

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

TESE

**PLASMA RICO EM PLAQUETAS E MASTITE BOVINA:
PROTOCOLO DE OBTENÇÃO, ATIVIDADE *IN VITRO* E RESPOSTA
DA GLÂNDULA MAMÁRIA**

Ana Paula Lopes Marques

2014



**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 e mastite bovina: protocolo de obtenção,
atividade *in vitro* e resposta da glândula mamária**

ANA PAULA LOPES MARQUES

Sob a Orientação da Professora
Rita de Cássia Campbell Machado Botteon

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

Seropédica, RJ
Novembro de 2014

636.208969

6

M357p

T

Marques, Ana Paula Lopes, 1978-
Plasma rico em plaquetas e
mastite bovina: protocolo de
obtenção, atividade *in vitro* e
resposta da glândula mamária / Ana
Paula Lopes Marques - 2014.

83 f.: il.

Orientador: Rita de Cássia
Campbell Machado Botteon.

Tese (doutorado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro,
Curso de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária - Patologia e Ciências
Clínicas.

Bibliografia: f. 49-67.

1. Bovino - Doenças - Teses. 2.
Mastite - Tratamento - Teses. 3.
Terapia celular - Teses. 4. Plasma
sanguíneo - Teses. 5. Plaquetas
(sangue) - Teses. I. Botteon, Rita
de Cássia Campbell Machado, 1964-.
II. Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro. Curso de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária -
Patologia e Ciências Clínicas. III.
Título.

Dedicado a:

Meus pais: Paulo e Lineide Marques,

Pelo sorriso de vocês que sempre reluziu em cada vitória que alcancei mesmo com as dificuldades e renúncias para me conduzir por essa vida.

Sergio Torres,

Por representar o conforto em épocas de dificuldade, por ser um lugar em que a tempestade não alcança e por fazer o coração e a alma viverem em paz.

Rita Botteon,

Encontrar pessoas dignas de respeito e admiração sempre foi algo quase impossível e, eu ao buscar exemplos, encontrei você.

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, representando vida, coragem e força;
A *minha família*, sempre transmitindo os valores morais e amparando nas situações difíceis;
A *Olavo Rossatti*, um amigo sempre presente ao longo de tantos anos de caminhada;
A *Maria Clara Soares Pereira, Mônica Aparecida Soares e Rafael Monteiro*, nesses últimos anos se tornaram uma nova família e sempre conseguem entender minhas ausências;
Aos *amigos eternos de minha vida: Ilê Maria, Patrícia Ferreira, José Roza Neto e Phillippe Bauer*, não importa o momento, o carinho de vocês é fundamental em minhas conquistas;
A *Dona Marília Campbell* que junto a *Vanda* representam o carinho de mãe que todos desejam ter e cuidam tão bem de nós quando estamos tão longe de casa;
Ao *Prof. Paulo Botteon*, pelos conselhos, estatísticas, incentivos e seriedade profissional;
A *antiga amiga Janne Paula N. de Barros*, durante anos presente nas muitas histórias de dificuldades e vitórias e; a *nova amiga Bianca Pachiel Medeiros*, fundamentais para que esse trabalho acontecesse;
A *Ludmila Campana*, o convívio foi rápido, mas extremamente agradável e a amizade e o carinho deixados são verdadeiros e serão duradouros;
A *Osvanira Alves e Bruna Patrícia S. Raimundo*, pelas horas dedicadas a esse trabalho, pela confiança conquistada e principalmente pelo sorriso e amizade sinceros;
Ao *Prof. Carlos Henrique Machado*, amizade, carinho e conhecimento frequentes e A *Prof.^a Ângela Oliveira*, transmitindo ensinamentos, paz, carinho e respeito, sem vocês a realização desse trabalho não seria possível;
Ao *Prof. Fábio Scott*, que sempre mantém as porteiras da Fazenda do LQEPV/UFRRJ abertas a novas propostas e descobertas;
Aos novos amigos *Jéssica Davilla de Assis, Suellen e Betinho* pela possibilidade de desenvolver nossas atividades com o rebanho da UFRRJ e, *ao Antonio e Caio* pelo auxílio com os animais;
Edilton Campbell, Carlinhos e Riquinho, companheiros de bons momentos e de profissão sempre dispostos a nos receber no sítio Três Coqueiros em Fumaça, Resende;
Aos *Profs. Sergio Campos e Francisco de Assis Baroni*, orientando e auxiliando sempre;
Aos *Professores do PPGMV*, por transmitirem conhecimento profissional e pessoal;
Aos *grandes amigos: Isabella Manes, Bruno Spíndola, Simone Calado, Bruno Gonçalves, Gabriela Ferreira, João Emídio e Erica Bezerra de Mello* por nunca dizerem um “não” quando mais preciso de vocês; *Juliana Macedo, Andresa Guimarães e Matheus Dias Cordeiro*, que me auxiliaram com grandes sorrisos e nas horas mais imprescindíveis; *Edmar e Maninho*, novas amizades conquistadas pelo trabalho na Fazenda do LQEPV;
Aos *queridos Atahyde*, pelos consertos seguidos de um grande sorriso que tornam nossas vidas mais fáceis, *Lorena Florêncio de Oliveira*, nas soluções que rebatem as dificuldades do dia-a-dia e *Solano* por literalmente “segurar o touro [ou vacas] a unhas”;
E *tantos outros...* que fazem minha vida, minha profissão e meus dias mais agradáveis!

A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada.

Albert Einstein

RESUMO

MARQUES, Ana Paula Lopes. **Plasma rico em plaquetas e mastite bovina: protocolo de obtenção, atividade *in vitro* e resposta da glândula mamária.** 2014. 83p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária, Ciências Clínicas). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Objetivou-se padronizar uma técnica manual para a obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo em bovinos para uso na rotina clínica. O sangue (450 mL) de nove vacas foi separado em alíquotas para avaliar 8 protocolos de centrifugação dupla que variaram quanto a velocidade e o tempo de centrifugação. Todos os protocolos (P1 a P8) foram eficientes em concentrar plaquetas sendo P5 e P8 os que mais se destacaram na concentração de plaquetas ($890,53 \pm 277,14$ e $702,23 \pm 298,8$ % em relação ao sangue total) ($p > 0,05$). Ao se comparar com o P5, o P8 apresentou maior número de leucócitos e obteve maior concentração de TGF- β 1 ($2422,67 \pm 509,97$ pg/mL) ($p < 0,05$). Os protocolos P5 e P8 que apresentaram bons resultados foram utilizados para avaliar o efeito antibacteriano *in vitro* de PRP puro, plasma pobre em plaquetas (PPP), gel de PRP e PPP e plasma (P) contra uma cepa padrão de *S. aureus*. A maior atividade antimicrobiana foi observada para os géis de PRP de ambos os protocolos ($p > 0,05$), confirmando a importância da segunda centrifugação com maior velocidade e tempo e a ativação plaquetária para obtenção de melhores resultados. Nos ensaios *in vivo* a partir de aplicação intramamária de PRP em vacas com mastite subclínica houve efeito sistêmico, alterou-se hematimetria e ocorreu mobilização de leucócitos sanguíneos com consequente aumento das células somáticas, mas reduzido estresse oxidativo na glândula sugerindo atuação positiva do PRP como agente quimiotático de atividade deletéria nos tecidos reduzida.

Palavras chave: concentrado de plaquetas, fator de crescimento, TGF- β 1, terapia celular, efeito antimicrobiano

ABSTRACT

MARQUES, Ana Paula Lopes. **Platelet-rich plasma and bovine mastitis: obtaining protocol, *in vitro* antimicrobial activity and response of the mammary gland.** 2014. 83p. Thesis (Doctor Science in Veterinary Medicine, Clinical Sciences). Institute of Veterinary, Federal University of Rio de Janeiro, Seropédica, 2014.

Aimed to standardize a manual technique for obtaining autologous platelet-rich plasma (PRP) in cattle for use in clinical practice. Blood (450 mL) from nine cows was divided into aliquots for test eight protocols (double centrifugation) which varied as the speed and time of centrifugation. All protocols (P1 to P8) were efficient to concentrate platelets being P5 and P8 the most concentrated platelets (890.53 ± 277.14 and $702.23 \pm 298.8\%$ compared to whole blood) ($p > 0.05$). Comparing with the P5, P8 showed a higher number of leukocytes and obtained higher concentration of TGF- β 1 (2422.67 ± 509.97 pg/mL) ($p < 0.05$). Because of good results, protocols P5 and P8, were used to assess the antibacterial effect of pure PRP, platelet-poor plasma (PPP), PRP and PPP gel and plasma (P) against a standard strain of *S. aureus*. The highest antimicrobial activity was observed for PRP gels of both protocols ($p > 0.05$), confirming the importance of the second centrifugation with greater speed and time, and platelet activation to obtain better results. *In vivo* assays from intramammary application of PRP in cows with subclinical mastitis was observed systemic effect, has changed the red blood cells and was mobilizing blood leukocytes with consequent increase in somatic cells, but reduced oxidative stress in the gland suggesting positive actions of PRP as chemotactic agent and reduced deleterious activity in the tissues.

Keywords: platelet concentrate, growth factor, TGF- β 1, cell therapy, antimicrobial effect

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

°C - graus centígrados (Escala Celsius de temperatura)
AMPs - Peptídeos antimicrobianos
ASD - adenosina difosfato
CCS - Contagem de células somáticas
CD34+ - Tipo de célula mielóide progenitora pluripotente
CEUA - Comitê de ética no uso de animais
CHCM - Concentração de Hemoglobina Corpuscular média
CMT - California Mastitis Test
CP - Concentrado de plaquetas
CPDA-1 - citrato-fosfato-dextrose-adenina
CTGF - Fator de crescimento do tecido conjuntivo
DMCV - Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária
DMIV - Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária
DNA - ácido desoxirribonucléico
ECN - estafilococos coagulase negativa
ECP - estafilococos coagulase positiva
EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
EGF - Fator de crescimento epidermal
ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimático
ERO - Espécies reativas de oxigênio
ESALQ/USP - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/Universidade de São Paulo
EUA - Estados Unidos da América
FC - fatores de crescimento
FCP - fator de crescimento plaquetário
FGF - Fator de crescimento fibroblástico
fl - Fentolitros
FPI - Fração plasmática inferior
FPS - Fração plasmática superior
G - Calibre das agulhas hipodérmicas (sistema inglês em polegadas)
g - grama
g/dL - grama por decilitro
GC - Gluconato de cálcio
HCM - Hemoglobina Corpuscular média
Hm - Hematimetria, hemácias, eritrócitos
IFN - interferons
IGF - Fator de crescimento semelhante à insulina
IL - Interleucina
kDa - Quilodaltons
LC - Capa leucocitária
LPC - Laboratório de Pesquisas Clínicas
LPS - Lipopolissacarídeos
LQEPV - Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária
MDA - malondialdeído
min. - minuto
MKs - Megacariócitos
mL - Mililitros
mm - milímetros

mm² - milímetro quadrado (medida de área)
mMol/g Hb - miliMol por grama de hemoglobina
n. ou n^o - número
nm - Nanômetro
P - plasma
PBS - Tampão fosfato-salino
PDGF - Fator de crescimento derivado de plaqueta
PF - Fator plaquetário
pg/mL - Picogramas por mililitro
PMN - Polimorfonuclear(es)
PPP - Plasma pobre em plaquetas
PRP - Plasma rico em plaquetas
rpm - Rotações por minuto
SFM - sistema fagocítico mononuclear
TBA - ácido tiobarbitúrico
TBARS - Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA - ácido tricloroacético
TGF- Fator de transformação
TNF - Fator de necrose tumoral
tPMP - Proteínas induzidas por trombina
UFC - Unidades formadoras de colônia
UFRRJ - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
UV - raios ultravioletas
VCM - Volume Corpuscular Médio
VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial
WMT - Wisconsin Mastitis Test
x g - força gravitacional em centrifugações
μL – microlitros

LISTAS DE FIGURAS

- Figura 01. Representação didática da ativação plaquetária pela trombina (estímulo agonista) com emissão de pseudópodos e liberação dos fatores de crescimento. Fonte: Pereira (2012), Adaptado de Everts et al. (2006). 03
- Figura 02. Vacas da raça Red Angus da fazenda do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV), UFRRJ, utilizadas na padronização do PRP. 13
- Figura 03. A: Os tubos de número 1 representam a primeira fração de plasma (FPS e FPI) obtida durante a 1ª centrifugação. O tubo de número 2 representa as frações de PRP e PPP obtidas após centrifugação das FPIs dos tubos iniciais. B: tubos com a primeira fração do plasma. C: PRP e PPP. 16
- Figura 04. A: *Multiskan* para leitura de ELISA conectada a notebook para posterior análise dos dados (Laboratório de Pesquisas Clínicas, UFRRJ). B: placa de ELISA evidenciando a cor amarela resultante anteriormente lida a 450 nm (absorção diretamente proporcional ao nível de TGF- β 1 na amostra). 17
- Figura 05. Tubo após a segunda centrifugação. PPP: plasma pobre em plaquetas; PRP: plasma rico em plaquetas. 18
- Figura 06. Caldo Casoy. À esquerda turbidez pelo crescimento bacteriano; à direita límpido, sem inoculação. 19
- Figura 07. Microscopia óptica (objetiva de 40x) evidenciando cocos Gram positivos (coloração de Gram) característicos de *S. aureus*. 20
- Figura 08. Crescimento de *S. aureus* e presença de β -hemólise em ágar sangue de carneiro a 8% após incubação a 37° por 24 horas. 20
- Figura 09. Concentração de plaquetas nos diferentes protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas de bovino em relação ao sangue total. 28
- Figura 10. Crescimento microbiano (UFC/mL - Log10) de *Staphylococcus aureus* em relação aos tratamentos com plasma rico em plaquetas (PRP), plasma rico em plaquetas ativado com gluconato de cálcio (PRPA), plasma pobre em plaquetas (PPP), plasma pobre em plaquetas ativado (PPPA) em dois protocolos (5 e 8), plasma (P) e controle positivo (CT+) em diferentes tempos. 32
- Figura 11. Unidades formadoras de colônia observadas nas placas de Petri contendo meio ágar padrão para contagem (APC), em duplicata, referentes ao plaqueamento da primeira hora do PRP5A (caldo + cultura + PRP5 + gluconato de Ca); controle positivo (caldo + cultura + salina) (CT+) e PRP8A (caldo + cultura + PRP8 + gluconato de Ca), na diluição 1:10.000. 33
- Figura 12. Crescimento de *S. aureus* após 1, 2, 6 e 12 horas de incubação com plasma rico em plaquetas ativado com gluconato de cálcio (PRPA, protocolos 5 e 8). CT+: caldo + cultura + salina. 35

| | |
|---|----|
| Figura 13. Leucometria global (células/ μ L) em T0 (antes do tratamento), T2, T6, T24, T48 (2, 6, 24 e 48 horas, respectivamente) após a aplicação intramamária do plasma rico em plaquetas (PRP). | 36 |
| Figura 14. TBARS (mMol/g Hb) do sangue em T0 (antes do tratamento), T2, T6, T24, T48 (2, 6, 24 e 48 horas, respectivamente) após a aplicação intramamária do plasma rico em plaquetas (PRP). | 38 |
| Figura 15. Contagem de células somáticas (CCS) em Log_2 do leite em T0 (antes do tratamento), T24 e T48 (24 e 48 horas, respectivamente) após a aplicação intramamária do plasma rico em plaquetas (PRP) e soro. Letras diferentes indicam diferença estatística a 95% de significância (Anova medidas repetidas). | 39 |
| Figura 16. CMT (escores) dos quartos mamários em T0 (antes do tratamento), T24 e T48 (24 e 48 horas, respectivamente) após a aplicação intramamária do plasma rico em plaquetas (PRP) e soro. Grupos e tempos sem diferença estatística a 95% de significância. | 40 |
| Figura 17. Malondialdeído (MDA - ppb) mensurado no leite em T0 (antes do tratamento), T24 e T48 (24 e 48 horas, respectivamente) após a aplicação intramamária do plasma rico em plaquetas (PRP) e soro. Letras diferentes indicam diferença estatística a 95% de significância. | 41 |
| Figura 18. Linfócitos (Log_2) quantificados no leite em T0 (antes do tratamento), T24 e T48 (24 e 48 horas, respectivamente) após a aplicação intramamária do plasma rico em plaquetas (PRP) e soro. * diferentes a 95% de significância. | 45 |
| Figura 19. Neutrófilos (Log_2) quantificados no leite em T0 (antes do tratamento), T24 e T48 (24 e 48 horas, respectivamente) após a aplicação intramamária do plasma rico em plaquetas (PRP) e soro. * diferentes a 95% de significância. | 45 |
| Figura 20. Macrófagos (Log_2) quantificados no leite em T0 (antes do tratamento), T24 e T48 (24 e 48 horas, respectivamente) após a aplicação intramamária do plasma rico em plaquetas (PRP) e soro. * diferente de ** a 95% de significância. | 46 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 01. Escore de Condição Corporal (ECC) de acordo com critérios sugeridos por Nicholson e Butterworth (1986) para gado de corte. | 14 |
| Tabela 02. Protocolos de dupla centrifugação utilizados para padronização do plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo bovino. | 15 |
| Tabela 03. Constituição dos grupos de plasma rico em plaquetas (PRP), plasma pobre em plaquetas (PPP) e plasma (P) para ensaios in vitro contra a cepa CCCD S008 similar a ATCC 6538P de <i>Staphylococcus aureus</i> . | 21 |
| Tabela 04. Escore de Condição Corporal (ECC) de acordo com critérios sugeridos por Wildman et al. (1982) e Edmonson et al. (1989) para gado de leite. | 22 |
| Tabela 05. Quantificação de plaquetas, eritrócitos e leucócitos no sangue total e nos oito protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas autólogo de bovinos (média \pm desvio padrão). | 28 |
| Tabela 06. Concentração de plaquetas, eritrócitos, leucócitos e TGF- β 1 em 8 protocolos de plasma rico em plaquetas autólogo de bovino. | 29 |
| Tabela 07. Parâmetros hematológicos (média \pm desvio padrão) em vacas antes (T0) e após a aplicação intramamária de plasma rico em plaquetas e soro. | 36 |
| Tabela 08. Média \pm desvio padrão da composição (% m/m) do leite em T0 (antes do tratamento), T24 e T48 (24 e 48 horas, respectivamente) após a aplicação intramamária de plasma rico em plaquetas (PRP) e soro em vacas com mastite subclínica. | 39 |
| Tabela 09. Média \pm desvio padrão da contagem de células somáticas (CCS – Log base 2) do leite em T0 (antes do tratamento), T24, T48 (24 e 48 horas, respectivamente) após a aplicação intramamária de plasma rico em plaquetas (PRP) e soro em vacas com mastite subclínica. | 40 |
| Tabela 10. Média \pm desvio padrão dos valores de malondialdeído (MDA) do leite em T0 (antes do tratamento), T24, T48 (24 e 48 horas, respectivamente) após a aplicação intramamária de plasma rico em plaquetas (PRP) e soro em vacas com mastite subclínica. | 42 |
| Tabela 11. Coeficiente de correlação de Pearson entre a contagem de células somáticas, (CCS) e malondialdeído (MDA) no leite de vacas com mastite subclínica em T0 (antes do tratamento), T24 e T48 (24 e 48 horas, respectivamente) após a aplicação intramamária de plasma rico em plaquetas (PRP) e soro. | 42 |
| Tabela 12. Média \pm desvio padrão (Log 2) da celularidade do leite em lâminas em T0 (antes do tratamento), T24 e T48 (24 e 48 horas, respectivamente) após a aplicação intramamária de plasma rico em plaquetas (PRP) e soro em vacas com mastite subclínica. | 44 |

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| RESUMO | vii |
| ABSTRACT | viii |
| LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS | ix |
| LISTAS DE FIGURAS | xi |
| LISTA DE TABELAS | xiii |
| SUMÁRIO..... | xiv |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 2 |
| 2.1 Plaquetas..... | 2 |
| 2.2 Plasma rico em plaquetas | 3 |
| 2.2.1 Conceitos | 3 |
| 2.2.2 Métodos de obtenção | 4 |
| 2.2.3 Aplicações na prática clínico-cirúrgica | 5 |
| 2.3 Citocinas e fatores de crescimento | 6 |
| 2.4 Atividade antibacteriana das plaquetas e do plasma rico em plaquetas | 8 |
| 2.5 Mastite | 9 |
| 2.5.1. Definição e importância..... | 9 |
| 2.5.2. Etiologia | 9 |
| 2.5.3. Diagnóstico e tratamento | 10 |
| 2.6 Mecanismos de defesa da glândula mamária | 10 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS..... | 13 |
| 3.1 Padronização de protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas de bovinos | 13 |
| 3.1.1 Local e animais | 13 |
| 3.1.2 Avaliação hematológica | 13 |
| 3.1.3 Avaliação clínica e escore de condição corporal..... | 14 |
| 3.1.4 Protocolos utilizados | 15 |
| 3.1.5 Plaquetas, hemácias, leucócitos e TGF- β 1 | 16 |
| 3.1.6 Análises estatísticas | 17 |
| 3.2 Atividade <i>in vitro</i> de plasma rico em plaquetas, plasma pobre em plaquetas e plasma de bovinos contra <i>S. aureus</i> | 18 |
| 3.2.1 Local e animais | 18 |
| 3.2.2 Obtenção do plasma, plasma rico em plaquetas e plasma pobre em plaquetas..... | 18 |
| 3.2.3 Ensaio antibacteriano..... | 19 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.2.4 | Análise estatística | 21 |
| 3.3 | Ensaio <i>in vivo</i> : aplicação intramamária de plasma rico em plaquetas em vacas com mastite subclínica | 22 |
| 3.3.1 | Local e animais | 22 |
| 3.3.2 | Seleção dos animais | 22 |
| 3.3.3 | Diagnóstico de mastite e formação dos grupos | 23 |
| 3.3.4 | Obtenção e aplicação do plasma rico em plaquetas | 23 |
| 3.3.5 | Sangue | 24 |
| A) | Hemogramas | 24 |
| B) | Peroxidação lipídica - Ensaio TBARS | 24 |
| 3.3.6 | Leite | 25 |
| A) | Contagem de células somáticas e composição | 25 |
| B) | Contagem diferencial de células | 25 |
| C) | Formação de malondialdeído | 25 |
| 3.3.7 | Análise estatística | 26 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 27 |
| 4.1 | Padronização de protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas de bovino | 27 |
| 4.2 | Atividade <i>in vitro</i> de plasma rico em plaquetas, plasma pobre em plaquetas e plasma de bovinos contra <i>S. aureus</i> | 31 |
| 4.2.1 | Procedimento | 31 |
| 4.2.2 | Atividade <i>in vitro</i> dos componentes do sangue contra <i>S. aureus</i> | 31 |
| 4.3 | Ensaio <i>in vivo</i> : aplicação intramamária de plasma rico em plaquetas em vacas com mastite subclínica | 35 |
| 4.3.1 | Sangue | 35 |
| 4.3.2 | Leite | 38 |
| 5 | CONCLUSÕES | 48 |
| 6 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 49 |
| | ANEXOS | 68 |

1 INTRODUÇÃO

O plasma rico em plaquetas (PRP) é obtido a partir do sangue total por meio de uma ou duas centrifugações, sendo o produto final um pequeno volume de plasma com elevado número de plaquetas e fatores de crescimento (FC) com propriedades antibacterianas, regenerativas, anti e pró-inflamatórias.

São descritos diversos protocolos para obtenção do PRP em diversas espécies. Os protocolos diferem em número, tempo e velocidade de centrifugação. O volume da amostra inicial de sangue e os tipos de tubos coletores e anticoagulantes utilizados também são diferentes para cada método. Independente do método, o PRP contém diferentes concentrações de leucócitos e eritrócitos, que podem influenciar no resultado final do tratamento proposto. Preconiza-se que cada espécie deve ter um protocolo que se adeque às suas características individuais. Contudo, mesmo na medicina humana em que o PRP é utilizado mais intensivamente, ainda não há consenso em relação aos valores adequados para se classificar o PRP, o que torna difícil a avaliação e comparação de resultados.

Apesar dos benefícios demonstrados até o presente momento, são escassos os estudos sobre a obtenção e uso de PRP para fins terapêuticos em bovinos. Como em outras espécies, clínica ou experimentalmente, existe um grande número de possibilidades para emprego do PRP nesta espécie. Na pecuária leiteira a mastite é uma das afecções de maior importância econômica, proporcionando prejuízos diretos e indiretos aos produtores de leite e a indústria. A etiologia da mastite é multifatorial e inúmeros microrganismos podem estar envolvidos, sendo o *Staphylococcus aureus* um dos agentes de maior prevalência. A alta prevalência de *S. aureus* está relacionada ao seu poder de se estabelecer nos tecidos da glândula mamária, formando focos encapsulados profundos e de difícil acesso aos antibióticos, bem como de subverter os mecanismos de imunidade do hospedeiro. A capacidade de desenvolver resistência aos antimicrobianos é um fator adicional desse agente.

Nesse contexto, foi proposto nesse estudo: 1) padronizar um protocolo para obtenção de PRP bovino autólogo, de fácil execução pelo método manual, com boa capacidade de concentrar plaquetas e reduzida contaminação com leucócitos e eritrócitos; 2) avaliar a atividade *in vitro* do PRP com melhores resultados contra uma cepa padrão de *S. aureus*; 3) testar a aplicação intramamária de PRP autólogo em vacas com mastite subclínica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plaquetas

Plaquetas são fragmentos derivados do citoplasma de grandes células multinucleadas situadas na medula óssea, os megacariócitos (MKs) que se desenvolvem a partir de células mielóides progenitoras pluripotentes CD34+ que residem no tecido hematopoiético e na corrente sanguínea. As plaquetas surgem da fragmentação do citoplasma dos MKs, sendo liberadas diretamente na corrente sanguínea, ao redor do espaço hematopoiético medular. A produção de plaquetas é estimulada e regulada por citocinas, principalmente as interleucinas (1, 3, 6 e 11) e pelo hormônio trombopoetina (LEVEN, 2000) que regula o desenvolvimento dos MKs e a liberação das plaquetas (REBAR et al., 2003).

As plaquetas de mamíferos possuem em seu citoplasma três tipos de grânulos: alfa, lisossomais e densos. Os grânulos alfa contêm fatores de crescimento (FC), fatores de coagulação, citocinas e proteínas de adesão. Os grânulos densos armazenam serotonina, cálcio, fósforo, ASD (adenosina difosfato) e ATP (adenosina trifosfato). O ASD induz a migração plaquetária e em combinação com a serotonina produz contração de artérias lesionadas. Os grânulos lisossomais possuem hidrolases, guanina, fosfolipases e cinases, enzimas com ações hidrolíticas e proteolíticas (WEISS; WARDROP, 2010).

Outras moléculas como albumina, fibrinogênio, fibronectina, fator V, Va e fator de Von Willebrand estão contidas nos grânulos alfa, porém não são específicas das plaquetas (ANITUA, 1999). Esses e outros componentes são importantes às funções das plaquetas desde a formação de trombos e síntese da matriz extracelular durante a cicatrização até a modulação da inflamação (WEISS; WARDROP, 2010).

A maioria das plaquetas (80%) se encontra na circulação e o restante fica armazenado no baço, com movimentação livre entre estes dois compartimentos (ZAGO et al., 2001). No sangue dos bovinos a concentração de plaquetas varia entre 160.000 e 650.000 por μL . Quando senis, as plaquetas são retiradas da circulação pelo sistema fagocítico mononuclear (SFM) após uma vida média de aproximadamente 10 dias (WEISS; WARDROP, 2010).

Em condições fisiológicas as plaquetas circulam num estado quiescente, protegidas de ativação prematura. Disfunção endotelial e alterações na liberação de fatores antiplaquetários podem levar ao aumento da ativação das plaquetas e interação com neutrófilos e monócitos (GACHET, 2005). A interação com neutrófilos promove o recrutamento de mais neutrófilos e outros leucócitos e, a ativação da produção de citocinas (FREYMILLER; AGHALOO, 2004).

Além de atuar no processo de hemostasia, cicatrização de feridas e reepitelização, as plaquetas secretam uma série de polipetídeos, denominados genericamente fatores de crescimento (FREYMILLER; AGHALOO, 2004). Estes fatores promovem a potencialização da quimiotaxia, proliferação, diferenciação e secreção celular (FOSTER et al., 2009), além de estimular a angiogênese e a proliferação de fibroblastos, que por sua vez proporcionam um aumento na síntese de colágeno (MARX, 2004).

Ao serem ativadas, as plaquetas mudam sua forma e apresentam projeções membranosas a partir da sua superfície, os pseudópodos (HOFFBRAND et al., 2004), responsáveis pela agregação plaquetária liberando todas as suas organelas e componentes para o tecido (Figura 01) (WEISS; WARDROP, 2010).

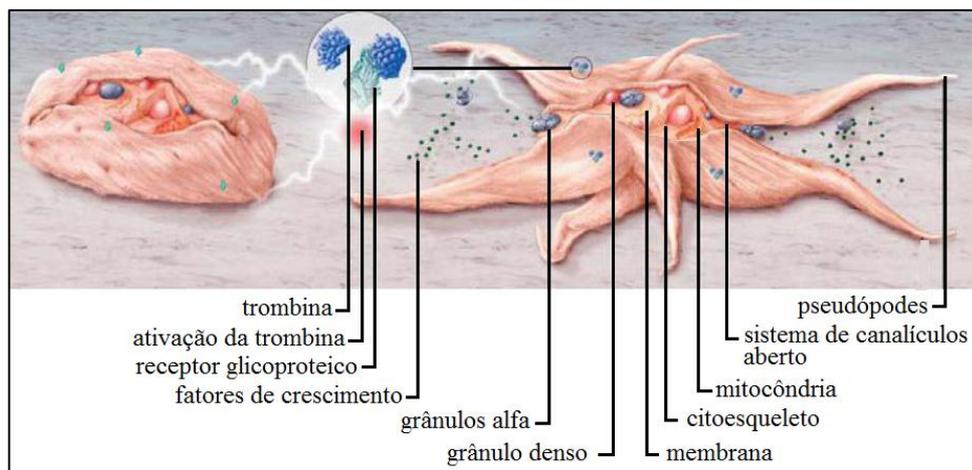


Figura 01. Representação didática da ativação plaquetária pela trombina (estímulo agonista) com emissão de pseudópodos e liberação dos fatores de crescimento. Fonte: Pereira (2012), Adaptado de Everts et al. (2006).

2.2 Plasma rico em plaquetas

2.2.1 Conceitos

O PRP apresenta diversas definições na medicina e odontologia humanas: concentrado de plaquetas (CP), plasma rico em fatores de crescimento, plasma enriquecido em plaquetas ou gel de plaquetas (WHITMAN et al., 1997, MARX et al. 1998). Mais precisamente, o PRP ou plasma enriquecido em plaquetas seria obtido a partir de uma centrifugação leve do sangue total, se novamente centrifugado, desta vez em alta rotação, originaria o CP (BRASIL 2010) e, após a adição de trombina ou gluconato de cálcio ao PRP ou CP, resultando na gelificação destes, originaria o gel de PRP (EFEOGLU et al., 2004). Usualmente, o termo PRP se refere a um hemocomponente autólogo obtido a partir da centrifugação do sangue total contendo um elevado número de plaquetas e FC em um pequeno volume de plasma (VENDRAMIN et al., 2006).

O PRP é uma fonte autógena, atóxica e não imunogênica que apresenta em sua constituição elevada concentração de plaquetas e outros compostos bioativos, os quais desempenham um papel importante em processos de 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 diversas espécies animais.

Conforme Sheth et al. (2012) não há ainda uma padronização do PRP humano e dependendo de como o PRP é produzido ele pode ter ações distintas, desde estimular até reduzir a cicatrização. As diferenças obtidas em cada metodologia dificultam a comparação dos efeitos entre diferentes estudos e limitam seu uso na prática clínica. Genericamente o PRP deve apresentar em sua composição elevado número de plaquetas íntegras e baixas concentrações de leucócitos e eritrócitos. A qualidade do PRP é mensurada pela capacidade de concentração de plaquetas e FC. Para humanos, Whitlow et al. (2008) consideram que um bom PRP deve apresentar de três a cinco vezes mais plaquetas que o sangue total. Marx et al. (1998), Weibrich et al. (2002) e Lemos (2002) consideram ser necessária uma concentração superior a um milhão de plaquetas/ μL .

Quanto à presença e quantidade de leucócitos no PRP humano, Ruggeri (1997) e Marx; Garg (1999) consideram que as células brancas conferem ao PRP resistência natural aos processos infecciosos e/ou alérgicos, melhorando as expectativas dos tratamentos, uma

vez que a principal função do sistema de defesa do organismo é a proteção contra microrganismos e substâncias estranhas.

O PRP deve ser sempre autólogo devido ao risco de rejeição. O sangue a ser utilizado deve ser colhido de maneira asséptica. A manipulação do sangue durante a centrifugação deve ser realizada de forma cuidadosa e em rotação adequada para assegurar a separação das plaquetas e evitar ruptura ou danos à sua membrana (TOSTES et al., 2008).

Em experimentos realizados com humanos e equinos, trombina bovina (SANCHEZ et al., 2003), gluconato de cálcio (CARMONA, 2006), cloreto de cálcio (MAIA et al., 2009) e trombina autóloga (VENDRAMIN et al., 2009) são as substâncias utilizadas para ativação de plaquetas, conhecidas como agonistas e desencadeando seus efeitos por meio da interação com receptores localizados na membrana plasmática das plaquetas (BLOCKMANS et al., 1995).

A liberação adequada de FC no local da lesão depende da ativação das plaquetas que deve acontecer próximo ao momento da aplicação terapêutica como proposto por Maia et al., (2009) em equinos. A liberação dos FC se inicia aproximadamente dez minutos após a ativação plaquetária (SALDALAMACCHIA, 2004) com 70% dos FC liberados nos primeiros dez minutos chegando a 100% na primeira hora (MARX, 2000) e as plaquetas continuam a sintetizar e a secretar proteínas adicionais até a sua morte (5 a 10 dias) nos estudos feitos com PRP humanos.

2.2.2 Métodos de obtenção

O PRP pode ser obtido por uma (MACEDO, 2004; MESSORA et al., 2009) ou duas centrifugações do sangue (VENDRAMIN et al., 2006; CARMONA et al., 2007; BARBOSA et al., 2008; LÓPEZ et al., 2012), utilizando-se preferencialmente o citrato de sódio como anticoagulante, em velocidade baixa, de modo a sedimentarem-se as hemácias e manterem-se os leucócitos e grande número de plaquetas em condição de liberar os FC, em pequeno volume de plasma (DUSSE et al., 2008). A centrifugação deve ser precisa e cuidadosa mantendo altas concentrações de plaquetas íntegras, pois se as plaquetas se romperem liberando os FC antecipadamente, a ação terapêutica do PRP será prejudicada (MARX, 2004). Outras medidas para evitar a ativação prematura das plaquetas incluem adequada contenção dos animais e utilização de vasos calibrosos para coleta de sangue (LÓPEZ et al., 2012).

Atualmente os protocolos de dupla centrifugação são os mais utilizados em diversas espécies. Na primeira centrifugação o sangue se separa em três camadas. As hemácias por terem peso maior, se depositam na camada inferior do tubo. Na região intermediária encontra-se a “zona de névoa”, uma camada fina esbranquiçada contendo leucócitos e algumas plaquetas maiores, e acima, a camada constituída pelo o plasma com as plaquetas difusamente distribuídas. Na centrifugação dupla, após o descarte das hemácias, a segunda centrifugação resulta na deposição das plaquetas no fundo (VENDRAMIN, et al., 2006).

As primeiras formas de extração do PRP autólogo empregavam grandes equipamentos de autotransusão para fazer a separação celular (JAMESON, 2007), com necessidade de grandes amostras de sangue chegando a 500 mL e supervisão de um profissional experiente (VENDRAMIN et al., 2006). Alguns equipamentos automáticos menos sofisticados foram propostos (ROUKIS et al., 2006), mas com custo elevado restringindo o emprego do PRP (ROSSI JÚNIOR; SOUZA FILHO, 2004). Com a finalidade de simplificar o método foram desenvolvidos protocolos utilizando aparelhos mais simples que obtinham em torno de 7 a 10 mL de PRP a partir de 50 a 60 mL de sangue retirado através de punção venosa periférica (KEYVY; JACOBSON, 2004). Para reduzir gastos, novos protocolos foram criados utilizando-se centrífugas convencionais (EFEOGLU et al., 2004).

Atualmente existem três métodos para obtenção de PRP: automático, semiautomático e manual. Todas as técnicas apresentam vantagens e inconvenientes, e segundo Vendruscolo et al. (2012), para equinos ainda não foi desenvolvido um método ideal e padronizado para obtenção do concentrado de plaquetas e FC.

O método automático tem como vantagem a eficiência em concentrar plaquetas com bom índice de FC (WEIBRICH et al., 2002) e menor risco de contaminação bacteriana durante a preparação, pois é realizado por aférese em equipamento específico e por profissional capacitado. Um grande volume de sangue (> 450 mL) é exigido em comparação com outras técnicas descritas e, associado ao custo pela tecnologia empregada, o método automático não é usado em pequenas clínicas (WHITMAN et al., 1997; MARX et al., 1998; WEIBRICH et al., 2002) ficando restrito a institutos de transfusão de sangue e ambientes hospitalares (SUTTER et al., 2004).

O método semiautomático tem como vantagem em relação ao método manual concentrar um maior número de plaquetas e FC (CARMONA et al., 2007) sendo o risco de contaminação bacteriana maior que no automático e menor que no manual (WEIBRICH et al., 2005). Apresenta um maior número de leucócitos quando comparado ao automático e maior investimento necessário se comparado ao manual (ZIMMERMANN et al., 2003; WEIBRICH et al., 2003; EPPLEY et al., 2004).

O método manual é o mais simples e com menor custo. Exige uma rigorosa assepsia para evitar a contaminação bacteriana. A desvantagem em relação aos outros métodos é a menor concentração de plaquetas e FC, mas a possibilidade de ser realizado em ambiente laboratorial (WEIBRICH et al., 2005) ou a campo utilizando uma centrífuga convencional, permite a obtenção do PRP com menor custo (VENDRAMIN et al., 2006) e consequentemente maior aplicabilidade em medicina veterinária.

Independentemente do protocolo utilizado, este deve aumentar a contagem plaquetária em uma concentração bem acima da encontrada no sangue total, preservando a estrutura e a função das plaquetas (LÓPEZ et al., 2012).

2.2.3 Aplicações na prática clínico-cirúrgica

O uso terapêutico do PRP teve início em odontologia humana sob a forma de gel de plaquetas em substituição a cola de fibrina autóloga, anteriormente utilizada para fixar enxertos ósseos e melhorar a hemostasia no local das cirurgias (MATRAS, 1982).

O PRP tornou-se popular na cirurgia oral e maxilofacial após Marx et al. (1998) demonstrarem que a combinação de PRP com o osso autógeno em defeitos ósseos mandibulares resultou em uma maturação radiográfica mais rápida e uma histomorfometria mais densa do osso. O tempo de preparação (três dias), o alto custo, a ocorrência de reações alérgicas e infecciosas em pacientes humanos resultaram na queda da sua utilização em cirurgias (WHITMAN et al., 1997).

Desde então, a maioria das pesquisas evidencia o efeito benéfico na regeneração óssea e tecidual, quando o PRP é utilizado em cirurgias periodontais e maxilofaciais (WHITMAN et al., 1997; MARX et al., 1998; ANITUA, 1999; MARX, 2004; ROSSI JÚNIOR et al., 2008), em cirurgias plásticas (VENDRAMIN et al., 2006, VENDRAMIN et al., 2009), como adjuvante nos tratamentos de osteoartrites (SANCHEZ et al., 2012), de lesões tendíneas (ANITUA et al., 2007), úlceras cutâneas crônicas (VENDRAMIN et al., 2006) e úlceras córneas (ROUKIS et al., 2006). Por outro lado, Aghaloo et al. (2002) em cirurgias de defeitos ósseos craniais e Bauer et al. (2009) em feridas experimentais em ratos não encontraram melhorias significativas com a utilização de PRP.

Em cães o uso de PRP está se popularizando na cirurgia ortopédica (BARBOSA et al., 2008; SILVA et al., 2011) e equinos nos tratamentos de afecções locomotoras crônicas

(CARMONA et al., 2009a, CARMONA et al., 2009b), traumatismos (LÓPEZ et al., 2010), feridas (CARTER et al., 2003; DE ROSSI et al., 2009, CARMONA; LÓPEZ, 2011), lesões ósseas (CARMONA et al., 2007; CARMONA; LÓPEZ, 2011), tendíneas (MAIA et al., 2009; YAMADA et al., 2011) e articulares (CARMONA et al., 2007).

Em bovinos, até o momento, os trabalhos sobre plaquetas envolvem alterações na coagulação (SEARCY et al., 1990), investigações sobre endotoxemia (DOHMEN et al., 2000; WITTEK et al., 2004) e celularidade (LÓPEZ et al., 2012), não sendo localizados trabalhos científicos abordando o uso clínico de PRP autólogo nesta espécie.

2.3 Citocinas e fatores de crescimento

Citocinas são polipeptídios ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, variando entre 8 e 30 kDa (quilodaltons) que regulam reações imunológicas e inflamatórias. São produzidas por diversos tipos de células no local da lesão e por células do sistema imunológico por meio da ativação de proteinoquinas (OLIVEIRA et al., 2011).

As citocinas são responsáveis pela produção, estimulação e diferenciação de múltiplos tipos celulares, bem como pela produção de outras citocinas. Não são armazenadas como moléculas pré-formadas e atuam por mecanismos parácrino (em células vizinhas) e autócrino (nas próprias células produtoras) (CURFS et al., 1997).

Como não é possível classificar as citocinas quanto à célula de origem ou quanto à função biológica, elas foram agrupadas em interleucinas (IL, numeradas sequencialmente de 1 a 35), fatores de necrose tumoral (TNF), quimiocinas (citocinas quimiotáticas), interferons (IFN) e fatores de crescimento (FC) (RAEBURN et al., 2002). A tendência geral é usar a denominação citocinas quando se refere a todas essas substâncias (CURFS et al., 1997).

Citocinas se ligam a receptores específicos, ativando mensageiros intracelulares que regulam a transcrição gênica. Dessa forma, influenciam a atividade, a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência de células do sistema imune, assim como regulam a produção e a atividade de outras citocinas, capazes de estimular ou inibir a síntese de proteínas ou os efeitos biológicos de determinados tipos celulares ou de outras proteínas, e podem aumentar ou atenuar a resposta inflamatória, reconhecidas como pró-inflamatórias (IL-1 alfa e beta, IL-6, IL-8 e o TNF) e anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β) (CURFS et al., 1997).

Fator de crescimento é a denominação genérica de um grupo de citocinas (BRAGA-SILVA et al., 2006) envolvidas na proliferação e diferenciação celular, morfogênese de tecidos e órgãos desde a embriogênese até a fase adulta, podendo atuar como agentes mitogênicos, melhorando a proliferação de certos tipos de células, ou morfogênicos, alterando o fenótipo celular (EVERTS et al., 2006). A síntese de DNA, quimiotaxia, citodiferenciação e síntese de matriz extracelular são funções desses polipeptídios. Essas moléculas são os iniciadores universais atuando como mediadores biológicos naturais de quase todos os processos de reparo e regeneração tecidual (SCHLIEPHAKE, 2002).

Plaquetas ativadas liberam além dos fatores de coagulação, os FC plaquetários (FCP). Esta secreção é mais intensa na primeira hora e as plaquetas continuam a sintetizar citocinas adicionais e FC por um mínimo de sete dias (SENZEL et al., 2009). Além de plaquetas ativadas os FC são secretados por leucócitos, macrófagos, fibroblastos e células endoteliais, todas envolvidas no processo de coagulação e de cicatrização (WEISS; WARDROP, 2010).

São inúmeros os FCP contidos no plasma sanguíneo, mas três são os que atuam basicamente na reparação celular: o fator de crescimento derivado de plaqueta (*Platelet-Derived Growth Factor*, PDGF), o fator de transformação beta (*Transforming growth factor β* , TGF- β) e o fator de crescimento vascular endotelial (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) (BRAGA-SILVA et al., 2006).

O PDGF é o primeiro a estar presente na ferida e guiar a neovascularização, a síntese de colágeno e a neoformação óssea. No sítio da ferida ele se liga aos receptores da membrana celular das células-alvo estabelecendo ligações de proteína tirosina-quinase. O aumento de suas concentrações nesses sítios parece acelerar os processos de reparo por estimular a quimiotaxia de fibroblastos, macrófagos e neutrófilos e regular a síntese de colágeno (PONTUAL; MAGINI, 2003). É sintetizado primariamente nos grânulos α -plaquetários, podendo ser produzido e secretado também por macrófagos, células endoteliais, monócitos, fibroblastos e matriz óssea (PIERCE et al., 1991). Tem ação mitogênica sobre as células do tecido conjuntivo e fibroblastos, é um importante regulador na proliferação e quimiotaxia de células mesenquimais e estimula a reepitelização da pele quando na presença de lesões e perdas de tecidos (PONTUAL; MAGINI, 2003). O PDGF é quimiotático para macrófagos e fibroblastos que ao chegarem ao foco da lesão liberam mais PDGF, além de TGF- β e fator do crescimento fibroblástico (FGF) (PAGLIOSA; ALVES, 2007).

O TGF- β constitui uma família de mediadores locais que regulam a proliferação e as funções da maioria das células. Este fator é liberado por macrófagos e fibroblastos, mas é nas plaquetas plasmáticas que se encontra sua maior concentração. Exerce ação reparadora e anti-inflamatória de lesões e tecidos. Seus efeitos são variados, dependendo do tipo de célula afetada. Podem suprimir a proliferação celular, estimular a síntese da matriz extracelular, estimular a formação óssea ou atrair células por quimiotaxia (MARSOLAIS; FRENETTE, 2005) sendo a quimiotaxia e a mitogênese as funções principais do TGF- β . Os mais comuns no plasma são o TGF- β 1 e o TGF- β 2, que são ligados à cicatrização do tecido conjuntivo e à regeneração do tecido ósseo. O TGF β 1 é encontrado nas plaquetas, linfócitos e neutrófilos, o β 2 nos extratos ósseos, plaquetas e neutrófilos (VILELLA, 2007). O TGF- β 1 é o mais importante sendo responsável pela maturação celular, migração fibroblástica e síntese de matriz extracelular. Existe um leve antagonismo entre o TGF- β e o PDGF (MARSOLAIS; FRENETTE, 2005) e em certas concentrações, a ação inibitória de TGF- β é maior do que a ação proliferativa do PDGF (VILELLA, 2007).

O VEGF age na proliferação e migração das células endoteliais, adaptação das integrinas aos receptores de VEGF e na diapedese das células endoteliais. É um potente indutor na formação do vaso sanguíneo atuando na neovascularização por aumentar a angiogênese e permeabilidade vascular (MARSOLAIS; FRENETTE 2005). Atrai os fibroblastos para produção de tecido conjuntivo e participa também da produção de fibrina a partir do fibrinogênio e em cuja malha ocorre o crescimento das células endoteliais e fibroblastos (PONTUAL; MAGINI, 2003).

O fator de crescimento semelhante à insulina (*Insulin-like growth factor*, IGF) é secretado durante a formação óssea pelos osteoblastos aumentando a osteogênese e acelerando a deposição óssea. Existem dois tipos, IGF-I e IGF-II, que se aderem a um receptor de membrana específico que estimula a atividade da quinase, resultando na mitose de células precursoras do osso. A atividade quimiotática para fibroblastos, osteoblastos e células progenitoras dos osteoclastos são outras funções importantes (GIANNOBILE, 1999).

O fator de crescimento fibroblástico (*Fibroblast growth factor*, FGF) é um potente fator mitogênico para endotélio, condrócitos, fibroblastos e músculo liso, atua sobre a hematopoiese e é considerado um potente agente quimiotático. É excessivamente liberado durante a injúria tecidual nas cirurgias ou traumatismos. Participa na angiogênese e, o FGF-2 em particular, tem a habilidade de induzir os estágios necessários à neovascularização. Outras funções incluem participação na migração de macrófagos, fibroblastos e células endoteliais em tecidos danificados e migração do epitélio para formar a nova epiderme. Também desempenha uma função no desenvolvimento muscular esquelético (ROSIER et al., 1998).

O fator de crescimento epidermal (*Epidermal growth factor*, EGF), amplamente distribuído nas secreções e nos líquidos teciduais, é mitogênico para uma variedade de células

epiteliais, hepatócitos e fibroblastos. É produzido por queratinócitos, macrófagos e outras células inflamatórias que migram para áreas onde está ocorrendo cicatrizações de feridas (STEENFOS, 1994).

O fator de crescimento do tecido conjuntivo (*Connective tissue growth factor*, CTGF) promove a angiogênese, a regeneração da cartilagem, fibrose e a adesão plaquetária (KUBOTA et al., 2004).

2.4 Atividade antibacteriana das plaquetas e do plasma rico em plaquetas

Os PRPs autólogos são utilizados com sucesso para estimular a regeneração de osso e tecido mole. A razão para a sua utilização consiste no fornecimento de uma vasta gama de moléculas bioativas derivadas de plaquetas, que promove a cicatrização de feridas. Além disso, propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas de PRP têm sido demonstradas contra *Staphylococcus aureus* (BIELECKI et al., 2007; MOOJEN et al., 2008; MARIANI et al., 2014; INTRAVIA et al., 2014, DRAGO et al., 2014) e *Escherichia coli* (BIELECKI et al., 2007) em ensaios clínicos (YUAN et al., 2008) e *in vitro* (BIELECKI et al., 2007; MOOJEN et al., 2008). Também foi evidenciada a inibição do crescimento *in vitro* de PRP contra *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus oralis* (DRAGO et al., 2013, 2014), *S. epidermidis* e *Propionibacterium acnes* (INTRAVIA et al., 2014).

Contra *Pseudomonas aeruginosa* (CIESLIK-BIELECKA et al., 2009; MOOJEN et al., 2008; DRAGO et al., 2013; LIHONG CHEN et al., 2013), *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* (LIHONG CHEN et al., 2013; MARIANI et al., 2014) o tratamento com PRP não demonstrou efeito antimicrobiano significativo.

Apesar de algumas evidências sugerirem que fragmentos de plaquetas contêm moléculas com efeito microbicida o mecanismo do efeito antibacteriano do PRP não é totalmente compreendido. Uma hipótese sugerida é que as plaquetas são capazes de se ligar, agregar e internalizar microrganismos e tem funções citotóxicas liberando uma variedade de peptídeos com efeito antimicrobiano direto (TANG et al., 2002; TRIER et al., 2008).

Plaquetas podem desempenhar múltiplas funções na defesa antimicrobiana, gerando metabólitos do oxigênio como superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais de hidroxila (YEAMAN, 1997; KRIJGSVELD et al., 2000). Os alfa grânulos plaquetários também contêm precursores C3 e C4 que participam da ativação da via do complemento (BLAIR; FLAUMENHAFT, 2009).

Substâncias como as proteínas induzidas por trombina (*thrombin-induced platelet microbicidal proteins*, tPMP-1) e uma proteína semelhante ao fator 4 de plaquetas humanas (*platelet factor 4*, PF-4) têm um importante efeito antibacteriano *in vitro* (YOUNT et al., 2004; MUKHOPADHYAY et al., 2007; TRIER et al., 2008). Drago et al. (2014) evidenciaram que a atividade antimicrobiana de PRP é sustentada por uma cooperação entre os componentes do plasma e os fatores derivados das plaquetas e que a ativação da coagulação é um passo fundamental. Em testes *in vitro* o PRP apresenta atividade inibitória do crescimento de microrganismos a partir da primeira hora (MARIANI et al., 2014). Os resultados sugerem que as moléculas fisiológicas fornecidas *in loco* podem ser importantes no período de tempo necessário para a ativação da resposta imune inata.

2.5 Mastite

2.5.1. Definição e importância

A mastite, inflamação da glândula mamária, classificada quanto à forma de apresentação em clínica e subclínica (PHILPOT; NICKERSON, 2002) caracteriza-se por alterações patológicas do tecido glandular e alteração nas características físicas, químicas e geralmente microbiológicas do leite (RADOSTITIS et al., 2002).

A mastite, consequência da interação entre fatores relacionados ao animal, aos patógenos e ao ambiente, é a doença de maior prevalência em rebanhos leiteiros, e a mais importante causa de perdas econômicas, tanto para o produtor, quanto para a indústria (AKERS; NICKERSON, 2011).

A forma subclínica além de preceder a forma clínica (40% dos casos) é mais prejudicial aos rebanhos pela falta de sinais clássicos e necessidade de exames complementares para detecção, determinando as maiores perdas da produção (AKERS; NICKERSON, 2011).

No Brasil, a alta prevalência em rebanhos leiteiros representa prejuízo de 12 a 71% na produção (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004) e custos estimados em U\$126 por vaca acometida (HOLANDA JÚNIOR et al., 2005). Nos EUA o custo total com mastites chega aos dois bilhões de dólares anuais (AKERS; NICKERSON, 2011).

2.5.2. Etiologia

A mastite pode ser relacionada a causas alérgicas, fisiológicas, metabólicas e traumáticas, sendo mais comum a de origem infecciosa e uma das principais características da mastite é a diversidade de agentes com potencial patogênico. Mais de 130 espécies de microrganismos estão envolvidas com a etiologia da enfermidade (RIBEIRO et al., 2003).

Apesar de diferentes agentes possíveis, a etiologia bacteriana assume um lugar de destaque na epidemiologia do processo infeccioso intramamário. Os principais patógenos envolvidos são *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Corynebacterium* spp. e *Mycoplasma bovis*. Também são relevantes os coliformes e estreptococos ambientais (PHILPOT; NICKERSON, 2002). *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp. são os agentes mais isolados em infecções intramamárias em bovinos (COSTA, 2010).

Mastites ocasionadas por *Staphylococcus* spp. ocorrem em todo o mundo e mais de 50 espécies e subespécies têm sido caracterizadas. O gênero é dividido em estafilococos coagulase negativos (ECN) e positivos (ECP), segundo sua habilidade em coagular o plasma (PYÖRÄLÄ; TAPONEN, 2009).

No Brasil *S. aureus* está amplamente distribuído nos rebanhos (LOMBARD, 2008), com frequência de isolamento de até 70% (ZANETTE et al., 2010). A glândula mamária é a principal fonte de infecção, sendo as mãos dos ordenhadores e equipamentos de ordenha infectados as principais vias de transmissão (FONSECA; SANTOS, 2000).

A longa duração da infecção, o difícil tratamento, o comprometimento da qualidade do leite e a redução da produção justificam a relevância de *S. aureus* como agente etiológico de mastite (BANDOCH; MELO, 2011).

2.5.3. Diagnóstico e tratamento

A mastite clínica manifesta-se por edema, aumento de temperatura, endurecimento e dor na glândula mamária, além da alteração das características do leite, e pode ou não estar acompanhada de reações sistêmicas. Na mastite subclínica, em que não se observa alterações do leite e da mama, o aumento na CCS é a principal característica utilizada para o diagnóstico. Testes como contagem microscópica direta em lâminas, *California Mastitis Test* (CMT), *Wisconsin Mastitis Test* (WMT) e contagem eletrônica podem ser empregados para avaliar CCS do leite (OLIVEIRA, 2013). O isolamento bacteriano e respectivo antibiograma além de úteis para confirmar o diagnóstico clínico podem indicar medidas específicas de controle (RUEGG, 2003).

A administração intramamária de antimicrobianos é a forma mais frequente de tratamento (POL; RUEGG, 2007). Tratamentos de maior duração foram associados com maiores chances de cura, porém é necessário avaliar os custos e retornos econômicos para justificar seu uso (RODRIGUES, 2008). Falhas de tratamento são geralmente atribuídas à baixa eficácia da droga, quando na verdade, fatores da vaca, do patógeno, ou a droga utilizada, deveriam ser responsabilizados (MORIN, 2004).

2.6 Mecanismos de defesa da glândula mamária

A invasão do organismo hospedeiro pelo patógeno é controlada tanto pela imunidade inata, quanto pela adquirida, sendo que o reconhecimento do microrganismo constitui o primeiro passo da defesa imunológica do hospedeiro. Após invasão do microrganismo, geralmente pelo ducto ou canal da teta, ocorre a infecção onde o agente coloniza e se multiplica no tecido glandular (RADOSTITS et al., 2002). Em consequência da inflamação ocorrem alterações qualitativas e quantitativas do leite (BRAMLEY, 1992) que procedem do aumento da permeabilidade vascular na glândula mamária (NICKERSON, 1994).

Os patógenos envolvidos na mastite possuem diversos fatores de virulência que facilitam a colonização e a infecção mamária. Para prevenir o estabelecimento da doença, o hospedeiro deve responder apropriadamente aos fatores de virulência, mediante a elaboração de respostas imunológicas adequadas (SORDILLO, 2005).

Para a sua proteção à glândula mamária possui mecanismos de defesa que consistem em um complexo de barreiras externas (pele e canal do teto), e internas divididas em humorais específicas (imunoglobulinas) e não específicas (lactoferrina, lactoperoxidase, lisozimas, citocinas e complemento), e celulares (CARNEIRO et al., 2009).

A imunidade inata, é responsável por impedir a entrada e/ou colonização de microrganismos eliminando ou limitando a multiplicação dos patógenos nos estágios iniciais do processo infeccioso (BUITENHUIS et al., 2011) e, estimula as respostas imunológicas adquiridas tornando-as eficazes contra os diferentes tipos de patógenos (ABBAS et al., 2008).

Os efetores da resposta imune nesta etapa incluem ativação de peptídeos antimicrobianos (AMPs), as defensinas (reconhecem estruturas microbianas lisando a parede de bactérias), o sistema complemento e fagócitos (ROOIJAKKERS et al., 2005). Monócitos, macrófagos, mastócitos, fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais e epiteliais, também produzem e secretam proteínas quimioatrativas para neutrófilos (RIGBY; DELEO, 2012).

Na glândula mamária sadia, a CCS é geralmente menor que 200.000 células por mL de leite e com predomínio de macrófagos e linfócitos. A presença de bactérias inicia o recrutamento quimiotático de polimorfonucleares, principalmente neutrófilos, da corrente sanguínea ou medula óssea 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 contagem celular aumenta rapidamente passando a predominar neutrófilos, seguidos por macrófagos e linfócitos e, as células epiteliais permanecem inalteradas (PHILPOT; NICKERSON, 1991).

As citocinas principalmente interleucinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12) e o TNF- α , agentes quimiotáticos e considerados marcadores de defesa da glândula mamária, desencadeiam o processo inflamatório por alteração na permeabilidade vascular, e além de promoverem o recrutamento de leucócitos, estimulam as células endoteliais a expressarem adesinas aos neutrófilos, induzindo-os a se infiltrar no tecido mamário para a função fagocítica (BANNERMAN et al., 2006).

A fagocitose de neutrófilos provoca a síntese de fatores moduladores com recrutamento de neutrófilos adicionais e ativação de outros tipos celulares, tais como monócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos. Monócitos e macrófagos, além de atuarem na imunidade inata, são também células especializadas na apresentação de antígenos para linfócitos T, com capacidade de secretar grande variedade de citocinas pró-inflamatórias (CARNEIRO et al., 2009), o que lhe confere grande capacidade de defesa da glândula mamária (CRUVINEL et al., 2010). Uma vez no local de infecção, os neutrófilos exercem efeito bactericida mediante o fenômeno de “explosão respiratória”, que produz espécies reativas do oxigênio (ERO), proteínas antibacterianas e defensinas, fundamentais para a defesa do hospedeiro contra microrganismos invasores (DELEO et al., 2009; RIGBY; DELEO, 2012).

As ERO atuam como fatores de transcrição na sinalização intracelular, e podem danificar células saudáveis (BARBOSA et al., 2010). A membrana é uma das mais atingidas em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na sua estrutura e permeabilidade (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Os produtos da peroxidação lipídica, como o malondialdeído (MDA, C₃H₄O₂) encontram-se em níveis elevados em condições associadas ao estresse oxidativo e podem ser utilizados como indicadores da ação das ERO no organismo (DEL RIO et al., 2005).

A alta prevalência de *S. aureus* está relacionada ao seu poder de invadir e se estabelecer nos tecidos mamários, formando focos encapsulados profundos, que protegem a bactéria dos mecanismos de defesa da mama e dificultam a penetração do antibiótico até o sítio da infecção, o que favorece o desenvolvimento de processos que geralmente evoluem para a forma crônica (GUNTHER et al., 2011).

A infecção crônica é acompanhada por alteração morfofuncional da glândula mamária, redução significativa da produção de leite, flutuação na CCS e uma intermitente excreção do agente, além de reduzidas taxas de cura microbiológica (NICKERSON, 1994; AKERS; NICKERSON, 2011).

S. aureus, ao contrário de outros agentes etiológicos de mastite, induz uma resposta inflamatória deficiente (BANNERMAN et al., 2006; GUNTHER et al., 2011; SCHUKKEN et al., 2011). A eliminação deficiente está relacionada com a habilidade de *S. aureus* de sobreviver dentro de fagócitos, células epiteliais e endoteliais (CAMPOY; COLOMBO, 2009; SINHA; FRAUNHOLZ, 2010; DAS; BISHAYI, 2010). Alguns *S. aureus* moderam e/ou contornam os mecanismos de defesa da glândula mamária pela resistência a peptídeos antimicrobianos (DELEO et al., 2009) e/ou pela lise de neutrófilos após a fagocitose (KOBAYASHI et al., 2012). A capacidade de desenvolver resistência aos antimicrobianos contribui para a alta prevalência de *S. aureus* (PELLEGRINO et al., 2011).

S. aureus secreta proteínas que inibem a deposição ou ativação do complemento, bem como a quimiotaxia de polimorfonucleares (PMNs) (KIM et al., 2012). Outros polipeptídios excretados por *S. aureus* alteraram ou inibem a função de células da imunidade inata (GRAVES et al., 2010; RIGBY; DELEO, 2012). *S. aureus* expressam também vários

peptídeos que, em baixas concentrações, recrutam e ativam neutrófilos desencadeando a resposta inflamatória, e em concentrações mais elevadas lisam neutrófilos (FOSTER, 2009).

A presença de citocinas pró-inflamatórias e a expressão de moléculas de adesão na superfície de neutrófilos e macrófagos em animais cronicamente infectados por *S. aureus* (NAGAHATA et al., 2011), indicam que a migração de neutrófilos e macrófagos à glândula mamária é contínua, sugerindo reconhecimento microbiano e ativação dos mecanismos de resistência do hospedeiro, no entanto, insuficientes para eliminar a bactéria (OVIEDO-BOYSO et al., 2007; SCHUKKEN et al., 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado em reunião ordinária da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) realizada em 05 de novembro de 2012 (Protocolo nº 86/2012, Anexo A).

3.1 Padronização de protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas de bovinos

3.1.1 Local e animais

Foram utilizadas nove vacas da raça Red Angus (Figura 02) da fazenda do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), com idade variando entre 3 e 8 anos (média 5,5). Os animais foram considerados clinicamente saudáveis mediante avaliações do histórico, anamnese, exame físico e parâmetros hematológicos. Animais que apresentaram evidências de doenças e carga parasitária alta não foram inseridos no estudo. Apenas animais hígidos, com parâmetros hematológicos dentro dos limites fisiológicos estabelecidos para a espécie (KANEKO et al., 1997; KRIMER, 2011) e condição corporal de 5 a 6 (escala de 1 a 9) foram utilizados.



Figura 02. Vacas da raça Red Angus da fazenda do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV), UFRRJ, utilizadas na padronização do PRP.

Os exames hematológicos e a padronização do PRP foram realizados no Laboratório de Pesquisas Clínicas (LPC) do Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária (DMCV) também na UFRRJ.

3.1.2 Avaliação hematológica

Amostras de sangue foram colhidas, após antissepsia, por punção da veia coccígea com agulha 21G, em frascos de 4,0 mL contendo o anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), mantidas em caixa isotérmica contendo gelo e transportadas até o LPC para processamento em até duas horas após a coleta.

A contagem global de hemácias ou hematimetria (células x 10⁶/μL), o volume globular (%), a concentração de hemoglobina (g/dL), a leucometria global (células x 10³/μL) e a contagem total de plaquetas (células/μL) foram determinados em analisador hematológico por impedância¹. Os índices hematimétricos: Volume Corpuscular Médio (VCM – fL), Concentração de Hemoglobina Corpuscular média (CHCM - %) e Hemoglobina Corpuscular média (HCM) foram calculados pelo próprio aparelho considerando as contagens de hemácias, o hematócrito e a taxa de hemoglobina.

A leucometria específica (contagem percentual de neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, monócitos e basófilos) foi avaliada em microscópio ótico em imersão com objetiva de 100x a partir de esfregaços do sangue total em superfície de lâminas coradas com Hematoxilina-Eosina (JAIN, 1993). Do plasma foram mensuradas as concentrações de fibrinogênio e proteínas por refratometria (COLES, 1987).

3.1.3 Avaliação clínica e escore de condição corporal

Avaliações clínicas abordando os parâmetros comportamento, postura, temperatura, frequências respiratória, cardíaca e de movimentos de rúmen, coloração de mucosas e demais avaliações (Anexo B) foram feitas previamente para inclusão dos animais no estudo. O escore de condição corporal foi definido de acordo com Nicholson e Butterworth (1986) para gado de corte (Tabela 01) sendo utilizadas vacas que, além de boa condição física e parâmetros hematológicos normais, apresentavam escore 5 a 6.

Tabela 01. Escore de Condição Corporal (ECC) de acordo com critérios sugeridos por Nicholson e Butterworth (1986) para gado de corte.

| Escore | Condição | Descrição |
|---------------|-----------------|---|
| 1 | Magro - | Processo de emaciação acentuado |
| 2 | Magro | Processo transverso proeminente, espinhas dorsais acentuadas |
| 3 | Magro + | Espinhas dorsais agudas ao tato; íleos, ísquios, inserção da cauda e costelas proeminentes; processo transverso ainda visível |
| 4 | Médio - | Costelas, íleos e ísquios visíveis; musculatura côncava nas ancas; processo transverso ligeiramente coberto |
| 5 | Médio | Costelas ainda visíveis, espinhas dorsais não podem ser vistas, mas sentidas facilmente ao tato |
| 6 | Médio + | Suave cobertura muscular, espinhas dorsais não podem ser vistas, mas sentidas facilmente ao tato |
| 7 | Gordo - | Boa cobertura muscular (não de gordura), espinhas dorsais podem ser sentidas ao tato, mas com dificuldade |
| 8 | Gordo | Depósitos de gordura visíveis, em algumas áreas; processo transverso não pode mais ser visto ou sentido |
| 9 | Gordo + | Acúmulo de gordura acentuado na inserção da cauda e maçã do peito; espinhas dorsais, costelas, íleos e ísquios cobertos |

¹ Analisador hematológico POCH-100iV Diff , Sysmex®

3.1.4 Protocolos utilizados

Após tricotomia e antissepsia adequadas, colheu-se 450 mL de sangue de cada animal, por punção da veia jugular com agulha 16G em bolsas de transfusão de sangue do tipo CPDA-1². As nove bolsas de sangue foram mantidas em recipiente isotérmico contendo gelo durante o transporte até o LPC e processadas em até quatro horas após a coleta. De cada bolsa foram avaliados oito protocolos (P1 a P8) para a obtenção de PRP, com as centrifugações variando quanto à velocidade e tempo (Tabela 02).

Tabela 02. Protocolos de dupla centrifugação utilizados para padronização do plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo bovino.

| Protocolo | 1ª Centrifugação | | 2ª Centrifugação | | Referências |
|-----------|------------------|--------------|------------------|--------------|-------------------------------|
| | Velocidade (g) | Tempo (min.) | Velocidade (g) | Tempo (min.) | |
| P1 | 120 | 5 | 240 | 5 | Carmona et al. (2007) |
| P2 | 120 | 5 | 473 | 5 | Maia et al. (2009) |
| P3 | 120 | 10 | 473 | 10 | Maia et al. (2009) modificado |
| P4 | 300 | 10 | 640 | 10 | Vendramin et al. (2006) |
| P5 | 400 | 10 | 800 | 10 | Vendramin et al. (2009) |
| P6 | 640 | 10 | 640 | 5 | * |
| P7 | 720 | 5 | 720 | 5 | López et al. (2012) |
| P8 | 640 | 5 | 120 | 10 | * |

Nota: Carmona et al. (2007) e Maia et al. (2009) trabalharam com equinos; Vendramin et al. (2006) e Vendramin et al. (2009) com humanos e López et al. (2012) avaliaram a celularidade do PRP de bovinos. * P6 e P8 foram criados durante o experimento.

Para cada protocolo foram utilizados 30 mL de sangue acondicionados assepticamente em dois tubos Falcon de 15 mL que foram centrifugados³ para separar o sangue total em três camadas: plasma (sobrenadante), zona de névoa (capa leucocitária, camada intermediária) e eritrócitos (camada inferior). O plasma sobrenadante foi arbitrariamente dividido em duas frações, fração plasmática superior (FPS) e fração plasmática inferior (FPI). A FPI foi considerada como sendo 50% do plasma mais próximo à capa leucocitária e a FPS foi classificada como 50% da fração plasmática imediatamente superior a FPI, sendo descartada. A FPI foi removida com pipeta Pasteur e transferida para um terceiro tubo Falcon de 15 mL, e novamente centrifugada, conforme cada protocolo testado. Após esta segunda centrifugação, o sobrenadante considerado como sendo 75% do plasma, foi nomeado plasma pobre em plaquetas (PPP) e descartado, sendo conservado apenas 25% da porção inferior, o PRP (Figura 03).

A partir de cada protocolo de cada bolsa CPDA-1, uma alíquota de PRP foi armazenada sob refrigeração (2-8°C) por no máximo duas horas em frascos plásticos de 2 mL

² 63 mL de solução CPDA-1 (2630 mg de citrato de sódio; 222 mg de fosfato de sódio monobásico; 2900 mg de dextrose anidra; 27,5 mg de adenina e 300 mg de ácido cítrico anidro), JP Indústria Farmacêutica S.A., lote nº 0214 12.

³ Centrífuga clínica para rotina laboratorial, Centribio, Modelo: 80-2B-15ML.

para quantificação de plaquetas, hemácias e leucócitos como descrito a seguir e, outra alíquota foi estocada em frasco criogênico a -80°C para dosagem do fator de crescimento TGF- β 1.

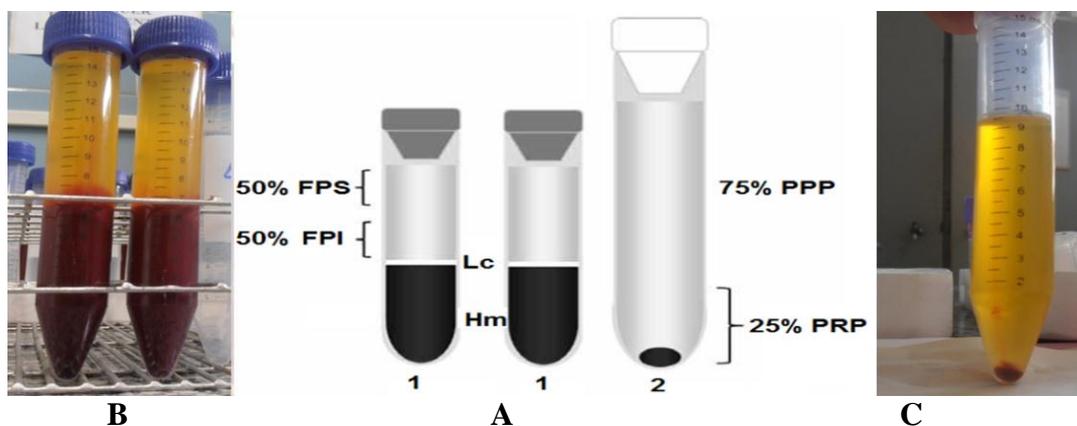


Figura 03. A: Os tubos de número 1 representam a primeira fração de plasma (FPS e FPI) obtida durante a 1ª centrifugação. O tubo de número 2 representa as frações de PRP e PPP obtidas após centrifugação das FPIs dos tubos iniciais. B: tubos com a primeira fração do plasma. C: PRP e PPP.

FPS: fração plasmática superior; FPI: fração plasmática inferior; Lc: Capa leucocitária; Hm: Eritrócitos; PPP: plasma pobre em plaquetas; PRP: plasma rico em plaquetas. Adaptado de López et al. (2012).

3.1.5 Plaquetas, hemácias, leucócitos e TGF- β 1

Amostras de PRP obtidas a partir de cada protocolo foram diluídas e homogeneizadas para contagem de plaquetas, hemácias e leucócitos, em câmara de Neubauer. As contagens foram feitas em duplicata, utilizando-se as médias dos valores obtidos para cada amostra.

Para determinação do número de plaquetas o PRP foi diluído a 1/200 (10 μL de PRP em 1990 μL de líquido de Brecher com oxalato de amônio a 1%), a câmara de Neubauer foi preenchida com tubo capilar e após 20 minutos foi realizada a contagem em microscópio óptico com objetiva de 40x no retículo central (25 quadrados médios centrais = área de 1 mm^2). As plaquetas apresentaram-se azuis escuras e refringentes. Devido às propriedades intrínsecas das plaquetas (alta capacidade de agregação e facilidade de rompimento), cuidados como uso de material apenas de plástico foram tomados para se obter resultados exatos e reprodutíveis.

Para determinação do número de hemácias, o PRP foi diluído a 1/1 (10 μL de PRP em 10 μL de líquido de Gower), a câmara de Neubauer foi preenchida com tubo capilar e após 5 minutos foi realizada a contagem em microscópio óptico com objetiva de 40x no retículo central (25 quadrados médios centrais). Para leucócitos, o PRP foi diluído a 1/1 (10 μL de PRP em 10 μL de líquido de Thoma), a câmara de Neubauer foi preenchida com tubo capilar e após 5 minutos foi realizada a contagem em microscópio óptico com objetiva de 40x nos quatro quadrados laterais maiores (área de 4 mm^2).

A fórmula utilizada para obtenção de células por μL de PRP foi: n° de células contadas x diluição x 10 (altura de 0,1 mm) x área.

Amostras de PRP destinadas a dosagem do fator de crescimento foram descongeladas em temperatura ambiente e em seguida submetidas a um ensaio imunoenzimático utilizando-se *kit*⁴ para determinação quantitativa de TGF- β 1 em cultura celular, plasma e soro de humanos, ratos e bovinos.

Amostras e padrões foram adicionados conforme instruções do fabricante aos poços previamente revestidos com um anticorpo monoclonal específico para o TGF- β 1. A placa foi incubada por uma hora e, após uma primeira lavagem com a solução tampão fornecida pelo kit, o TGF- β 1 presente na amostra ligou-se aos anticorpos monoclonais da placa. Uma solução contendo um anticorpo policlonal para o TGF- β 1 foi adicionado aos poços para que se ligasse ao TGF- β 1 capturado na placa e incubou-se novamente por duas horas. Uma segunda lavagem foi realizada para remoção do excesso de anticorpos. Após, uma solução de anticorpo conjugado foi adicionada a cada poço, se ligando ao anticorpo policlonal para o TGF- β 1. Após incubação de 30 minutos e nova lavagem, foi adicionada uma solução contendo um substrato que gerou uma cor azul quando catalisada pelo anticorpo conjugado. Ao final, uma solução de parada (*stop*) foi adicionada para parar a reação do substrato. A cor amarela resultante (Figura 04) foi lida a 450nm, estando a quantidade de absorção diretamente proporcional ao nível de TGF- β 1 na amostra. Nas etapas que envolveram incubação com agitação de placa e leitura em nm foi utilizado um aparelho *multiskan*⁵ (Figura 04). O coeficiente de correlação da curva foi 0,9996 e os coeficientes de variação, CV(%), intra e inter ensaio foram 27,86 e 27,77, respectivamente.

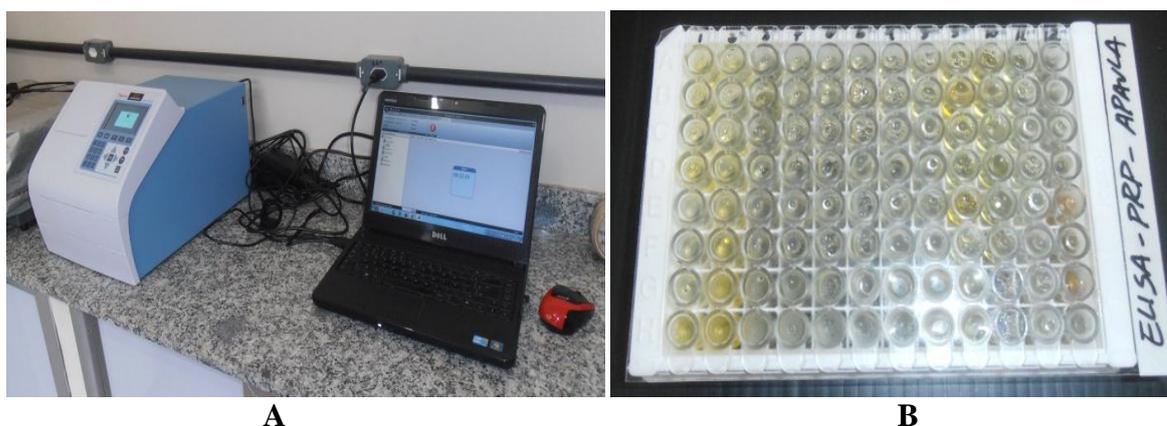


Figura 04. A: *Multiskan* para leitura de ELISA conectada a *notebook* para posterior análise dos dados (Laboratório de Pesquisas Clínicas, UFRRJ). B: placa de ELISA evidenciando a cor amarela resultante anteriormente lida a 450 nm (absorção diretamente proporcional ao nível de TGF- β 1 na amostra).

3.1.6 Análises estatísticas

Os dados foram apresentados como média e desvio padrão. Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e foi feita a comparação múltipla entre as médias das concentrações encontradas pelo teste de Duncan com 95% de probabilidade ($p < 0,05$). A correlação de Pearson foi usada para testar a correlação entre plaquetas, TGF- β 1

⁴ ELISA sanduiche, kit Enzo Life Science, ADI-900-155.

⁵ Multiskan Go, ThermoScientific.

e leucócitos. As análises foram realizadas usando o programa *Prism* versão 6.0 para *Windows* (*GraphPad Software*, Califórnia, EUA).

3.2 Atividade *in vitro* de plasma rico em plaquetas, plasma pobre em plaquetas e plasma de bovinos contra *S. aureus*

3.2.1 Local e animais

Foram utilizadas quatro vacas Red Angus da fazenda do LQEPV, UFRRJ, de idade variando entre 3 e 8 anos (média 5,5) e avaliadas como clinicamente saudáveis mediante histórico, anamnese, exame físico, condição corporal (como descrito no tópico 3.1.3), hemograma, fibrinogênio sérico, proteínas plasmáticas (como indicado no tópico 3.1.2).

Os exames hematológicos foram realizados no LPC do DMCV e os ensaios *in vitro* foram realizados no LPC e no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária (DMIV) ambos na UFRRJ.

3.2.2 Obtenção do plasma, plasma rico em plaquetas e plasma pobre em plaquetas

De cada animal, após antissepsia adequada da pele na região do pescoço, 60 mL de sangue foi colhido por punção venosa da jugular com cateter 16G, armazenado em 13 tubos de 4,5 mL contendo citrato de sódio a 3,2%⁶. Para efeito comparativo entre dois protocolos de bons resultados após os testes iniciais como descrito em 3.1, seis tubos foram destinados ao protocolo 5 (400 g e 800 g ambos por 10 minutos), seis tubos ao protocolo 8 (640 g por 5 minutos e 120 g por 10 minutos), e, um tubo foi utilizado para obtenção de plasma.

Para obtenção de PRP o processo de centrifugação foi como descrito no item 3.1.4 sendo que na primeira centrifugação foram utilizados os tubos contendo sangue total e citrato de sódio a 3,2% e na segunda, tubos sem anticoagulante. Dos produtos obtidos após a segunda centrifugação em ambos os protocolos, 75% do plasma sobrenadante (PPP) e 25% do plasma inferior (PRP) (Figura 05), foram armazenados sob refrigeração (2-8°C) por no máximo duas horas em tubos plásticos de 2 mL para o ensaio *in vitro*.

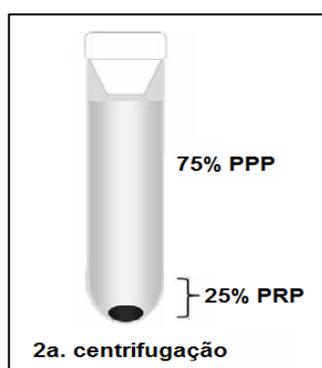


Figura 05. Tubo após a segunda centrifugação. PPP: plasma pobre em plaquetas; PRP: plasma rico em plaquetas.

⁶ Tubos BD Vacutainer® com Citrato de Sódio Tamponado 0,109 mol/L (3,2%)

O 13º tubo contendo sangue com citrato de sódio a 3,2% foi centrifugado a 1500 g por 10 minutos e o sobrenadante (plasma, P) foi armazenado. Os PRPs (PRP5 e PRP8), PPPs (PPP5 e PPP8) e o plasma de cada animal, foram armazenados sob refrigeração em tubos plásticos de 2 mL para uso em até duas horas.

3.2.3 Ensaio antibacteriano

A atividade antimicrobiana dos produtos obtidos do sangue (PRP e PPP) e o plasma (P) foi investigada *in vitro* a partir de incubação com a cepa liofilizada de *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCCD S008 similar a ATCC 6538P⁷.

O conteúdo liofilizado foi reconstituído adicionando-se 1,0 mL de solução soro estéril. Duas alíquotas de 0,1 mL foram semeadas em dois tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo Casoy⁸, incubados a 37°C por 6 horas (Figura 06). Após, retirou-se duas alíquotas de 0,01 mL que foram semeadas pelo método de esgotamento por estrias compostas em duas placas de Petri contendo ágar-sangue de carneiro a 8% incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. A identificação e confirmação do *S. aureus* foi realizada por meio das características morfológicas e tintoriais pelo método de Gram (Figura 07), prova de catalase, presença de hemólise (Figura 08) e da fermentação de açúcares (KONEMAN, 2008).

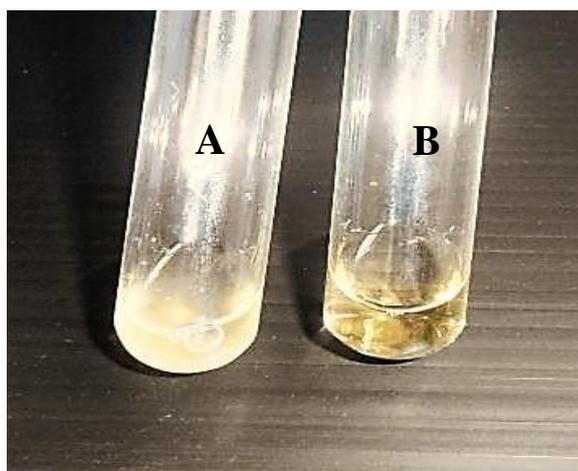


Figura 06. Caldo Casoy. A: turbidez pelo crescimento bacteriano; B: límpido, sem inoculação.

⁷ Cepas Cefar Diagnóstica®; www.atcc.org/Products/All/6538P.aspx#generalinformation

⁸ Caldo Triptona de Soja (Tryptic Soy Broth, Difco)

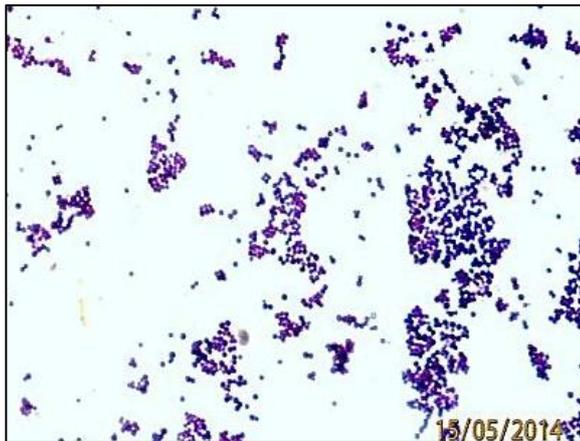


Figura 07. Microscopia óptica (objetiva de 40x) evidenciando cocos Gram positivos (coloração de Gram) característicos de *S. aureus*.



Figura 08. Crescimento de *S. aureus* e presença de β -hemólise em ágar sangue de carneiro a 8% após incubação a 37° por 24 horas.

Para uso nos ensaios bacterianos, a partir do crescimento da cultura de *S. aureus* no caldo Casoy, foram realizados repiques até que as suspensões tivessem a densidade ajustada para 0,5 de turvação na escala de McFarland, que corresponde a concentração de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC) por mL.

As amostras experimentais foram constituídas de dez grupos: grupo 1 (PRP 5), grupo 2 (gel de PRP 5), grupo 3 (PPP 5), grupo 4 (gel de PPP 5), grupo 5 (plasma), grupo 6 (solução fisiológica 0,9%), grupo 7 (PRP 8), grupo 8 (gel de PRP 8), grupo 9 (PPP 8), grupo 10 (gel de PPP 8). O grupo 6 foi concebido como controle positivo do crescimento da bactéria na diluição dos demais grupos. Os grupos 2, 4, 8 e 10, representaram os géis de PRP e PPP, ativados com gluconato de cálcio. A composição dos grupos foi instituída com caldo Casoy, a suspensão da bactéria, o respectivo derivado do sangue e para os géis, o gluconato de cálcio

(Tabela 03). Para cada grupo foi mantido um controle negativo contendo exclusivamente o PRP ou PPP, definido como “controle de qualidade” dos produtos e estes não foram incluídos nas análises.

Tabela 03. Constituição dos grupos de plasma rico em plaquetas (PRP), plasma pobre em plaquetas (PPP) e plasma (P) para ensaios *in vitro* contra a cepa CCCD S008 similar a ATCC 6538P de *Staphylococcus aureus*.

| Grupo | Composição Inicial | Produto do Sangue + Gluconato de Ca* | Definição Final |
|-------|------------------------|--------------------------------------|-----------------|
| G1 | | 1 mL de PRP 5 | PRP5 |
| G2 | | 0,9 mL de PRP 5 + 0,1 mL | PRP5A** |
| G3 | | 1 mL de PPP 5 | PPP5 |
| G4 | 5,0 mL de Caldo Casoy | 0,9 mL de PPP 5 + 0,1 mL | PPP5A |
| G5 | + | 1 mL de P | P |
| G6 | 0,1 mL da suspensão de | 1 mL de soro | CT+*** |
| G7 | <i>S.aureus</i> | 1 mL de PRP 8 | PRP8 |
| G8 | (0,5 McFarland) | 0,9 mL de PRP 8 + 0,1 mL | PRP8A |
| G9 | | 1 mL de PPP 8 | PPP8 |
| G10 | | 0,9 mL de PPP 8 + 0,1 mL | PPP8A |

* 1 ml dos produtos puros obtidos a partir do sangue ou 0,9 ml desses produtos com adição de 0,1 ml gluconato de cálcio formando os géis: gel de PRP e gel de PPP.

** A significa “ativado” (adição do gluconato de cálcio).

*** Grupo controle positivo.

PRP - plasma rico em plaquetas, PPP - plasma pobre em plaquetas, P - plasma.

Todos os tubos foram incubados a 37°C por 1, 2, 6, 12 e 24 horas e, para cada tempo, uma amostra de 1,0 mL foi obtida e utilizada para diluições em série de 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000 e 1:100.000 em 9 mL de solução salina estéril (1:10). Destas diluições, 0,1 mL das amostras foram plaqueadas pela técnica *spread-plate* em placas de Petri contendo ágar padrão para contagem⁹. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas quando foram enumeradas as unidades formadoras de colônias (UFC) equivalentes ao número de bactérias viáveis na amostra.

A quantidade de UFC de cada placa foi contada individualmente sendo calculada a média aritmética por diluição e, as UFC/mL foram determinadas da seguinte maneira: UFC/placa x (1/0,01 mL alíquota plaqueada) x fator de diluição. Para que os resultados obtidos fossem estatisticamente válidos, fez-se a duplicata de placas para cada diluição e foram consideradas as médias de cada diluição.

3.2.4 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média e desvio padrão. Para normalização, as contagens de bactérias em UFC/mL foram convertidas em log de base 2 conforme (YANG et al., 2012). Os resultados foram analisados pelo teste de Friedman feita à comparação múltipla entre as médias com 95% de probabilidade ($p < 0,05$) utilizando-se o *Action 2,7* [<http://www.plataformaaction.com/index.php?lang=pt>].

⁹ Agar Extrato de Levedura Glicose Triptona (Tryptone Glucose Yeast Extract Agar, Difco)

3.3 Ensaio *in vivo*: aplicação intramamária de plasma rico em plaquetas em vacas com mastite subclínica

3.3.1 Local e animais

O estudo foi realizado com animais do rebanho de bovinos de leite da fazenda da UFRRJ com idade variando entre 5 e 10 anos (média 7,5), no terço final de lactação e avaliados como clinicamente saudáveis mediante histórico, anamnese, exame físico, avaliação hematológica e, diagnosticados com mastite subclínica pelo CMT. Os exames hematológicos e os ensaios para avaliação do metabolismo oxidativo foram realizados no LPC (DMCV, UFRRJ).

Amostras de leite foram analisadas quanto à composição (gordura, proteína, lactose e sólidos totais e não gordurosos) por espectrofotometria por radiação infravermelha e CCS em contador eletrônico por citometria de fluxo em laboratório da Rede Brasileira de Qualidade do Leite (RBQL, Clínica do Leite, ESALQ/USP, Piracicaba SP). Os parâmetros de composição foram expressos em porcentagem (% m/m) e a CCS em unidades x mil/mL.

3.3.2 Seleção dos animais

Foram utilizadas seis vacas pluríparas, mestiças (holandês x zebu), mantidas sob regime de pastejo, recebendo concentrado comercial, além de mistura mineral completa e água sem restrição. Avaliações clínicas e hematológicas foram realizadas como descrito nos itens 3.1.2 e 3.1.3. O escore de condição corporal foi definido de acordo com Wildman et al. (1982) e Edmonson et al. (1989) para gado de leite (Tabela 04) sendo utilizadas vacas que, além de boa condição física e parâmetros hematológicos normais apresentavam escore 3,0 e infecção intramamária subclínica identificada pelo CMT realizado no início da ordenha .

Tabela 04. Escore de Condição Corporal (ECC) de acordo com critérios sugeridos por Wildman et al. (1982) e Edmonson et al. (1989) para gado de leite.

| Grupos | ECC | Descrição |
|-----------------|----------|--|
| Muito magra | 1 | Vaca extremamente magra com severa perda de musculatura, com as costelas e espinha dorsal extremamente proeminentes. |
| Magra | 2 | Vaca magra com pequeno ou nenhum enfraquecimento da estrutura muscular, espinha dorsal e costelas ainda proeminentes. |
| Moderada | 3 | Condição ideal. Vaca com estrutura muscular normal. Alguma evidência de deposição de gordura nas costelas, espinha dorsal e peito. |
| Gorda | 4 | Vaca gorda, mas ainda com estrutura firme, considerando deposição de gordura no quarto dianteiro, na inserção da cauda e estrutura esquelética não aparente. |
| Muito gorda | 5 | Vaca muito gorda com considerável maciez, peito largo, muita deposição de gordura na inserção da cauda, espinha dorsal, costelas, quarto dianteiro e traseiro. |

Os mesmos animais foram utilizados como grupo controle a partir de uma primeira coleta (T0) que foi realizada após as avaliações e antes de receberem qualquer tipo de tratamento.

Animais que apresentaram, além da mastite, evidências de outras afecções, condição corporal ruim e parâmetros hematológicos fora dos padrões estabelecidos para a espécie não foram inseridos no estudo. Os animais foram monitorados quanto aos sinais de inflamação na glândula mamária e reações sistêmicas mediante exame clínico, avaliações da CCS no leite e avaliações hematológicas.

3.3.3 Diagnóstico de mastite e formação dos grupos

Inicialmente as vacas foram avaliadas quanto à ocorrência de mastite clínica por exame físico (inspeção e palpação) da glândula mamária e observação do aspecto dos três primeiros jatos de leite de cada quarto mamário em caneca de fundo escuro. A presença de grumos, secreção purulenta, coloração amarelada ou consistência aquosa foram considerados sinais de mastite clínica e estes animais não foram incluídos no estudo.

A infecção intramamária subclínica foi identificada pelo *California Mastitis Test* (CMT) realizado no início da ordenha, após higiene da pele do teto e óstio com algodão embebido em álcool 70% (PHILPOT; NICKERSON, 1991).

O CMT foi realizado mediante mistura, em bandeja própria, de partes iguais de leite e detergente aniônico (alquil-lauril sulfato de sódio). Após homogeneização, a interpretação do teste baseia-se na observação visual da reação que se processa entre o reagente e o material genético das células somáticas. O resultado é dado em cinco escores: negativo (-), suspeito (traços), fracamente positivo (+), positivo (++) e fortemente positivo (+++) (SCHALM; NOORLANDER, 1957). Para este estudo, inicialmente foram selecionadas seis vacas com quartos mamários com reação positiva e fortemente positiva ao CMT (6 vacas, n=24 quartos mamários).

O teste da caneca de fundo escuro e o CMT foram realizados antes da aplicação dos tratamentos (T0), 24 e 48 horas depois. Para as análises estatísticas foram considerados os quartos que apresentaram CCS superior a 200.000 células/mL indicando a ocorrência de mastite subclínica (SANTOS; FONSECA, 2007). Quartos mamários positivos ao CMT, mas com CCS abaixo de 200.000 células/mL não foram considerados nas análises.

3.3.4 Obtenção e aplicação do plasma rico em plaquetas

Após antissepsia adequada da pele na região do pescoço, de cada animal, foram coletados 60 mL de sangue por punção venosa da jugular com cateter 16G acondicionado em 12 frascos de 4,5 mL contendo citrato de sódio a 3,2%. Estes tubos foram submetidos a duas centrifugações, a primeira a 400 g por 10 minutos e a segunda centrifugação 800 g por 10 minutos. Após a segunda centrifugação, 75% do plasma sobrenadante foi considerado PPP e foi descartado, restando os 25% do plasma considerado PRP que foi acondicionado em frasco estéril e mantido em recipiente isotérmico por até duas horas quando foi preparado para aplicação por via intramamária.

Cada quarto mamário constituiu-se de uma unidade experimental. O PRP, num volume final de 3 mL foi asépticamente inoculado em dois quartos mamários de seis vacas com mastite subclínica, perfazendo um total de 12 quartos mamários tratados com PRP autólogo e os outros dois quartos mamários de cada vaca foram inoculados com igual volume de solução fisiológica estéril a 0,9% (soro). Os produtos (PRP e soro) foram inoculados na glândula mamária por meio de seringa de plástico e sonda uretral estéril nº 6, imediatamente

após ordenha completa e antissepsia com álcool 70°. Após, seguiu-se imersão dos tetos em solução de glicerina iodada a 5%.

3.3.5 Sangue

Amostras de sangue foram colhidas por venopunção da coccígea com agulha 21G em seringas descartáveis após antissepsia imediatamente antes (T0), 2, 6, 24 e 48 horas após a inoculação. Para cada momento foram colhidas três alíquotas: A1 (4,0 mL) acondicionada em frascos com EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) encaminhadas para hemograma, A2 (10 mL) acondicionada em frascos com heparina sódica para avaliação da peroxidação lipídica e A3 (10 mL) em frascos sem anticoagulante ou aditivo para obtenção do soro que foi acondicionado a -80°C para posteriormente, dependendo dos resultados, ser utilizado na determinação mediadores inflamatórios.

A) Hemogramas

Os hemogramas, a contagem diferencial dos leucócitos, a determinação de fibrinogênio e proteínas plasmáticas foram realizados como descrito no tópico 3.1.2.

B) Peroxidação lipídica - Ensaio TBARS

Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico foram determinadas de acordo com OHKAWA et al. (1979) em metodologia modificada.

As amostras sanguíneas colhidas com heparina sódica foram acondicionadas em frascos plásticos de 2 mL e centrifugadas a 1000 g por 10 minutos a 4 °C. Transcorrido o tempo, o sobrenadante contendo plasma e leucócitos foi removido, tendo sido o plasma armazenado em tubos criogênicos a -80°C e a capa leucocitária desprezada. Em seguida foram adicionados em cada frasco solução de PBS num volume correspondente ao dobro do volume de hemácias. O tubo foi fechado e o conteúdo ressuspendido, por inversão cuidadosa dos frascos por três vezes (para não promover hemólise). O conteúdo foi novamente centrifugado a 1000 g por 3 minutos a 4°C e o procedimento repetido duas vezes. Após, foram diluídos com água milli-Q para obtenção do hemolisado 1:20 e então envasados frascos criogênicos de 2 mL, identificados e estocados a -80 °C até o momento das análises.

Para a determinação do TBARS utilizou-se o hemolisado de hemácias na proporção de 1:20 preparado anteriormente. Desta solução, 1,0 mL do hemolisado foi pipetado em tubos plásticos de fundo cônico estéreis com capacidade de 15 mL e adicionado 1,0 mL de ácido sulfossalicílico a 3%. A mistura foi agitada em vórtex por 10 segundos, centrifugada a 1400 g por 3 minutos e deixada em repouso por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo frasco e neste foi acrescentado 500 µL do ácido tiobarbitúrico 0,67%, seguindo-se de agitação por 10 segundos em vórtex e os tubos incubados por 30 minutos a 80°C. Para leitura utilizou-se como padrão 500 µL água bidestilada deionizada acrescida de 500 µL de solução de TBA 0,67% e a amostra representada pelo sobrenadante. A absorbância foi determinada em 532nm e os resultados expressos em nM de malodialdeído (MDA) por grama de hemoglobina (nM/gHb).

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

3.3.6 Leite

Amostras de leite foram coletadas imediatamente antes (T0), 24 e 48 horas após a aplicação intramamária de soro e PRP. As amostras obtidas foram mantidas refrigeradas ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) durante o transporte até o LPC onde foram destinadas aos exames específicos: CCS e composição, contagem diferencial de células em lâmina e peroxidação lipídica pela determinação de malondialdeído (MDA). Uma alíquota de cada amostra colhida nos diferentes momentos foi armazenada a -80°C em frascos criogênicos para, na dependência dos resultados obtidos, ampliar o estudo dos mediadores inflamatórios.

A) Contagem de células somáticas e composição

Alíquotas de 40 mL de leite foram acondicionadas em recipientes contendo o conservante bronopol. Os frascos foram homogeneizados por inversão, mantidos sob refrigeração e encaminhados por Sedex, em no máximo 48 horas, para análises na Clínica do Leite (ESALQ-USP) por métodos de referência (BRASIL, 2011). As amostras foram analisadas para determinação da composição (gordura, proteína total, lactose, sólidos totais e extrato seco desengordurado, em porcentagem), por espectrofotometria no infravermelho e CCS por citometria de fluxo em contador eletrônico (células/mL).

B) Contagem diferencial de células

Lâminas foram preparadas conforme técnica descrita por Pilla et al. (2012), modificada. Uma alíquota de 2,0 mL de leite foi diluída com 5,0 mL de PBS contendo 0,5% de EDTA (PBS-EDTA) e centrifugada a 125 g por 15 minutos em tubos falcon. A camada de gordura e o sobrenadante foram desprezados e 10 μL do botão de células do fundo do tubo foi ressuspensionado em 2,0 mL de PBS-EDTA, e posteriormente por meio de pipeta Pasteur foi distribuído homogeneamente na superfície de lâminas perfazendo uma área de 1 cm^2 . As lâminas foram feitas em duplicata, secas ao ar e coradas com May-Grünwald Giemsa.

Para essa coloração, a lâmina foi coberta com o corante de May-Grünwald por 2 minutos; acrescentou-se 20 gotas (aproximadamente 1 mL) de água destilada tamponada (pH 7,0-7,2)

por 1 minuto e homogeneizou-se com uma pipeta. Após retirar as soluções por inversão da lâmina, sem lavar, cobriu-se com a solução de Giemsa diluída (1 gota de corante de Giemsa para cada 1 mL de água destilada tamponada pH 7,0-7,2) por 15 minutos. Ao final, lavou-se com água destilada tamponada e as lâminas foram secas ao ar em posição vertical.

Em cada lâmina foram contadas 100 células, observadas em microscópio óptico com objetiva de imersão (100x). Estas células foram diferenciadas em linfócitos, macrófagos e neutrófilos (COLES, 1987). Células epiteliais nem sempre são diferenciadas dos macrófagos, sendo assim foram contadas como macrófagos.

C) Formação de malondialdeído

O malondialdeído (MDA) do leite foi mensurado pelo método de Smith (1980) modificado como descrito por Suriyasathaporn et al. (2006, 2010). Adicionou-se 1,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% a 100 μL de leite e agitou-se em vórtex. A seguir, 400 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 2% foram adicionados e a mistura foi fervida a 60°C durante 30 minutos em banho-maria, arrefecida por água da torneira e mensurada quatro vezes por

espectrofotometria de UV a 532 nm contra a sua reação em branco (sem TBA). A média de densidades ópticas obtidas a partir de cada amostra foi utilizada para determinar a concentração de MDA em ppb.

3.3.7 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média e desvio padrão.

A CCS foi convertida em log de base 2 para normalização, a quantificação da celularidade em lâmina foi feita em porcentagem e os valores foram relacionados a CCS individual de cada amostra sendo também convertida em log de base 2 para normalização.

Os parâmetros do hemograma e leite foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Variáveis do leite (CCS, diferencial de células e MDA) foram analisadas por ANOVA fator duplo com repetição e o teste de Tukey a 95% de probabilidade ($p < 0,05$) foi usado para identificar as diferenças.

Os valores de TBARS foram analisados pelo Teste T pareado e foi feita a comparação múltipla entre as médias pelo teste exato de Fischer com 95% de probabilidade ($p < 0,05$).

Os valores encontrados foram confrontados com a literatura.

As análises foram realizadas usando os programas *Prism* versão 6.0 para *Windows* (*GraphPad Software*, Califórnia, EUA) e *Action 2,7* [<http://www.plataformaaction.com/index.php?lang=pt>].

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Padronização de protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas de bovino

Como o resultado final do PRP depende da contagem inicial de plaquetas no sangue total do animal, e segundo Barbosa et al. (2008) a trombocitopenia ou um número reduzido de plaquetas são fatores limitantes para obtenção do PRP, apenas animais com parâmetros hematológicos dentro dos limites fisiológicos estabelecidos para a espécie (KANEKO et al., 1997; KRIMER, 2011), principalmente em relação à quantidade de plaquetas, objeto principal deste estudo, foram utilizados.

O ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) de origem orgânica age formando complexos estáveis com vários íons metálicos sendo usado como anticoagulante do sangue, por quelar os íons de cálcio que promovem a coagulação sanguínea (JAIN, 1993) e foi a escolha para realização dos hemogramas.

Kolenkin (2002) identificaram uma pseudoplaquetopenia em sangue colhido com EDTA. Segundo Rebar et al. 2003 e Sink e Feldman (2006) o citrato de sódio é o melhor anticoagulante para os estudos de plaquetas e testes de coagulação, preserva a integridade da membrana das plaquetas (TRINDADE-SUEDAM et al., 2007) e, tem sua ação anticoagulante revertida com a adição de cálcio na amostra, viabilizando o seu uso como os géis de PRP (KERR, 2003). Assim, o citrato de sódio foi o escolhido para padronização do PRP.

As terapias com hemoderivados em medicina veterinária são realizadas há muitos anos e, uma das formas de obtenção do PRP é por meio da bolsa de transfusão CPDA-1 (ácido cítrico, citrato de sódio, fosfato de sódio, dextrose e adenina) (BRASIL, 2010). Desde a adição de adenina aos outros componentes, a CPDA-1 tem se mostrado eficiente para conservação de todos os tipos celulares por reduzir a fragilidade osmótica (NAKÃO et al., 1960) e, em bovinos, a viabilidade de hemácias tem sido preservada por 2 a 3 semanas (DeLOACH JR; SPRANDEL, 1985) podendo chegar até a 35 dias (RIBEIRO FILHO et al., 1994), por isso a escolha deste tipo de bolsa para o acondicionamento do sangue utilizado para padronização do protocolo de preparação do PRP.

A obtenção do PRP pelo método manual exige a definição de um melhor protocolo com base na velocidade e tempo de centrifugação. Fatores como anticoagulante, sistema de coleta de sangue, quantidade de sangue a ser utilizado, treinamento pessoal, bem como, o método de contagem das plaquetas (EFEUGLU et al., 2004; JAMESON, 2007) devem ser considerados na escolha do método. Neste estudo foram selecionados apenas protocolos de dupla centrifugação já que protocolos de centrifugação única resultam em uma mistura de PPP e PRP com baixa concentração total de plaquetas (MACEDO, 2004)

Como diversos protocolos de dupla centrifugação em centrífugas convencionais para diversas espécies têm sido propostos, a escolha dos protocolos se baseou nos volumes de hemácias de equinos e bovinos (37-59 fl e 36-50 fl, respectivamente) e volume de plaquetas de equinos, bovinos e humanos (5,6-8,3 fl, 4,6-8,5 fl e 7,0-10,0 fl, respectivamente) (WEISS; WARDROP, 2010). Em relação ao P6 e ao P8 estes foram propostos levando em consideração menor tempo e menor força (g), respectivamente, no segundo momento de centrifugação o que contrariou grande parte da literatura por também apresentaram bons resultados para confecção de PRP em bovinos.

Não foram selecionadas centrifugações mais altas do que 2300 g, como as realizadas para obtenção de PRP em cães por Ferraz et al. (2007), estes e Adler e Kent (2002) em humanos verificaram que a velocidade de centrifugação excessiva pode danificar as plaquetas e resultar em um PRP de má qualidade. Os resultados alcançados por Ferraz et al. (2007) demonstraram que o emprego de 3200 rpm na segunda centrifugação concentrou maior

quantidade de plaquetas, mas estas se encontravam morfológicamente alteradas, interferindo na qualidade do produto.

Mesmo a menor concentração de plaquetas em P1 ($1.750,00 \pm 286,01 \times 10^3$ plaquetas/ μL) (Tabela 05) foi superior aos resultados obtidos por Carmona et al. (2007) (250.000 plaquetas/ μL) utilizando método manual, Carter et al., (2003) (490.000 plaquetas/ μL) e Schnabel et al. (2007) (3,77 vezes) utilizando o método automático e Sutter et al., (2004) (855.000 plaquetas/ μL) utilizando o método semiautomático em equinos e, os resultados dos oito protocolos evidenciaram boa qualidade segundo Marx et al., (1998) e Lemos (2002) já que estes autores, para o PRP de humanos, consideram ser necessária uma concentração superior a 1.000.000 de plaquetas/ μL .

Na figura 09 se observa que em todos os protocolos avaliados o número de plaquetas aumentou ($p < 0,05$) em relação ao sangue total.

Tabela 05. Quantificação de plaquetas, eritrócitos e leucócitos no sangue total e nos oito protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas autólogo de bovinos (média \pm desvio padrão).

| Sangue total | Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) | Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$) | Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) |
|---------------------|---|---|--|
| | 494,56 \pm 124,38 | 6,02 \pm 1,22 | 8677,78 \pm 2775,24 |
| Protocolos | Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) | Eritrócitos (células/μL) | Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) |
| P1 | 1750,00 \pm 286,01 | 1122,22 \pm 939,23 | 1406,11 \pm 266,74 |
| P2 | 1969,33 \pm 872,07 | 1484,44 \pm 360,8 | 1918,33 \pm 212,53 |
| P3 | 3422,22 \pm 1590,03 | 1800,00 \pm 975,45 | 1261,67 \pm 562,56 |
| P4 | 3822,00 \pm 952,85 | 962,22 \pm 444,23 | 1491,67 \pm 528,73 |
| P5 | 4129,78 \pm 755,98 | 820,00 \pm 496,99 | 637,78 \pm 178,45 |
| P6 | 3292,67 \pm 956,41 | 780,00 \pm 283,02 | 768,33 \pm 295,28 |
| P7 | 2768,00 \pm 893,32 | 753,33 \pm 454,86 | 1027,22 \pm 403,28 |
| P8 | 3242,22 \pm 1099,72 | 648,89 \pm 302,67 | 731,67 \pm 184,54 |

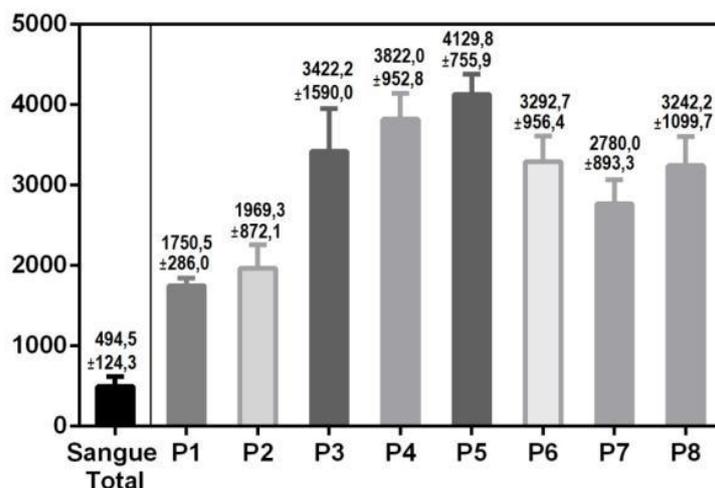


Figura 09. Quantidade de plaquetas nos diferentes protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas de bovino em relação ao sangue total.

Whitlow et al. (2008) consideram que a concentração plaquetária no PRP deve ser três a cinco vezes superior (ou 300 a 500 % a mais) do que a presente no sangue total, significando que todos os protocolos (P1 a P8) foram eficientes em concentrar plaquetas e adequados para confecção de PRP com $365,24 \pm 79,5$ % (P1) o menor valor encontrado (Tabela 06). O maior valor foi $890,53 \pm 277,14$ % (P5), sem diferença ($p > 0,05$) para P3, P4, P6 e P8 e estes quatro últimos sem diferença ($p > 0,05$) para o P7, mas diferindo ($p < 0,05$) dos menores valores encontrados em P1 e P2.

Tabela 06. Concentração de plaquetas, eritrócitos, leucócitos e TGF- β 1 em 8 protocolos de plasma rico em plaquetas autólogo de bovino.

| Protocolos | Plaquetas* | Eritrócitos ($\times 10^{-2}$) * | Leucócitos* | TGF- β 1 (pg/ μ L) |
|------------|--------------------------|------------------------------------|-----------------------|------------------------------|
| P1 | $365,24^c \pm 79,5$ | $1,76^{bc} \pm 1,16$ | $17,93^b \pm 6,65$ | $2432,95^a \pm 555,67$ |
| P2 | $406,09^c \pm 160,62$ | $2,46^{ab} \pm 0,57$ | $24,40^a \pm 9,78$ | $2174,27^{ab} \pm 783,87$ |
| P3 | $711,14^{ab} \pm 262,53$ | $2,91^a \pm 0,14$ | $13,80^{bc} \pm 3,93$ | $2157,30^{ab} \pm 507,05$ |
| P4 | $813,01^{ab} \pm 268,41$ | $1,64^{bc} \pm 0,87$ | $17,42^b \pm 4,89$ | $2324,43^{ab} \pm 629,35$ |
| P5 | $890,53^a \pm 277,14$ | $1,30^c \pm 0,61$ | $7,67^d \pm 2,68$ | $1744,21^b \pm 766,13$ |
| P6 | $708,65^{ab} \pm 309,61$ | $1,29^c \pm 0,39$ | $8,95^{cd} \pm 2,53$ | $2288,32^{ab} \pm 582,82$ |
| P7 | $608,71^{bc} \pm 271,36$ | $1,27^c \pm 0,79$ | $11,90^{cd} \pm 3,28$ | $2261,28^{ab} \pm 518,66$ |
| P8 | $702,23^{ab} \pm 298,8$ | $1,10^c \pm 0,56$ | $9,26^{cd} \pm 3,79$ | $2422,67^a \pm 509,97$ |

* % em relação ao sangue total.

Valores apresentados como média \pm desvio padrão.

Médias na mesma coluna seguidas por letras diferentes indicam diferença estatística a 95% de confiança.

A média de concentração das plaquetas no P1 e no P2 foi semelhante ao observado por Carmona et al. (2007) e Maia et al. (2009) em equinos, respectivamente, mas quando se compara as médias obtidas no P4 e no P5 em humanos por Vendramin et al. (2006; 2009) e os dados de P7 (LÓPEZ et al., 2012) em plasma de bovinos, se observa que as médias obtidas neste trabalho foram superiores as descritas por estes autores em seus respectivos estudos utilizando as mesmas velocidades e tempos de centrifugação, porém com diferentes volumes de sangue e uma única metodologia para obtenção de PRP que foi adaptada a todos.

Marx e Garg (1999) relatam que a presença de leucócitos no PRP de humanos é benéfica contribuindo na resistência natural a processos infecciosos e/ou alérgicos. Contudo, Carmona et al. (2007) recomenda minimizar o número de leucócitos no PRP quando se deseja utilizá-lo em articulações de equinos e McCarrel e Fortier (2009) também não consideraram um fator positivo a presença de leucócitos no PRP humano relacionando um aumento do catabolismo e diminuição da síntese de matriz extracelular nos tecidos aos leucócitos. Estas células podem interferir na ação regenerativa do PRP em alguns tecidos (uso intra-articular, por exemplo), mas não são fatores negativos quando se deseja usar o PRP como modulador de respostas imunes já que parece haver uma correlação positiva entre as células brancas do sangue, o fator de necrose tumoral e a IL-1 (McCARREL e FORTIER, 2009), com aumento da produção de citocinas inflamatórias e melhoramento nos efeitos catabólicos *in vivo* (SCHNABEL et al., 2007).

Sabendo-se que o tamanho e o peso das plaquetas, hemácias e leucócitos determinam o protocolo mais efetivo para concentrar plaquetas em cada espécie (LÓPEZ et al., 2012) e que o processo de centrifugação e separação do plasma deve ser executado com muita

precisão para separar as plaquetas dos eritrócitos e leucócitos que são considerados contaminantes das amostras de PRP (MARX, 2004), P2 e P3 foram os protocolos que apresentaram mais eritrócitos e P2 o maior número de leucócitos (Tabela 06), podendo estes resultados estarem relacionados conforme Pereira et al. (2013) à menor força gravitacional (g) e menor tempo de centrifugação destes protocolos. Vendruscolo et al. (2012) observaram em sangue de equinos, altas contagens de plaquetas associados a menores forças de centrifugação.

O protocolo que apresentou menos leucócitos foi o P5, mas sem diferir ($p > 0,05$) em relação ao P6, P8 e P7, e estes diferentes ($p < 0,05$) de P2 e P1. Em relação aos eritrócitos, o P8 apresentou menor valor acompanhado por P7, P6 e P5 ($p > 0,05$). As concentrações de eritrócitos e leucócitos em cada protocolo estão na Tabela 06.

O P1 e o P8 apresentaram maior quantidade de TGF- β 1 (Tabela 06). No P1 obteve-se grande quantidade de leucócitos e eritrócitos e inversamente pouca quantidade de plaquetas evidenciando como descrito por Weibrich et al. (2003) em humanos, que além das plaquetas, células como os leucócitos, têm a capacidade de liberar FC.

A maior concentração de TGF- β 1 obtida (2432,95 a \pm 555,67 pg/mL) foi inferior ao descrito por Carter et al. (2003) (7.480 pg/mL), Sutter et al. (2004) (23.600 pg/mL) e Carmona et al. (2007) (12.515 pg/mL) em equinos e superior aos níveis obtidos em protocolos testados por Vendruscolo et al. (2012), também em equinos, evidenciando que não só o protocolo como também a técnica são importantes no preparo do PRP.

O aumento da velocidade na segunda centrifugação como realizado por Aghallo et al. (2002), Scarso Filho (2002) e Ferraz et al. (2007) em coelhos, humanos e cães, respectivamente, baseou-se no fato de que uma segunda centrifugação do sangue, de maior intensidade, permitiria separar melhor a fração do plasma pobre em plaquetas, que corresponde à parte superior, da parte inferior, que representa o PRP (BARROSO et al., 2007).

Os protocolos P6 e P8, criados com segunda centrifugação menor em tempo (P6) e em intensidade (P8) do que a primeira, nesse método manual, apresentaram boa capacidade de concentração de plaquetas associada a altos valores de TGF- β 1. Os resultados foram adequados à meta de aumentar a contagem plaquetária em uma concentração bem acima da encontrada no sangue total, preservando a estrutura e a função das plaquetas, como indicado por López et al. (2012) sugerindo a possibilidade de resultados favoráveis *in vivo* em que, a ação terapêutica do PRP é prejudicada se as plaquetas se rompem ou se ativam antecipadamente liberando os FC e isto ocorre em velocidades (força g) altas (FERRAZ et al. 2007).

O protocolo que mais concentrou plaquetas (P5) obteve os menores valores do fator de crescimento TGF- β 1, com diferença ($p < 0,05$) em relação ao P1 e P8, resultado divergente dos obtidos por Vendruscolo et al. (2012) que não observaram diferença entre protocolos que mais concentraram plaquetas em relação aos níveis de FC.

Houve correlação negativa moderada entre plaquetas e TGF- β 1 ($\rho = -0,48$), e entre plaquetas e leucócitos ($\rho = -0,69$) e uma correlação positiva fraca entre leucócitos e TGF- β 1 ($\rho = 0,26$) o que se assemelha a observações de Weibrich et al. (2003) que evidenciaram que outras células, além de plaquetas são capazes de produzir FCs e, esses valores são divergentes dos encontrados por López et al. (2012) que evidenciaram correlações positivas entre leucócitos e plaquetas.

De acordo com os resultados, o protocolo usado por Vendramin et al. (2009) em humanos (P5) apresentou bons resultados em concentrar plaquetas de bovinos e o P8, confeccionado neste estudo, se destacou pela maior quantidade de TGF- β 1 e altas concentrações de plaquetas.

4.2 Atividade *in vitro* de plasma rico em plaquetas, plasma pobre em plaquetas e plasma de bovinos contra *S. aureus*

4.2.1 Procedimento

EDTA e citrato de sódio se ligam ao cálcio do sangue impedindo a coagulação (WEISS; WARDROP, 2010), mas para preparo do PRP escolheu-se citrato de sódio por ser considerado mais adequado por preservar a integridade das plaquetas (MARX 2000, TRINDADE-SUEDAM et al. 2007) e pela possibilidade de se reverter o efeito anticoagulante com a adição de cálcio (KERR, 2003).

Os tipos de meios de cultura são selecionados de acordo com o microrganismo ou grupo de microrganismos que se quer cultivar, possuindo os requisitos nutritivos em condições ambientais favoráveis para propiciar um bom desenvolvimento. *S. aureus* crescem rapidamente em meios de cultura não seletivos, tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias, com formação de grandes colônias lisas em 24 horas (SILVA et al., 2007). A não seletividade é uma condição que se aplica ao caldo Casoy e ao Agar padrão utilizados neste estudo os quais possibilitaram um bom desenvolvimento do *S. aureus*.

A técnica de espalhamento em superfície (*spread-plate*), também conhecida como método das diluições seriadas, escolhida para o ensaio *in vitro* do efeito antibacteriano, serve tanto para o isolamento quanto para contagem de microrganismos (QUINN et al., 2005). Após o plaqueamento e incubação por tempo e temperatura adequados previamente definidos para cada microrganismo, as células ou pequenos agrupamentos crescem isoladamente, dando origem a colônias que serão contadas na diluição apropriada e, portanto, chamadas de unidades formadoras de colônias (UFC).

Nos tubos com maiores diluições (1:100.000) não houve crescimento bacteriano suficiente em todos os grupos e/ou em todos os tempos analisados, ao mesmo tempo em que nos tubos de menor diluição cresceram células em excesso não sendo possível a quantificação adequada das UFC. Segundo Silva et al. (2007), as diluições da amostra devem ser feitas para viabilizar a contagem de microrganismos quando não se tem noção do número de UFC. O ideal é que cada placa escolhida para a contagem contenha um número, que para bactérias, varia de 30 a 300 colônias, sendo assim, as diluições de 1:1.000 a 1:100.000 foram as que se apresentaram mais apropriadas para as contagens.

4.2.2 Atividade *in vitro* dos componentes do sangue contra *S. aureus*

Nos ensaios de inibição do crescimento *in vitro* do *S. aureus*, comparou-se os dois melhores protocolos (P5 e P8) a partir dos resultados descritos no item 4.1 em suas categorias: plasma rico em plaquetas (PRP5 e PRP8), géis de PRP (PRP ativado com GC - PRP5A e PRP8A), plasma pobre em plaquetas (PPP5 e PPP8), géis de PPP (PPP ativado com GC - PPP5A e PPP8A) e plasma (P) em relação ao controle (CT+) em quatro momentos (1, 2, 6 e 12 horas), representando o tempo em que os produtos atuaram contra o *S. aureus* antes do plaqueamento. O tempo de 24 horas não foi analisado, pois o crescimento microbiano em todos os tratamentos e controle se expressou em incontáveis UFC em todas as diluições.

Observou-se nos grupos de PRPs ativados (PRP5A e PRP8A) que o crescimento bacteriano foi inibido significativamente ($p < 0,05$) em relação ao CT+ (caldo + cultura + salina) em todos os momentos. Os demais grupos de PRP, PPP, gel de PPP e P tiveram resultados semelhantes ($p > 0,05$) quando comparados entre si e ao grupo controle (Figura 10).

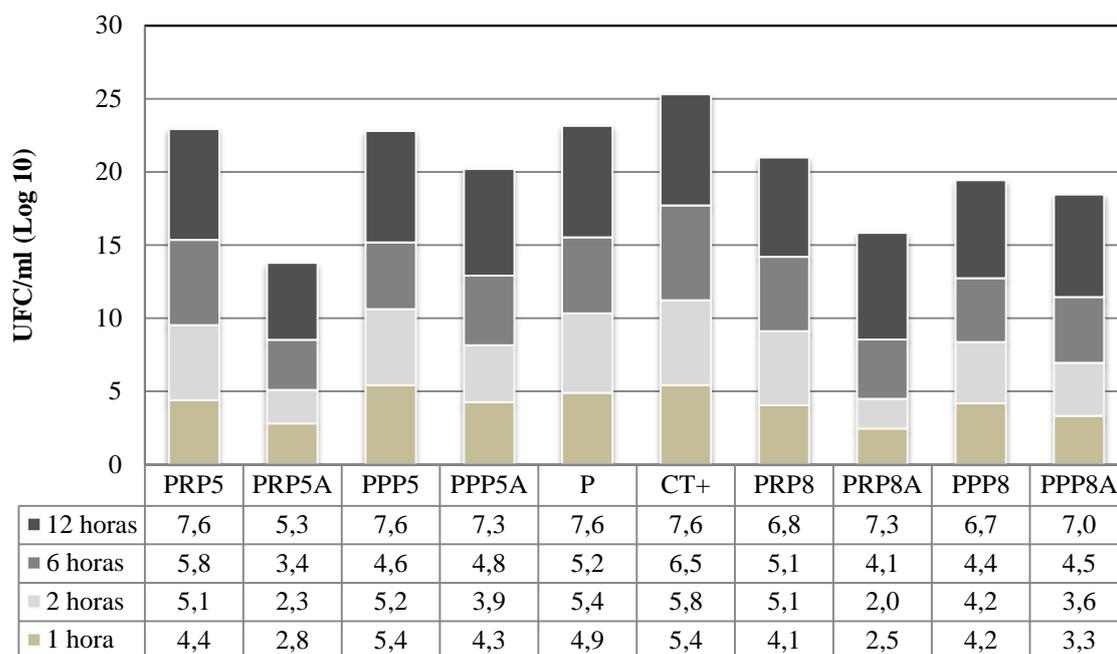


Figura 10. Crescimento microbiano (UFC/mL - Log₁₀) de *Staphylococcus aureus* em relação aos tratamentos com plasma rico em plaquetas (PRP), plasma rico em plaquetas ativado com gluconato de cálcio (PRPA), plasma pobre em plaquetas (PPP), plasma pobre em plaquetas ativado (PPPA) em dois protocolos (5 e 8), plasma (P) e controle positivo (CT+) em diferentes tempos.

Após uma hora de incubação da bactéria com os produtos testados, PRP5A e PRP8A já demonstravam inibição no crescimento bacteriano ao se comparar com o grupo controle (Figura 11) e demais grupos ($p < 0,05$), enquanto que o grupo tratado com o PPP5 teve o mesmo comportamento do CT+ ($p > 0,05$).

Na segunda hora o crescimento bacteriano no CT+ foi maior que em todos os tratamentos, mas com diferença ($p < 0,05$) observada apenas em relação aos géis de PRP (PRP5A e PRP8A).

Na 6ª hora o PRP8A expressou atividade semelhante aos géis de PPP e ao P ($p > 0,05$), e mesmo com menores crescimentos bacterianos ao serem comparados com o CT+ ($p > 0,05$), apenas o PRP5A diferiu do controle ($p < 0,05$) divergindo dos resultados obtidos por Alvarez et al. (2011) que relataram que a inibição do crescimento em todos os produtos do sangue diferindo do controle se iniciou após 8 horas.

O plasma apresentou efeito limitado, com resultado semelhante ao controle após 12 horas. A diminuição da ação do plasma sobre o crescimento do microrganismo foi evidente no estudo de Álvarez et al. (2011) também na 12ª hora.

Comparou-se o PRP e o gel de PRP com a finalidade de confirmar se a ativação com gluconato de cálcio influenciaria a atividade do PRP nos ensaios de inibição do crescimento de *S. aureus*. Obteve-se em ambos os protocolos melhores resultados com o PRP ativado, mas de forma significativa somente na 2ª hora ($p < 0,05$).

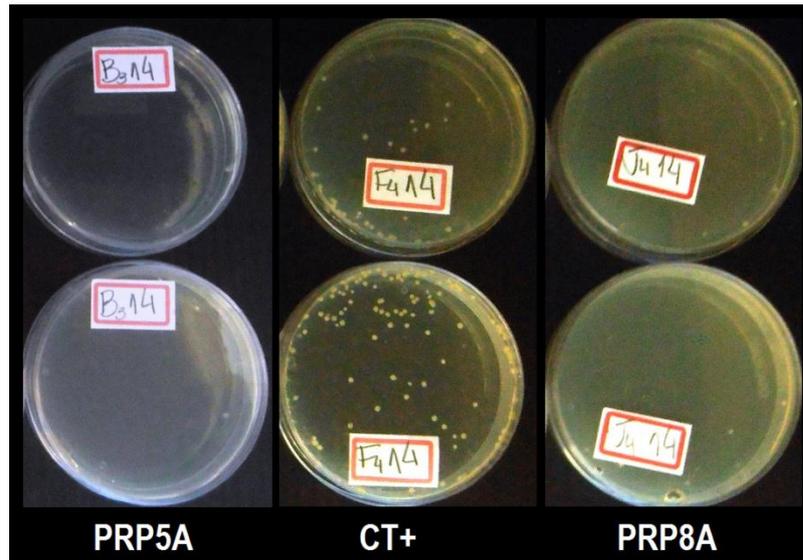


Figura 11. Unidades formadoras de colônia observadas nas placas de Petri contendo meio ágar padrão para contagem (APC), em duplicata, referentes ao plaqueamento da primeira hora do PRP5A (caldo + cultura + PRP5 + gluconato de Ca); controle positivo (caldo + cultura + salina) (CT+) e PRP8A (caldo + cultura + PRP8 + gluconato de Ca), na diluição 1:10.000.

O gluconato de cálcio que resulta na gelificação do PRP facilitando a aplicação em feridas traumáticas e cirúrgicas (EFEOGLU et al., 2004), em meios de cultura líquidos, como o caldo Casoy usado neste ensaio, pode promover o aprisionamento da bactéria e, este pode estar relacionado ao crescimento bacteriano menor no PRP5A em todos os momentos, e em alguns momentos no PRP8A. Observou-se que a viscosidade do gel de PRP diminui em seis a oito horas, coincidindo com o aumento do crescimento bacteriano. A possibilidade de que o crescimento de microrganismos seja limitado pelo aprisionamento no gel não se justifica plenamente, visto que o crescimento no gel (produtos ativados), embora não significativo, foi menor que no controle em todos os momentos.

Um melhor efeito antibacteriano do gel de PRP seguido pelo gel de PPP em comparação com o PRP puro foi obtido por Álvarez et al. (2011). Argüelles et al. (2006) evidenciaram que os sais de cálcio produzem uma melhor ativação de plaquetas. Corroborando com esses dados, no presente estudo, efeito inibitório significativo foi evidenciado somente para gel de PRP na segunda hora em relação ao controle.

A inibição do crescimento microbiano pelas plaquetas segundo Blockmans et al. (1995), ocorre por meio da interação dos microrganismos com receptores destas promovendo a liberação de FC e outras substâncias que agem limitando ou impedindo o crescimento de patógenos (HARRISON; CRAMER, 1993).

Ainda que não significativo, observou-se um menor crescimento bacteriano nos PPP e PRP puro em relação ao controle, sugerindo que a defesa contra patógenos do PRP pode envolver outros fatores além da ativação de plaquetas. Até o momento os resultados encontrados em ensaios *in vitro* com PRP sugerem que o efeito antimicrobiano não depende apenas da presença de plaquetas e da sua ativação com liberação das citocinas, mas também envolve fatores humorais presentes no plasma como sugerido por Moojen et al. (2008). Mecanismos de defesa como estimulação do *S. aureus* sobre a glicoproteína Ib da membrana das plaquetas ativando-as (SHENKMAN et al., 1999) e geração de metabólitos do oxigênio

pelas plaquetas destruindo a parede de microrganismos (YEAMAN, 1997; KRIJGSVELD et al., 2000) são mencionados.

Dohan et al. (2009) sugeriram que as células brancas do sangue podem auxiliar a atividade antibacteriana dos componentes sanguíneos, mas não se observou diferença ($p > 0,05$) entre os protocolos 5 e 8 quanto ao efeito inibitório do crescimento microbiano, sendo o protocolo 5 com maior número de plaquetas e o 8 com maior número de leucócitos. Estudos conduzidos por Anitua (1999) também sugeriram que uma dose adicional de leucócitos não melhorou significativamente as propriedades antimicrobianas do PRP.

Weibrich et al. (2003) evidenciaram que além das plaquetas, diversas células são capazes de produzir FC incluindo os leucócitos e, embora as citocinas possam interferir negativamente na ação regenerativa do PRP em tecidos (uso intra-articular, por exemplo), transformam o PRP em modulador de respostas imunes. Neste sentido, com uma e duas horas o melhor efeito inibitório contra *S. aureus* foi obtido com o gel de PRP do protocolo 8 com mais leucócitos e FC (TGF β -1) e menos plaquetas que o protocolo 5. Nas horas seguintes a condição foi inversa, com melhores efeitos inibitórios obtidos com o PRP do protocolo 5. A dúvida neste caso é se os leucócitos estariam envolvidos com a atividade inibitória do crescimento nos momentos 1 e 2 do protocolo 8.

Intravia et al. (2014) ao avaliarem protocolos diferentes de PRP, um com menores concentrações de plaquetas e leucócitos e outro com concentrações mais elevadas, não observaram diferenças significativas na atividade antibacteriana. Ambos os produtos mostraram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no crescimento de *S. aureus* em até 8 horas.

Drago et al. (2014) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de plaquetas na atividade antimicrobiana de PRP e observaram que independentemente da concentração de plaquetas, a atividade antibacteriana era similar. Os resultados obtidos pelos autores não mostram nenhuma correlação entre a atividade antimicrobiana e a concentração de plaquetas no PRP.

Os PRP8A e PRP5A se mostraram mais eficientes em inibir o crescimento bacteriano (Figura 12). Em estudos de Drago et al. (2014) observa-se no gel de PRP uma maior e mais sustentada concentração de TGF- β 1 e PDGF ao longo do tempo em comparação com os outros componentes do sangue (gel de leucócitos, PPP e PRP puro) e, associado aos resultados, sugere-se que a atividade antimicrobiana do gel de PRP contra *S. aureus* e outras bactérias é devido a uma cooperação entre diversos componentes do plasma e os FCP após a ativação das plaquetas.

Um aumento do crescimento microbiano ao longo do tempo foi observado em todos os tratamentos, inclusive no controle. Segundo Quinn et al. (2005) observaram que em um novo meio as bactérias não se reproduzem imediatamente, este período é chamado de Fase Lag que pode ser estender por horas a vários dias. Depois, as células iniciam o processo de divisão celular com crescimento exponencial atingindo valores constantes e maior atividade metabólica, seguindo-se de uma fase de estabilização do crescimento. Observa-se que com os géis de PRP houve inibição do crescimento na segunda hora enquanto que no controle manteve-se o crescimento constante em padrão exponencial diferente dos tratamentos com PRP ativado (Figura 12).

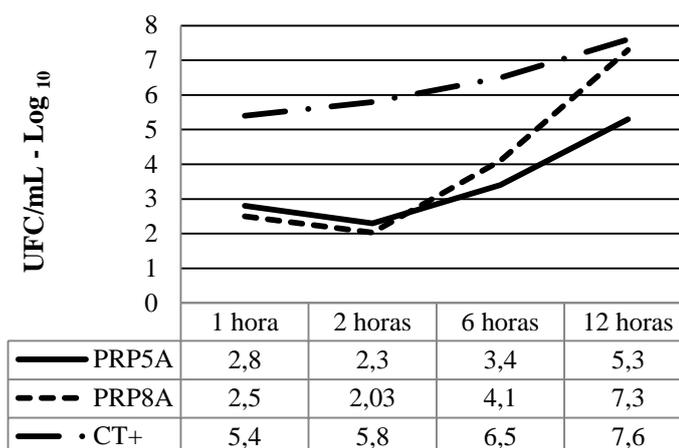


Figura 12. Crescimento de *S. aureus* após 1, 2, 6 e 12 horas de incubação com plasma rico em plaquetas ativado com gluconato de cálcio (PRPA, protocolos 5 e 8). CT+: caldo + cultura + salina.

Mariani et al. (2014) observaram que o PRP e o PPP inibiram o crescimento de bactérias por até 2 horas sendo o PRP significativamente melhor que o PPP e, esses resultados indicaram que o PRP pode fornecer uma proteção precoce contra contaminações bacterianas a partir da primeira hora de tratamento, o que sugere que a atuação *in loco* pode ser importante por um período de tempo necessário para a ativação da resposta imune inata.

4.3 Ensaio *in vivo*: aplicação intramamária de plasma rico em plaquetas em vacas com mastite subclínica

4.3.1 Sangue

De acordo com Parker e Blowey (1974) a composição do sangue venoso depende em parte da fisiologia do tecido que a veia drena. A avaliação seriada de parâmetros hematológicos auxilia no monitoramento da saúde do rebanho leiteiro e alterações hematológicas podem estar associadas a diferentes doenças. Desta forma, para acompanhamento dos parâmetros hematológicos foi escolhida a veia coccígea já que seus componentes não são modificados pela passagem por órgãos secretórios como acontece com as veia jugular e epigástrica superficial (BORGES et al., 1997).

Os parâmetros eritrocitários ao serem avaliados quanto aos valores de referência para a espécie bovina (KANEKO et al., 1997; KRIMER, 2011) apresentaram-se normais em todos os momentos, exceção para hematimetria 48 horas após o tratamento, que ficou abaixo do limite de 5 milhões estabelecido como fisiológico para a espécie.

Para os demais parâmetros do hemograma, observou-se um aumento (acima dos fisiológicos) na leucometria global no T2, aumento do fibrinogênio em T24 e T48 ($p > 0,05$) e proteínas plasmáticas elevadas em todos os momentos (Tabela 07).

A leucometria global teve um aumento no T2 e decresceu progressivamente nos momentos seguintes com diferença ($p < 0,05$) observada entre duas e 48 horas (Tabela 07, Figura 13) após aplicação intramamária do PRP ($12,42 \pm 4,39$ e $9,10 \pm 2,84$ células $\times 10^3/\mu\text{L}$ nos tempos 2 e 48, respectivamente).

Costa et al. (2004) observaram que a leucometria global de vacas com mastite estava aumentada em relação aos valores de referência, esses autores observaram clinicamente sadias apresentaram $11,69 \times 10^3/\mu\text{L}$, com um aumento de 13,67% e 9,75% ($13,29$ e $12,83 \times 10^3/\mu\text{L}$) em relação às vacas que apresentaram mastite subclínica e clínica, respectivamente. Os valores encontrados pelos autores foram mais altos que os observados em nosso estudo em que também se utilizou vacas com mastite subclínica.

Tabela 07. Parâmetros hematológicos (média \pm desvio padrão) das seis vacas antes (T0) e após a aplicação intramamária de plasma rico em plaquetas e soro.

| | Referências* | T0 | T2 | T6 | T24 | T48 |
|-------------|--------------|------------------|--------------------|------------------|-----------------|-------------------|
| VG | 21 - 30 | 26 ± 6 | 25 ± 6 | 26 ± 5 | 26 ± 6 | 25 ± 4 |
| Hg | 8,0 - 15,0 | $9,2 \pm 1,9$ | $8,9 \pm 2,0$ | $9,2 \pm 1,9$ | $9 \pm 2,0$ | $8,8 \pm 1,6$ |
| Hm | 5,0 - 10,0 | $5,82 \pm 1,6$ | $5,68 \pm 1,61$ | $5,73 \pm 1,41$ | $5,7 \pm 1,52$ | $4,82 \pm 1,26$ |
| LG | 4,0 - 12,0 | $10,70 \pm 4,07$ | $12,42 \pm 4,39^a$ | $11,03 \pm 3,29$ | $9,93 \pm 3,78$ | $9,10 \pm 2,84^b$ |
| Eos | 0 - 2400 | 1317 ± 1150 | 1212 ± 376 | 1458 ± 685 | 1229 ± 781 | 1101 ± 516 |
| Seg | 600 - 4000 | 2431 ± 742 | 3422 ± 2300 | 3312 ± 2421 | 2305 ± 1106 | 2478 ± 1039 |
| Lin | 2500 - 7500 | 6335 ± 3012 | 7372 ± 2903 | 5779 ± 1409 | 5889 ± 2409 | 5097 ± 2380 |
| Mon | 0 - 800 | 567 ± 259 | 343 ± 259 | 411 ± 340 | 470 ± 322 | 444 ± 297 |
| Plaq | 100 - 800 | 163 ± 45 | 260 ± 136 | 276 ± 192 | 183 ± 29 | 248 ± 152 |
| FB | 200-600 | 500 ± 179 | 533 ± 151 | 467 ± 175 | 750 ± 455 | 667 ± 294 |
| PPT | 6,0 - 8,0 | $8,2 \pm 0,4$ | $8,4 \pm 0,4$ | $8,4 \pm 0,5$ | $8,5 \pm 0,3$ | $8,5 \pm 0,6$ |

* Valores de referências segundo Kaneko et al. (1997) e Krimer (2011)

a e b: Diferença estatística a 95% de confiança (Anova medidas repetidas)

T0: antes do tratamento; T2, T6, T24, T48: 2, 6, 24 e 48 horas, respectivamente, após a aplicação intramamária do plasma rico em plaquetas.

VG: Volume globular ou hematócrito (%), Hg: concentração de hemoglobina (g/dL), Hm: hematimetria (células $\times 10^6/\mu\text{L}$), LG: leucometria global (células $\times 10^3/\mu\text{L}$), Eos: eosinófilos (células/ μL), Seg: segmentados (células/ μL), Lin: linfócitos (células/ μL), Mon: monócitos (células/ μL), Plaq: plaquetas (células $\times 10^3/\mu\text{L}$), FB: Fibrinogênio (g/dL), PPT: proteínas plasmáticas totais (g/dL).

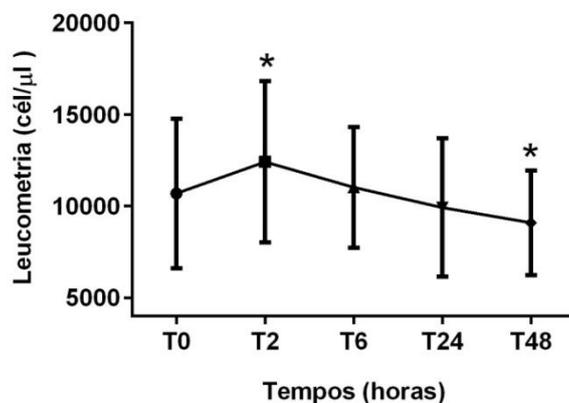


Figura 13. Leucometria global (células/ μL) em T0 (antes do tratamento), T2, T6, T24, T48 (2, 6, 24 e 48 horas, respectivamente) após a aplicação intramamária do plasma rico em plaquetas (PRP). *Diferença estatística a 95% de confiança (Anova medidas repetidas).

As alterações leucocitárias observadas podem ser justificadas segundo Garcia Navarro (2005) ao afirmarem que há mobilização de células dos compartimentos de reserva com aumento da leucometria após 2 horas e quimiotaxia de leucócitos para a glândula mamária (MONFARDINI et al., 2004) após o estímulo do PRP, resultando em queda progressiva da leucometria até 48 horas, quando foram observadas as menores contagens de leucócitos. Questiona-se se em aplicações repetidas estes valores estariam alterados.

Em ruminantes, diferentemente de outras espécies animais nos estados inflamatórios agudos os neutrófilos imaturos aparecem rapidamente na circulação (TAYLOR, 2000). Garcia Navarro (2005) atribuem essa diferença ao fato de ruminantes possuírem um compartimento de reserva leucocitária limitado na medula óssea. Neutrofilia e desvio à esquerda são atribuídos ao aumento da mobilização a partir da medula óssea, onde o número de neutrófilos maduros é relativamente pequeno. Segundo Paape e Schultze (1974) o número de PMN do sítio de armazenamento que respondem a uma inflamação na glândula mamaria depende da gravidade da inflamação e da capacidade do agente de estimular a quimiotaxia. Assim, a ausência de neutrófilos imaturos na circulação dos animais deste estudo indica que a resposta inflamatória induzida pela ação do PRP na glândula mamária ocorreu prematuramente (2 horas), porém não intensa o suficiente para a liberação de células imaturas nas 48 horas em que foram avaliados.

Sutherland e Whitney (1995) explicaram que devido à variabilidade da resposta leucocitária em bovinos, a avaliação de proteínas plasmáticas juntamente ao leucograma, oferece melhor parâmetro de interpretação do que a contagem de leucócitos isoladamente. E, como proposto por Petersen et al. (2004), o monitoramento dessas proteínas em vacas leiteiras é útil para identificar situações clínicas e subclínicas, como as afecções mamárias. No presente estudo observou-se a proteína plasmática elevada em todos os momentos ($p > 0,05$) (Tabela 07) não sendo possível atribuir ao tratamento o motivo para tal elevação.

Sutton e Hobman (1975) observaram que a concentração plasmática do fibrinogênio aumentou após 24 a 36 horas da injúria tecidual, permaneceu elevada durante a doença, e decresceu com a melhora do animal. De forma coerente, houve um aumento ($p > 0,05$) do fibrinogênio plasmático após 24 horas da aplicação do PRP intramamário e que se manteve por 48 horas. O fibrinogênio é considerado um bom marcador e avaliador do processo inflamatório e curso da doença (WEISS; PERMAN, 1992).

Para a redução dos parâmetros eritrocitários na circulação (hematócrito, hemoglobina e hematimetria), que ocorreu após o aumento ($p > 0,05$) do TBARS em 24 horas (Figura 14), sugere-se aumento da remoção de eritrócitos da circulação periférica por aumento da lipoperoxidação da membrana eritrocitária. Segundo Tang et al. (2007) a oxidação da membrana induz a um aumento da rigidez, menor deformabilidade celular, e maior reconhecimento por macrófagos com conseqüente fagocitose destes eritrócitos.

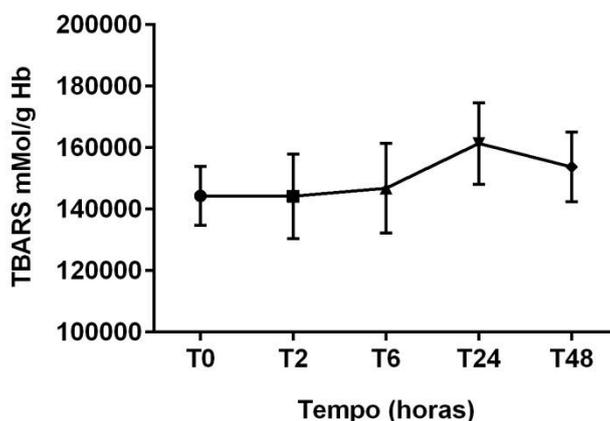


Figura 14. TBARS (mMol/g Hb) do sangue em T0 (antes do tratamento), T2, T6, T24, T48 (2, 6, 24 e 48 horas, respectivamente) após a aplicação intramamária do plasma rico em plaquetas (PRP).

Após aplicação intramamária do PRP houve um aumento do TBARS entre a 6^a e 24^a hora, porém não significativa ($p > 0,05$). Os metabólitos do oxigênio embora altamente reativos são parte integrante do metabolismo normal, incluindo o processo de respiração e produção de energia, a função fagocítica contra microrganismos, o metabolismo do ácido araquidônico na produção de prostaglandinas e leucotrienos e a ovulação e fertilização (FREEMAN; CRAPO, 1982). Assim, o aumento da atividade metabólica e a leucocitose em resposta à aplicação do PRP podem ser a causa da elevação discreta do TBARS sérico, sem configurar um estresse oxidativo, que ocorre pelo desequilíbrio entre os agentes oxirredutores e as defesas antioxidantes (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Conforme Kubow (1993), os radicais livres são capazes de reagir rapidamente com vários compostos ou atingir alvos celulares, como as membranas. Como a membrana é uma estrutura vital para a célula, a lesão induzida por ERO pode influenciar os parâmetros eritrocitários. Assim, embora não significativo, o aumento do TBARS pode estar relacionado às alterações eritrocitárias observadas.

4.3.2 Leite

Sabendo-se que a mudança na composição do leite é proporcional ao grau de prejuízo causado às células secretoras e capilares sanguíneos da glândula (KITCHEN, 1981), observou-se que os parâmetros de composição (gordura, proteínas, lactose, sólidos totais e sólidos não gordurosos) não variaram ($p > 0,05$) em função dos tratamentos e tempos de avaliação (Tabela 08).

Os teores de proteína, sólidos totais e estrato seco desengordurado foram normais nos quartos mamários tratados com PRP e soro em todos os tempos. As concentrações de gordura e lactose foram baixas em relação aos teores médios do leite de vacas de diferentes raças (GONZÁLEZ et al., 2001). A gordura foi inferior ao valor encontrado por Oliveira e Caruso (1996) (3,80%) quando fizeram um levantamento das médias de gordura encontradas por diversos autores, e no T0 e T24 inferiores ao mínimo estabelecido como critério de qualidade para o leite no Brasil (3,0%) (BRASIL, 2011).

O baixo teor de gordura das amostras justifica-se pelo momento de coleta (antes da ordenha), sendo que o leite do início da ordenha apresenta em torno de 1,0 a 2,0% de gordura

podendo chegar a níveis de 5 a 10% no final da operação (MACHADO et al., 1998). Observou-se contudo um valor mais elevado no T48, sendo este discordante dos valores sugeridos por Machado et al. (1998) para amostras obtidas no início da ordenha. Outros fatores como fase de lactação, intervalo entre ordenhas, idade e alimentação têm influência sobre a concentração de lactose e gordura no leite (GONZÁLEZ et al., 2001), mas provavelmente foram irrelevantes nas condições deste estudo.

Tabela 08. Média \pm desvio padrão da composição (% m/m) do leite em T0 (antes do tratamento), T24 e T48 (24 e 48 horas, respectivamente) após a aplicação intramamária de plasma rico em plaquetas (PRP) e soro em vacas com mastite subclínica.

| Composição | Grupo | T0 | T24 | T48 |
|----------------|-------|------------------|------------------|------------------|
| Gordura | Soro | 2,87 \pm 1,11 | 2,88 \pm 0,68 | 3,20 \pm 0,54 |
| | PRP | 2,57 \pm 0,84 | 2,70 \pm 0,81 | 3,28 \pm 0,50 |
| Proteína | Soro | 3,19 \pm 0,44 | 2,96 \pm 0,38 | 2,99 \pm 0,31 |
| | PRP | 3,28 \pm 0,45 | 3,18 \pm 0,57 | 3,17 \pm 0,42 |
| Lactose | Soro | 4,31 \pm 0,12 | 4,37 \pm 0,19 | 4,39 \pm 0,13 |
| | PRP | 4,27 \pm 0,42 | 4,08 \pm 0,47 | 4,31 \pm 0,29 |
| Sólidos Totais | Soro | 11,37 \pm 1,49 | 11,19 \pm 0,69 | 11,59 \pm 0,55 |
| | PRP | 11,12 \pm 1,11 | 10,94 \pm 1,02 | 11,79 \pm 0,51 |
| Etrato Seco | Soro | 8,50 \pm 0,49 | 8,32 \pm 0,48 | 8,39 \pm 0,41 |
| Desengordurado | PRP | 8,55 \pm 0,70 | 8,24 \pm 0,99 | 8,51 \pm 0,68 |

Nota: Sem diferenças estatísticas a 95% de probabilidade.

A CCS do leite dos quartos mamários tratados com PRP aumentou em 24 horas e manteve-se elevada até 48 horas após a aplicação intramamária. A diferença foi significativa ($p < 0,05$) em relação ao T0 no grupo tratado com PRP e em relação aos tempos do controle (soro) em que a CCS ficou estável, com ligeira redução em 48 horas (Figura 15).

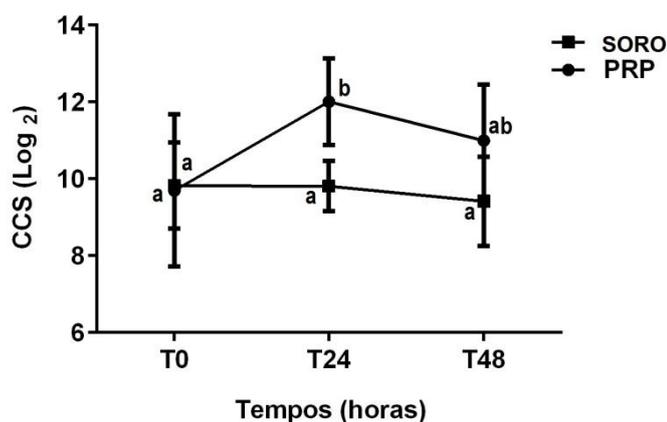


Figura 15. Contagem de células somáticas (CCS) em Log₂ do leite em T0 (antes do tratamento), T24 e T48 (24 e 48 horas, respectivamente) após a aplicação intramamária do plasma rico em plaquetas (PRP) e soro. Letras diferentes indicam diferença estatística a 95% de significância (Anova medidas repetidas).

A avaliação ao CMT nos mesmos momentos confirmou uma correspondência aproximada do escore ao CMT com a CCS no T0 (Figura 16) conforme indicado por Ruegg (2003). Contudo, a diferença entre as células somáticas do leite foi menos evidenciada pelo escore ao CMT em ambos os grupos, confirmando a subjetividade do teste.

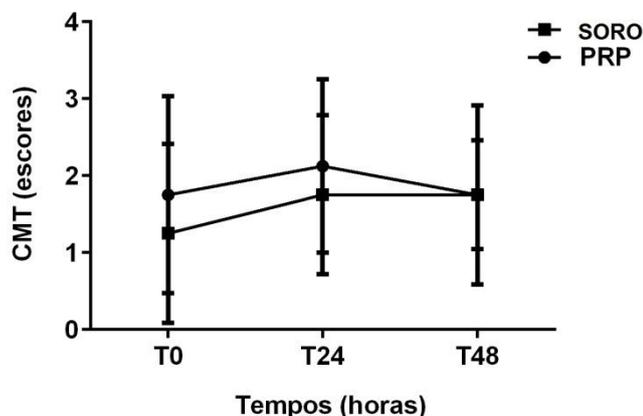


Figura 16. CMT (escores) dos quartos mamários em T0 (antes do tratamento), T24 e T48 (24 e 48 horas, respectivamente) após a aplicação intramamária do plasma rico em plaquetas (PRP) e soro. Grupos e tempos sem diferença estatística a 95% de significância.

Destaca-se que a divisão dos quartos mamários entre tratamentos foi efetuada mediante o escore ao CMT avaliado antes do tratamento (T0) de forma a manter uma relativa homogeneidade entre os grupos. A CCS inicial foi equivalente entre os grupos ($9,70 \pm 1,98$ e $9,82 \pm 1,12$ Log₂ células/mL no grupo PRP e soro, respectivamente) (Tabela 09) e após o tratamento o grupo tratado com PRP diferiu do controle (soro). A semelhança na CCS no T0 entre animais tratados e controles atesta a adequação dos critérios estabelecidos para a divisão dos grupos, apesar da subjetividade do CMT (DELLA LIBERA et al., 2011).

Tabela 09. Média \pm desvio padrão da contagem de células somáticas (CCS – Log base 2) do leite em T0 (antes do tratamento), T24, T48 (24 e 48 horas, respectivamente) após a aplicação intramamária de plasma rico em plaquetas (PRP) e soro em vacas com mastite subclínica.

| | | T0 | T24 | T48 |
|-----|------|-------------------|--------------------|-----------------------|
| CCS | Soro | $9,82 \pm 1,12^a$ | $9,81 \pm 0,66^a$ | $9,42 \pm 1,06^a$ |
| | PRP | $9,70 \pm 1,98^a$ | $12,01 \pm 1,13^b$ | $10,99 \pm 1,46^{ab}$ |

As médias diferem a 95% de significância quando seguidas de letras diferentes.

Barber e Yang (1998) demonstraram que ambas as secreções mamárias, normal e mastítica apresentam atividade quimiotóxica para o aumento das células somáticas, especificamente os neutrófilos. A resposta inflamatória é desencadeada por leucócitos residentes em conjunto com as células epiteliais (PAAPE et al., 2002; RAINARD; RIOLLET 2003) que liberam substâncias quimiotóxicas para o rápido recrutamento de neutrófilos promovendo assim o aumento das células somáticas no leite como evidenciado no grupo tratado com PRP 24 horas após a inoculação.

A hipótese para o uso intramamário do PRP baseia-se no aumento da atividade imunológica local. O PRP possui moléculas bioativas que estimulam a quimiotaxia de neutrófilos (MARSOLAIS; FRENETTE, 2005) e também estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias. Assim, a elevação da CCS nos quartos mamários inoculados com PRP ocorreu conforme esperado.

Verificou-se que o tratamento intramamário com PRP promoveu o aumento de leucócitos do sangue após 2 horas da aplicação sugerindo-se mobilização para a glândula mamária como indicado por Paape et al. (2002) e Rainard e Riollot (2003). A maior atividade fagocítica e bactericida destas células como observado por Paschoal et al. (2005) e Bouwstra et al. (2008) seria evidenciada pelo aumento da produção de radicais livres e estresse oxidativo local e sistêmico.

Foi demonstrado que o leite com maior teor de células somáticas possui mais infiltrados PMNs e com isso um aumento de reações oxidativas e que a CCS do leite está associada positivamente com o nível malondialdeído (SURIYASATHAPORN et al., 2006; YANG et al., 2011). Por sua relação com a CCS, o MDA, produto final da peroxidação lipídica, foi considerado um indicador de úberes com mastite subclínica e é um dos mais utilizados para mensurar o estresse oxidativo (ESTERBAUER et al., 1991) sendo usado na presente investigação para avaliação da atividade oxidativa no leite.

As variações do MDA quanto aos tratamentos (PRP ou soro) não foram significativas, mas em relação aos tempos, os valores de MDA diminuíram em 24 horas ($p < 0,05$) e se elevaram (valores próximos dos iniciais, $p > 0,05$) 48 horas após a inoculação intramamária em ambos os grupos (Figura 17).

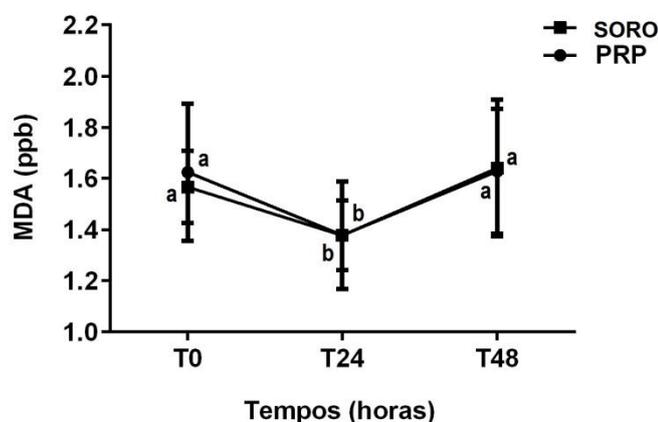


Figura 17. Malondialdeído (MDA - ppb) mensurado no leite em T0 (antes do tratamento), T24 e T48 (24 e 48 horas, respectivamente) após a aplicação intramamária do plasma rico em plaquetas (PRP) e soro. Letras diferentes indicam diferença estatística a 95% de significância.

Os valores de MDA para os grupo PRP e controle no T0 foram $1,62 \pm 0,27$ e $1,57 \pm 0,14$ ppb ($p > 0,05$), respectivamente (Tabela 10). Estes valores foram semelhantes ao valor médio obtido por Suriyasathaporn et al., (2010) de 1,57 ppb ao analisarem leite de 133 tanques de expansão de pequenos produtores de leite de propriedades com alto índice de mastite subclínica.

Tabela 10. Média \pm desvio padrão dos valores de malondialdeído (MDA) do leite em T0 (antes do tratamento), T24, T48 (24 e 48 horas, respectivamente) após a aplicação intramamária de plasma rico em plaquetas (PRP) e soro em vacas com mastite subclínica.

| | | T0 | T24 | T48 |
|-----------|------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| MDA (ppb) | Soro | 1,57 \pm 0,14 ^a | 1,37 \pm 0,14 ^b | 1,64 \pm 0,27 ^a |
| | PRP | 1,62 \pm 0,27 ^a | 1,38 \pm 0,21 ^b | 1,63 \pm 0,24 ^a |

Suriyasathaporn et al., (2010), ao correlacionarem o MDA com a CCS concluíram que há correlação positiva forte entre estas variáveis, o que não foi observado neste estudo em que a CCS aumentou no T24 no grupo tratado e se manteve estável no grupo controle, enquanto o MDA diminuiu em ambos os grupos também no T24, o que resultou em correlações negativa no grupo com PRP e fracamente positiva no controle após 24 horas (Tabela 11).

Tabela 11. Coeficiente de correlação de *Pearson* entre a contagem de células somáticas, (CCS) e malondialdeído (MDA) no leite de vacas com mastite subclínica em T0 (antes do tratamento), T24 e T48 (24 e 48 horas, respectivamente) após a aplicação intramamária de plasma rico em plaquetas (PRP) e soro.

| | Controle (soro) | | | Tratado (PRP) | | |
|-----|-----------------|-------|-------|---------------|--------|--------|
| | T0 | T24 | T48 | T0 | T24 | T48 |
| | MDA | | | | | |
| CCS | 0,642 | 0,120 | 0,094 | 0,602 | -0,373 | -0,726 |

O PRP possui ações imunoestimulantes auxiliando a produção de anticorpos, proliferação celular, produção de citocinas, aumento da quimiotaxia de neutrófilos, a fagocitose e atividade bactericida (POLITES et al., 2004). O aumento da CCS após o tratamento justificaria um aumento significativo do MDA no leite dos animais tratados com o PRP e a manutenção da correlação entre MDA e CCS relatada por outros autores (SURIYASATHAPORN et al., 2006; 2010, YANG et al., 2011), o que não ocorreu.

Durante o desencadeamento da resposta imunológica há produção de metabólitos do oxigênio por meio de reações de oxirredução. O mecanismo de explosão respiratória tem por finalidade a destruição dos patógenos e potencialmente pode afetar as células sadias do tecido infectado (SORDILLO et al., 1997). Dessa forma as defesas na glândula mamária devem atuar de forma intensa o suficiente para a destruição dos patógenos, mas preservando as células e tecidos mamários, bem como os componentes do leite. Os valores diminuídos de MDA no T24 indicam que a peroxidação lipídica no leite diminui entre T0 e T24 ($p < 0,05$), sugerindo que não houve estresse oxidativo na glândula mamária, sendo este um resultado favorável, pois um maior acúmulo de ERO em quartos infectados pode contribuir, pelo menos em parte, com o maior recrutamento de leucócitos para a glândula mamária e a persistência do processo inflamatório (BASTOS et al., 2012) com maior lesão tecidual.

Segundo Yang et al. (2011), o estresse oxidativo diminui a fagocitose. Assim, a diminuição significativa do MDA no leite no T24 sugere que não houve aumento do metabolismo oxidativo (LAMBETH, 2004). Portanto, a hipótese de aumento da imunidade nos quartos mamários tratados com PRP deve ser mais bem investigada, especialmente em relação aos demais fatores de defesa da glândula mamária em resposta ao PRP já que houve afluxo de células de defesa mas sem evidência de acréscimo na fagocitose.

A diminuição da capacidade fagocítica com consequente redução da atividade oxidativa dos PMN ocorre fisiologicamente durante a diapedese através de epitélio mamário (SMITS et al., 1999). Adicionalmente, a fagocitose dos PMN de glóbulos de gordura e caseína do leite reduz a capacidade fagocitária de agentes microbianos (PAAPE et al., 1975; 1977), sendo necessários milhares de células para manter as defesas na glândula mamária (YANG et al., 2012).

Bastos et al. (2012) observaram correlação positiva entre a CCS, viabilidade celular e os índices de fagocitose e, correlação negativa entre a liberação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) com CCS e H_2O_2 com viabilidade celular corroborando observações de Yang et al. (2011) sobre diminuição da fagocitose em meio a estresse oxidativo.

Os dados deste estudo confirmam os achados de Pessoa et al. (2012) que encontraram maior viabilidade de leucócitos e menor porcentagem de apoptose em amostras de leite com alta celularidade. Similarmente, Sladek e Rysanek (2010) observaram maior porcentagem de macrófagos residentes em apoptose que os macrófagos inflamatórios que migraram após indução de resposta inflamatória com solução salina tamponada (pH 7,4) ou lipopolissacarídeos em glândulas mamárias de novilhas clinicamente saudáveis e, concluíram que a apoptose de macrófagos na glândula mamária está envolvida na resolução da resposta inflamatória.

Ao avaliarem a fagocitose de neutrófilos Sladek e Rysanek (2000) demonstraram que o influxo dessas células induzido pela administração intramamária de um derivado de muramilo sintético (componente da parede celular de bactérias Gram negativas) demonstrou alterações típicas de apoptose em 24 horas e, chegaram à conclusão que estas observações foram limitadas a um curto período de tempo, sendo a questão da dinâmica da fagocitose de neutrófilos que migram para a glândula mamária envolta numa grande variedade de processos.

Um dos fatores relacionados à observação de fagocitose é que 24 horas corresponde ao tempo de vida médio de neutrófilos, estimado de 1 a 2 dias por Squier et al. (1999). A ocorrência de neutrófilos apoptóticos às 24 horas após a administração de LPS ou salina tamponada (PBS) indica que neutrófilos foram recrutados a partir do sangue, desenvolveram sua atividade fagocítica entre 24 e 48 horas e entraram em processo de apoptose como observado por Ishii et al (1998). As alterações morfológicas indicativas de apoptose são lentas, mas o reconhecimento pelo sistema monocítico fagocitário (SMF) para que ocorra a fagocitose e degradação de neutrófilos apoptóticos é extremamente rápido (NEWMAN et al, 1982).

Alguns estudos têm demonstrado que o SMF começa a fagocitar neutrófilos numa fase precoce de apoptose quando a membrana citoplasmática ainda está intacta (SAVILL, 1994). Isto poderia explicar a baixa concentração de MDA em ambos os grupos no T24, a maioria das células que participaram ativamente da fagocitose podem ter sido degradadas e removidas pelo SMF.

A lipoperoxidação é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação (SEVANI; HOCHSTEIN, 1985). A reação inicia-se com o sequestro do hidrogênio da membrana celular dos ácidos graxos poli-insaturados com consequente formação do radical lipídico. A fase de terminação é resultado da reação em cadeia entre os próprios radicais produzidos nas etapas anteriores (FERRARI, 2000). Uma vez iniciada a reação de oxidação lipídica segue em cadeia e somente termina quando forem esgotadas as reservas de ácidos insaturados e o oxigênio do meio (FERRARI, 2000). Desta maneira, com o esgotamento dos substratos, as reações de propagação vão cessando e inicia-se a formação dos produtos finais estáveis ou não reativos (KUBOW, 1993; ESTERBAUER, 1993).

Assim, para a redução do MDA no grupo tratado com soro sugere-se que não havendo estímulo inflamatório significativo, como evidenciado pela CCS estável em todos os momentos, as células de defesa residentes perderam parte da capacidade de fagocitose reduzindo-se assim a lipoperoxidação. Em experimentos conduzidos por Sladek e Rysanek (2000, 2001 e 2010) e Sladek et al. (2005), a aplicação intramamária de salina e LPS ou similares induziu resposta inflamatória em ambos os grupos, caracterizada pelo influxo de células somáticas para glândula mamária, evidenciando que solução salina não se mantém totalmente inerte na glândula mamária, o que também observamos em nosso estudo.

O aumento de leucócitos no sangue das vacas foi identificado com duas horas e a CCS aumentou com 24 horas. É possível que o recrutamento celular na glândula mamária tenha aumentado antes de 24 horas e em consequência também o MDA pela maior atividade fagocitária e, no T24, as células tivessem diminuído sua atividade fagocítica. Os momentos de avaliação do leite (0, 24 e 48 horas), em comparação com as análises do sangue foram menos efetivos na detecção da resposta ao PRP, recomendando-se em estudos posteriores coletas com menores intervalos e extensão do ensaio para mais de 48 horas.

Quanto à avaliação da citologia láctea a predominância em todos os tempos foi de macrófagos e neutrófilos seguidos de linfócitos (Tabela 12).

As proporções encontradas diferem daquelas relacionadas para o leite de glândulas mamárias sadias (PAAPE et al., 2003; SLADEK; RYSANEK, 2010) em que predominam macrófagos (60%) e linfócitos (28%) e mamas infectadas nas quais os neutrófilos PMN chegam a 90% do total de células (SLADEK et al., 2005).

Tabela 12. Média \pm desvio padrão (\log_2) da celularidade do leite em lâminas em T0 (antes do tratamento), T24 e T48 (24 e 48 horas, respectivamente) após a aplicação intramamária de plasma rico em plaquetas (PRP) e soro em vacas com mastite subclínica.

| | GRUPO CONTROLE (SORO) | | | GRUPO TRATADO (PRP) | | |
|-------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| | T0 | T24 | T48 | T0 | T24 | T48 |
| Macrófagos | 18,65 \pm 1,37 ^{bc} | 18,34 \pm 0,84 ^c | 18,55 \pm 0,95 ^c | 18,72 \pm 1,75 ^{bc} | 20,73 \pm 0,96 ^a | 20,48 \pm 1,54 ^{ab} |
| Linfócitos | 14,43 \pm 2,18 ^{ab} | 14,85 \pm 1,56 ^{ab} | 12,69 \pm 1,87 ^b | 15,16 \pm 2,67 ^{ab} | 17,27 \pm 3,02 ^a | 14,30 \pm 1,16 ^{ab} |
| Neutrófilos | 18,24 \pm 1,40 ^{ab} | 18,13 \pm 2,57 ^{ab} | 17,19 \pm 2,92 ^b | 18,12 \pm 2,37 ^{ab} | 20,90 \pm 1,23 ^a | 17,95 \pm 2,37 ^{ab} |

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística a 95% de significância.

Antes dos tratamentos (T0) não houve diferença ($p > 0,05$) na celularidade entre quartos tratados com PRP e com soro. A celularidade no grupo controle se manteve análoga em relação a todos os momentos analisados e em relação ao T0 do grupo tratado com PRP. No grupo PRP observou-se mudança de padrão na celularidade do leite. Linfócitos e neutrófilos tiveram mesmo comportamento. Houve aumento em T24, mas não significativo ao se comparar com os outros momentos do grupo tratado, diferindo ($p < 0,05$) apenas do T48 do grupo controle. No T48, em ambos os grupos, houve tendência à diminuição dos diferentes tipos celulares (Figuras 18 e 19).

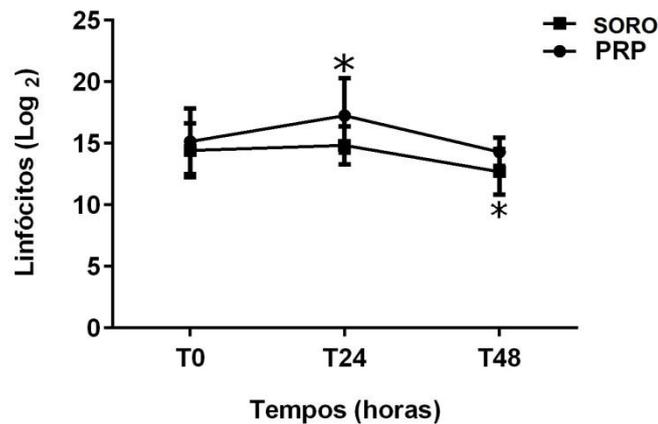


Figura 18. Linfócitos (Log₂) quantificados no leite em T0 (antes do tratamento), T24 e T48 (24 e 48 horas, respectivamente) após a aplicação intramamária do plasma rico em plaquetas (PRP) e soro. * diferentes a 95% de significância.

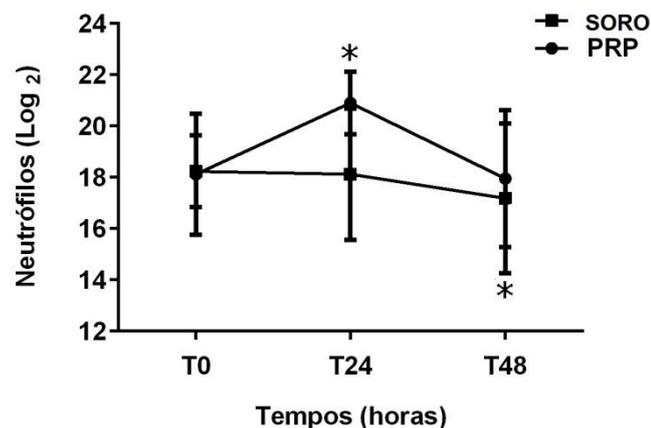


Figura 19. Neutrófilos (Log₂) quantificados no leite em T0 (antes do tratamento), T24 e T48 (24 e 48 horas, respectivamente) após a aplicação intramamária do plasma rico em plaquetas (PRP) e soro. * diferentes a 95% de significância.

Neutrófilos são as primeiras células recrutadas (PAAPE et al., 2000) durante a infecção mamária e predominam nas secreções mamárias no início da inflamação (PAAPE et al., 2002; SORDILLO et al., 1997), porém atuam por curtos períodos (SORDILLO et al., 1997), justificando-se o aumento significativo de neutrófilos na secreção de mamas tratadas com PRP em T24 e decréscimo destas células no T48.

Os maiores estímulos para os neutrófilos migrarem da circulação sanguínea para a glândula mamária são promovidos pelos mediadores inflamatórios, principalmente pelo estímulo das citocinas (TARGOWSKI, 1983), encontradas também nos concentrados de plaquetas (MARSOLAIS; FRENETTE, 2005). Rainard e Riollot (2006) ressaltaram o fato dos neutrófilos bovinos, diferentes de outras espécies, não serem atraídos por bactérias ou por seus produtos, mas apenas por sinalizadores bioquímicos. Os dados do presente estudo sugerem o efeito do PRP também sobre as citocinas pró inflamatórias da glândula mamária a partir do aumento da celularidade no leite.

Devido à ingestão de caseína e glóbulos de gordura pelos neutrófilos no leite há perda dos pseudópodos, o que diminui drasticamente sua atividade fagocítica e bactericida ao se

fazer uma comparação com sua função na corrente sanguínea (PAAPE et al., 2002; RAINARD; RIOLLET, 2006). Como se observa um aumento significativo de neutrófilos em T24, a redução dos níveis de MDA pode estar relacionada também a essa redução de fagocitose pelos neutrófilos.

No leite de quartos mamários tratados com PRP os macrófagos tiveram um aumento significativo no T24 com diferença ($p < 0,05$) em relação ao T0 e todos os momentos do grupo controle (Figura 20).

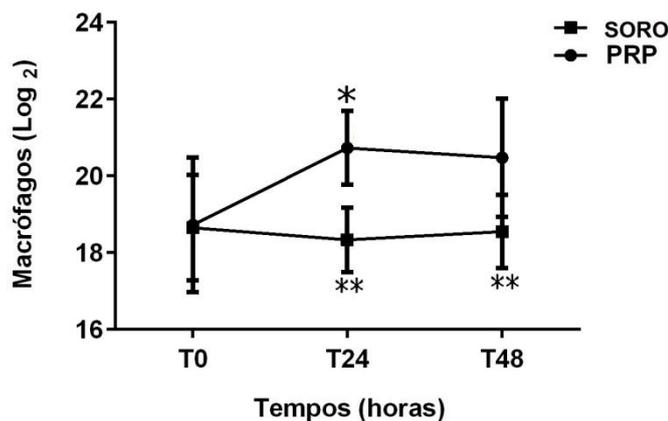


Figura 20. Macrófagos (Log₂) quantificados no leite em T0 (antes do tratamento), T24 e T48 (24 e 48 horas, respectivamente) após a aplicação intramamária do plasma rico em plaquetas (PRP) e soro. * diferente de ** a 95% de significância.

A presença em grande quantidade de macrófagos no T24 que permanece no T48 é justificada por Rainard e Riollet (2003) ao afirmarem que são células fagocíticas de meia-vida longa que removem detritos teciduais, patógenos da mastite e fagocitam os neutrófilos apoptóticos.

Como as células somáticas são células epiteliais e leucócitos residentes e migrados do sangue para a glândula mamária, o aumento da celularidade e a predominância de neutrófilos no T24 e valores altos de macrófagos no T24 e T48 indicam que houve aumento da reação inflamatória local induzida pela quimiotaxia de leucócitos após a aplicação intramamária do PRP.

Alterações na celularidade do leite, principalmente por elevação de macrófagos e linfócitos foram observadas por Bertagnon et al. (2014) ao avaliarem o efeito imunomodulador da vitamina E na imunidade sistêmica e na glândula mamária de bovinos leiteiros alimentados com silagem. Os autores sugeriram um estímulo da capacidade proliferativa de subpopulações de linfócitos para justificar a elevação destas células no leite, como ocorrido neste estudo em que foi usado o PRP como possível modulador da resposta imune da glândula mamária.

A cultura e o isolamento do patógeno poderia esclarecer melhor o padrão celular desse ensaio em ambos os grupos já que o agente etiológico também influencia na celularidade e resposta imune da glândula mamária (PHILPOT; NICKERSON, 2000; O'RIORDAN; LEE, 2004; RAINARD; RIOLLET, 2006; WELLNITZ; BRUCKMAIER, 2012).

Observou-se que os valores de leucócitos, TBARS e MDA tenderam a voltar aos níveis iniciais (T0) enquanto que a celularidade no leite atingiu o pico em 24 horas diminuindo após esse momento. Esses resultados estão de acordo com afirmações de Sordilo (2005), que alegou que as células fagocíticas ao migrarem rapidamente do sangue com

capacidade de eliminar o estímulo inflamatório, ocasionam menor recrutamento dos leucócitos com retorno de neutrófilos aos níveis normais.

O prolongamento da migração leucocitária, assim como a duração e a severidade da resposta inflamatória, podem causar danos ao tecido mamário com reduções na qualidade e quantidade de leite (ZHAO; LACASSE, 2008). Hibbitt (1983), Rainard e Riollot (2003) afirmaram que vacas que mobilizam um grande número de células somáticas em curto período de tempo apresentam maior resistência à mastite.

As expectativas propostas neste estudo foram admitidas, o aumento da celularidade no leite indica um aumento da imunidade local uma vez que leucócitos são fagócitos e tem atividade bactericida (PEIXOTO et al., 2002). Finalizando, em uma glândula mamária, o importante é a capacidade de mobilizar células somáticas em tempo hábil de combater o agente etiológico e reduzir a reação inflamatória com menor agressão tecidual possível. A competência de mobilização celular é mais essencial do que o tipo ou a quantidade celular que será mobilizada.

5 CONCLUSÕES

O tempo e a velocidade da centrifugação são relevantes para concentração das plaquetas, hemácias, leucócitos e fatores de crescimento do PRP.

A quantidade final do fator de crescimento TGF- β 1 não está relacionada diretamente à concentração plaquetária. Maiores valores de TGF- β 1 foram observados nos protocolos com menor número de plaquetas e elevados valores de leucócitos (P1).

Em ensaios *in vitro* contra *S. aureus* (ATCC 6538P), ao se avaliar o crescimento microbiano, os melhores resultados e por tempo mais prolongado são encontrados em protocolos de PRP ativados mediante adição de gluconato de cálcio.

No ensaio *in vivo* a partir da aplicação intramamária de PRP em vacas com mastite subclínica houve alteração da resposta inflamatória da glândula mamária. A partir de efeito sistêmico, alterou-se a série vermelha e ocorreu mobilização de leucócitos sanguíneos com consequente aumento das células somáticas, mas reduzido estresse oxidativo na glândula sugerindo atuação positiva do PRP como agente quimiotático de reduzida atividade deletéria.

O preparo do PRP a partir de sangue bovino pelo método manual em centrífuga comum foi viável e relativamente fácil e apresentou bom potencial para uso clínico.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. *Imunidade Celular e Molecular*. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564p.

ADLER, S.C.; KENT, K.J. Enhancing wound healing with growth factors. *Facial Plast. Surgical Clinics of North America*, v.10, p.129-146, 2002.

AGHALLO, T.L; MOY, P.K; FREYMILLER, E.G. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects. A pilot study. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v.60, p.1176-81, 2002.

AKERS, R.M.; NICKERSON, S.C. Mastitis and its impact on structure and function in the ruminant mammary gland. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, v.16, p.275-289, 2011.

ÁLVAREZ, M.E.; LÓPEZ, C.B.; GIRALDO, C.E.; SAMUDIO, I.; CARMONA, J.U. In vitro bactericidal activity of equine platelet concentrates, platelet poor plasma, and plasma against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Archivos de Medicina Veterinaria*, v.43, p.155-161, 2011.

ANITUA, E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implantes. *Internal Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, v.14, n.4, p.529-35, 1999.

ANITUA, E.; SANCHEZ, M.; A NURDEN, A.T.; ZALDUENDO, M.M.; DELA FUENTE, M.; AZOFRA, J.; ANDIA, I. Platelet-released growth factors enhance the secretion of hyaluronic acid and induce hepatocyte growth factor production by synovial fibroblasts from arthritic patients. *Rheumatology*, v.46, p.1769-1772, 2007.

ARGÜELLES, D.; CARMONA, J.U.; PASTOR, J.; IBORRA, A.; VIÑALS, L.; MARTÍNES, P.; BACH, E.; PRADES, M. Evaluation of single and double centrifugation tube methods for concentrating equine platelets. *Research in Veterinary Science*, v.81, p.237-245, 2006.

BANDOCH, P.; MELO, L.S. Prevalence of bovine mastitis due to *Staphylococcus aureus*: a literature review. *Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 17, n. 1, p. 47-51, 2011.

BANNERMAN, D.D.; PAAPE, M.J.; CHOCKALINGAM, A. *Staphylococcus aureus* intramammary infection elicits increased production of transforming growth factor. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.112, n.3-4, p. 309-15, 2006.

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.81-86, 1998.

BARBOSA, A.L.T.; DEL CARLO, R.J.; GOMES, H.C.; OLIVEIRA, A.C.; MONTEIRO, B.S; DEL CARLO, B.N. Plasma rico em plaquetas para reparação de falhas ósseas em cães. *Ciencia Rural*, v.38, p.1335-1340, 2008.

BARBOSA, K.B.F; COSTA, N.M.B; ALFENAS, R.C.G; DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Review of Nutrition*, v.23, n.4, p.629-643, 2010.

BARROSO, C.S.T.; BENITO, J.C.; PUIG, A.G. Calidad del plasma rico en plaquetas: estudio de la activación plaquetaria. *Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial*, v.29, p.240-248, 2007.

BASTOS, C.R.; BLAGITZ, M.G.; SOUZA, F.N.; BATISTA, C.F.; STRICAGNOLO, C.R.; AZEDO, M.R.; DELLA LIBERA, A.M.M.P. Viabilidade celular, fagocitose e espraiamento de fagócitos mononucleares, e liberação de peróxido de hidrogênio por leucócitos de glândulas mamárias bovinas sadias e infectadas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 32, n. 9, p.850-854, 2012.

BAUER, J.A.; CORREA, L.; LIMA, F.L.M.; LIMA, L.A.P.A.; EMILIO, F. Efeitos do plasma rico em plaquetas no processo de reparação de feridas dérmicas padronizadas em ratos. *Revista de Periodontia*, v.19, n.03, p.98-108, 2009.

BERTAGNON H.G.; SILVA, E.B.; CONNEGLIAN, M.M.; GREYSON, M.N.; ESPER, V.Z.; BASTOS, G.P.; PEREIRA, J.R. Ação imunomoduladora da vitamina E na imunidade sistêmica e da glândula mamária de bovinos leiteiros alimentados com silagem. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 35, n. 2, p. 857-866, 2014.

BIELECKI, T.M.; GAZDZIK, T.S.; ARENDT, J.; SZCZEPANSKI, T.; KROL, W.; WIELKOSZYNSKI, T. Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances: an in vitro study. *Journal of Bone and Joint Surgery*, v. 89, p. 417-420, 2007.

BLAIR, P.; FLAUMENHAFT, R. Platelet alpha-granules: Basic biology and clinical correlates. *Blood Reviews*, v. 23, p.177-189, 2009.

BLOCKMANS, D.; DECKMYN, H.; VERMYLEN, J. Platelet activation. *Blood Reviews*, Cambridge, v.9, n.3, p.143-156, 1995.

BORGES, J.R.J.; GRANDY, M.C.; SIQUEIRA, A.J.S. Comparação dos níveis de cálcio, fósforo inorgânico, glicose, proteínas totais, albumina no sangue coletado nas veias jugular, mamaria e coccígea em vacas leiteiras. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 4, n. 2, p. 63-66, 1997.

BOUWSTRA, R.J.; GOSELINK, R.M.; DOBBELAAR, P.; NIELEN, M.; NEWBOLD, J.R.; VAN WERVEN, T. The relationship between oxidative damage and vitamin E concentration in blood, milk, and liver tissue from vitamin E supplemented and nonsupplemented periparturient heifers. *Journal of Dairy Science*, v. 91, p. 977-987, 2008.

BRAGA-SILVA, J.; GEHLEN, D.R.; MENTA, C.; ATKINSON, E.A.; MACHADO, D.C.; VIEZZER, C.; BARBOSA, G.L.; BAES, C.V.W.; SILVA, V.D.; COSTA, J.C. Efeitos das células tronco adultas de medula óssea e do plasma rico em plaquetas na regeneração e recuperação funcional nervosa em um modelo de defeito agudo em nervoso periférico em rato. *Acta ortopédica brasileira*, v.14, n.5, p.273-275, 2006.

BRAMLEY, A.J. Factors affecting milk quality. In: ANDREWS, A.H.; BLOWEY, R. W.; BOYD, H. *Bovine medicine: diseases and husbandry of cattle*. Oxford: Blackwell Publications, 1992. p.291.

BRASIL. Guia para o uso de hemocomponentes. Ministério da Saúde, Brasília, DF. 2010. 140p.

BRASIL. *Instrução normativa nº 62*, de 29 de dezembro de 2011. MAPA, Brasília, DF.

BUITENHUIS, B.; RONTVED, C.M.; EDWARDS, S.M.; INGVARTSEN, K.L.; SORENSEN, 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.

CAMPOY, E.; COLOMBO, M.I. Autophagy in intracellular bacterial infection. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1793, n. 9, p.1465-77, 2009.

CARMONA, J.U. *Use of autologous platelet concentrates for the treatment of musculoskeletal injuries in the horse*. 2006. 91f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Universidade Autònoma de Barcelona, ESP.

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.

CARMONA, J.U.; LÓPEZ, C. Autologous platelet concentrates as a treatment for shoulder injury in a horse. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 31, n. 9, p. 1-5, 2011.

CARMONA, J.U.; LÓPEZ, C.; PRADES, M. Use of autologous platelet concentrates obtained by the tube method as a treatment for arthropathies in horses. *Archivos de Medicina Veterinaria*, v. 41, p. 175-179, 2009a.

CARMONA, J.U.; PRADES, M.; ARGUELLES, D. Autologous platelet concentrates as a treatment for soft tissue musculoskeletal lesions in horses. *Archivos de Medicina Veterinaria*, v. 41, p. 77-82, 2009b.

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.

CARTER, C.A.; JOLLYA, D.G.; WORDEN, C.E.; HENDRENA, D.G.; KANE, C.J.M. Platelet rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Experimental and Molecular Pathology*, v.74, n.3, p.244-255, 2003.

CIESLIK-BIELECKA, A.; BIELECKI, T.; GAZDZIK, T.S.; ARENDT, J.; KROL, W.; SZCZEPANSKI, T. Autologous platelets and leukocytes can improve healing of infected high-energy soft tissue injury. *Transfusion and Apheresis Science*, v. 41, p. 9–12, 2009.

COLES, E.H. *Veterinary Clinical Pathology*, 4 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1987, 421p.

COSTA, A.C. *Mastite subclínica: Patógenos isolados e respectiva sensibilidade antimicrobiana, variação da contagem de células somáticas e fatores de risco*. 2010. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária, BRA.

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, n. 1/2, p. 88-91, 2004.

CRUVINEL, W.M.; MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J.A.P.; CATELAN, T.T.T; SOUZA, A.W.S.; SILVA, N.P.; ANDRADE, L.E.C. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v.50, n.4, p.434-447, 2010.

CURFS, J.H.; MEIS, J.F.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J.A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 10, p. 742-780, 1997.

DAS, D; BISHAYI, B. Contribution of Catalase and Superoxide Dismutase to the Intracellular Survival of Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* in Murine Macrophages. *Indian Journal of Microbiology*, v. 50, n.4, p.375–384, 2010.

DE ROSSI, R.; COELHO, A.C.A.O.; MELLO, G.S.; FRAZÍLIO, F.O.; LEAL, C.R.B.; FACCO, G.G.; BRUM, K.B. Effects of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horses. *Acta Cirurgica Brasileira*, v.24, n.4, p.276-281, 2009.

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 and 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.; SOUZA, F. N.; BLAGITZ, M. G.; BATISTA, C. F. Avaliação de indicadores inflamatórios no diagnóstico da mastite bovina. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 78, n. 2, p. 297-300, 2011.

DELOACH, J.R.; SPRANDEL, U. Red blood cells as carriers for drugs. *Karger*, Basel, 1985.

DOHAN, D.M.E.; DISS, A.; ODIN, G.; DOGLIOLI, P.; HIPPOLYTE, M.P.; CHARRIER, J.B. In vitro effects of Choukroun's PRF on human gingival fibroblasts, dermal prekeratinocytes, preadipocytes, and maxillofacial osteoblasts in primary cultures. *Oral*

Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, v. 108, n. 3, p.341-352, 2009.

DOHMEN, M.J.W.; JOOP, K.; STURK, A.; BOLS, P.E.J.; LOHUIS, J.A.C.M. Relationship between intra-uterine bacterial contamination, endotoxin levels and the development of endometritis in postpartum cows with dystocia or retained placenta. *Theriogenology*, v. 54, p.1019-1032, 2000.

DRAGO, L.; BORTOLIN, M.; VASSENA, C.; ROMANÒ, C.L.; TASCHIERI, S.; FABBRO, M.D. Plasma components and platelet activation are essential for the antimicrobial properties of autologous platelet-rich plasma: an in vitro study. *PLoS ONE*, v. 9, n.9, p. 1-5, 2014.

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

DUSSE, L.M.S.; MACEDO, A.P.; BATSCHAUER, A.; CARVALHO, M.G. Plasma rico em plaquetas (PRP) e sua aplicação em odontologia. *Revista Brasileira de Análises Clínicas.*, v.40, n.3, p. 193-197, 2008.

EDMONSON, A.J.; LEAN, I.J.; WEAVER, L.D.; FARVER, T.; WEBSTER, G. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.72, n. 1, p.68-78, 1989.

EFEOGLU, C.; AKCAY, Y.D.; ERTURK, S. A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 62, n. 11, p. 1403-1407, 2004.

EPPLEY, B.L.; WOODSELL, J.E.; HIGGINS, J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet rich plasma: Implications for wound healing. *Plastic Reconstructive Surgery*, v.114, p. 1502- 1508, 2004.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R.J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 11, p.81-128, 1991.

EVERTS, P.A.; KNAPE, J.T.; WEIBRICH, G.; SCHÖNBERGER, J.P.; HOFFMANN, J.; OVERDEVEST, E.P.; BOX, H.A.; VAN ZUNDERT, A. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *Journal of Extracorporeal Technology*, v. 38, n. 2 p. 174-187, 2006.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C.A.F. Infecções intramamárias por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. *Ciência Rural*, v.34, p.1315-1320, 2004.

FERRARI, C.K.B. Free radicals, lipid peroxidation and antioxidants in apoptosis: implications in cancer, cardiovascular and neurological diseases. *Biologia, Bratislava*, v. 55, n. 6, p. 581-590, 2000.

FERRAZ, V.C.M.; FERRIGNO, C.R.A.; SCHMAEDECKE, A. Platelet concentration of platelet-rich plasma from dogs, obtained through three centrifugation speeds. *Brazilian Journal of Veterinary Research And Animal Science*, v.44, p.435-440, 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.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. Qualidade do leite e controle de mastite. São Paulo:Lemos Editorial, 2000, 176p.

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

FOSTER, T.J. Colonization and infection of the human host by staphylococci: adhesion, survival and immune evasion. *Journal of Veterinary Dermatology*, v. 20, n.5-6 p. 456-470, 2009.

FREEMAN, B.A.; CRAPO, J.D. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation*, v. 47, n. 5, p. 412-26, 1982.

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

ESTERBAUER, H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v.57, n.5, p.S779-S786, 1993. Supplement.

GACHET, C. The platelet P2 receptors as molecular targets for old and new antiplatelet drugs. *Pharmacology & Therapeutics.*, v.108, p.180-192, 2005.

GARCIA NAVARRO, C.E.K. *Manual de Hematologia Veterinária*. São Paulo: Editora Varela, 2005, 206p.

GIANNOBILE, W.V. Periodontal tissue regeneration by polypeptide growth factors and gene transfers. In: *Tissue Engineering: Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics*. Illinois: Quintessence, 1999, p.231-243.

GONZÁLEZ, F.H.D.; DÜRR, J.W.; FONTANELI, R.S. Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras. Porto Alegre - RS, 2001. 77p.

GRAVES, S.F.; KOBAYASHI, D.S.; DELEO, F. R. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* immune evasion and virulence. *Journal of Molecular Medicine*, v. 88, n. 2, p. 109-114, 2010.

GUNTHER, J.; ESCH, K.; POSCHADEL, N.; PETZL, W.; ZERBE, H.; MITTERHUEMER, S.; BLUM, H.; SEYFERT, H.M. Comparative kinetics of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* specific activation of key immune pathways in mammary epithelial cells demonstrates that *S. aureus* elicits a delayed response dominated by

interleukin-6 (Il-6) but not by Il-1a or Tumor Necrosis Factor α . *Infection and Immunity*, v.79, n.2, p.695-707, 2011.

HARRISON, P.; CRAMER, E.M. Platelet alpha-granules. *Blood Reviews*, Cambridge, v.7, n.1, p.52-62, 1993.

HIBBITT, K. G. Immunity factors in mastitis. *Proceedings, British Cattle Veterinary Association*. 1983.

HOFFBRAND, A.V.; PETTIT, J.E.; MOSS, P.A.H. Plaquetas, coagulação do sangue e hemostasia. In: *Fundamentos em Hematologia*. Artmed, 2004. cap.18, p.244-257.

HOLANDA JUNIOR, E.V.; MADALENA, F.E.; HOLANDA, E.D.; MIRANDA, W.M.; SOUZA, M.R. Impacto econômico da mastite em seis fazendas de Araxá - Minas Gerais, Brasil. *Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal*, v. 13, n. 2, p. 63-69, 2005.

INTRAVIA, J.; ALLEN, D.A.; DURANT, T.J.; MCCARTHY, M.B.; RUSSELL, R.; BEITZEL, K.; COTE, M.P.; DIAS, F.; MAZZOCCA, A.D. In vitro evaluation of the anti-bacterial effect of two preparations of platelet rich plasma compared with cefazolin and whole blood. *Muscles Ligaments Tendons Journal*, v. 8, n. 4(1), p. 79-84, 2014.

ISHII, Y.; HASHIMOTO, K.; NOMURA, A.; SAKAMOTO, T.; UCHIDA, Y.; OHTSUKA, M.; HASEGAWA, S.; SAGAI, M. Elimination of neutrophils by apoptosis during the resolution of acute pulmonary inflammation in rats, *Lung*, v. 176, p. 89-98, 1998.

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

JAMESON, C.A. Autologous platelet concentrate for the production of platelet gel. *American Society for Clinical Pathology, Lab Medicine*, v.38, p.39- 42, 2007.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. (Eds). *Clinical biochemistry of domestic animals*. California: Academic, 1997. 932p.

KERR M.G. Plaquetas (trombócitos) e fatores de coagulação, In: Ibid. (Ed.), *Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária: Bioquímica Clínica e Hematologia*. São Paulo: Rocca. 2003. p.45-59.

KEVY, S.V.; JACOBSON, M.S. Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. *Journal of Extra-Corporeal Technology*, v.36, n.1, p.28-35, 2004.

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, n.1, p. 167-188, 1981.

KOBAYASHI, S.D.; BRAUGHTON, K.R.; PALAZZOLO-BALLANCE, A.M.; KENNEDY, A.D.; SAMPAIO, E.; KRISTOSTURYAN, E.; WHITNEY, A.R.; STURDEVANT, D.E.; DORWARD, D.W.; HOLLAND, S.M.; KREISWIRTH, B.N.; MUSSER, J.M.; DELEO, F.R. Rapid Neutrophil Destruction following Phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Innate immune system*, v. 2, n. 6 p. 560-575, 2012.

KOLENKIN SM. Automatic blood platelet count. A method for controlling correctness of an analyzer performance. *Klin Lab Diagn*, v.8, p.33-5. 2002.

KONEMAN, E.W. *Diagnóstico Microbiológico*. Guanabara Koogan, 2008. 1488p.

KRIJGSVELD, J.; ZAAT, S.A.; MEELDIJK, J.; VAN VEELLEN, P.A.; FANG, G.; POOLMAN, B.; BRANDT, E.; EHLERT, J.E.; KUIJPERS, A.J.; ENGBERS, G.H.; FEIJEN, J.; DANKERT, J. Thrombocidines, microbicidal proteins from human blood platelets, are C-terminal deletion products of CXC chemokines. *The Journal of Biological Chemistry*, v., 275, p. 20374–20381, 2000.

KRIMER, P.M. Reference Intervals. In: LATIMER, K. S. Duncan & Prasses: *Veterinary Laboratory Medicine Clinical Pathology*. 5ed. Blackwell Publishing, 2011. p. 375.

KUBOTA, S.; KAWATA, K.; YANAGITA, T.; DOI, H.; KITO, T.; TAKIGAWA, M. Abundant retention and release of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) by platelets. *Journal of Biochemistry*, v.136, n.3, p.279-282, 2004.

KUBOW, S. Lipid oxidation products in food and atherogenesis. *Nutrition Reviews*, v.51, p. 33-40, 1993.

LAMBETH JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology*, v. 4, n.3, p. 181-189, 2004.

LEMOS, J.J. *Utilização de plasma rico em plaquetas em enxertos ósseos – Proposta de um protocolo de obtenção simplificado*. 2002. Acessado em: 15 nov de 2013. Online. Disponível em: [<http://www.dentaria.com/artigos/ver/?art=58>]

LEVEN, E.R. Megakaryocytes. In: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, et al (eds) *Schulman's veterinary hematology*. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, p. 443-447, 2000.

LIHONG, C.; WANG, C.; LIU, H.; LIU, G.; RAN, X. Antibacterial effect of autologous platelet-rich gel derived from subjects with diabetic dermal ulcers in vitro. *Journal of Diabetes Research*, v. 2013, p. 1-5, 2013.

LOMBARD, J. Prevalence of contagious mastitis pathogens on U.S. dairy operations. *NMC 47th Ann Meet Proceeds*, New Orleans, Louisiana, v.20, n.23, p.170-171, 2008.

LÓPEZ, C.; CARMONA, J.U.; SAMUDIO, I. Use of autologous platelet concentrates as treatment for a scapular fracture and brachial plexus nerve injury produced by a gunshot in a horse. *Archivos de Medicina Veterinaria*, v. 42, p. 209-214. 2010.

LÓPEZ, C.; GIRALDO, C.E.; CARMONA, J.U. Evaluación de un método de doble centrifugación en tubo para concentrar plaquetas bovinas: estudio celular. *Archivos de Medicina Veterinaria*, v. 44, p. 109-115, 2012.

MACEDO, A.P. Plasma rico em plaquetas: uma análise quantitativa e qualitativa de dois protocolos de obtenção. 2004. 64f. Dissertação (Mestrado em Odontologia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

MACHADO, P.F.; PEREIRA, A.R.; SILVA, L.F.P. Fatores que afetam a composição do leite. *Revista Indústria de Laticínios*, n.17, p 32-36, 1998.

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

MARIANI, E.; FILARDO, G.; CANELLA, V.; BERLINGERI, A.; BIELLI, A.; CATTINI, L.; LANDINI, M.P.; KON, E.; MARCACCI, M.; FACCHINI, A. Platelet-rich plasma affects bacterial growth in vitro. *Cytotherapy*, v. 16, n. 9, p. 1294-304, 2014.

MARSOLAIS, D.; FRENETT, J. Inflammation and tendon healing. *Médecine Sciences*, Paris, v. 21, n. 2, p. 180-186, 2005.

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

MARX, R.E. Platelet-rich plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP? *Implant Dentistry*, v. 10, n. 4, p. 225-228, 2000.

MARX, R.E., CARLSON, E.R.; EICHSTAEDT, R.M.; SCHIMMELE, S.R.; STRAUSS, J.E.; GEORGEFF, K.R. Platelet-rich plasm: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, v. 85, n. 6, p. 638-646, 1998.

MARX, R.E.; GARG, A.K. Bone graft physiology with use of platelet-rich plasma and hiperbaric oxygen. In: *The sinus bone graft*. Colorado: Quintessense, p. 183-189, 1999.

MATRAS, H. The use of fibrin glue in oral and maxillofacial surgery. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, n. 40, p. 617, 1982.

McCARREL, T.; FORTIER, L.A. Temporal growth factor release from platelet-rich plasma, thehalose lyophilized platelets, and bone marrow aspirate and their effect on tendon and ligament gene expression. *Journal of Orthopaedic Research*, v.27, p.1033-1042, 2009.

MESSORA, M.E.; NAGATA, M.J.H.; MELO, L.G.N.; FURLANETO, F.A.C.; DELIBERADOR, T.M.; GARCIA, V.G.; BOSCO, A.F. Análise de um protocolo de única centrifugação para o preparo do plasma rico em plaquetas (PRP) - estudo em coelhos. *Revista Sul-Brasileira de Odontologia*, v.6, n.2, p.135-141, 2009.

MONFARDINI, E.; VAN MERRIS, V.; PAAPE, M.; DUCHATEAU, L.; BURVENICH, C. Selectin and Chemotaxis Throughout Bone Marrow Granulocyte Maturation in the Bovine. *Journal of Dairy Science* , v. 87, n. 10, p. 3350 - 3357, 2004.

MOOJEN, D.J.; EVERTS, P.A.; SCHURE, R.M.; OVERDEVEST, E.P.; VAN ZUNDERT, A.; KNAPE, J.T.; CASTELEIN, R.M.; CREMERS, L.B.; DHERT, W.J. Antimicrobial activity of plateletleukocyte gel against Staphylococcus aureus. *Journal of Orthopaedic Research*, v. 26, p. 404-410, 2008.

MORIN, D.E. Acute mastitis: revisiting the goals of therapy. *Proceedings of the 23rd World Buiatrics Congress*, Québec, Canada, 2004.

MUKHOPADHYAY, K.; WHITMIRE, W.; XIONG, Y.Q.; MOLDEN, J.; JONES, T.; PESCHEL, A.; STAUBITZ, P.; ADLER-MOORE, J.; MCNAMARA, P.J.; PROCTOR, R.A.; YEAMAN, M.R.; BAYER, A.S. In vitro susceptibility of *Staphylococcus aureus* to thrombin-induced platelet microbicidal protein-1 (tPMP-1) is influenced by cell membrane phospholipid composition and asymmetry. *Microbiology*, v. 153, p.1187-1197, 2007.

NAGAHATA, H.; KAWAI, H.; HIGUCHI, H.; KAWAI, K.; YAYOU, K.; CHANG, C.J. Altered leukocyte responsiveness in dairy cows with naturally occurring chronic *Staphylococcus aureus*. *Japanese journal of veterinary science*, v.73, p.885-94, 2011.

NAKÃO, M.; NAKÃO, T.; ARIMATSU, Y. A new preservative medium maintaining the level of adenosine triphosphate and the osmotic resistance of erythrocytes. *Proceedings of the Japan Academy*, v.36, n. 43, 1960.

NEWMAN, S.L.; HENSON, J.E.; HENSON, P.M. Phagocytosis of senescent neutrophils by human monocyte-derived macrophages and rabbit inflammatory macrophages. *Journal of Experimental Medicine*, v.156, n.2, p.430-42. 1982.

NICHOLSON, M.J.; BUTTERWORTH, M.H. *A guide to condition scoring of zebu cattle*. Addis Ababa: International Livestock Centre for Africa, 1986. 29 p.

NICKERSON, S.C. Bovine mammary gland: structure and function; relationship to milk production and immunity to mastitis. *Agri-Practice*, v. 15, n. 1, p. 11-18, 1994.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, v.v95, p. 351-358, 1979.

OLIVEIRA, A.J.; CARUSO, J.G.B. *Leite - obtenção e qualidade do produto fluido e derivados*. Piracicaba: FEALQ. 1996. 80p.

OLIVEIRA, C.M.B.; SAKATA, R.K.; ISSY, A.M.; GEROLA, L.R.; SALOMÃO, R. Citocinas e Dor. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 61, n.2, 2011.

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, BR.

O'RIORDAN, K.; LEE, J.C. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clinical Microbiology Reviews*. v. 17, n.1, p. 218-234, 2004.

OVIEDO-BOYSO, J.; VALDEZ-ALARCÓN, J.J.; CAJERO-JUÁREZ, M.; OCHOA-ZARZOSA, A.; LÓPEZ-MEZA, J.E.; BRAVO-PATIÑO, A.; BAIZABAL-AGUIRRE, V.M. Innate immune response of bovinemammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *Journal of Infection*, v.54, p.399-409, 2007.

PAAPE, M.J.; BANNERMAN, D.D.; ZHAO, X.; LEE, J.W. The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Veterinary Research*, v. 34, p. 597–627, 2003.

PAAPE, M.J.; GUIDRY, A.J.; KIRK, S.T.; BOLT, D.J. Measurement of phagocytosis of ³²P-labeled *Staphylococcus aureus* by bovine leukocytes: lysostaphin digestion and inhibitory effect of cream, *American Journal of Veterinary Research*, v. 36, p. 1737-1743, 1975.

PAAPE, M.J.; PEARSON, R.E.; WERGIN, W.P.; GUIDRY, A.J. Enhancement of chemotactic response of polymorphonuclear leukocytes into the mammary gland and isolation from milk, *Journal of Dairy Science*, v.60, p. 53–62, 1977.

PAAPE, M.J.; RAUTIAINEN, P.M.; LILIUS, E.M.; MALSTROM, C.E.; ELSASSER, T.H. Development of anti-bovine TNF-alpha mAb and ELISA for quantitating TNF-alpha in milk after intramammary injection of endotoxin, *Journal of Dairy Science*, v. 85, p. 765-773, 2002.

PAAPE, M.J.; SCHULTZE, W.D. Heat and stress do not increase cell counts. *Hoard's Dairyman*, v. 25:857, 1974.

PAAPE, M.J.; SHAFER-WEAVER, K.; CAPUCO, A.V. Immune surveillance of mammary gland secretion during lactation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v.480, p.259-277, 2000.

PAGLIOSA, G. M.; ALVES, G. E. S. Considerações sobre a obtenção e o uso do plasma rico em plaquetas e das células mesenquimais indiferenciadas em enxertos ósseos. *Ciência Rural*, v.37, n.4, p.1202-1205, 2007.

PARKER, B.J.; BLOWEY, R.W. A comparison of blood from the jugular vein and coccygeal artery and vein of cows. *Veterinary Record*, v. 95, n.1, p.14-18, 1974.

PASCHOAL, J.J.; ZANETTI, M.A.; CUNHA, J.A. Mastite clínica em vacas leiteiras suplementadas com selênio e vitamina E. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 40, n. 10, 2005.

PEIXOTO, A.P.C.; COSTA, J.N.; KOHAYAGAWA, A.; TAKAHIRA, R.K.; SAITO, M.E. Hemograma e metabolismo oxidativo dos neutrófilos de bovinos da raça Holandesa preta e branca – Influência dos fatores etários. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 3, n.1, p. 16- 20, 2002.

PELLEGRINO, M.S.; FROLA, I.D.; ODIERNO, L.M.; BOGNI, C.I. Mastite bovina: resistência a antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de leite. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, v.12, n.7, 2011.

PEREIRA, R.C.F. Avaliação de sete protocolos de obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP). 2012. 54f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Santa Maria, RS, BRA.

PEREIRA, R.C.F.; ZACARIAS, G.V.F.; CANTARELLI, C.; CORRÊA, M.M.B; SILVA, G.B; BARBOSA, A.L.T.; BRASS, K.E.; CÔRTE, F.D.L. Avaliação de sete protocolos para

obtenção de plasma rico em plaquetas na espécie equina. *Ciência Rural*, v. 43, n.6, p.1122-1127, 2013.

PESSOA, R.B.; BLAGITZ, M.G.; BATISTA, C.F.; SANTOS, B.P.; PARRA, A.C.; SOUZA, F.N.; DELLA LIBERA, A.M.M.P. Avaliação da apoptose de leucócitos polimorfonucleares CH138+ em leite bovino de alta e baixa celularidade: dados preliminares. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 64, n. 3, p. 533-539, 2012.

PETERSEN, H.H.; NIELSEN, J.P.; HEEGAARD, P.M. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research*, v.35, n.2, p.163-187, 2004.

PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. Qualidade do leite e controle de mastite: passado, presente e futuro. In: Congresso Panamericano de Qualidade do Leite e Controle de Mastite, 2., 2002, Ribeirão Preto. *Anais...*São Paulo: Instituto Fernando Costa, 2002. p.23-38.

PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. *Mastitis: Counter Attack*. Naperville: Babson Bros, 1991. 150p.

PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. *Winning the Battle Against Mastitis*. Westfalia-Surge, Naperville: IL, 2000. 188p.

PIERCE, G.F.; MUSTOE, T.A.; ALTROCK, B.W.; DEUEL, T.F.; THOMASON, A. Role of platelets-derived growth factoring wound healing. *Journal of Cellular Biochemistry*, , v.45, n.4, p.319-326, 1991.

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 Craniofacial Surgery*, v. 18, n. 3, p. 559-67, 2007.

PILLA, R.; SCHWARZ, D.; KONIG, S.; PICCININI, R. Microscopic differential cell counting to identify inflammatory reactions in dairy cow quarter milk samples. *Journal of Dairy Science*, v. 95, p.4410-4420, 2012.

POL, M.; RUEGG, P.L. Relationship between antimicrobial usage and antimicrobial susceptibility of Gram-positive mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science*, v. 90, p. 262-273, 2007.

POLITIS, I.; BIZELIS, I.; TSIARAS, A.; BALDI, A. Effect of vitamin E in dairy cows in a commercial herd. *Journal of Dairy Research*, v. 71, n. 3, p. 273-278, 2004.

PONTUAL, M.A.B.; MAGINI, R.S. *Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento*. São Paulo: Santos, 2003. 308p.

PYÖRÄLÄ, S.; TAPONEN, S. Coagulase-negative staphylococci - emerging mastitis pathogens. *Veterinary Microbiology*, v.134, p.1-2, 2009.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K., CARTER, M.E. (Eds). *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512p.

- RADOSTITS, O.M.; BLOOD D.C.; GAY, C.C. *Clínica Veterinária. Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos*. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara. 2002. 1737 p.
- RAEBURN, C.D.; SHEPPARD, F.; BARSNESS, K.A. Cytokines for surgeons. *American Journal Surgery*, v. 183, p.268-273, 2002.
- RAINARD, P.; RIOLLET, C. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Veterinary Research*, v.37, n.3, p.369- 400, 2006.
- RAINARD, P.; RIOLLET, C. Mobilization of neutrophils and defense of the bovine mammary gland. *Reproduction Nutrition Development*, v.43, n.5, p.439-457, 2003.
- REBAR, A.H.; FELDMAN, B.F. *Guia de hematologia para cães e gatos*. 1 ed., São Paulo: Roca, p. 133-156, 2003.
- RIBEIRO FILHO, J.D.; ALMEIDA, C.T.; GONÇALVES, R.C.; KOHAYAGAWA, A.; CURY, P.R. Alterações hemogasométricas de sangue bovino durante a conservação em frascos de vidro com ACD e bolsas plásticas com CPDA-1, por 35 dias. *Veterinary Zootecnic*, v.6, p.77-84, 1994.
- RIBEIRO, M. E. R.; PETRINI, L. A.; AITA, M. F.; BALBINOTTI, M.; STUMPF JUNIOR, 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 Sul do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 9, n. 3, p. 287-290, 2003.
- 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.
- RODRIGUES, R.M. *Terapia antimicrobiana seqüencial: impacto de uma intervenção na adesão em um hospital universitário no Brasil*. 2008. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Universidade Federal de Uberlândia, MG, BRA.
- ROOIJAKKERS, S.H.M.; VAN KESSEL, K.P.M.; VAN STRIJP, J.A.G. Staphylococcal innate immune evasion. *Trends in Microbiology*, v. 13, n. 12, p. 596-601, 2005.
- ROSIER, R.N. O'KEEFE, R.J.; HICKS, D.G. The potential role of transforming growth factor beta in fracture healing. *Clinical Orthopaedics Related Research*, v.355, p.294-300, 1998.
- ROSSI JUNIOR, R.; NEGREIROS, R.M.; ELIAS, F.M.; JORGE, W.A. Utilização de plasma rico em plaquetas em enxertos ósseos para reparação de defeitos ósseos. *Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo*, v. 20, n.3, p.265-300, 2008.
- ROSSI JÚNIOR, R.; SOUZA FILHO, M.A.P. Obtenção de trombina autógena: proposta de um protocolo simplificado e de fácil reprodução clínica. *Revista Paulista de Odontologia*, v.26, p.4-9, 2004.

- ROUKIS, T.S.; ZGONIS, T.; TIERNAN, B. Autologous platelet-rich plasma for wound and osseous healing: A review of the literature and commercially available products. *Advances in Therapy*, v.23, p.218-237, 2006.
- RUEGG, P.L. Investigation of mastitis problems on farms. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.19, p.47-73. 2003.
- RUGGERI, Z.M. Mechanisms initialing platelet thrombus formation. *Thrombosis Haemostasis*, v.78, n.1, p.611-6, 1997.
- SALDALAMACCHIA, G.; LAPICE, E.; CUOMO, V.; DE FEO, ME.; D'AGOSTINO, E. Uso del gel di piastrine autologo per la cura delle ulcere del piede diabetico. *Giornale Italiano di Diabetologia Metabolismo*, v. 24, p.103-105, 2004.
- SANCHEZ, A.; RSHERIDAN, P.J.; KUPP, L.I. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *International Journal Oral and Maxillofacial Implants*, v.1, n.18, p. 93-103, 2003.
- SÁNCHEZ, M.; GUADILLA, J.; FIZ, N.; ANDIA, I. Ultrasound-guided platelet –rich plasma injections for the treatment of osteoarthritis of the hip. *Rheumatology*, v.51, n.1, p.144-150, 2012.
- SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. *Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite*. São Paulo: Manole, 2007. 314 p.
- SAVILL, J. Apoptosis in disease. *European Journal of Clinical Investigation*, v. 24, n. 11, p.715-723, 1994.
- SCARSO FILHO, J. *Avaliação do plasma rico em plaquetas na proliferação celular. Estudo in vitro*. 2002. 75f. Tese (Doutorado em Odontologia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, BRA.
- SCHALM, O.W., NORLANDER, D.O. Experimental and observations leading to development of the California Mastitis Test. *American Veterinary Medical Association*, v.139, p.199, 1957.
- SCHLIEPHAKE, H. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, Guildford, v.31, n.5, p.469-484, 2002.
- SCHNABEL, L.V., MOHAMMED, H.O., MILLER, B.J., MCDERMOTT, W.G., JACOBSON, M.S., SANTANGELO, K.S. AND FORTIER, L.A. Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. *Journal of Orthopaedic Research*, v. 25, p.230–240, 2007.
- SCHUKKEN, Y.H.; GÜNTHER, J.; FITZPATRICK, J.; FONTAINE, M.C.; GOETZE, L.; HOLST, O.; LEIGH, J. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.144, n. 3-4, p. 270-89, 2011.

SEARCY, G.P.; SHERIDAN, D.; DOBSON, K.A. Preliminary studies of a platelet function disorder in Simmental cattle. *Canadian journal of veterinary research*, v. 54, p. 394-396, 1990.

SENZEL, L.; GNATENKO, D.V.; BAHOU, W.F. The platelet proteome. *Current Opinion in Hematology*, v.5, p.329-333, 2009.

SEVANIAN A, HOCHSTEIN P. Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Annual Review of Nutrition*, v. 5, p.365-90, 1985.

SHENKMAN, B.; RUBINSTEIN, E.; DARDIK, R.; TAMARIN, I.; SAVION, N.; VARON, D. Activated platelets mediate *Staphylococcus aureus* deposition on subendothelial extracellular matrix: the role of glycoprotein Ib. *Platelets*, v. 10, p.36-44. 1999.

SHETHS, S.; JAJOO, S.; KAUR, T. Resveratrol reduces prostate cancer growth and metastasis by inhibiting the Akt/MicroRNA-21 pathway. *PLoS One*, v. 7, 2012.

SILVA, E.C.B.F.; MACIEL, M.A.V.; MELO, F.L.; ANTAS, M.G.C.; NETO, A.M.B.; RABELO, M.A. *Staphylococcus aureus*: aspectos biológicos e patogênicos. *Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco, Recife*, v. 52, n. 2, p. 168-172, 2007.

SILVA, R.F.; REZENDE, C.M.F.; CARMONA, J.U. Uso de concentrados autólogos de plaquetas intra articulares como coadyuvantes en el tratamiento quirúrgico de la rotura del ligamento cruzado anterior en una perra. *Archivos de Medicina Veterinaria*, v. 43, p. 313-316. 2011.

SINHA, B.; FRAUNHOLZ, M. *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events. *International Journal of Medical Microbiology*, v.300, n.2-3, p. 170-5, 2010.

SINK, C.A.; FELDMAN, B F. *Urinálise e Hematologia Laboratorial para o Clínico de Pequenos Animais*. São Paulo: Roca Ltda, 2006, 111 p.

SLADEK, Z.; RYSANEK, D. Apoptosis of polymorphonuclear leukocytes of the juvenile bovine mammary glands during induced influx. *Veterinary Research*, v.v31, p.553-563, 2000.

SLADEK, Z.; RYSANEK, D. Apoptosis of resident and inflammatory macrophages before and during the inflammatory response of the virgin bovine mammary gland. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 52, n. 1, p.12, 2010.

SLADEK, Z.; RYSANEK, D. Neutrophil apoptosis during resolution of bovine mammary gland injury. *Research in Veterinary Science*, v. 70, p.41-46, 2001.

SLADEK, Z.; RYSANEK, D.; RYZNAROVA, H.; FALDYNA, M. Neutrophil apoptosis during experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. *Veterinary Research*, v.36, p. 629-643, 2005.

SMITS, E.; BURVENICHA, C.; GUIDRYB, A.J.; HEYNEMANA, R.; MASSART-LEE, A. Diapedesis across mammary epithelium reduces phagocytic and oxidative burst of bovine neutrophils. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 68, p.169-176, 1999.

SORDILLO, L. 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.; DE ROSA, D. Immunobiology of the mammary gland. *Dairy Science*, v.80, p.1851-1865, 1997.

SQUIER, M.K.; SEHNERT, A.J.; SELLINS, K.S.; MALKINSON, A.M.; TAKANO, E.; COHEN, J.J. Calpain and calpastatin regulate neutrophil apoptosis. *Journal of Cellular Physiology*, v. 178, n.3, p.311-9, 1999.

STEENFOS, H.H. Growth factors and wound healing. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery*, v.28, n.2, p.95-105, 1994.

SURIYASATHAPORN, W.; VINITKETKUMNUEN, U.; CHEWONARIN, T. Relationships among malondialdehyde, milk compositions, and somatic cell count in milk from bulk tank. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, v.32, n.1, p.23-26, 2010.

SURIYASATHAPORN, W.; VINITKETKUMNUEN, U.; CHEWONARIN, T.; BOONYAYATRA, S.; KREASUKON, K.; SCHUKKEN, Y.H. Higher somatic cell counts resulted in higher malondialdehyde concentrations in raw cows' milk. *International Dairy Journal*, v. 16, p. 1088-1091, 2006.

SUTHERLAND, R.J.; WHITNEY, M.S. Acute phase proteins in bovine inflammatory diseases. *Texas Veterinary*, v.57, n.6, p.27-29, 1995.

SUTTER, W.W.; KANEPS, A.J.; BERTONE, A.L. Comparison of hematologic values and transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor concentrations in platelet concentrates obtained by use of buffy coat and apheresis methods from equine blood. *American Journal of Veterinary Research*, v.65, n.7, p.924-930. 2004.

SUTTON, R.H.; HOBMAN, B. The value of plasma fibrinogen estimations in cattle: a comparison with total leukocyte and neutrophil counts. *New Zealand Veterinary Journal*, v.23, n.3, p.21-27, 1975

TANG, C.Y.; KWON, Y.N.; LECKIE, J.O. Fouling of reverse osmosis and Nan filtration membranes by humic acid - Effects of solution composition and hydrodynamic. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, v. 5, n. 1, p. 11-18, 2007.

TANG, Y.Q.; YEAMAN, M.R.; SELSTED, M.E. Antimicrobial peptides from human platelets. *Infection and Immunity*, v. 70, p.6524-6533, 2002.

TARGOWSKI, S.P. Role of immune factors in protection of mammary gland. *Dairy Science*, v.66, n.8, p.1781- 1789, 1983.

TAYLOR, J.A. Leukocyte responses in ruminants. In: FELDMAN, B.F. et al. *Schalm's Veterinary Hematology*. 5.ed. Philadelphia: Wilkins, 2000. p.891-898.

TOSTES, M.A.V.; TOSTES JUNIOR, S.; PEREIRA, G.A.; SOARES, S.; SOUZA, H.M. Influência da coleta, da produção e da estocagem na qualidade dos concentrados de plaquetas. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. v. 30, n. 5, p. 367-373, 2008.

TRIER, D.A.; GANK, K.D.; KUPFERWASSER, D.; YOUNT, N.Y.; FRENCH, W.J.; MICHELSON, A.D.; KUPFERWASSER, L.I.; XIONG, Y.Q.; BAYER, A.S.; YEAMAN, M.R. Platelet antistaphylococcal responses occur through P2X(1) and P2Y(12) receptor-induced activation and kinocidin release. *Infection and Immunity*, v. 76, p. 5706-5713, 2008.

TRINDADE-SUEDAM, I.K.; LEITE, F.R.M.; MORAIS, J.A.N.D.; LEITE, E.R.M.; MARCANTONIO, E.; LEITE, A.A.. Avoiding leukocyte contamination and early platelet activation in platelet-rich plasma. *Journal of Oral Implantology* v. 33, p. 334-339, 2007.

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 Cirurgiões*, v.33, n.1, p.24-28, 2006.

VENDRUSCOLO, C.P.; CARVALHO, A.M.; MORAES, L.F.; MAIA, L.; QUEIROZ, D.L.; WATANABE, M.J.; YAMADA, A.L.M.; ALVES, A.L.G. Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo do Plasma Rico em Plaquetas para uso em Medicina Equina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 32, n. 2, p.106-110, 2012.

VILELLA, D.L. *Terapia tópica de úlceras crônicas de perna com plasma rico em plaquetas (PRP): Revisão sistemática da literatura*. 154f., 2007. Dissertação (Mestrado em Enfermagem), Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo, SP, BRA.

WEIBRICH, G.; BUCH, R.S.; KLEIS, W.K.; HAFNER, G.; HITZLER, W.E.; WAGNER, W. Quantification of thrombocyte growth factors in platelet concentrates produced by discontinuous cell separation. *Growth factors*, v. 20, p.93-97, 2002.

WEIBRICH, G.; KLEIS, W.K.; HAFNER, G.; HITZLER, W.E.; WAGNER, W. Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. *Clinical Oral Implants Research*, p. 357-362, 2003.

WEIBRICH, G.; KLEIS, W.K.; HITZLER, W.E.; HAFNER, G. Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma rich in growth factors kit to produce platelet rich plasma: a technical report. *Internal Journal Oral Maxillofacial Implants*, v. 29, p. 118-123, 2005.

WEISS, D.J.; PERMAN, V.P. Assessment of the hematopoietic system in ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.8, n.2, p.411-429, 1992.

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

WELLNITZ, O.; BRUCKMAIER, R.M. The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *Veterinary Journal*, v.192, n.2, p.148-152, 2012.

WHITLOW, J.; SHACKELFORD, A.G.; SIEVERT, A.N.; SISTINO J. Barriers to the acceptance and use of autologous platelet gel. *Perfusion*, v.23, p.283-289, 2008.

WHITMAN, D.H.; BERRY, R.L.; GREEN, D.M. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *Journal Oral Maxillofacial Surgery*. v. 55, p. 1294-1299, 1997.

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

WITTEK, T.; FÜRL, M.; CONSTABLE, P.D. Prevalence of Endotoxemia in Healthy Postparturient Dairy Cows and Cows with Abomasal Volvulus or Left Displaced Abomasum. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 18, p.574–580, 2004.

YAMADA, A.L.M.; CARVALHO, A M.; OLIVEIRA, P.G.G.; QUEIROZ, D.L.; WATANABE, M.J.; HUSSNI, C.A.; ALVES, A.L.G. Avaliação clínica e artroscópica do tratamento de lesões condrais, experimentalmente induzidas em equinos, com células tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas. In: Associação Brasileira de Médicos Veterinários de Equídeos, ABRAVEQ, 2011, Campinas. Suplemento II da Revista +Equina, v. 35. p. 77-78, 2011.

YANG, F.L.; LI, X.S.; YANG, B.Z.; ZHANG, Y.; ZHANG, X.F.; QIN, G.S.; LIANG, X.W. Clinical mastitis from calving to next conception negatively affected reproductive performance of dairy cows in Nanning, China. *African Journal of Biotechnology*, v. 11, n. 10, p. 2574-2580, 2012.

YANG, F.L.; SHAN LI, X.; XIANG HE, B.; YANG, X.L.; LI, C.H.; LIU, P.; HUANG, Q.H.; PAN, X.M.; LI, J. Malondialdehyde level and some enzymatic activities in subclinical mastitis milk. *African Journal of Biotechnology*, v. 10, n.28, p. 5534-5538, 2011.

YEAMAN, M.R. The role of platelets in antimicrobial host defense. *Clinical Infectious Diseases*, v. 25, p.951–968, 1997.

YOUNT, N.Y.; GANK, K.D.; XIONG, Y.Q.; BAYER, A.S.; PENDER, T.; WELCH, W.H.; YEAMAN, P.M.R. Platelet microbicidal protein 1: Structural themes of a multifunctional antimicrobial peptide. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 48, p.4395-4404, 2004.

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.

YUAN, T.; ZHANG, C.Q.; ZENG, B.F. Treatment of chronic femoral osteomyelitis with platelet-rich plasma (PRP): A case report. *Transfusion and Apheresis Science*, v. 38, p. 167-173, 2008.

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. *Hematologia: Fundamentos e Prática*. 1ed. São Paulo: Atheneu, 2001, 1081p.

ZANETTE, E.; SCAPIN, D.; ROSSI, E.M. Suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de bovinos com suspeita de mastite. *Unoesc & Ciência*, ACBS, v. 1, n. 1, p. 65-70, 2010.

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

ZHAO, X.; LACASSE, P.J. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *Journal of Animal Science*, v. 86, n.13, p. 57-65, 2008.

ZIMMERMANN, R.; ARNOLD, D.; STRASSER, E.; RINGWALD, J.; SCHLEGEL, A.; WILTFANG, J.; ECKSTEIN, R. Sample preparation technique and white cell content influence the detectable levels of growth factors in platelet concentrates. *Vox Sanguinis*, v. 85, p. 283-289, 2003.

ANEXOS

Anexo A



Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica da UFRRJ

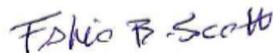
Seropédica 05 de dezembro de 2012

Nº 86/2012

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que foi aprovado o protocolo intitulado “**EFEITO DA APLICAÇÃO INTRAMAMÁRIA DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) SOBRE A RESPOSTA IMUNE DE VACAS COM MASTITE POR *Staphylococcus spp***” encaminhado pelo Professor (a) do Departamento Parasitologia Animal do Instituto de Veterinária, Rita de Cássia Campbell Machado Botteon . Informamos que foi aprovado em reunião ordinária da CEUA-FAPUR realizada no dia 05 de dezembro de 2012, após avaliação do plenário da referida Comissão.

Coordenador da CEUA-FAPUR



Fabio Barbour Scott

Coordenador CEUA-FAPUR

Anexo B

FICHA DE AVALIAÇÃO INDIVIDUAL

Data: ____ / ____ / ____

| | |
|---------------------------|-----------------------------------|
| Nome/Identificação: _____ | Raça: _____ |
| Propriedade: _____ | Data de Nasc.: ____ / ____ / ____ |

Histórico/Anamnese: _____

Temperatura: ____ °C Pulso: ____ bpm Freq. Resp.: ____ mrpm
Mov. Rúmen: ____ /3min. Peso: ____ kg ECC: _____

Número de ordenhas por dia: ____ Quantidade de leite produzido por dia: ____ (média)

INSPEÇÃO / PALPAÇÃO

Temperamento: () Linfático () Sanguíneo
Postura: _____ Atitude: () Normal () Apático () Deprimido () Decúbito
Apetite: () Normal () Diminuído () Ausente () Não observado
Pelagem: () s/ alteração () c/ alteração: _____ () Generalizado () Focal
Pele: () s/ alteração () c/ alteração: _____ () Generalizado () Focal
Ectoparasitas: _____
Corrimentos: () ausente () presente: _____
Mucosas: () Normocoradas () Hipocoradas () Congestas () Ictéricas () Outros: _____
Globo ocular: () Normal () Retraído
Linfonodos: () s/ alterações () alterados: _____
Sist. Genital: () s/ alteração () alterado: _____
Glândula Mamária: () s/ alteração () alterado: _____

PERCURSSÃO

Cardíaca: () s/ alt/mate () outros: _____
Pulmonar: () s/ alt/claro () outros: _____
Digestiva: () s/ alt () outros: _____

Outros problemas observados: _____

Quais as principais doenças que ocorrem na região? _____

Observações: _____

