

## Utilização de plasma rico em plaquetas como tratamento alternativo de endometrite em bovinos – relato de caso

*Use of platelet rich plasma as an alternative treatment of endometritis in cattle – case report*

Tarcisio Ferreira Silva<sup>1</sup>; Zenide França Borges Neta<sup>1</sup>; Mayara Ferreira Brito<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Curso de Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Campus Betim.

\*Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Rua do Rosário, 1.081, Angola, 32604-115, Betim, MG, Brasil

### Resumo

A endometrite é uma afecção muito presente na pecuária, sobretudo leiteira, acarretando impactos econômicos para o sistema e para a saúde pública devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos no tratamento, principalmente as bases comuns à medicina humana. Nesse relato foi proposto um tratamento alternativo com plasma rico em plaquetas (PRP) em dois animais (01 e 02) da raça Girolando, com 22 e 28 dias em lactação (DEL) e administrado plasma pobre em plaquetas (PPP) em um animal da mesma raça (03) com DEL 25, a fim de se compararem os resultados e a eficácia do PRP. O diagnóstico positivo para endometrite foi obtido através de citologia endometrial, ultrassonografia e cultura bacteriana. Após realização do método de dupla centrifugação do sangue total de um bovino doador, foi obtido um PRP com concentração final de  $698 \times 10^3$  plaquetas/ml que foi ativado por meio de congelamento e descongelamento, em nitrogênio líquido. Cada animal recebeu 10 mL de infusão intrauterina do PRP ativo ou PPP; repetindo-se as avaliações clínicas após 14 dias da infusão. Observou-se diminuição da secreção intrauterina e do percentual de neutrófilos na citologia endometrial, variação na espessura endometrial e menor crescimento bacteriano. Nesse trabalho, o PRP mostrou-se potencialmente eficaz para controlar inflamações e infecções intrauterinas em vacas com endometrite.

**Palavras-chave:** vacas de leite, afecções uterinas, PRP, citologia endometrial.

### Abstract

*Endometritis is a prevalent condition in livestock, especially dairy cattle, causing economic impacts on the system and public health due to the indiscriminate use of antimicrobials in treatment, mainly those common to human medicine. In this report, an alternative treatment with platelet-rich plasma (PRP) was proposed in two animals (01 and 02) of the Girolando breed, with 22 and 28 days in lactation (DEL), and platelet-poor plasma (PPP) was administered in one animal of the same breed (03) with DEL 25, in order to compare the results and efficacy of PRP. Positive diagnosis for endometritis was obtained through endometrial cytology, ultrasonography, and bacterial culture. After performing the double centrifugation method of total blood from a donor bovine, a PRP with a final concentration of  $698 \times 10^3$  platelets/ml was obtained, which was activated by freezing and thawing in liquid nitrogen. Each animal received 10 mL of intrauterine infusion of active PRP or PPP, with clinical evaluations repeated after 14 days of infusion. A decrease in intrauterine secretion and percentage of neutrophils in endometrial cytology was observed, as well as variation in endometrial thickness and reduced bacterial growth. In this study, PRP proved to be potentially effective in controlling intrauterine inflammation and infections in cows with endometritis.*

**Keywords:** dairy cows, uterine disorders, PRP, endometrial cytology.

### Introdução

A endometrite é caracterizada como uma inflamação das camadas superficiais do endométrio, que causa o aumento percentual persistente de células polimorfonucleares (PMN) no lúmen uterino, sendo classificada como clínica quando da presença de secreção mucopurulenta no útero (Sheldon et al., 2006). Essa enfermidade é frequentemente diagnosticada no período que se segue ao parto, sendo especialmente relevante em rebanhos de bovinos leiteiros. Ela acarreta complicações reprodutivas, como queda da natalidade, aumento do intervalo entre partos e aumento do número de serviços, impactando nos índices zootécnicos das propriedades rurais e levando a prejuízos econômicos (Sheldon et al., 2006; Paiano et al., 2022). O tratamento dessa afecção ainda apresenta divergências na literatura, mas envolve o uso de

\*Correspondência: mayarafebrito@gmail.com

Recebido: 22 de setembro de 2023

Aceito: 05 de março de 2024



antibióticos intrauterinos e/ou aplicações de prostaglandina (Sheldon et al., 2006). Contudo, o uso constante e indiscriminado de antibióticos para tratamento de enfermidades em rebanhos possui impactos potenciais sobre a saúde pública, podendo levar à resistência bacteriana. Por essas razões é importante buscar alternativas de menor impacto econômico/social para o tratamento de endometrite em bovinos, com eficácia comparável (Paiano e Baruselli, 2022).

Uma tecnologia que vem sendo adotada em diferentes áreas é a infusão do PRP, devido às suas propriedades terapêuticas (Puttman, 2019). Obtido por meio da centrifugação do sangue total, o PRP apresenta altas concentrações de plaquetas e fatores de crescimento, com propriedades regenerativas, antimicrobianas, anti e pró-inflamatórias (Gonçalves et al., 2019). Apesar das suas comprovadas ações em terapêuticas de processos inflamatórios em diversas espécies, sua aplicação para as afecções reprodutivas em bovinos ainda apresenta poucos estudos, com variações nos protocolos e nas concentrações a serem utilizadas (Marques et al., 2014; Marini et al., 2016; Puttman, 2019). O uso de PRP para tratamento de bovinos com endometrite pode ser uma alternativa eficaz para aumentar a eficiência reprodutiva, sem o uso de antibióticos. Nesse contexto, objetivou-se com esse trabalho relatar os procedimentos diagnósticos e terapêuticos, com uso de PRP intrauterino, em duas vacas da raça Girolando, e com uso de PPP intrauterino em uma vaca da mesma raça, todas apresentando endometrite pós-parto, e com isso estimular o desenvolvimento de mais pesquisas nessa área.

## Material e Métodos

### *Caracterização dos animais*

Foram avaliados três animais da espécie bovina, fêmeas, da raça Girolando, com escore de condição corporal (ECC) 2,75 (escala de 1-5), criadas em regime semi-intensivo no município de Rio Manso/MG (Latitude: 20° 15' 44" Sul, Longitude: 44° 18' 29" Oeste, Altitude: 890m) apresentando média de produção de 15 litros. O Animal 01 tratava-se de uma primípara, com idade de 03 anos e dias em lactação (DEL) 28, o Animal 02 era uma múltipara de 06 anos, com DEL 22 e o animal 03 uma primípara de 03 anos com DEL 25. Durante a anamnese e exame clínico apresentavam-se hígidos e com histórico de retenção de placenta sem tratamento prévio, além disso o animal 01 vinha de um parto prematuro.

### *Diagnóstico inicial*

Para realização do diagnóstico de endometrite procedeu-se a palpação e ultrassonografia transretal para avaliação dos cornos uterinos, espessura do endométrio e presença ou não de secreções intrauterinas. Em sequência realizou-se a citologia endometrial utilizando a técnica de *cytobrush* modificado (Kasimanickam et al., 2004). De forma sucinta, para a técnica foi utilizada uma escova citológica estéril acoplada a um aplicador universal de inseminação artificial, protegido com bainha de inseminação descartável e camisinha sanitária. O aplicador já preparado foi conduzido até o óstio externo do útero, por manipulação transretal da cérvix, quando a camisinha sanitária foi rompida; uma vez no corpo do útero a escova foi exposta e rotacionada contra a parede uterina, sendo então novamente protegida e cuidadosamente retirada do aparelho reprodutor. O esfregaço celular foi preparado rotacionando a escova em lâmina de microscopia, deixada secar ao ar e corada no método de Panótico Rápido. Amostras foram analisada em microscopia (1000x) e julgadas positivas para endometrite se contendo >18% de células polimorfonucleares, considerando o DEL entre 21 e 33 (Sheldon et al., 2006).

Também foi realizada a cultura microbiológica, com obtenção da amostra semelhante à da técnica de citologia, porém, ao retirar do trato reprodutivo a escova foi removida de maneira asséptica e introduzida rapidamente em meio de cultura Stuart. A amostra foi transportada refrigerada em uma caixa isotérmica, por 04 horas até a chegada no laboratório, onde foi realizada a semeadura em meio Ágar Sangue e cultivado por 48 horas, a 37°C, para verificar características do crescimento bacteriano e posterior coloração.

### *Obtenção e infusão do PRP e PPP*

Para a obtenção do PRP foi utilizado um animal doador da raça Girolando, com vacinações e vermifugações em dia, ECC 4 (escala 1-5), 9 anos de idade, apresentando hemograma dentro dos parâmetros normais, com plaquetas no valor de  $221 \times 10^3/\text{ml}$  (valor mensurado por meio de hemocítomômetro e confirmado por método de Fônio).

O protocolo de extração seguiu aquele descrito por Marques et al. (2014), com algumas



modificações. O sangue foi coletado através da punção da Veia Epigástrica Cranial Superficial, após realização de antissepsia local, em bolsa CPDA-1 simples de 500 ml, mantida em homogeneização constante. Uma vez finalizada a coleta, o sangue foi transferido para tubos cônicos de centrifuga estéreis contendo 14 ml de sangue total, destinados à primeira etapa de centrifugação, realizada em centrífuga Kasvi Digital K14-0815C. A primeira centrifugação foi realizada na velocidade de 640g por 5 minutos com objetivo de separação do plasma, capa leucocitária e eritrócitos. Após a 1ª centrifugação foi descartado 50% do plasma superior (5 ml), sendo os 50% do plasma inferior e a capa leucocitária transferidos para outro tubo de centrifuga. Para a obtenção da capa leucocitária utilizou-se uma micropipeta automática, com o objetivo de evitar a aspiração excessiva de eritrócitos. A segunda centrifugação foi realizada na velocidade de 120g por 10 minutos, sendo então os 75% da fração superior do plasma, ora denominado PPP, e os 25% restantes foram homogeneizados para obtenção do PRP. Em média, o rendimento para produção de PRP foi de 8,33%. A ativação dos fatores plaquetários foi realizada por meio de congelamento em nitrogênio líquido (Muir et al., 2022) e descongelamento imediato a 37°C, por 3 vezes consecutivas (Marini et al., 2016). Em seguida o PRP e o PPP foram armazenados separadamente em tubos estéreis e congelados a -20°C até sua utilização. A segurança microbiológica do PRP e do PPP obtidos foi assegurada pela realização de cultura em Ágar Sangue, por 48h a 37°C, quando não foi observado crescimento bacteriano.

Para utilização nos animais o PRP (animal 01 e 02) e o PPP (animal 03) foram descongelados a 37°C e transferidos para uma seringa de 10 ml. A infusão intrauterina foi realizada com uma pipeta de infusão revestida por uma camisinha sanitária, que foi rompida após a entrada no óstio uterino externo, e direcionada ao corpo do útero por meio de manipulação cervical através de palpação retal.

#### *Diagnóstico pós-tratamento*

Assim como Puttman (2019) a verificação do resultado foi realizada após 14 dias da infusão do PRP, repetindo-se todas as técnicas utilizadas anteriormente para diagnóstico.

### **Resultados e Discussão**

Segundo Marini et al. (2016) é considerado como PRP o plasma que ao final do processo de centrifugação apresenta concentração de plaquetas/ml de 3 a 5 vezes maior, quando comparado ao sangue total. O PRP obtido através do processo descrito nesse relato teve uma concentração final de  $698 \times 10^3$  plaquetas/ml, ou seja, 3,16 vezes maior em relação a concentração inicial do sangue total. Além disso, de acordo com Marques et al., (2014) o método de obtenção utilizado foi um dos que apresentou maior concentração de TGF- $\beta$ , um dos fatores de crescimento que devem estar presentes após a ativação do PRP, que tem como principal função quimiotaxia, diferenciação celular e angiogênese (Gonçalves et al., 2019). Por essa razão era esperado que o animal tratado com PPP, que apresentou baixa de plaquetas mensuradas através de hemocitômetro eletrônico e confirmado por método de Fônio, não apresentasse melhora, pois não há fatores de crescimento neste plasma, sendo possível assim, comparar as diferenças observadas entre os animais após os diferentes tratamentos e comprovar a eficácia do PRP.

A partir da ultrassonografia e palpação retal no exame clínico inicial dos animais foi possível observar involução uterina completa, apesar de presença de secreções hiperecóticas no lúmen uterino, com pouca descarga mucopurulenta encontrada na vagina à manipulação (Fig. 01A). O animal 01 apresentou espessura endometrial do corno direito de 0,45 cm e esquerdo de 0,38 cm. O animal 02 apresentou corno direito com espessura de 0,58 cm e esquerdo de 0,70 cm (Fig. 01A). Já o animal 03 apresentou corno direito com espessura de 0,57 cm e esquerdo de 0,55 cm. Segundo Kasimanickam et al. (2004) trata-se de um meio de diagnóstico útil e rápido, sendo que quanto maior a quantidade de secreções e sua ecogenicidade, maior o índice de contaminação e gravidade da infecção, porém quando é utilizado de forma isolada apresenta baixo índice de confiabilidade. Considerando a variabilidade de tamanhos e espessuras do útero nas diferentes espécies/raças foi realizado o acompanhamento pré e pós infusão para avaliação do grau de edema resultante do processo inflamatório.

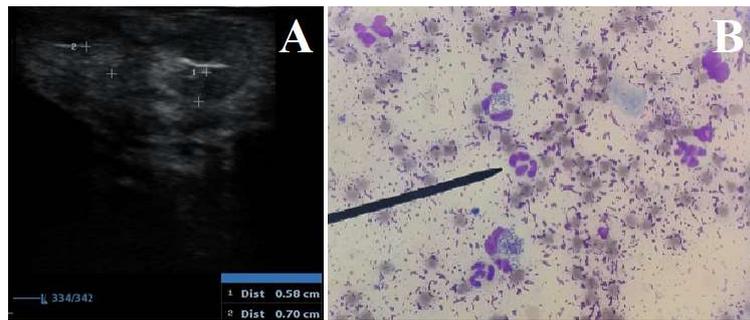


Figura 01. A- Ultrassonografia de segmentos dos cornos uterinos do animal 02 antes do tratamento.

B- Campo da lâmina do animal 01 durante o diagnóstico citológico de endometrite.

Decorridos 14 dias após a infusão intrauterina de PRP observou-se por ultrassonografia uma diminuição considerável de secreção no lúmen uterino, não se observando mais secreções hiperecóticas. Notou-se uma diminuição da espessura endometrial no animal 02 de aproximadamente 30% em comparação à primeira ultrassonografia (0,40 cm no corno direito e 0,49 cm no corno esquerdo) (Fig. 2A). O animal 01, porém, apresentou endométrio com 0,52 cm no corno direito e 0,39 cm no corno esquerdo, ou seja, 13% e 3% de aumento na espessura endometrial, respectivamente. É esperado que após a resolução de uma inflamação a espessura da parede endometrial reduza, porém nem sempre esse fenômeno é visto. Farimani et al. (2016) observaram um aumento da espessura do endométrio em mulheres após a infusão de PRP, sendo esse fator associado a uma potencial redução na taxa de aborto. Já em um estudo com vacas de corte com endometrite subclínica, não foi observado variação do diâmetro do corno uterino antes e após o tratamento com PRP, apenas houve diferença no diâmetro cervical (Puttman, 2019). Para o animal 3, após a administração do PPP foi observado aumento da espessura endometrial para 0,70 cm em ambos os cornos uterinos, além de se observar significativa quantidade de secreção hiperecóticas em seu lúmen.

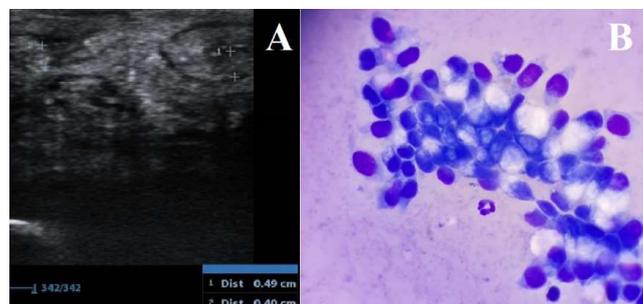


Figura 02. A- Ultrassonografia do animal 02 após o tratamento. B- Campo da lâmina do animal 01 durante o diagnóstico citológico de endometrite, destacando a diminuição da concentração de PMN.

Para o diagnóstico da endometrite por meio de citologia endometrial é necessário se atentar ao DEL do animal e a porcentagem de PMN observadas a partir da leitura da lâmina por microscopia. Sheldon et al. (2006) definem que animais são considerados positivos entre 21 e 33 DEL quando apresentam mais de 18% de PMN, quando comparadas às células endometriais ou, quando apresentam mais de 11% de PMN entre 34 e 47 DEL. O animal 01, que se apresentava com 28 DEL, teve resultado citológico de 75,5% de PMN (Fig. 01B), o animal 02 com 22 DEL possuía 29% de PMN e o animal 03 com 42% de PMN, todos com resultado positivo para endometrite. O processo inflamatório observado pode ser relacionado com o histórico dos animais, uma vez que partos prematuros e retenção de placenta aumentam a chance de infecções e inflamações uterinas no pós-parto (Sheldon et al., 2006).

Na citologia uterina realizada 14 dias após a infusão intrauterina do PRP, foi identificada significativa redução da concentração de PMN em ambos os animais (01 e 02), no qual o animal 01, com 42 DEL, apresentou 8% de PMN e o animal 02, com 36 DEL, apresentou 2% de PMN (Fig. 02B); já o animal 03, tratado com PPP, a citologia não foi realizada pois o útero se apresentava espesso e o animal demonstrava grande desconforto com sua manipulação. Em consonância com os parâmetros estabelecidos



por Sheldon et al. (2006), ambos os animais foram diagnosticados como negativos após o tratamento com PRP. Essa diminuição pode ser justificada pela grande quantidade de fatores de crescimento presentes no PRP associado ao grande número de receptores para esses fatores no endométrio (Marini et al., 2016; Gonçalves et al., 2019). O PRP apresenta fatores de crescimento capazes de atuar em diferentes tipos celulares como em miócitos, condrócitos, fibroblastos e células endometriais, também aumentam a infiltração de leucócitos no local de administração e promovem angiogênese, fibroplastia e ação antimicrobiana, além de induzir a uma regeneração tecidual, com posterior diminuição das células inflamatórias culminando na restauração do ambiente uterino (Anitua et al, 2004). Especificamente em células endometriais de bovinos tratados com PRP, Marini et al. (2016) comprovaram o aumento da expressão de receptores de progesterona além de genes envolvidos na regulação do ciclo estral e da interação materno-fetal, repercutindo em um ambiente uterino mais propício para o desenvolvimento embrionário inicial.

Outra alternativa utilizada para o diagnóstico da endometrite foi a cultura bacteriana quando, se observou crescimento significativo em meio de Ágar Sangue nas amostras coletadas antes do tratamento intrauterino, em todos os animais. O animal 01 apresentou crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas, com predomínio das gram-negativas, e os animais 02 e 03 apresentaram apenas crescimento de bactérias gram-negativas. Sabe-se que a endometrite nem sempre está associada ao isolamento de bactérias, porém esse pode ser um agravante para a persistência do processo inflamatório, atrasando a recuperação do ambiente uterino para a próxima concepção (Sheldon et al., 2006; Madoz et al., 2013).

Na cultura após a infusão de PRP observou-se menor crescimento bacteriano baseado em número de colônias, porém após a técnica de Gram foi observado crescimento do mesmo tipo de bactéria, já no animal 03 a cultura não foi realizada pelo mesmo motivo relatado anteriormente. Entre as ações dos fatores de crescimento liberados após a ativação do PRP estão a liberação de citocinas que apresentam ação antibacteriana, além de quimiotaxia de células inflamatórias e liberação de citocinas anti e pró-inflamatórias, dessa maneira, levando a um estímulo do sistema imune auxiliando no controle de infecções (Anitua et al, 2004), o que justificaria a diminuição do crescimento bacteriano no ambiente uterino. No experimento de Marini et al. (2016) o PRP também mostrou-se eficaz contra infecções, pois foi capaz de neutralizar a ação de lipopolissacarídeos (LPS) e diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias.

### Considerações finais

Nesse relato o PRP mostrou-se eficaz em controlar a inflamação e contaminação no útero de vacas leiteiras pós-parto, ao reestabelecer o ambiente uterino com redução significativa do número de células inflamatórias e colônias bacterianas. Em contrapartida o animal tratado com PPP não apresentou melhora clínica da inflamação. Esse tratamento é promissor para potencializar os índices reprodutivos em vacas pós-parto e reduzir o uso de antimicrobianos no tratamento das endometrites. Contudo, reforça-se a necessidade de desenvolver estudos com maior controle dos eventos e em maior escala, para determinar protocolos e dosagens ideais.

### Referências bibliográficas

- Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost*, v.91, n.01, p.4-15, 2004.
- Gonçalves NJN, Frantz N, Oliveira RM. Platelet-rich plasma (PRP) therapy: An approach in reproductive medicine based on successful animal models. *Anim. Reprod.*, v.16, n.1, p.93-98, 2019.
- Farimani M, Bahmanzadeh M, Poorolajal J. A new approach using autologous platelet-rich plasma to treat infertility and to improve population replacement rate. *J Res Health Sci*, v. 16, n.03, p.172-173, 2016.
- Kasimanickam R et al. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, v.62, p.9-23, 2004.
- Madoz LV. et al. Endometrial cytology, biopsy, and bacteriology for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. *J. Dairy Sci*, v.97, p.195-201, 2014.
- Marini MG et al. Effects of platelet-rich plasma in a model of bovine endometrial inflammation in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.14, n.58, p.01-17, 2016.
- Marques APL et al. Padronização de técnica manual para obtenção de plasma rico em plaquetas de bovinos. *Pesq. Vet Bras.*, v.34, n.01, p.1-6, 2014.



**Muir AJT et al.** Autologous platelet-rich plasma effects on *Staphylococcus aureus*-induced chondrocyte death in an in vitro bovine septic arthritis model. *AVMA*, v.83, n.02, p.119-125, 2022.

**Paiano RB, Baruselli PS.** The use of herbal treatments as alternatives to control uterine diseases in dairy cows. *Trop. Anim. Health Prod.*, v.54, n.2, p.148, 2022.

**Paiano RB et al.** Evaluation of clinical and subclinical endometritis impacts on the reproductive performance and milk production of dairy cows in Brazilian herds. *Reprod. Dom. Anim.*, v.58, p.414-422, 2023.

**Puttman E.** Use of Rich Plasma of the Treatment of Subclinical Endometrits in Beef Heifers. 2019. 68. Monografia, Graduação – Oregon State University, Eugene, EUA, 2019.

**Sheldon IM et al.**, Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology*, v.65, p.1516–1530, 2006.

---