas (PRP, n=10); Tratamento 3 = PRP + ATB(n=12)). *Diferença nos três tratamentos na secagem e T2 apresentou maior EST em D30 ( $p \leq 0,05$ )*



**Figura 6:** Médias de gordura % do leite de cada quarto mamário de 9 vacas submetidas a três tratamentos na secagem (Tratamento 1 = Antibiótico (ATB, n=12); Tratamento 2 = Plasma Rico em Plaquetas (PRP, n=10); Tratamento 3 = PRP + ATB(n=12)). *O tratamento 2 apresentou menores teores de gordura que antes do parto e maiores em D14 e D30 ( $p \leq 0,05$ )*



**Figura 7:** Médias de proteínas do leite (mg/dL) dos quartos mamários de 9 vacas submetidas a três tratamentos na secagem (Tratamento 1 = Antibiótico (ATB, n=12); Tratamento 2 = Plasma Rico em Plaquetas (PRP, n=10); Tratamento 3 = PRP + ATB(n=12)). *Os três grupos diferiram na secagem ( $p \leq 0,05$ )*



**Figura 8:** Médias de lactose do leite (mg/dL) de quartos mamários de 9 vacas submetidas a três tratamentos na secagem (Tratamento 1 = Antibiótico (ATB, n=12); Tratamento 2 = Plasma Rico em Plaquetas (PRP, n=10); Tratamento 3 = PRP + ATB(n=12)). Não houve diferença entre os tratamentos em nenhum momento de coleta ( $p>0,05$ )

#### 4.3.2 Cultura microbiológica

Na Tabela 3, encontra-se o número de quartos mamários positivos à cultura microbiológica. Observa-se que os tratamentos em que houve administração do PRP (T2 e T3) apresentaram mais quartos mamários com cultura negativa em D60, enquanto que no T1 os resultados foram semelhantes ao momento da secagem. Apesar de este dado não poder ser utilizado isoladamente, devido à possibilidade de ocorrência de resultados falso-positivos e falso-negativos (VOLTOLINI et al., 2001), pode sugerir uma maior eficiência na defesa da glândula mamária nos quartos que receberam o PRP.

**Tabela 3:** Resultado qualitativo da cultura microbiológica do leite por quarto mamário de 9 vacas, pertencentes ao plantel da Fazenda Boa Liga (Barra do Pirai-RJ), submetidas a três tratamentos na secagem (Tratamento 1 = Antibiótico (ATB); Tratamento 2 = Plasma Rico em Plaquetas (PRP); Tratamento 3 = PRP + ATB)

|            | Negativo |    |    | Positivo |    |    |
|------------|----------|----|----|----------|----|----|
|            | T1       | T2 | T3 | T1       | T2 | T3 |
| <b>A1</b>  | 7        | 2  | 4  | 5        | 8  | 8  |
| <b>D0</b>  | 8        | 0  | 5  | 4        | 10 | 7  |
| <b>D14</b> | 11       | 3  | 3  | 1        | 7  | 9  |
| <b>D30</b> | 4        | 5  | 7  | 8        | 5  | 5  |
| <b>D60</b> | 9        | 9  | 11 | 3        | 1  | 1  |

A1= antes da secagem; D0= dia do parto; D14,30 e 60= dias após o parto

Nas amostras colhidas antes da secagem, *Staphylococcus* não *aureus* foi o micro-organismo mais isolado, seguido de *Streptococcus spp.* Após o parto, independente do tratamento, houve predominância de *Staphylococcus* não *aureus* e *Corynebacterium spp* (Tabela 4). Porém destaca-se que o T2 no D0 apresentou alta porcentagem de isolamento de *Streptococcus agalatie*, micro-organismo contagioso (LANGONI et al., 2017).

Segundo Pyörälä (2008), bactérias ambientais são mais problemáticas em torno do parto, sendo os coliformes capazes de causar infecções intramamárias severas em vacas multíparas, porém, no presente estudo, na maior parte das amostras foram isolados micro-organismos classificados como contagiosos cuja infecção caracteriza-se por grande número de infecções subclínicas, com episódios esporádicos de mastite clínica.

De acordo com Langoni et al. (2017) deve-se atentar às infecções causadas por ECN, porque, apesar de serem considerados patógenos secundários, de menor patogenicidade, têm sido frequentemente isolados em infecções intramamárias, sendo responsáveis por aumento de CCS, diminuição da produção de leite e produção de enterotoxinas, alertando quanto ao potencial prejuízo desses micro-organismos em saúde pública.

Gillespie et al. (2009) afirmaram que *Staphylococcus* não *aureus* estão envolvidos em 10 a 20% dos casos de mastites, com maior frequência no início da lactação, diferindo do que foi observado no presente estudo.

Um dado a ser ressaltado é que 26,1 % das amostras com isolamento negativo apresentaram CMT positivo, assim como 44,5% de amostras com isolamento positivo tiveram resultado negativo no CMT, mais uma vez ressaltando que o CMT não pode ser usado isoladamente para controle da enfermidade. Um grande problema na propriedade em estudo é a não utilização de linha de ordenha. Os animais são alocados em três lotes de acordo com a produção e vacas cujo leite vão para descarte entram a qualquer momento durante a ordenha, sendo ordenhadas em máquina específica para tal. No entanto, vacas primíparas, recém-paridas que estão na fase colostrar podem ser ordenhadas com a mesma ordenhadeira que foi utilizada em uma vaca em tratamento. Este manejo favorece a contaminação e o desenvolvimento de mastite, sobretudo por agentes contagiosos.

Estudos epidemiológicos sobre a etiologia da mastite bovina revelam que os agentes contagiosos são mais prevalentes, destacando-se os do gênero *Staphylococcus* por possuir maior frequência em casos clínicos e subclínicos, sendo *S. aureus* a espécie de maior relevância (MEDEIROS; SOUZA, 2009; OLIVEIRA et al., 2010; MOTA et al., 2012; CHAGAS et al., 2012; VIEIRA et al., 2013). Porém, os isolados no presente experimento (*Staphylococcus* não *aureus* e *Corynebacterium spp.*) são considerados micro-organismos secundários e tem despertado bastante a atenção como causadores de mastite na atualidade. Krewer et al. (2013), Mira et al., (2013), Mota et al. (2012) e Martins et al. (2010) ressaltaram a alta prevalência de infecções intramamárias por *Corynebacterium spp.*, corroborando como os dados obtidos no presente estudo.

Em relação à ocorrência de mastite clínica durante a lactação, além dos dois animais que apresentaram cortes no teto logo após o parto, como já dito anteriormente, foi relatada a necessidade de antibioticoterapia em apenas um quarto mamário de um animal do tratamento 3, já no final da lactação. Este dado reforça que os animais tratados com PRP, assim como aqueles tratados com antibiótico de vaca seca somente ou com PRP, não apresentaram MC durante a lactação, demonstrando a eficácia dos tratamentos.

**Tabela 4:** Resultado quantitativo da cultura microbiológica do leite por quarto mamário de 9 vacas, pertencentes ao plantel da Fazenda Boa Liga (Barra do Pirai-RJ), submetidas a três tratamentos na secagem (Tratamento 1 = Antibiótico (ATB); Tratamento 2 = Plasma Rico em Plaquetas (PRP); Tratamento 3 = PRP + ATB)

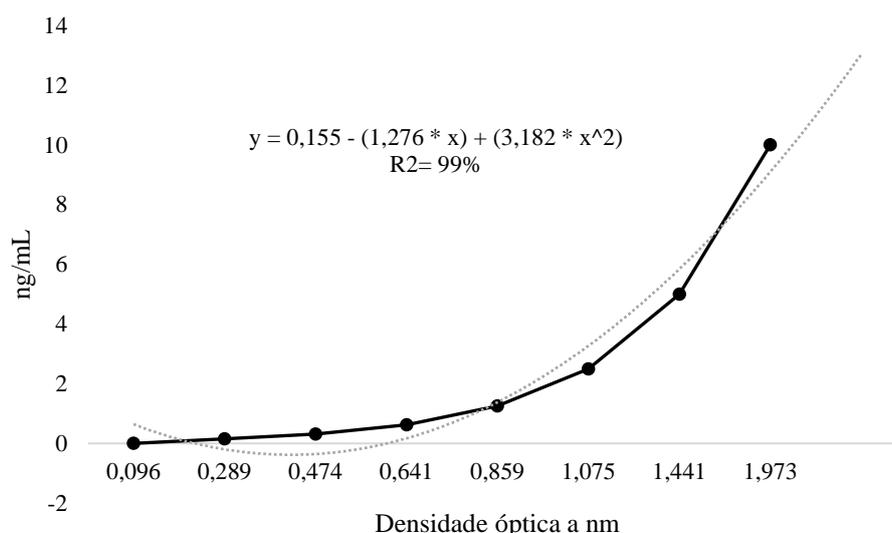
| Isolamento                       | Tratamento | A1 | D0 | D14 | D30 | D60 |
|----------------------------------|------------|----|----|-----|-----|-----|
| <i>Staphylococcus não aureus</i> | ATB        | 3  | 1  | 1   | 3   | 2   |
|                                  | PRP        | 9  | 1  | 3   | 0   | 1   |
|                                  | PRP+ATB    | 8  | 5  | 5   | 3   | 0   |
| <i>Corynebacterium spp.</i>      | ATB        | 0  | 0  | 1   | 3   | 1   |
|                                  | PRP        | 0  | 4  | 2   | 5   | 0   |
|                                  | PRP+ATB    | 0  | 1  | 2   | 3   | 0   |
| <i>Streptococcus spp.</i>        | ATB        | 2  | 0  | 0   | 0   | 0   |
|                                  | PRP        | 4  | 0  | 0   | 0   | 0   |
|                                  | PRP+ATB    | 0  | 1  | 0   | 0   | 0   |
| <i>Staphylococcus aureus</i>     | ATB        | 0  | 0  | 0   | 1   | 0   |
|                                  | PRP        | 0  | 2  | 2   | 1   | 1   |
|                                  | PRP+ATB    | 1  | 0  | 0   | 0   | 0   |
| <i>Streptococcus agalactiae</i>  | ATB        | 0  | 0  | 0   | 0   | 0   |
|                                  | PRP        | 0  | 6  | 3   | 1   | 1   |
|                                  | PRP+ATB    | 1  | 0  | 1   | 1   | 0   |
| Outros                           | ATB        | 1  | 3  | 0   | 1   | 1   |
|                                  | PRP        | 1  | 1  | 2   | 4   | 0   |
|                                  | PRP+ATB    | 1  | 1  | 5   | 1   | 1   |
| Negativo                         | ATB        | 7  | 8  | 11  | 4   | 9   |
|                                  | PRP        | 2  | 0  | 3   | 5   | 9   |
|                                  | PRP+ATB    | 4  | 5  | 3   | 7   | 11  |

A1= antes da secagem; D0= dia do parto; D14,30 e 60= dias após o parto

OBS: Há amostras com mais de um agente isolado.

### 4.3.3 Amiloide A

A curva padrão obtida através das leituras das concentrações das soluções-padrão pode ser vista na Figura 9 e as médias calculadas nos diferentes dias de coleta dos três tratamentos estão descritos na Tabela 5. Não houve diferença entre os tratamentos em nenhum dia de coleta ( $p > 0,05$ ). Houve diferença nos momentos de coletas ( $p < 0,05$ ), onde amostras colhidas antes da secagem apresentaram médias mais elevadas, como era esperado, apresentando diferença de D14.



**Figura 9:** Curva padrão obtida através das densidades ópticas das soluções-padrão para dosagem de Amiloide A (Cloud-Clone Corp. SEA885Bo for Serum Amyloid A)

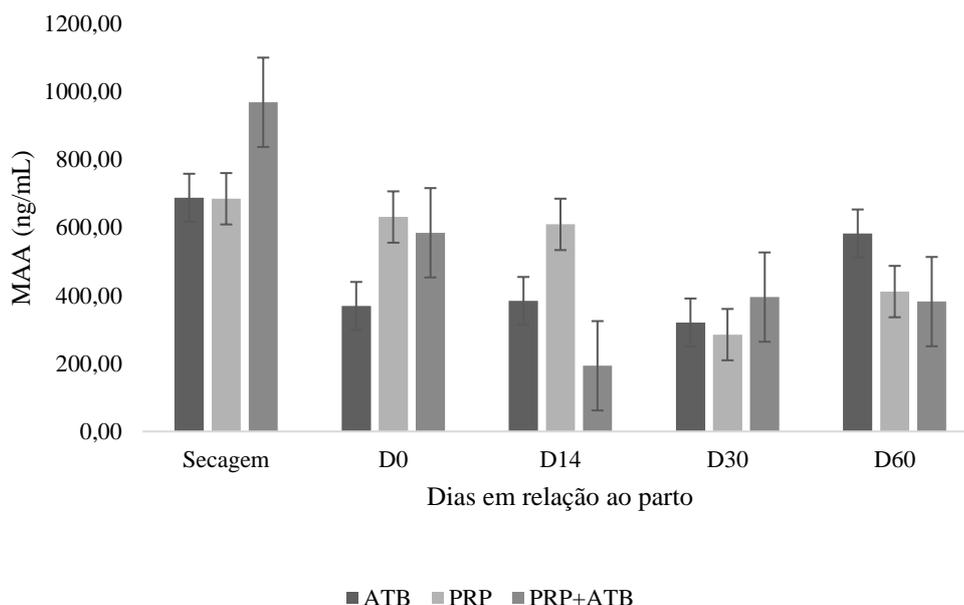
**Tabela 5:** Médias e desvio padrão de Amiloide A no leite de quartos mamários de 9 vacas pertencentes ao plantel da Fazenda Boa Liga (Barra do Piraí-RJ), submetidas a três tratamentos na secagem (Tratamento 1 = Antibiótico (ATB); Tratamento 2 = Plasma Rico em Plaquetas (PRP); Tratamento 3 = PRP + ATB).

| Dia de coleta                       | Tratamentos  |             |                |
|-------------------------------------|--------------|-------------|----------------|
|                                     | ATB (n=12)   | PRP (n=10)  | PRP+ATB (n=12) |
| <b>Antes da secagem<sup>A</sup></b> | 687,80±8,23  | 684,87±8,23 | 968,77±8,23    |
| <b>0<sup>AB</sup></b>               | 369,45±8,23  | 631,11±8,23 | 584,82±8,23    |
| <b>14<sup>B</sup></b>               | 384,12±8,23  | 609,50±8,23 | 193,46±8,23    |
| <b>30<sup>AB</sup></b>              | 320,70±8,23  | 285,10±8,23 | 395,53±8,23    |
| <b>60<sup>AB</sup></b>              | 582,74±12,33 | 411,77±9,27 | 382,24±9,27    |

Médias seguidas de letras distintas diferem estatisticamente a um nível de confiança de 95% ( $p \leq 0,05$ )

Hussein et al. (2018) mostraram uma forte correlação entre CCS e MAA, em grupos com diferentes graus de CCS, e uma proporção direta com a cultura microbiológica. O presente trabalho apresentou correlação fraca positiva com CCS (0,280), corroborando com o fato de o amiloide A aumentar nos casos de aumento de CCS.

As concentrações de Amiloide A em todos os tempos e tratamentos foram inferiores aos descritos por Evkuran Dal et al. (2019) em vacas com mastite subclínica. As concentrações após o parto são condizentes com o esperado para animais sem sinais de infecção intramamária (Figura 10).



**Figura 10:** Médias e desvio padrão de Amiloide A dosado do leite (MAA) de quartos mamários de 9 vacas submetidas a três tratamentos na secagem (Antibiótico (ATB); Plasma Rico em Plaquetas (PRP); PRP + ATB)

#### 4.4 Análises Sanguíneas

##### 4.4.1 Hemograma série vermelha

Nas Tabelas 6 e 7 estão representados os valores médios dos constituintes da série vermelha do hemograma (hemácias, hematócrito e hemoglobina), bem como dos índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM). Observa-se que em todos os momentos e tratamentos os constituintes do eritrograma mantiveram-se dentro do intervalo de referência para a espécie (SMITH, 2006), com pequenas variações entre os grupos.

O teor de hemoglobina está, assim como o valor do hematócrito, em estreita associação com o número de eritrócitos. Como foram normais a hematimetria, o VG e a concentração de hemoglobina, os índices eritrocitários ou hematimétricos que permitem estimar a medida dos eritrócitos do sangue e da concentração de hemoglobina nos eritrócitos, foram também normais em todos os momentos, indicando inexistência de anemia (Tabela 6).

Alterações nos parâmetros hematimétricos (VCM e CHCM) observadas foram sutis e sem relevância, condizentes com a condição clínica dos animais, que não apresentaram sinais de enfermidades infecciosas, parasitárias ou metabólicas durante o período de avaliação.

A vaca no período de transição (três semanas antes e após o parto) apresenta mudanças significativas no estado fisiológico, nutricional, anatômico e comportamental, em função dos eventos relacionados ao parto e a lactogênese (MULLIGAN; DOHERTY, 2008). Alterações hematológicas durante a gestação são descritas em diferentes espécies e estão relacionadas à adaptação da fêmea ao período reprodutivo (JAIN, 1993).

As variações observadas em relação ao que foi descrito em outros estudos, se justificam pela influência de fatores individuais como idade, sexo, raça e condição metabólica (JAIN, 1993), assim como pela nutrição e manejo (BIONDO et al., 1998; SAUT; BIRGEL JR, 2006).

**Tabela 6:** Valores médios da contagem de hemácias, hematócrito e concentração de hemoglobina em nove vacas mestiças (holandês x zebu), pertencentes ao plantel da Fazenda Boa Liga (Barra do Pirai-RJ), na interrupção da lactação (A1), ao parto (D0) e aos 14, 30 e 60 dias após o parto (D14, D30, D60) e valores de referência para a espécie (SMITH, 2006).

|                   | Hemácias (x 10 <sup>6</sup> /μL) |      |      | Hematócrito (%) |      |      | Hemoglobina/g/dL |      |      |
|-------------------|----------------------------------|------|------|-----------------|------|------|------------------|------|------|
|                   | T1                               | T2   | T3   | T1              | T2   | T3   | T1               | T2   | T3   |
| <b>A1</b>         | 6,48                             | 5,34 | 5,77 | 33,4            | 26   | 31,6 | 11,7             | 9,3  | 11,0 |
| <b>D0</b>         | 6,47                             | 6,00 | 6,01 | 35,4            | 30,2 | 35,1 | 12,6             | 10,8 | 12,2 |
| <b>D14</b>        | 5,94                             | 5,58 | 5,15 | 31,6            | 26,2 | 29,4 | 11,5             | 9,7  | 10,5 |
| <b>D30</b>        | 6,39                             | 6,02 | 5,50 | 30,3            | 26,5 | 29,6 | 11,0             | 9,9  | 10,6 |
| <b>D60</b>        | 6,70                             | 5,69 | 5,70 | 29,6            | 26,1 | 27,2 | 10,8             | 9,5  | 9,9  |
| <b>Referência</b> | 5 a 10                           |      |      | 24 a 46         |      |      | 8 a 15           |      |      |

Tratamento intramamário na interrupção da lactação com antibiótico ATB (T1), plasma rico em plaquetas PRP (T2); ATB + PRP (T3)

**Tabela 7:** Valores médios dos parâmetros hematimétricos volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) em nove vacas mestiças (holandês x zebu) na interrupção da lactação (A1), ao parto (D0) e aos 14, 30 e 60 dias após o parto (D14, D30, D60) e valores de referência (SMITH, 2006).

|                   | VCM (fl) |      |      | CHCM (g/dL) |      |      |
|-------------------|----------|------|------|-------------|------|------|
|                   | T1       | T2   | T3   | T1          | T2   | T3   |
| <b>A1</b>         | 51,8     | 48,7 | 54,8 | 35,1        | 35,6 | 34,7 |
| <b>D0</b>         | 54,9     | 50,9 | 59,3 | 35,6        | 35,8 | 34,6 |
| <b>D14</b>        | 53,1     | 47,7 | 55,1 | 36,2        | 36,8 | 35,7 |
| <b>D30</b>        | 47,9     | 44,5 | 54,2 | 36,4        | 37,2 | 36   |
| <b>D60</b>        | 44,2     | 49,9 | 48,2 | 36,4        | 36,4 | 36,3 |
| <b>Referência</b> | 40 a 60  |      |      | 30 a 36     |      |      |

Tratamento intramamário na interrupção da lactação com antibiótico ATB (T1), plasma rico em plaquetas PRP (T2); ATB + PRP (T3)

Em semelhança às observações de Anosa e Obgogu (1979) em ovelhas, houve aumento dos parâmetros eritrocitários no dia do parto, exceto hemácias nos animais do T1 que se mantiveram estáveis em relação ao momento da secagem. O aumento dos índices eritrocitários em exames realizados no momento do parto também foi verificado por Jonsson et al. (2013) e Saut; Birguel JR (2012), e, segundo Moretti et al. (2016), pode estar relacionado com diminuição na ingestão de água. No presente estudo, a hemoconcentração decorrente da restrição no consumo de água e estresse não foi marcante, provavelmente porque houve ingestão hídrica e alimentação antes da coleta.

Em semelhança ao presente estudo, Moreira (2016) ao avaliarem o perfil hematológico na fase inicial da lactação em vacas holandesas preto e branco, encontraram valores mais elevados de hemácias, hemoglobina e hematócrito no dia do parto, diferindo quanto aos valores mais baixos do presente estudo no D14 (hemácias e hemoglobina) e A1 (hematócrito).

#### 4.4.2 Hemograma série branca

No leucograma foram evidenciadas alterações na leucometria, neutrófilos segmentados e bastonetes, linfócitos e monócitos, sendo estas relacionadas ao aumento absoluto no número destas células.

Leucocitose foi observada no T1 entre D0 e D30, no T2 no D0 e T3 em todos os momentos (Tabela 8). Aumento no número de neutrófilos segmentados no sangue foi observado no T1 do D0 ao D30 e no T3 do D0 ao D60. Bastonetes estiveram aumentados (desvio a esquerda) no T1 de D0 ao D30, no T2 do D0 ao D60 e no T3 no D30. Linfocitose foi verificada antes do parto (A1) no T3 e ao parto (D0) em T2 e T3, e monocitose entre D14 e D30 no T1, no D0 em T2 e entre D30 e D60 no T3.

O aumento no número de neutrófilos no dia do parto pode estar relacionado ao aumento de cortisol sérico até 12 horas após o parto (ISLAM, 2014). Os corticosteróides liberados em resposta ao estresse induzem a uma leucocitose média a moderada (aumento de duas a três vezes o normal dependendo da espécie animal), geralmente sem desvio a esquerda, associada à linfopenia e à eosinopenia (JAIN, 1993; GRAHAM, 2000).

As alterações evidenciadas (leucocitose, neutrofilia, linfocitose e monocitose) não correspondem tipicamente ao leucograma de estresse mediado pelos glicocorticóides que é caracterizado por leucocitose, neutrofilia, linfopenia, monocitose e eosinopenia. Porém, esse padrão típico nem sempre é encontrado. Diferentes autores concordam sobre a leucocitose e a neutrofilia induzidas pelo estresse, porém divergem quanto aos linfócitos, eosinófilos e monócitos.

**Tabela 8:** Valores médios de leucócitos totais e leucometria diferencial de nove vacas pertencentes ao plantel da Fazenda Boa Liga (Barra do Piraí-RJ), submetidas a três tratamentos intramamários na interrupção da lactação (A1), ao parto (D0) e aos 14, 30 e 60 dias após o parto (D14, D30, D60) e valores de referência (SMITH, 2006).

|             | Tratamentos | A1    | D0    | D14   | D30   | D60   | Referência   |
|-------------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------|
| Leucócitos  | ATB         | 11333 | 15433 | 20633 | 12433 | 10367 | 4000 a 12000 |
|             | PRP         | 11033 | 16333 | 11100 | 11433 | 6033  |              |
|             | PRP+ATB     | 15000 | 18133 | 18833 | 17767 | 12900 |              |
| Bastonetes  | ATB         | 43    | 100   | 275   | 270   | 85    | 0 a 120      |
|             | PRP         | 53    | 383   | 216   | 158   | 133   |              |
|             | PRP+ATB     | 0     | 80    | 109   | 570   | 92    |              |
| Segmentados | ATB         | 2624  | 6239  | 10264 | 3515  | 2416  | 600 a 4000   |
|             | PRP         | 985   | 3416  | 2393  | 3286  | 2159  |              |
|             | PRP+ATB     | 3444  | 4956  | 4883  | 6872  | 2274  |              |
| Linfócitos  | ATB         | 3444  | 4956  | 4883  | 6872  | 2274  | 2500 a 7500  |
|             | PRP         | 7149  | 8067  | 6960  | 6977  | 6923  |              |
|             | PRP+ATB     | 8288  | 9547  | 7273  | 6754  | 2812  |              |
| Monócitos   | ATB         | 698   | 663   | 1606  | 899   | 349   | 25 a 840     |
|             | PRP         | 393   | 1081  | 555   | 488   | 474   |              |
|             | PRP+ATB     | 619   | 610   | 787   | 1711  | 1141  |              |
| Eosinófilos | ATB         | 819   | 364   | 1528  | 773   | 595   | 0 a 2400     |
|             | PRP         | 1314  | 1907  | 663   | 748   | 455   |              |
|             | PRP+ATB     | 1635  | 482   | 966   | 882   | 1078  |              |

ATB= Antibiótico; PRP=Plasma Rico em plaquetas

Segundo Jain (1993) a neutrofilia é frequentemente acompanhada por linfocitose e algumas vezes por monocitose e eosinofilia. A leucocitose fisiológica, devido à ação da

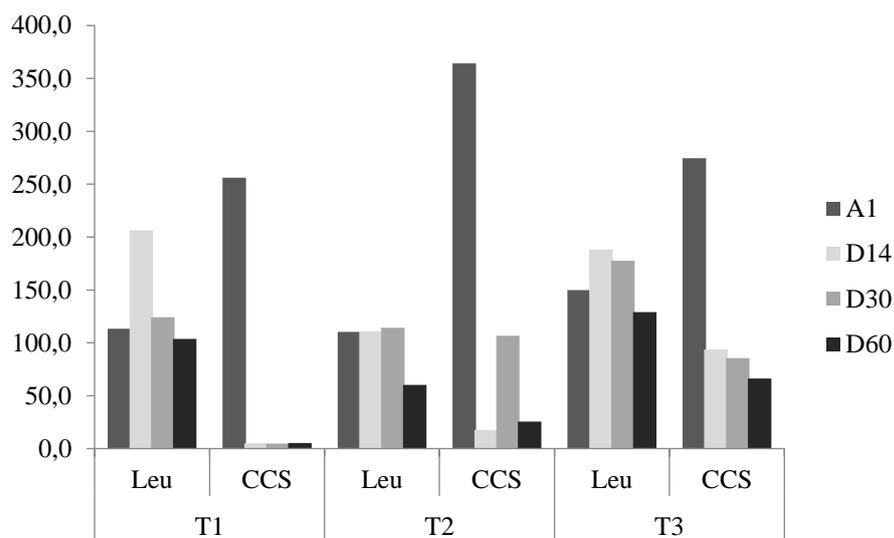
adrenalina, provoca uma neutrofilia transitória e ou linfocitose, e raramente ocorre aumento no número de monócitos e eosinófilos. Graham (2000) reafirmou que a neutrofilia pode ser acompanhada por linfocitose, e que os outros tipos leucocitários permanecem dentro do intervalo de referência no sangue periférico.

Saut e Birguel Jr (2006) relataram nas primeiras 24 horas após a parição de fêmeas bovinas da raça holandesa, uma leucocitose fisiológica por neutrofilia com desvio à esquerda regenerativo, linfocitose e eosinopenia. Na primeira semana após o parto ocorreu a diminuição gradual do número de leucócitos, devido à redução de neutrófilos e linfócitos. Estas observações diferem do presente estudo uma vez que os leucócitos se mantiveram aumentados do D0 ao D30 no T1 e em todos os momentos no T3. Contudo, no T2, houve redução dos leucócitos totais após o parto e o número absoluto de leucócitos foi normal no D14. Ao mesmo tempo, os bastonetes mantiveram-se aumentados do D0 ao D60, diferindo dos animais do T1 e do T3 em que o desvio a esquerda foi evidenciado em períodos mais curtos (D14 ao D30 no T1 e D30 no T2).

É possível observar em ruminantes um quadro de leucocitose relacionada a processos inflamatórios ocorridos no momento do parto (LASSEN; REBAR; WEISER, 2007). Simplício et al. (2013) observaram leucocitose em bovinos com mastite e a contagem de leucócitos totais decresceu, atingindo valor significativamente menor após quatro dias, e seguiu diminuindo nos dias seguintes.

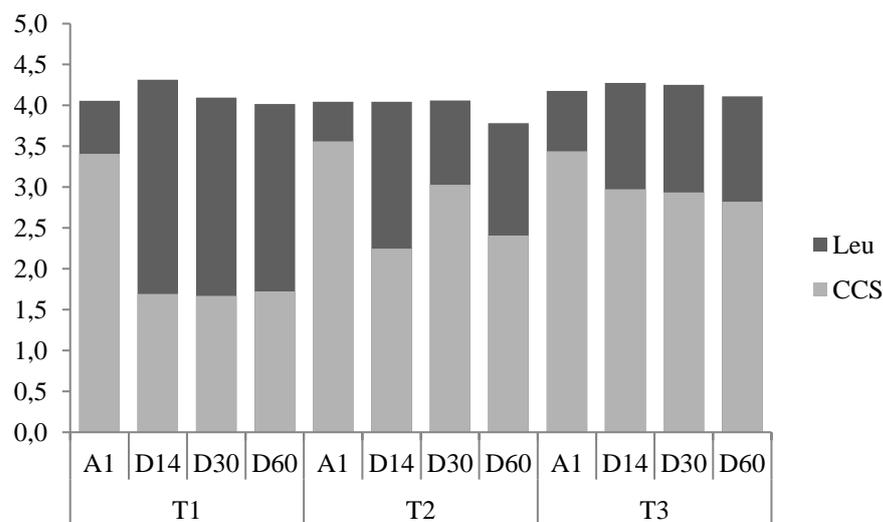
Segundo Weiss e Wardrop (2010) é esperado um intenso recrutamento inicial de células de defesa para o sítio de inflamação com subsequente elevação de neutrófilos circulantes. Theodorou et al. (2010) estudando mastite clínica em ovelhas leiteiras concluíram que na fase aguda ocorre um aumento de 18 a 38 vezes na expressão de alguns genes da cascata de inflamação, os quais seriam responsáveis pelo aumento de neutrófilos circulantes.

No parto, um grande número de leucócitos é recrutado para o sistema reprodutivo e mama, sendo esperado um menor número de leucócitos no sangue periférico, porém dentro da faixa de normalidade se não há infecção. Após o parto, o cortisol regula seus próprios receptores em neutrófilos e o sistema retorna à função normal (BURTON et al., 2005). Neste contexto, a CCS do leite foi alta somente em T2 no D14 (Figura 11), logo não houve correlação entre as células sanguíneas e a CCS durante os períodos de lactação (Figura 12). Vacas que passam por curas espontâneas apresentam respostas rápidas e massivas de neutrófilos no leite, enquanto que as vacas com respostas fracas ou negativas de neutrófilos sucumbem às formas prematuras e severas de mastite (PYÖRÄLÄ, 2003). No entanto, é preciso relacionar a contagem sanguínea à real mobilização na glândula mamária, através da contagem diferencial no leite. A princípio, pode-se afirmar que o T2 apresentou menores taxas de isolamentos positivos após D14, o que pode demonstrar um efeito benéfico da alta CCS neste caso.



**Figura 11:** Médias de leucometria absoluta sanguínea e Contagem de Células somáticas de vacas submetidas a diferentes tipos de tratamento na secagem (antibiótico ATB (T1); Plasma Rico em Plaquetas (T2); ATB + PRP (T3)).

A1= antes da secagem; D0= dia do parto; D14,30 e 60= dia



**Figura 12:** Proporção da leucometria absoluta no sangue e contagem de células somáticas de vacas submetidas a diferentes tipos de tratamento na secagem (antibiótico ATB (T1); Plasma Rico em Plaquetas (T2); ATB + PRP (T3)).

A1= antes da secagem; D0= dia do parto; D14,30 e 60= dias após o parto; CCS Log 10

#### 4.4.3 TBARS

Conforme demonstrado na Tabela 9, os três tratamentos foram semelhantes quanto aos valores de TBARS, tanto antes do parto, quanto nos momentos seguintes. Os animais que receberam o tratamento com PRP na secagem demonstraram maior estabilidade lipídica até os

30 dias pós-parto e ligeira redução dos níveis de TBARS aos 60 dias pós-parto. Os resultados revelam que os eritrócitos não sofreram peroxidação lipídica no período pós-parto, o que é sugerido pela não alteração dos valores de TBARS nas células eritrocitárias nesse período, indiferente do tratamento instituído (Figura 13).

Os resultados obtidos por diferentes autores em estudos sobre a peroxidação lipídica em bovinos (CHANDRA et al., 2013; KUMAR et al., 2011; KRIZANOVIC et al., 2008, LIU et al., 2008; CASTILLO et al., 2005, 2006) de diferentes raças e condições metabólicas diversas são difíceis de comparar em função das diferentes metodologias empregadas e unidades de concentração na mensuração do MDA como indicador de estresse oxidativo.

A peroxidação lipídica celular avaliada por meio da determinação dos níveis de TBARS, um método comumente usado em pesquisas clínicas para quantificação de MDA nos sistemas biológicos e avaliação do estresse oxidativo celular (PILZ et al., 2000; SIM et al., 2003), demonstrou estabilidade das defesas antioxidantes em relação aos agentes oxidantes e com valores ligeiramente mais altos no T2 em D60, mas sem diferença significativa em relação aos demais tratamentos e momentos de avaliação.

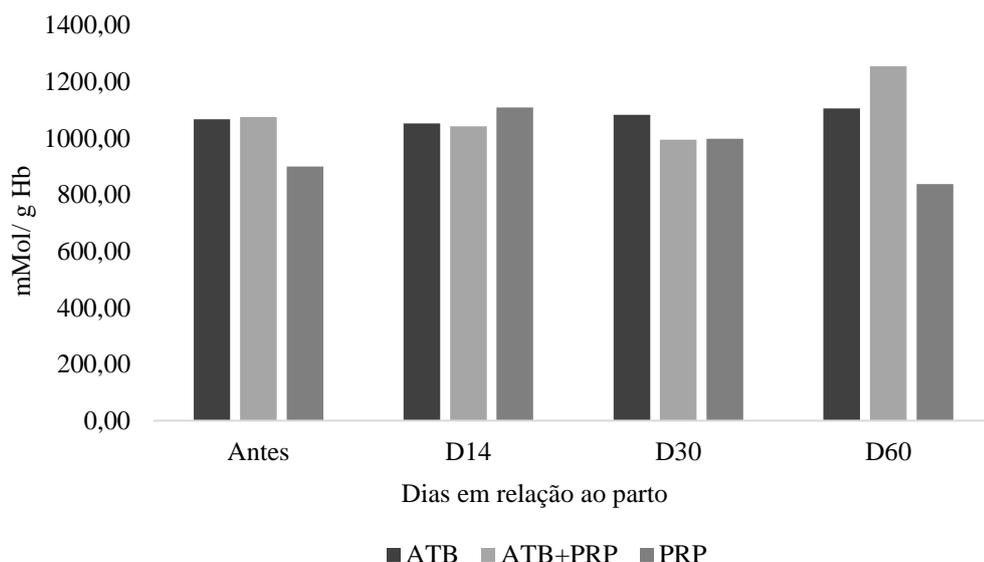
Os ácidos graxos insaturados são especialmente sensíveis aos efeitos dos radicais livres (MACHADO et al., 2009). Como o leite contém alto teor de gordura (maior que 3%) que pode sofrer peroxidação, um acréscimo na concentração sanguínea de MDA na ausência de outras alterações clínicas poderia estar relacionado ao aumento da peroxidação lipídica e dano oxidativo, fato não evidenciado em nenhum momento e em função de nenhum tratamento instituído.

**Tabela 9:** Médias e desvios padrões de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no sangue de nove vacas pertencentes ao plantel da Fazenda Boa Liga (Barra do Piraí-RJ), submetidas a três tratamentos intramamários na interrupção da lactação.

| Tratamento     | Dias em relação ao parto |        |          |        |        |
|----------------|--------------------------|--------|----------|--------|--------|
|                | Secagem                  | D0     | D14      | D30    | D60    |
| <b>ATB</b>     | 1068±0                   | 1075±1 | 900±184  | 1084±1 | 973±33 |
| <b>PRP</b>     | 1105±26                  | 1043±1 | 1109±244 | 1132±0 | 960±32 |
| <b>PRP+ATB</b> | 1029±72                  | 995±1  | 998±420  | 1112±0 | 955±24 |

ATB=Antibiótico; PRP= Plasma Rico em Plaquetas

Embora o ensaio do TBARS seja frequentemente utilizado para a avaliação dos produtos de peroxidação lipídica em fluidos biológicos, ele não é específico para detecção de MDA (STEGHENS et al., 2001), uma vez que quantifica a soma das diferentes substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Os valores de TBARS incluem interferentes provenientes da reação do TBA com outras substâncias como carboidratos e proteínas (PILZ et al., 2000; SIM et al., 2003; KORCHAZHKINA; EXLEY; SPENCER, 2003) presentes no leite. E ainda, conforme Steghens et al. (2001) este método propicia geração *in vitro* de aldeídos que podem interferir nos resultados.



**Figura 13:** Médias de TBARS no sangue (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico) na secagem e aos 14, 30 e 60 dias após o parto de vacas submetidas a três tratamentos na secagem (Tratamento 1 = Antibiótico (ATB); Tratamento 2 = Plasma Rico em Plaquetas (PRP); Tratamento 3 = PRP + ATB)

#### 4.4.4 Proteínas totais e haptoglobina

Os valores médios de proteínas totais estão descritos na Tabela 10. Nota-se que, exceto em D14 no T3, estão um pouco acima dos valores descritos para a espécie. Costa et al. (2004) descreveram aumento significativo nas proteínas totais de vacas com MC e MSC, com médias 8,42 e 7,52 g/dL, respectivamente, valores próximos aos encontrados no presente estudo, porém os autores não citaram o período de lactação das vacas estudadas. Ferreira et al. (2009) relataram hiperproteinemia nos dias próximos ao parto, porém não elucidaram a causa desta alteração.

**Tabela 10:** Médias e desvios padrões de proteínas totais séricas de nove vacas pertencentes ao plantel da Fazenda Boa Liga (Barra do Piraí-RJ), submetidas a três tratamentos intramamários na interrupção da lactação.

| Tratamento | Dias em relação ao parto |          |          |          |          | Referência                        |
|------------|--------------------------|----------|----------|----------|----------|-----------------------------------|
|            | Secagem                  | D0       | D14      | D30      | D60      |                                   |
| ATB        | 8,17±0,7                 | 7,41±3,4 | 8,11±1,0 | 7,68±0,1 | 7,61±0,2 | 6,5 – 7,4<br>Kaneko et al. (2008) |
| PRP        | 7,83±1,1                 | 7,64±3,2 | 7,62±0,2 | 8,23±1,0 | 8,11±0,7 |                                   |
| PRP+ATB    | 7,7±1,1                  | 7,74±3,1 | 7,0±0,9  | 8,2±1,1  | 8,27±0,6 |                                   |

ATB=Antibiótico; PRP= Plasma Rico em Plaquetas

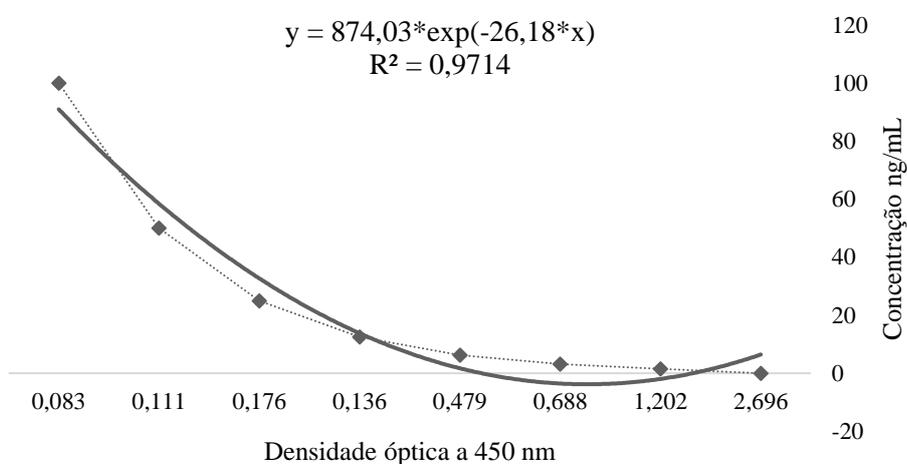
Quanto à Hp, com a diluição das amostras recomendada no manual do kit, foram encontradas densidades ópticas extrapolando a curva padrão (Figura 14), ou seja, as densidades estiveram um pouco menores que a obtida na maior concentração do padrão (densidade=0,083; concentração=100ng/mL). Ainda assim, as concentrações foram estimadas através da equação, as quais estão descritas na Tabela 11. Os tratamentos foram semelhantes em todos os momentos.

**Tabela 11:** Médias e desvios padrões de haptoglobina sérica de nove vacas pertencentes ao plantel da Fazenda Boa Liga (Barra do Piraí-RJ), submetidas a três tratamentos intramamários na interrupção da lactação.

| Tratamento     | Dias em relação ao parto |           |           |           |           |
|----------------|--------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                | Secagem                  | D0        | D14       | D30       | D60       |
| <b>ATB</b>     | 393,34±18                | 370,5±28  | 390,05±21 | 383,18±17 | 393,24±18 |
| <b>PRP</b>     | 396,91±21                | 383,44±12 | 398,56±22 | 378,26±23 | 388,26±22 |
| <b>PRP+ATB</b> | 368,32±29                | 398,29±15 | 414,21±12 | 363,28±29 | 403,5±15  |

ATB=Antibiótico; PRP= Plasma Rico em Plaquetas

Kováč et al. (2007) encontraram correlação positiva na dosagem de Hp no leite e CCS, enquanto no soro não houve correlação. Wenz et al. (2010) descreveram que Hp mensurada no leite foi maior nos casos de mastite moderada e grave. Simplício et al. (2013) encontraram aumento significativo de Hp em mastite, onfaloflebite e fotossensibilização. Por estar relacionada a outras enfermidades e não só à mastite, a dosagem sérica de Hp pode não ser uma boa ferramenta para avaliação da saúde da mama, porém os dados demonstram, somados ao exame clínico e hemograma, que os animais de todos os grupos se mantiveram saudáveis em todos os momentos de coleta.



**Figura 14:** Curva padrão obtida através das densidades ópticas das soluções-padrão para dosagem de haptoglobina sérica bovina (Fine Test Bovine Hp ELISA kit EB0011)

#### 4.5 Considerações sobre o uso do PRP

A busca por tratamentos que minimizem o uso de antibióticos na pecuária leiteira tem sido o foco de muitos trabalhos, pois seu uso imprudente pode promover o desenvolvimento de resistência bacteriana, além de poder deixar resíduos de antibióticos no leite e derivados lácteos que chegam ao consumidor (BERRY; HILLERTON, 2002).

Na propriedade onde foi desenvolvido o presente experimento, há relatos de recusa do recebimento do leite no laticínio, devido à presença de resíduo de antibiótico, provavelmente

por causa da mistura de leite de vacas no início da lactação, mesmo tendo sido respeitado o tempo de carência determinado pela bula da formulação (marca não mencionada). Este é um problema com grande impacto econômico e o produtor é penalizado pela inutilização de grande volume de leite.

O uso do PRP pode ser uma alternativa para propriedades que querem minimizar o uso de antibióticos e principalmente na pecuária orgânica. O uso isolado de PRP não impediu a ocorrência de mastite subclínica nos primeiros 30 dias da lactação, considerando um limiar de CCS de  $\leq 200.000$  céls/mL de leite para mamas sadias (PYÖRÄLÄ, 2003; DELLA LIBERA et al., 2010), porém mostrou-se semelhante aos demais tratamentos a partir deste período crítico. A média de CCS em D30, no entanto, ficou abaixo do preconizado pela legislação (BRASIL, 2018). Nenhum quarto mamário deste grupo necessitou de antibioticoterapia durante toda a lactação, assim como no grupo que recebeu antibiótico.

Berry e Hillerton (2002) compararam os índices de novas infecções e mastite clínica em rebanhos com baixa CCS tratados e não tratados com antibiótico, encontrando índices superiores naqueles que não receberam tratamento algum. Vanhoudt et al. (2018) fizeram um estudo retrospectivo de terapia seletiva de vaca seca na Holanda, na qual animais com baixa CCS na secagem deixaram de receber antibiótico intramamário, demonstrando que não houve diferença nos índices de novas infecções durante o período seco, sendo possível reduzir a utilização de antibióticos. No presente trabalho, os quartos mamários apresentavam alta CCS no momento da secagem e os tratamentos instituídos foram equivalentes, demonstrando eficácia do PRP na manutenção da saúde da glândula mamária quando utilizado na secagem, mesmo com alta contagem de CCS.

O custo e a praticidade para utilização do tratamento com PRP são fatores limitantes. Comparado ao tratamento convencional, a obtenção do PRP necessita de maior investimento pelo produtor, pois, além do material, deve-se considerar os honorários veterinários para a coleta e manipulação no laboratório. As coletas sanguíneas foram bastante trabalhosas, pois não havia um tronco de contenção específico para esta finalidade. Sendo assim, o investimento em estrutura que torne a coleta mais prática e rápida, deve ser planejado. Os resultados promissores devem encorajar tais investimentos.

Evkuran Dal et al. (2019) demonstraram redução significativa nas CCS em vacas com mastite subclínica tratadas com concentrado plaquetário, associado ou não a antibiótico, apresentando semelhança com o tratamento com antibiótico intramamário. Lange-Consiglio et al. (2014) relataram que o tratamento com concentrado plaquetário nos casos de mastite aguda foi semelhante ao tratamento com antibiótico ou antibiótico associado ao concentrado plaquetário e, nos casos de mastite crônica, o concentrado apresentou resultados melhores que o tratamento convencional. Diferentemente deste experimento, no qual foi utilizado PRP autólogo, os autores citados utilizaram sangue de vacas doadoras para obtenção do hemoderivado.

O tratamento intramamário no momento da secagem com PRP associado a antibiótico foi semelhante ao tratamento convencional. Os parâmetros avaliados não foram suficientes para demonstrar se houve melhoria na imunidade da glândula mamária neste caso, com resposta imune mais rápida e sustentada durante a lactação. Porém, Lange-Consiglio et al. (2014) relataram que a administração de fatores de crescimento através do PRP, pode auxiliar na reparação dos tecidos lesados por resposta inflamatória prologada. Estudos que avaliem a expressão gênica de interleucinas pró e anti-inflamatórias na glândula mamária sob efeito do tratamento com PRP podem elucidar esta questão.

## 5 CONCLUSÕES

Os tratamentos de vaca seca com PRP e PRP associado a antibiótico foram similares ao tratamento convencional com antibiótico na manutenção da saúde da glândula mamária na lactação subsequente.

PRP intramamário pode ser utilizado para tratamento na secagem de vacas com mastite subclínica.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunidade Celular e Molecular**. 6<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564p.
- ANDREWS, A.H.; BLOWEY, R.W.; BOYD, H.; EDDY, R.G. **Medicina bovina: doenças e criação de bovinos**. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Roca, 2008. 1080p.
- ANITUA, E.; ANDIA, I.; ARDANZA, B.; NURDEN, P.; NURDEN, T. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 91, p. 4–15, 2004.
- ANOSA, V.O.; OGBOGU, D. A. The effect of parturition on the blood picture of sheep. **Research Veterinary Science**. v. 26(3), p. 380-382, 1979.
- ARCANJO, A.H.M.; OLIVEIRA, P.C.S.; MOREIRA, L.C.; JAYME, C.G.; SOARES, N.A.; OLIVEIRA, A.R.; PEREIRA, K.A.; NOGUEIRA, A.R. Programa de seis pontos de controle da mastite em rebanhos leiteiros. **Global Science and Technology**, v. 10, p.78-88, 2017.
- ASFAW, M; NEGASH, A. Review on Impact of Bovine Mastitis in Dairy Production. **Advances in Biological Research**, v. 11 (3). p. 126-131, 2017.
- AZZARA, C.D; DIMICK, P.S. Lipoprotein lipase activity of milk from cows with prolonged subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 3171-3175, 1985.
- BANNENBERG, G.L.; CHIANG, N.; ARIEL, A.; TJONAHEN, E., GOTLINGER, K. H., HONG, S., SERHAN, C.N. Molecular circuits of resolution: Formation and actions of resolvins and protectins. **The Journal of Immunology**, v. 174, p.4345-4355, 2005.
- BANNERMAN, D. D. Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 13 Suppl, p. 10–25, 2009.
- BAR, D.; GROHN, Y.T.; BENNETT, G.; GONZALEZ, R.N.; HERTL, J.A.; SCHULTE, H.F.; TAUER, L.W.; WELCOME, F. L.; SCHUKKEN, Y. H. Effect of repeated episodes of generic clinical mastitis on milk yield in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 4643–4653, 2007.
- BARBER, M. R.; YANG, T. J. Chemotactic activities in nonmastitic and mastitic mammary secretions: presence of interleukin-8 in mastitic but not nonmastitic secretions. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 5, n. 1, p. 82–86, 1998.
- BARBOSA, C.P.; BENEDETTI, E.; RIBEIRO, S.C.A.; GUIMARÃES, E.C. Relação entre contagem de células somáticas (CCS) e os resultados do “California Mastitis Test” (CMT), no diagnóstico de mastite bovina. **Bioscience Journal**, v. 18, n.1, junho, p.93-102. 2002.
- BARRERA, G., PIZZIMENTI, S., DIANZANI, UM. Lipid peroxidation: control of cell proliferation, cell differentiation and cell death. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 29, p. 1-2 :1-8. 2008.

BATISTA, C. F.; BLAGITZ, M. G.; AZEDO, M. R.; STRICAGNOLO, C. R.; DELLA LIBERA, A. M. M. P. Efeito de medicamentos indicados para o tratamento de mastite bovina no período seco sobre os índices de fagocitose. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n.2, p. 574-580, 2009.

BERRY, E.A.; HILLERTON, J.E. The effect of selective dry cow treatment on new intramammary infections. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 112-121, 2002.

BEVILACQUA, M.P.; POBER, J. S.; DONNA, L. M.; RAMZI, S. C.; JIMBRONE JR, M. A. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, p.9238-9242, 1987.

BHUTTO, A.L.; MURRAY, R.,D.; WOLDEHIWET, Z. Udder shape and treated lesions as potential risk factors for high somatic cell counts and intra-mammary infections in dairy cows. **The Veterinary Journal**. v. 183, p. 63–67, 2010.

BIONDO, A.W; LOPES S.T.A.; KOHAYAGAWA, A.; TAKAHIRA, R. K.; ALENCAR, N. X. Hemograma de bovinos (*Bos indicus*) sadios da raça Nelore, no primeiro mês de vida, criados no estado de São Paulo. **Ciência Rural**. v. 28, p.251-256, 1998.

BLOWEY, R.W.; EDMONDSON, P. Teat Disinfection. In: BLOWEY, R.W. & EDMONDSON, P. **Mastitis Control in Dairy Herds**. Washington: CAB International, 2010, 2<sup>a</sup> ed.. p.152-170.

BOUDREAUX, M. K.; CATALFAMO, J. L. Platelet biochemistry, signal transduction, and function. In: WEISS, D.J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6<sup>a</sup> ed. USA: Willey-Blackwell, 2010. Cap. 76, p.569-575.

BRADLEY, A.J.; GREEN, M.J. An investigation of the impact of intramammary antibiotic dry cow therapy on clinical coliform mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 632-1639, 2001.

BRAGA, V.A. Dietary salt enhances angiotensin-II-induced superoxide formation in the rostral ventrolateral medulla. **Autonomic Neuroscience**, v. 155(1–2), p. 14–18. 2010.

BRASIL, Instrução Normativa nº 77 de 26 de novembro de 2018. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União, 2018.

BUENO, V. F. F.; NICOLAU, E. S.; MESQUITA, A. J.; RIBEIRO, A. R.; SILVA, J. A. B.; COSTA, E. O.; COELHO, K. O.; NEVES, R. B. S. Mastite bovina clínica e subclínica, na região de Pirassununga, SP: frequências e redução na produção. **Ciência Animal Brasileira**, v. 3, n. 2, p. 47-52, 2002.

BUITENHUIS, B; RØNTVED, C. M.; EDWARDS, S. M.; INGVARTSEN, K. L.; SØRENSEN, P. In depth analysis of genes and pathways of the mammary gland involved in the pathogenesis of bovine *Escherichia coli*-mastitis. **BMC Genomics**, v. 12, n.1, p.130, 2011.

BURTON, J.L.; MADSEN, S.A.; CHANG, L.C.; WEBER, P.S.; BUCKHAM, K.R.; VAN, D.R.; HICKEY, M.C.; EARLEY, B. Gene expression signatures in neutrophils exposed to

glucocorticoids: a new paradigm to help explain “neutrophil dysfunction” in parturient dairy cows. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 105, p. 197–219, 2005.

CARMONA, J.U.; ARGÜELLES, D.; CLIMENT, F.; PRADES M. Autologous platelet concentrates as a treatment of horses with osteoarthritis: a preliminary pilot clinical study. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 27, n.4, p.167-170, 2007.

CARNEIRO, D.M.V.; DOMINGUES, P.F.; VAZ, D.A.K. Imunidade inata da glândula mamária bovina: resposta à infecção. **Ciência Rural**, v. 39, n.6, p.1934-1943, 2009.

CASTILLO, C.; HERNANDEZ J.; VALVERDE, I.; PEREIRA, V. Plasma malonaldehyde (MDA) and total antioxidant status (TAS) during lactation in dairy cows, **Research in Veterinary Science**, v. 80, p. 133-139, 2006.

CASTILLO, C.; HERNANDEZ, J.; BRAVO, A.; LOPEZ-ALONSO, M.; PEREIRA, V.; BENEDITO, J. L. Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. **The Veterinary Journal**, London, v. 169, p. 286-292, 2005.

CHAGAS, L. G. S.; MELO, P. C.; BARBOSA, N. G.; GUIMARÃES, E. C.; BRITO, D. V. D. Ocorrência de mastite bovina causada por *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. e *Candida* sp. em uma propriedade rural no município de Indianópolis – Minas Gerais, Brasil, 2012. **Bioscience Journal**, v. 28, n.6, p.1007-1014, 2012.

CHANDRA, G.; AGGARWAL, A.; SINGH, K.; KUMAR, M.; UPADHYAY, R. C. Effect of vitamin E and zinc supplementation on energy metabolites, lipid peroxidation, and milk production in peripartum sahiwal cows. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Seoul, v. 26, n. 11, p. 1569-1576, 2013.

CHI, K.; ANDRADE, U.; FERREIRA, A. Sanitary program in dairy cattle. **Archives of Veterinary Science** [Online], n.6, v. 1, 2001.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 28ª edição, 2018.

COSTA, A.P.D.; BORGES, J.R.J.; CARVALHO, C.B.; ALBERNAZ, A.P.; VIANA, A.P. Determinação de leucometria global, proteínas totais, albumina e globulinas no sangue das veias jugular e mamária de vacas leiteiras com mastite. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 11, p.88–91, 2004.

CULLOR, J. S.; TYLER, J. W.; SMITH, B. P. Distúrbios da glândula mamária. In: SMITH, B. P. **Tratado de Medicina Interna dos Grandes Animais**. São Paulo, v. 2, p. 1041- 1060, 1994.

CUNHA, A.F.; BRAGANÇA, L.J.; QUINTÃO, L.C.; SILVA, S.Q.; SOUZA, F.N.; CERQUEIRA, M.M.O.P. Prevalência, etiologia e fatores de risco de mastite em rebanhos leiteiros de Viçosa-MG. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 9, n. 2, p.160-166, 2015.

DAVIES, M.G.; HAGEN, P.O. The vascular endothelium. **Annals of Surgery**, v. 218, p.593-609, 1993.

DEL RIO, D.; STEWART, A.J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 15, p.316-328, 2005.

DELEO, F.R.; DIEP, B.A.; OTTO, M. Host Defense and Pathogenesis in *Staphylococcus aureus* Infections. **Journal of Infectious Disease Clinics of North America**, v. 23, n. 1, p. 17-34, 2009.

DELLA LIBERA, A.M.M.P.; ARAÚJO, W.P.; COSTA, E. O.; GARCIA, M.; TÁVORA, J.F. P.; BENATTI, L.A.T. Características físico-químicas e microbiológicas do leite de vacas sem alterações ao exame físico da glândula mamária e com alta contagem de células somáticas. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 1, n.2, p. 42 – 47, 2001.

DELLA LIBERA, A.M.M.P.; SOUZA, F.N.; BLAGITZ, M.G.; BATISTA, C.F. Avaliação de indicadores inflamatórios no diagnóstico da mastite bovina. **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, p. 726-731, 2010.

DETILLEUX, J. Tolerance to bovine clinical mastitis: Total, direct, and indirect milk losses. **Journal of Dairy Science**, v. 101(4), p. 3334-3343, 2018.

DINGWELL, R.T.; LESLIE, K.E.; SCHUKKEN, Y.H.; SARGEANT, J.M.; TIMMS, L.L.; DUFFIELD, T.F.; KEEFEE, G.P.; KELTON, D.F.; LISSEMORE, K. D.; CONKLIN, J. Association of cow and quarter-level factors at drying-off with new intramammary infections during the dry period. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 63, p. 75-89, 2004.

DIX, TA., AIKENS, J. Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation. **Chemical Research of Toxicology**, v. 6, p. 2-18. 1993.

DRAGO, L.; BORTOLIN, M.; VASSENA, C.; TASCHERI, S.; DEL FABBRO, M. Antimicrobial activity of pure platelet-rich plasma against microorganisms isolated from oral cavity. **Microbiology**, v. 13, n. 47, 2013.

ECKERSALL, P. D., YOUNG, F. J., MCCOMB, C., HOGARTH, C. J., SAFI, S., FITZPATRICK, J. L., NOLAN, A. M., WEBER, A. McDONALD, T. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. **Journal Veterinary Record**, v. 148, p.35-41, 2001.

ECKERSALL, P.D., YOUNG, F.J., NOLAN, A.M., KNIGHT, C.H., MCCOMB, C., WATERSTON, M.M., HOGARTH, C.J., SCOTT, E.M., FITZPATRICK, J.L. Acute Phase Proteins in Bovine Milk in an Experimental Model of *Staphylococcus aureus* Subclinical Mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p.1488-1501, 2006.

EVKURAN DAL, G.; SABUNCU, A.; AKTARAN BALA, D.; ENGINLER, S. Ö.; ÇETIN, A.C.; ÇELIK, B.; KOÇAK, Ö. Evaluation of intramammary platelet concentrate efficacy as a subclinical mastitis treatment in dairy cows based on somatic cell count and milk amyloid A levels. **Kafkas Univ Vet Fak Derg**, v. 25 (3), p. 357-363, 2019.

EMBRAPA. Embrapa aposta na tecnologia digital para acelerar o desenvolvimento da cadeia produtiva do leite. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/>

[/noticia/30276763/embrapa-aposta-na-tecnologia-digital-para-acelerar-o-desenvolvimento-da-cadeia-produtiva-do-leite2017 Acesso em 01/08/2018](#)

FAJARDO, L.F. The complexity of endothelial cells. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 92, p.241-250, 1989.

FERREIRA, J. L.; LINS, J.L.F.H.A.; CAVALCANTE, T.V.; MACEDO, N.A.; BORJAS, A.R. Prevalência e etiologia da mastite bovina no município de Teresina, Piauí. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 2, p. 261-266, 2007.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 43, n.1, p.61-8, 1997.

FERREIRA, M. R.; ASSIS, T. S.; SILVA, N. C. M.; MOREIRA, C. N. Efeitos do período puerperal sobre o hemograma e teste de NBT em vacas girolando. **Ciência Animal Brasileira**, Suplemento 1– Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria, 2009.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do Leite e Controle de Mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 175p., 2000.

FOSTER, T.E.; PUSKAS, B.L.; MANDELBAUM, B. R.; GERHARDT, MB; RODEO, S. A. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. **American Journal of Sports Medicine**, v. 37, p.2259-2272, 2009.

FREYMILLER, E.A.; AGHALOO, T.L. Platelet-rich plasma: Ready or not? **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 62, p.484-488, 2004.

GERARDI, G., BERNARDINI, D., AZZURRA, C., FERRARI, V., LOB, L., SEGATO, S. Use of serum amyloid A and milk amyloid A in the diagnosis of subclinical mastitis in dairy cows. **Journal of Dairy Research**, v. 76, p.411, 2009.

GERRARD, J.M. Platelet aggregation: celular regulation and physiologic role. **Hospital Practice**, v. 23, p.89-92, 1988.

GILLESPIE, B.E.; HEADRICK, S.I.; BOONYAYATRA, S.; OLIVER, S.P. Prevalence and persistence of coagulase-negative Staphylococcus species in three dairy research herds. **Veterinary Microbiology**, v. 134(1), p.65-72, 2009.

GOLDEN, M.H.; RAMDATH, D. Free radicals in the pathogenesis of kwashiorkor. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 46, n.1, p.53-68, 1987.

GRAHAM, S.S. Neutrophils. In: FELDMAN B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 5<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p.281-296.

GREEN, M.J.; GREEN, L.E.; MEDLEY, G.F.; SCHUKKEN, Y.H.; BRADLEY, A.J. Influence of dry period bacterial intra-mammary infection of clinical mastitis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 2589-2599, 2002.

HENDERSON, A. C. et al. Prediction of intramammary infection status across the dry period

from lifetime cow records. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 7, p. 5586–5595, jul. 2016.

HENTZE, W.M. et al. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. **Cell, Heidelberg**, v. 117, p.285-297, 2004.

HORADAGODA, N.U.; KNOX, K.M.G.; GIBBS, H.A.; REID, S.W.J.; HORADAGODA, A.; EDWARDS, S.E.R.; ECKERSALL, P.D. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. **Veterinary Record**, v. 144, n.16, 1999.

HOFFBRAND A.V., PETTIT J.E.; MOSS P.A.H. **Fundamentos em hematologia**. 4ª ed. São Paulo: Artmed, 2004. 358p.

HULTGREN, J.; SVENSON, C Heifer rearing conditions affect length of productive life in Swedish dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 89, p.255–264, 2009.

HUSSEIN, H. A. et al. Milk amyloid A as a biomarker for diagnosis of subclinical mastitis in cattle. **Veterinary World**, v. 11, n. 1, p. 34–41, 2018.

ISLAM, R.K.; HARENDRA, K.; KRISHNAN, B.B. Investigation on leukocyte profile of periparturient cows with or without postpartum reproductive disease. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 3, n.1, p.57-63, 2014.

JAEGER, S. et al. Test characteristics of milk amyloid A ELISA, somatic cell count, and bacteriological culture for detection of intramammary pathogens that cause subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 9, p. 7419–7426, 2017.

JAFFE, EA. Cell Biology of endothelial cells. **Human Pathology**, v. 8, p.234-239, 1987.

JAIN, N.C. **Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febger, 1993. 417 p.

JANERO, DR., BURGHARDT, B. Analysis of cardiac membrane phospholipid peroxidation kinetics as malondialdehyde: nonspecificity of thiobarbituric acid-reactivity. **Lipids**, v. 23, p. 452-458. 1988.

JONSSON, N.N.; FORTES, M.R.S.; PIPER, E.K.; VANKAN, D.M.; DE CISNEROS, J.P.J.; WITTEK, T. Comparison of metabolic, hematological, and peripheral blood leukocyte cytokine profiles of dairy cows and heifers during the periparturient period. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n.4, p.2283-2292, 2013.

JORGE, A. M.; ANDRIGHETTO, C.; STRAZZA, M. R. B.; CORREA, R. C.; KASBURGO, D. G.; PICCININ, A.; VICTÓRIA, C.; DOMINGUES, P. F. Correlação entre o *California Mastitis Test* (CMT) e a Contagem de Células Somáticas do Leite de Búfalas Murrah. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 6, p. 2039-2045, 2005.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6ª ed. 314 Academic Press, 2008. 928p.

KASRAVI, R., BOLOURCHI, M., FARZANEH, N., SEIFI, HA., BARIN, A., HOVARESHTI P, et al. Efficacy of conventional and extended intra-mammary treatment of persistent sub-

clinical mastitis with cefquinome in lactating dairy cows. **Tropical Animals Health Production**, v. 43 p.1203-10. 2011.

KITCHEN, B. J. Review of the progress of dairy science: Bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. **Journal of Dairy Research**, v. 48, p. 167-188, 1981.

KORCHAZHKINA, O.; EXLEY, C.; SPENCER, S.A. Measurement by reversed-phase high-performance liquid chromatography of malondialdehyde in normal human urine following derivatisation with 2,4- dinitrophenylhydrazine. **Journal of Chromatography. B: Anal. Technol. Biomed. Life. Sci.**, v. 794, n.2, p.353-362, 2003.

KOVÁČ, G.; POPELKOVÁ, M.; TKÁČIKOVÁ, L.; BURDOVÁ, O.; IHNÁT, O. Interrelationship between Somatic Cell Count and Acute Phase Proteins in Serum and Milk of Dairy Cows. **Acta Veterinaria Brno**, v. 76, p. 51-57, 2007

KREWER, C.C., LACERDA, I.P.S., AMANSO, E.S., CAVALCANTE, N.B., PEIXOTO, R.M., PINHEIRO JÚNIOR, J.W., COSTA, M.M.; MOTA, R.A. Etiology, antimicrobial susceptibility profile of *Staphylococcus spp.* and risk factors associated with bovine mastitis in the states of Bahia and Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n.5, p.601-606, 2013.

KRIŽANOVIĆ, D.; SUŠIĆ, V.; BOŽIĆ, P.; ŠTOKOVIĆ, I.; EKERT-KABALIN, A. Changes of bovine blood lipid peroxides and some antioxidants in the course of growth. **Veterinarski Arhiv**, Zagreb, v. 78, n. 4, p. 269-278, 2008.

KROLL, M.H.; SCHAFER, A. Biochemical mechanism of platelet activation. **Blood**, v.74, p.1181-1989.

KRÖMKER, V1., PADUCH, JH., KLOCKE, D., FRIEDRICH, J., ZINKE, C. Efficacy of extended intramammary therapy to treat moderate and severe clinical mastitis in lactating dairy cows. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, v. 123, p.3-4:147-52. 2010.

KUMAR, A.; GYANENDRA SINGH, B. V.; MEUR, S. K. Modulation of antioxidant status and lipid peroxidation in erythrocyte by dietary supplementation during heat stress in buffaloes. **Livestock Science**, London, v. 138, p. 299–303, 2011.

LADEIRA, S. R. L. Mastite bovina. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.C.; LEMOS, R. A. A. **Doenças de Ruminantes e equinos**. São Paulo: Livraria Varela, 2001, v. 1, p. 294-307.

LANGE-CONSIGLIO, A.; SPELTA, C.; GARLAPPI, R.; LUINI, M.; CREMONESI, F. Intramammary administration of platelet concentrate as an unconventional therapy in bovine mastitis: First clinical application. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 10, 2014.

LANGE-CONSIGLIO, A.; CAZZANIGA, N.; GARLAPPI, R.; SPELTA, C.; POLLERA, C., PERRINI, C.; CREMONESI, F. Platelet concentrate in bovine reproduction: effects on in vitro embryo production and after intrauterine administration in repeat breeder cows. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 65-74, 2015.

LANGONI, H. Qualidade do Leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33(5), p. 620-626, 2013.

LANGONI, H. et al. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 12, p. 1059–1065, dez. 2011.

LANGONI, H.; SALINA, A.; OLIVEIRA, G.C.; JUNQUEIRA, N.B.; MENOZZI, B.D.; JOAQUIM, S.FH. Considerações sobre o tratamento das mastites. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 11, p. 1261–1269, 2017.

LANKFORD, C.E. Bacterial assimilation of iron. **Critical reviews in Microbiology**, v. 2, p.273-331, 1973.

LASSEN, E.D.; REBAR, A.; WEISER, G. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. 1ª ed. São Paulo: Roca, 2007. 582p.

LESLIE, K.E.; DINGWELL, R. Mastitis control: where are we and where are we going? In: KASKE, M.; SCHOLZ, H.; HOLTERSHINKEN, M. **Recent developments and perspectives in bovine medicine**. Tierärztliche Hochschule: Klinik für Rinderkrankheiten, 2002, p. 370–382.

LISMAN, T. Platelet–neutrophil interactions as drivers of inflammatory and thrombotic disease. **Cell and Tissue Research**, v. 371 (3), p. 567-576, 2018.

LIU, Z. L.; YANG, P.; CHEN, P.; WANG, W. X. D. D. M. Supplementation with selenium and vitamin E improves milk fat depression and fatty acid composition in dairy cows fed fat diet. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Seoul, v. 21, n. 6, p. 838-844, 2008.

LÓPEZ, C.; GIRALDO, C.; CARMONA, J. Evaluación de un método de doble centrifugación en tubo para concentrar plaquetas bovinas: estudio celular. **Archivos de medicina veterinaria**, v. 44, n. 2, p. 109–115, 2012.

MACHADO, L. P.; KOHAYAGAWA, A.; SAITO, M. E.; SILVEIRA, V.F. da; YONEZAWA, L. A. Lesão oxidativa eritrocitária e mecanismos antioxidantes de interesse em Medicina Veterinária. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 8, n. 1, p. 84-94, 2009.

MAIA, L.; SOUZA, M.V.; ALVES, G.E.S.; JÚNIOR, J. I.R.; OLIVEIRA, A.C.; ZANDIM, B. M.; YAMÊ, E.; SILVA, F.R.S. Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite induzida em equinos: avaliação ultra-sonográfica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29(3), p. 241-245, 2009.

MARINI, M. G. et al. Effects of platelet-rich plasma in a model of bovine endometrial inflammation in vitro. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 14, n. 1, p. 58, 13 dez. 2016.

MARQUES, A. P. L. Plasma rico em plaquetas: padronização da técnica para bovinos, atividade antimicrobiana in vitro contra *Staphylococcus aureus* e atividade na glândula mamária de vacas com mastite. 2014. 85f. Tese (Doutorado em Ciências, pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração Ciências Clínicas) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ. BRA.

MARQUES, A.P.L.; BOTTEON, R.C.C.M.; CORDEIRO, M.D.; MACHADO, C.H.; BOTTEON, P.T.L.; BARROS, J.P.N.; SPÍNDOLA, B.F. Padronização de técnica manual para obtenção de plasma rico em plaquetas de bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34(Supl.1), p.1-6, 2014.

MARTINS, R. P.; CUNHA NETO, A.; MARQUES, M. R. H. PRADO, R. Etiologia da mastite subclínica em vacas do rebanho de uma queijaria em Nossa Senhora do Livramento, MT. **Higiene Alimentar**, v. 20, n. 139, 2006, p. 104-409.

MARTINS, R. P.; DA SILVA, J. A. G.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; FILHO, E. S. A. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 1, p. 181-187, 2010.

MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; TECLES, F.; PARRA, M.D.; CERÓN, J.J. Proteínas de fase aguda: conceptos básicos y principales aplicaciones en medicina veterinaria. **Anales de Veterinaria**, v.17, p.99-103, 2001.

MARX, R.E. Platelet-rich plasma: evidence to suport its use. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.62, p.489-496, 2004.

MCDONALD, T. L.; LARSON, M. A.; MACK D. R.; WEBER A.. Elevated extrahepatic expression and secretion of mammary associated serum amyloid A 3 (M-SAA3) into colostrum. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 83, p. 203–211, 2001.

McMILLEN, M.A.; HURIBAL, M. Common pathway of endothelial-leukocyte interaction in shock, ischemia, and reperfusion. **American Journal of Surgery**, v.166, p.557-562, 1993.

MEDEIROS, M. I. M.; SOUZA, L. C. Associação de agentes patogênicos isolados em análise microbiológica da água, com a presença de mastite clínica ou subclínica, em vacas de propriedades leiteiras da Região de Cerqueira César-SP. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 2, p. 580-585, 2009.

MELLO, E.D.A; MELLO, G.P.S.; SILVA, L.A.; FREITAS, M.A.C. As bases biológicas do plasma rico em plaquetas. **Revista da Faculdade de Odontologia**, UPF, v.11, n.2, p.91-95, 2006.

MILLER, J.K.; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E.; MADSEN, F.C. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.2812-2823, 1993.

MIRA, C.S.; DELLA LIBERA, A.M.M.P.; SOUZA, F.N.; BLAGITZ, M.G. Correlação entre a contagem automática de células somáticas e a porcentagem de neutrófilos pela citometria de fluxo e pela técnica de citocentrifugação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.5, p.1403-1408, 2013.

MOREIRA, P.A.Z. Análise dos perfis bioquímicos, hematológicos e urinários na fase inicial da lactação em vacas holandesas preto e branco. 2016. 33f. Dissertação (Mestrado Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal), Universidade Federal do Paraná, PR. BRA.

MORETTI, P.; PROBO, M.; CANTONI, A.; PALTRINIERI, S.; GIORDANO, A. Fluctuation of neutrophil counts around parturition in Holstein dairy cows with and without retained placenta. **Research in Veterinary Science**, v. 107, n. 1, p. 207-212, 2016.

MORIN, D. E. Acute mastitis: revisiting the goals of therapy. Proceedings of the 23rd World Buiatrics Congress, Québec, Canadá, 11-16 Jul. 2004.

MOTA, R.A.; MEDEIROS, E.S.; SANTOS, M.V.; PINHEIRO JR, J.W; MOURA, A.P.B.L; COUTINHO, L.C.A. Participação dos Staphylococcus spp na etiologia das mastites em bovinos leiteiros no estado de Pernambuco (Brasil) **Ciência Animal Brasileira**, v.13, n.1, p. 124-130, 2012.

MULLIGAN, F.J.; DOHERTY, M.L. Production diseases of the transition cow. **The Veterinary Journal**, v.176, n.1, p.3-9, 2008.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **Veterinary Journal. London**, v. 168, n. 1, p. 28-40, 2004.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL - NMC. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection. 4.ed. Arlington, 2004. 46p.

NICKERSON, S. C. Bovine mammary gland: structure and function; relationship to milk production and immunity to mastitis. **Agri-practice**, v. 15, p. 8-18, 1994.

NIELSEN, B. H., JACOBSEN, S., ANDERSEN, P. H., NIEWOLD, T. A., HEEGAARD, P. M. H. Acute phase protein concentrations in serum and milk from healthy cows, cows with clinical mastitis and cows with extramammary inflammatory conditions. **Journal Veterinary Record**, v.154, p.361-3656, 2004.

NURDEN, AT. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2011;105(Suppl 1):S13–33. BLAIR P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. **Blood Rev**; v.23 p. (4):177–89. 2009.

OLIVEIRA, C.M.C.; SOUSA, M.G.S.; SILVA, N.S.; MENDONÇA, C.L.; SILVEIRA, J.A.S; OAIGEN, R.P.; ANDRADE, S.J.T.; BARBOSA, J.D. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.2, p.104-110, 2011.

OLIVEIRA, A. A.; MELO, C. B.; AZEVEDO, H. C. Diagnóstico e determinação microbiológica da mastite em rebanhos bovinos leiteiros nos Tabuleiros Costeiros de Sergipe. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 1, p. 226-230, 2009.

OLIVEIRA, E. J.; BIGNARDI, A. B.; VERCESSI FILHO, A. E.; PAZ, C. C. P.; CARDOSO, V. L.; FARO, L. Ocorrência da mastite clínica e fatores ambientais que favorecem sua incidência. **Boletim da Indústria Animal**, v.70, n.2, p.132-139, 2013.

OLIVEIRA, U, V.; GALVÃO, G.S.; PAIXÃO, A.R.R.; MUNHOZ, A.D. Ocorrência, etiologia infecciosa e fatores de risco associados à mastite bovina na microrregião Itabuna-Ilhéus, Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.11, n.3, p.630-640, 2010.

OLIVER, S. P.; SORDILLO, L. M. Udder health in the periparturient period. **Journal of Dairy Science**, v.71, n.9, p.2584-2606, 1988.

OLIVER, S.P.; LEWIS, T.M.; LEWIS, M.J.; DOWLEN, H.H.; MAKI, J.L. Persistence of antibiotics in bovine mammary secretions following intramammary infusion at cessation of milking. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 9, p. 301–311, 1990.

OLIVER, S.P.; GILLESPIE, B.E.; HEADRICK, S.J.; MOOREHEAD, H.; LUNN, P.; DOWLEN, H.H.; JONHSON, D.L.; LAMAR, K.C.; CHESTER, S.T.; MOSELEY, W.M. Efficacy of extended ceftiofur intramammary therapy for treatment of subclinical mastitis in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.2393-2400, 2004.

OLIVIERA, E.F. Análise espacial da contagem de células somáticas e prevalência de patógenos contagiosos da mastite em rebanhos leiteiros em Minas Gerais, Brasil. 2013. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados), Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, BRA.

ÖZGÜNER, M.F.; DELÝBAŞ N.; TAHAN V.; KOYU A.; KÖYLÜ H. Effects of industrial noise on the blood levels of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and malondialdehyde. **Eastern Journal Medicine**, v. 4, n.1, p.13-15, 1999.

PEREYRA, E. A. L.; DALLARD, B. E.; CALVINHO, L. F. Aspects of the innate immune response to intramammary *Staphylococcus aureus* infections in cattle. **Revista Argentina de microbiología**, v. 46, n. 4, p. 363–75, 2014.

PETERSEN, H. H.; NIELSEN, J. P.; HEEGAARD, P. M. H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research**, v. 35, p. 163-187, 2004.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **A strategy to combat mastitis**. Illinois: Brothers Co., 150p, 1991.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **Vencendo a luta contra a mastite**. Piracicaba: Westfalia Landtechnik do Brasil, 192P, 2002.

PIETRZAK, W.S.; AN, Y. H.; KANG, Q. K.; DEMOS, H. A.; EHRENS, K.H. Platelet-rich and platelet-poor plasma: development of an animal model to evaluate hemostatic efficacy. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 18, p.559-567, 2007.

PILZ, J.; MEINEKE, I.; GLEITER, C. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by highperformance liquid chromatography as the 2,4- dinitrophenylhydrazine derivative. **Journal of Chromatography B**. v. 742, p.315-325, 2000.

POL, M.; RUEGG, P. L. Treatment practices and quantification of antimicrobial drug usage in conventional and organic dairy farms in Wisconsin. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 249–261, 2007.

PYÖRÄLÄ, S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. **Veterinary Research**, v. 34, n. 1, p. 565–578, 2003

PYÖRÄLÄ, S. Mastitis in post-partum dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43 (Suppl. 2), p. 252–259, 2008.

PYÖRÄLÄ, S.; HOVINEN, M.; SIMOJOKI, H.; FITZPATRICK, J.; ECKERSALL, PD.; ORRO, T. Acute phase proteins in milk in naturally acquired bovine mastitis caused by different pathogens. **Veterinary Record**, v. 168, 535, 2011.

QUINN P.J., CARTER M.E., MARKEY B. & CARTER G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**. 4.ed. London: Wolfe, 1994, 648p.

RAJALA-SCHULTZ, P.J.; HOGAN, J.S.; SMITH, K.L. Short communication: association between milk yield at dry-off and probability of intramammary infections at calving. **Journal of Dairy Science**, v. 88, 577–579, 2005.

RAPACCI, M. **Tecnologia de leite**. Curitiba: PUCPR/Departamento de Engenharia de Alimentos, 2000.

REIS, S.R.; SILVA, N.; BRESCIA, M.V. Antibioticoterapia para controle da mastite subclínica de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, p.651-658, 2003.

REYES, J. F. F; URDANETA, A. G.; D'POOL, G.; LEAL, K. V.; CAGNASO, M. A.; ANGELOSANTE, G. Detección de mastitis subclínica en bovinos mestizos doble propósito ordeñados en forma manual o mecánica. Comparación de tres pruebas diagnósticas. **Revista Científica. Maracaibo**, v. 15, n. 2, p. 109-118, 2005.

RIBEIRO, M. E. R. Ocorrência de mastite causada por *Nocardia spp.* em rebanhos de unidades de produção leiteira no sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 12, n. 4, p. 471-473, 2006.

RIBEIRO, M.E.R.; PETRINI, L.A.; AITA, M.F.; BALBINOTTI, M.; STUMPF JÚNIOR W.; GOMES, J.F.; SCHRAMM, R.C.; MARTINS, P.R.; BARBOSA, R.S. Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na Região do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 9, p.287-290, 2003.

RIBEIRO, M.G., LANGONI, H., DOMINGUES, P.F. & PANTOJA, J.C.F. 2016. Mastite em animais domésticos, p.1155-1205. In: Megid J., Ribeiro M.G. & Paes A.C. (Eds), **Doenças Infecciosas em Animais de Produção e de Companhia**. Roca, Rio de Janeiro.

RIGBY, K.M.; DELEO, F.R. Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections. **Seminars in Immunopathology**, v. 34, n. 2 p. 237-259, 2012.

ROSENBERGER, G. **Exame clínico dos bovinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 329-341, 1993.

RUEGG, P. L. Investigation of mastitis problems on farms. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 19, p. 47-73, 2003.

SANTOS, M. V. Importância do período seco no controle da mastite. In: INTERLEITE – SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO INTENSIVA DE LEITE, 6, 2003. Piracicaba, SP. **Anais...** Piracicaba, SP: Milkpoint, v. 1, p. 136-148, 2003.

SANTOS, M. V. CMT – Fermenta para diagnóstico da mastite. **Inforleite**, p.32-34, julho 2013.a

SANTOS, M. V. Mastite bovina e o uso de antibióticos. **Mundo do Leite**, v. 61, p.18 - 20, 2013.b

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para o controle da mastite e melhoria da qualidade do leite**. São Paulo: Manole, 2007, 314p.

SANTOS, R. L.; BOTTEON, R.C.C.M.; BOTTEON, P.T.L.; LOPES, N.L. Peroxidação lipídica em cabras com anemia e doença respiratória tratadas com ferro por via parenteral. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 11, p. 1081–1084, 2014.

SARGEANT, J.M.; LESLIE, K.E.; SHIRLEY, J.E.; PULKRABEK, B.J.; LIM, G.H. Sensitivity and specificity of somatic cell count and *California Mastitis Test* for identifying intramammary infection in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n.9, p.2018-2024, 2001.

SAUT, J.P.E.; BIRGEL JUNIOR, E.H. Influência do período pós-parto sobre o leucograma de fêmeas bovinas da raça holandesa. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 5, p. 588-597, 2006.

SAUT, J.P.E.; BIRGEL JUNIOR, E.H. Variação dos constituintes do eritrograma em vacas holandesas no pós-parto. **Bioscience Journal**, v. 28, n.5, p.805-809, 2012.

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. D. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 130, p. 199-204, 1957.

SIM, A.S.; SALONIKAS, C.; NAIDOO, D.; WILCKEN, D.E.L. Improved method for plasma malondialdehyde measurement by high-performance liquid chromatography using methyl malondialdehyde as an internal standard. **Journal of Chromatography B**, v. 785, p.337-344, 2003.

SIMPLÍCIO, K.M.M.G.; SOUSA, F.C.; FAGLIARI, J.J.; SILVA, P.C. Proteinograma sérico, com ênfase em proteínas de fase aguda, de bovinos saudáveis e bovinos portadores de enfermidade aguda de ocorrência natural. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n.5, p.1339-1347, 2013.

SMITH, B.P. **Medicina interna de grandes animais**. São Paulo: Manole Ltda. p.1019-1022. 2006.

SMITH, K. L., J. H. HARRISON, D., D. HANCOCK, D., A. TODHUNTER, AND H. R. CONRAD. Effect of vitamin E and selenium supplementation on incidence of clinical mastitis and duration of clinical symptoms. **Journal Dairy Science**, v. 49 p.67-1293. 1984.

SOMMERHÄUSER, J.; KLOPPERT, B.; WOLTER, W.; ZSCHOCK, M.; SOBIRAJ, A.; FAILING, K. The epidemiology of Staphylococcus aureus infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. **Veterinary Microbiology**, v. 96, p. 91-102, 2003.

SONDERGAARD, E., SORENSEN, M.K.; MAO I.L.; JENSEN, J. Genetic parameters of production, feed intake, body weight, body composition, and udder health in lactating dairy cows. **Livestock Production Science**, v.77, p. 23-34, 2002.

SORDILLO, L. M. Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. **Livestock Production Science**, v. 98, n. 1-2, p. 89–99, 2005.

SORDILLO, L. M.; SHAFER-WEAVER, K.; DEROSA, D. Immunobiology of the mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 8, p. 1851–1865, 1997.

SORDILLO, L.M.; STREICHER, K.L. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 7, n.2, p.135-146, 2002.

SOUZA, G.N.; BRITO, J.R.F.; MOREIRA, E.C.; BRITO, M.A.V.P.; SILVA, M.V.G.B. Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n.5, p.1015-1020, 2009.

SVOBODA, M.; DRABEK, J.; KREJCI, J.; REJAKOVA, Z.; FALDYNA, M. Impairment of the peripheral lymphoid compartment in iron deficient piglets. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 5, n.1, p.231-237, 2004.

STEGHENS, J.P.; KAPPEL, A.L.V.; DENIS, I.; COLLOMBEL, C. Diaminonaphtalene, a new highly specific reagent for HPLC-UV measurement of total and free malondialdehyde in human plasma or serum. **Free Radical. Biol. Med.**, v. 31, n.2, p.242-249, 2001.

SWENSON, M.J. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 799p.

TARGOWSKI S.P. Role of immune factors in the protection of mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v. 66, p. 1781-1789, 1983.

THEODOROU, G.; DASKALOUPOULOU, M.; CHRONOPOULOU, R.; BALDI, A.; DELL'ORTO, V.; POLITIS, I. Acute mastitis induces upregulation of expression of plasminogen activator-related genes by blood monocytes and neutrophils in dairy ewes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 138, n. 1-2, p. 124- 128, 2010.

TIZARD, I.R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

TRUCHETTI, G., BOUCHARD, E., DESCÔTEAUX, L., SCHOLL, D., ROY JP. Efficacy of extended intramammary ceftiofur therapy against mild to moderate clinical mastitis in Holstein dairy cows: a randomized clinical trial. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 78, p. (1):31-7. 2014.

VANHOUDT, A. et al. Effects of reduced intramammary antimicrobial use during the dry period on udder health in Dutch dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 4, p. 3248–3260, abr. 2018.

VENDRAMIN, F.S.; FRANCO, D.; FRANCO, T.R. Método de obtenção do gel de plasma rico em plaquetas autólogo. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 24, n.2, p.212-218, 2009.

VENDRAMIN, F.S.; FRANCO, D.; NOGUEIRA, C.M.; PEREIRA, M.S.; FRANCO, T.R. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de obtenção e utilização em cirurgia plástica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias**, v. 33, n.1, p.24-28, 2006.

VIEIRA, B.C.R.; LORENZONI, L.S.; SOUZA, M.H.; ALFAIATE, M.B.; XAVIER, T.M.T. Etiologia infecciosa associada à mastite subclínica em bovinos de propriedades rurais no município de Alegre-ES. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia**, v. 9, n.16; p.1154-172, 2013.

VOLTOLINI, T.V.; SANTOS, J.T.; ZAMBOM, M.A.; RIBAS, N.P.; MÜLLER, E.E.; DAMASCENO, J.C.; ÍTAVO, L.C.V.; VEIGA, D.R. Influência dos estádios de lactação sobre a contagem de células somáticas do leite de vacas da raça holandesa e identificação de patógenos causadores de mastite no rebanho. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 4, p. 961-966, 2001.

WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. **Schalm's veterinary hematology**. 6 ed. Iowa: Blackwell Publishing Ltda. 2010, cap 75, pag 561-568.

WENZ, J. R.; BARRINGTON, G.M.; GARRY, F.B.; DINAMORE, R.P.; CALLAN, R.,J. Use of systemic disease signs to assess disease severity in dairy cows with acute coliform mastitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 218, p. 567-572, 2001.

WENZ, J. R.; FOX, L. K.; MULLER, F. J.; RINALDI, M.; ZENG, R.; BANNERMAN, D. Factors associated with concentrations of select cytokine and acute phase proteins in dairy cows with naturally occurring clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 93, No. 6, 2010.

WILDMAN, E.E., JONES, G.M., WAGNER, P.E.; BOMAN, R.L. A dairy body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. **Journal of Dairy Science**, v. 65(3), p. 495-501, 1982.

YUAN, T.; GUO, S. C.; HAN, P.; ZHANG, C. Q.; ZENG, B. F. Applications of leukocyte and platelet-rich plasma (L-PRP) in trauma surgery. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 13, n.7, p.1173-84, 2012.

ZAFALON, L. F.; FILHO, A. N.; OLIVEIRA, J. V.; RESENDE, F. D. Comportamento da condutividade elétrica e do conteúdo de cloretos do leite como métodos auxiliares de de cloretos do leite como métodos auxiliares de diagnóstico na mastite subclínica bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25(3), p.159-163, 2005.

ZAFALON, L. F.; ARCARO, J.R.P.; NADER FILHO, A.; FERREIRA, L.M.; CASTELANI, L.; BENVENUTTO, F. Investigação de perfis de resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados na ordenha de vacas em lactação. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v. 67, n.2, p. 118-125, 2008.

ZALAVARY, S.; GRENEGÅRD, M.; STENDAHL, O.; BENGTSSON, T. Platelets enhance FC- $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis and respiratory burst in neutrophils: the role. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 60, n.7, p.58-68, 1996.

ZARBOCK, A.; POLANOWSKA-GRABOWSKA, R. K.; LEY, K. Platelet-neutrophil-interactions: Linking hemostasis and inflammation. **Blood Reviews**, 2006. (In Press).

ZHAO, X.; LACASSE, P. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. **Journal of Animal Science**, v. 86, p.57- 65, 2008.