

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE VETERINÁRIA

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

**DISPOSITIVO FOTOBIMODULADOR PARA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE
HIPERQUERATOSE DE TETO EM VACAS LEITEIRAS.**

PEDRO GUIMARÃES LAGE

Belo Horizonte

Escola de Veterinária- UFMG

2013

PEDRO GUIMARÃES LAGE

**DISPOSITIVO FOTOBIMODULADOR PARA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE
HIPERQUERATOSE DE TETO EM VACAS LEITEIRAS.**

**Dissertação apresentada a Universidade
Federal de Minas Gerais, como requisito
parcial para à obtenção do grau de mestre
em Ciência Animal.**

**Área de concentração: Clínica e Cirurgia
Veterinária.**

Orientador: Prof. Rafael Resende Faleiros

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária- UFMG
2013**

Lage, Pedro Guimarães, 1985-
L174d Dispositivo fotobiomodulador para prevenção e tratamento de
hiperqueratose de teto
em vacas leiteiras / Pedro Guimarães Lage. – 2013.
55 p. : il.

Orientador: Rafael Resende Faleiros
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais.
Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Bovino de leite – Doenças – Tratamento – Teses. 2. Mastite –
Teses. 3. Fototerapia –
Teses. 4. Tetas – Teses. I. Faleiros, Rafael Resende. II. Universidade
Federal de Minas
Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.214 089 69

Dissertação defendida e aprovada em 27 de Fevereiro 2013, pela Comissão Examinadora constituída por:


Prof. Rafael Resende Faleiros
Presidente


Prof.ª Angélica Rodrigues de Araújo


Prof. Marcos Pinotti Barbosa


Prof. Lívio Molina

*“O começo de todas as ciências
é o espanto das coisas serem como são”*
Aristóteles

AGRADECIMENTOS

Para que pudesse concluir essa Dissertação de Mestrado diversas pessoas passaram pelo meu caminho. Entre estas algumas em particular sinto-me no dever de agradecer

Ao Prof. Rafael, meu orientador e amigo, uma das melhores pessoas que conheci e umas das pessoas que mais me ensinou.

Sou muito grato a minha família. Meu pai Domício, por ser exemplo de profissional e me mostrar o belo caminho da profissão Médico Veterinário. Minha mãe Sônia, por sempre se preocupar, me encorajar e mostrar-se orgulhosa do meu percurso.

Minhas irmãs Mariana e Laurinha e minha sobrinha Alice, pelo carinho e amizade eterna.

À Angélica e Alexandre por toda a participação no desenvolvimento e realização deste trabalho e disposição em ajudar.

À Laura e Marcos pela análise das fotos.

À Luciele, Moisés e Hélio, pelo tempo de convivência, trabalho e divertimento na fazenda.

Aos meus amigos, que são a família que eu escolhi, com vocês aprendi muito! Obrigado pelos momentos de descontração, tornando meus dias menos árduos.

A Escola de Veterinária da UFMG, minha segunda casa, me proporcionou muito aprendizado no que mais amo.

À fazenda São João, agradeço muito por abrirem suas portas para mim e para o experimento, acreditando na importância trabalho e permitindo que a realização deste fosse possível. A toda equipe da plataforma, os quase 3 meses de convivência e de muito trabalho foi muito especial na minha vida. Em especial ao PH.

A empresa Bios Serviços e comércio LTDA, pelo projeto e desenvolvimento dos dispositivos para este trabalho

A FAPEMIG, pelo financiamento da pesquisa.

Obrigado Deus, por colocar estas pessoas no meu percurso. Sem eles nada seria possível.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE ABRVIATURAS	13
Resumo	14
Abstract	15
 1. INTRODUÇÃO	 16
 2. REVISÃO DE LITERATURA	 17
2.1 Anatomia da Glândula mamária	18
2.1.1 Anatomia do Úbere	18
2.1.2 Anatomia do Teto	18
2.1.3 Noções Básicas sobre causas e classificação de mastites	19
2.1.4 Bases do sistema imunológico da glândula mamária	20
2.1.5 Outras formas de defesa	21
2.1.6 Mastite Subclínica e CCS	21
2.1.7 Hiperqueratose	22
2.1.8 Fatores predisponentes da hiperqueratose	23
2.1.9 Relação entre hiperqueratose e mastites.	23
2.2.1 Uso do LED	24
2.2.2 Fundamentos para ação biológica dos LEDs	25
 3. MATERIAL E MÉTODOS	 28
3.1 Caracterização da Fazenda	28
3.2 Experimento I- Avaliação do efeito do tempo de Exposição à ação da ordenhadeira no aparecimento e progressão da hiperqueratose de teto	28
3.3 Experimento II- Avaliação do possível efeito preventivo da fototerapia sobre o desenvolvimento da hiperqueratose de teto	29

3,4 Experimento III- Avaliação do possível efeito terapêutico da fototerapia sobre o desenvolvimento da hiperqueratose de teto	32
3.5 Análise estatística	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 Experimento I	35
4.2 Experimento II	36
4.3 Experimento III	41
5. CONCLUSÕES	46
6. Considerações finais	47
7. Referências	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características da luz 33

**Tabela 2. Incidência dos diversos graus de hiperqueratose em um rebanho de vacas
leiteiras submetidas a três ordenhas diárias..... 35**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração do sistema de escores, demonstrando os quatro graus de hiperqueratose de teto	29
Figura 2. (A) Momento da obtenção da imagem. Observe a régua metálica, fixada à base da câmera, que serviu para padronização da distância. (B) Logo após a captura da imagem, ela era conferida, a fim de verificar a possibilidade de realização de mensuração.....	31
Figura 3. Imagem do Programa MATLAB 7.0.1 mostrando o gabarito de 1cm ² montado na extremidade da régua metálica, que serviu como referência para a calibragem do programa computacional	31
Figura 4. Médias e desvios padrões dos graus de hiperqueratose segundo o número de partos e o tempo de lactação em vacas da raça HPB.....	36
Figura 5. Médias e erros padrões das áreas externas de hiperqueratose de tetos em primíparas submetidas ou não à terapia fotobiomoduladora.....	37
Figura 6. Médias e erros padrões das áreas externas de hiperqueratose de tetos em primíparas submetidas ou não à terapia fotobiomoduladora	37
Figura 7. Médias e erros padrões dos graus de hiperqueratose de tetos em primíparas submetidas ou não à terapia fotobiomoduladora.	38
Figura 8. Classificações das imagens realizadas pelos avaliadores do experimento.....	39
Figura 9. Médias e erros padrões de CCS de primíparas submetidas ou não à terapia fotobiomoduladora nos meses durante e após o tratamento	40

Figura 10. Incidência de CCS normais ou acima de 250 células/mL (mastite subclínica) em primíparas submetidas ou não à terapia fotobiomoduladora nos meses durante e após o tratamento	40
Figura 11. Médias e erros padrões das áreas externas de hiperqueratose de tetos em vacas submetidas ou não à terapia fotobiomoduladora.....	41
Figura 12. Médias e erros padrões das áreas internas de hiperqueratose de tetos em vacas submetidas ou não à terapia fotobiomoduladora.	42
Figura 13. Médias e erros padrões dos escores para hiperqueratose de tetos em vacas submetidas ou não à terapia fotobiomoduladora	43
Figura 14. Médias e erros padrões de CCS de vacas submetidas ou não à terapia fotobiomoduladora nos meses durante e após o tratamento. tempo ($P<0,05$)	44
Figura 15. Incidência de CCS normais ou acima de 250 células/mL (mastite subclínica) em vacas submetidas ou não à terapia fotobiomoduladora nos meses durante e após o tratamento	44

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina tri-fosfato
As-Ga	Arsenito de gálio
CETEA	Comitê de Ética em experimentação Animal
cm	centímetros
CMT	Teste Californiano de Mastites
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fig.	Figura
G	Grande
He-Ne	Hélio-Neônio
HPB	Holandês Preto e Branco
Ig	Imunoglobulina
J	Joules
Labbio	Laboratório de Bioengenharia
LASER	Amplificador de Luz por Emissão Estimulada de Radiação
LED	Diodo Emissor de Luz
NASA	<i>National Aeronautics and Space Administration</i>
nm	nanômetros
M	Médio
mL	mililitros
mm	milímetros
P	Pequeno
RNA	Ácido Ribonucleico
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

RESUMO

As mastites constituem um dos principais problemas da produção leiteira, devido principalmente às perdas de produção e ao aumento dos custos do leite. Os benefícios da fototerapia têm sido observados em algumas condições, inclusive, no tratamento de feridas cutâneas em animais. O canal do teto é a primeira e a principal defesa anatômica do úbere. Assim que as bactérias ultrapassam o canal do teto entram em contato com células do sistema imunológico. Em casos graves de hiperqueratose o canal do teto pode se tornar uma barreira mais fácil para que as bactérias atravessem. Efeitos fisiológicos da fototerapia, como alteração na permeabilidade da membrana celular, aumento do metabolismo celular, síntese de DNA e RNA, proliferação de fibroblastos, ativação de células de defesas, melhora na circulação estão entre os principais. Os objetivos deste estudo foi avaliar um dispositivo fotobiomodulador, de LED com para tratamento e prevenção de hiperqueratose de teto em rebanho de leite. E verificou-se a incidência de mastite subclínica. Experimento 1, – Avaliação do efeito do tempo de exposição à ação da ordenhadeira no aparecimento e progressão da hiperqueratose de teto. Experimento 2 – Avaliação do possível efeito preventivo da fototerapia sobre o desenvolvimento da hiperqueratose de teto com 60 primíparas no começo da lactação. O experimento 3 Avaliação do possível efeito terapêutico da fototerapia sobre a cicatrização da hiperqueratose de teto com 30 vacas de segunda ordem de lactação. Nos experimentos 2 e 3 metade dos animais foram tratados com o dispositivo fotobiomodulador 3 vezes por semana durante 6 semanas. Imagens fotográficas digitalizadas foram realizadas na avaliação inicial e, semanalmente por 6 semanas consecutivas, no experimento 1 foi realizada mais imagens entre 6 e 7 meses de lactação das primíparas. CCS foram feitas mensalmente. No experimento 1 a hiperqueratose foi alta, 35,3% de casos graves. No experimento 2, o diâmetro externo das lesões permaneceu constante nos tetos do grupo tratado, no grupo controle, apresentou aumento significativo ao final da lactação. Em relação aos casos de mastite subclínica foi observado melhora da qualidade do leite e diminuiu os casos de mastite subclínica. Concluiu-se que houve efeito para prevenir o aumento da hiperqueratose. No experimento 3, o uso do LED reduziu a incidência de mastites subclínicas. O protótipo é promissor como adjuvante na prevenção do desenvolvimento de hiperqueratose de teto e como forma de reduzir a mastite subclínicas em vacas leiteiras de alta produção.

Palavras Chaves: Gado de leite; mastites; hiperqueratose de tetos; fotobiomodulação; LED,

ABSTRACT

The mastitis consists one of the main problems of milk production, mainly due to the production losses and the rising cost of milk. The benefits of phototherapy have been observed in certain conditions, including in treatment of lesions in some animals. The teat canal is the first and major anatomical defense of the udder. Once the bacteria pass the teat canal, they approach the immune cells. In case of severe hyperkeratosis, the teat canal can become an easier barrier for the bacteria to penetrate. Changes in cell membrane permeability, increased cellular metabolism, DNA and RNA synthesis, fibroblast proliferation, activation of defense cells, and improvement of circulation are the most important physiological effects of phototherapy. The objective of this study was to assess a device of phototherapy with LED for treatment and prevention of teat hyperkeratosis in herd milk. Besides, it was found the incidence of clinical and subclinical mastitis. Experiment 1 – Evaluation of the effect of exposure time to the action of milking in the onset and progression of teat hyperkeratosis. Experiment 2 – Evaluation of the conceivable preventive effect of phototherapy on the development of teat hyperkeratosis with 60 cows in early lactation. Experiment 3 - Evaluation of the possible therapeutic effect of phototherapy on the cicatrization of teat hyperkeratotic with 30 cows of second parity. In the Experiments 2 and 3, half of the animals were treated with the phototherapy device three times per week for 6 weeks. Scanned images were performed at baseline and weekly for 6 consecutive weeks; in the experiment 1, it was performed more images between 6 and 7 months of fist lactation. CCS was performed monthly. In the experiment 1, hyperkeratosis was high, 35.3% of severe cases. In experiment 2, the outer diameter of the lesions remained constant in the teats of the treated group; the control group showed a significant increase at the end of lactation. For cases of subclinical mastitis, it was observed improvement of milk quality and decreasing of subclinical mastitis. It can be concluded that there was efficiency to prevent the increase of hyperkeratosis. In the experiment 3, the use of LED reduced the incidence of subclinical mastitis. The prototype is promising as an adjunct in preventing the development of teat hyperkeratosis, and also as a way to reduce subclinical mastitis in dairy cows of high production.

Key Words: Dairy Cattle; mastitis; teats hyperkeratosis; phototerapia; LED.

1- Introdução

O Brasil produziu 29.112.024 mil litros de leite em 2009, sendo o estado de Minas Gerais o maior produtor do país com 7.931.115 mil litros de leite. Este número corresponde a 27,2% da produção nacional (IBGE, 2009). De acordo com a projeção, a produção de leite deve crescer 1,95% ao ano, Devendo ultrapassar em 2020 os 37 bilhões de litros (Brasil, 2010).

A produção de leite, como acontece em outros segmentos de produção da atual sociedade, é uma atividade cada vez mais competitiva. Portanto, é importante quantificar e qualificar os fatores que podem influenciá-la, buscando ganhos efetivos na quantidade e qualidade do leite produzido, na tentativa de suprir a demanda nacional (Coldebella et al., 2004).

As mastites constituem um dos principais problemas da produção leiteira, devido principalmente às perdas de produção e ao aumento dos custos do leite (Sandholm et al., 1995). A ocorrência da mastite, inflamação da glândula mamária, está relacionada ao desequilíbrio entre a resistência da vaca, a patogenicidade do agente e o ambiente. A resistência do animal tem impacto direto sobre o desenvolvimento da mastite, abrangendo além da imunidade, características anatômicas dos tetos e úbere, estágio de lactação, número de partos e adequação nutricional (Santos e Fonseca, 2007).

Dentre os fatores de risco ambientais associados à ocorrência de mastite estão manejo inadequado, inexistência de treinamento dos ordenhadores, não utilização de serviços laboratoriais para identificação dos patógenos e uso de equipamentos de ordenha sem manutenção periódica (Coentrão et al., 2008). Portanto, a mastite não deve ser vista apenas como uma infecção na glândula mamária causada por um patógeno, mas sim como a expressão de um conjunto de condições inadequadas presentes no sistema de produção (Mitiedro, 2002).

O canal do teto é a primeira e a principal defesa das vacas contra as mastites. Esta é uma estrutura altamente especializada, que impede a entrada de microrganismos causadores das mastites no úbere. Alterações ou lesões que ocorram no canal do teto permitem uma maior penetrabilidade de microrganismos patogênicos. Alguns estudos descrevem a existência de uma associação entre infecções do úbere e lesões dos tetos como feridas e fístulas (Fox et al., 1996).

A hiperqueratose é uma reação do canal do teto a alguns estímulos que provocam o aumento da sua espessura e rugosidade, principalmente pelo acúmulo de grandes quantidades de queratina. A ação mecânica exercida durante a ordenha é o principal fator desencadeador desta alteração (Capuco et al., 1994). Uma pequena quantidade de hiperqueratose não parece aumentar o risco de uma infecção intra-mamária na vaca em lactação, podendo ser considerada como um benefício fisiológico na resposta do teto à ordenha. Um grau maior de hiperqueratose está associado com o aumento da probabilidade de novas infecções intra-mamárias. A avaliação da hiperqueratose em rebanhos comerciais pode ajudar a identificar ou a resolver problemas relacionados com o manejo da ordenha, com o meio ambiente ou com a ordenhadeira (Neijenhuis, 2001).

Estudos recentes têm demonstrado que a radiação tecidual com fontes de luz com baixa intensidade, LASER ou LED (diodo emissor de luz) de baixa intensidade, na faixa do vermelho ao infravermelho próximo, parece ser uma estratégia efetiva para modular a dor e favorecer o

processo de cicatrização tecidual (Lagan et al., 2000; Lucas et al., 2003; Takezaki et al., 2006). Os benefícios do LASER e do LED de baixa intensidade têm sido observados em condições tais como osteoartrite, radiculopatias, tendinites e, principalmente, no tratamento de feridas cutâneas em animais (Kana et al., 1981; Soares et al., 1989; Matera et al., 2003) e em humanos (Corrêa et al., 2003; Siqueira et al., 2004).

LED é o mais novo recurso da fototerapia (Barolet, 2008). Os primeiros trabalhos utilizando LED para tratamento de lesões surgiram na década de 1990, nos quais a NASA (*National Aeronautics and Space Administration*) obteve resultados satisfatórios na cicatrização de feridas (Whelan et al., 2001). Expandiram ao longo dos últimos anos, e atualmente, eles têm sido utilizados nas mais diversas áreas da saúde (Yeh et al., 2010).

Tatarunas et al. (1998) avaliaram a ação do LASER As-Ga, 904 nm, em feridas cirúrgicas de pele de felinos. Foram utilizados 63 animais divididos em 3 grupos: A- irradiados com 4 J/cm², B- irradiados com 2 J/cm², C- controle, não irradiados. A aplicação foi realizada de modo pontual, com a caneta mantida perpendicular e contatando levemente a ferida. As aplicações foram realizadas no 2º, 4º, 8º e 15º dias de pós-operatório de ovariectomia. O estudo concluiu que o LASER As-Ga nas dosagens de 2 e 4 J/cm² atuou positivamente na cicatrização por primeira intenção de feridas cirúrgicas em pele de felinos, tendo a dose de 2 J/cm² se mostrado vantajosa em relação à de 4 J/cm².

Say et al. (2003) realizaram um estudo experimental em seres humanos, com o objetivo de comparar a eficácia do LASER de diferentes comprimentos de onda no tratamento de úlceras cutâneas venosas crônicas. O estudo foi realizado com quatro indivíduos, sendo dois submetidos à aplicação de LASER He-Ne, 632,8 nm, dose de 4J/cm² e os outros dois à terapêutica com LASER As-Ga, 904 nm, na mesma dose. Os resultados, avaliados através de registros fotográficos e mensuração da área da ferida, demonstraram que o LASER promoveu aceleração do processo de cicatrização das úlceras. Uma vez que o controle da mastite é extremamente complexo, principalmente por seu caráter multifatorial, e as intervenções existentes para a resolução dos traumas dos tetos nem sempre são eficazes, determinar e validar alternativas para o tratamento das lesões do teto tem grande relevância para a indústria leiteira e condição sócio-econômica do país.

Os objetivos deste estudo foi avaliar um dispositivo fotobiomodulador, que se utiliza de diodos emissores de luz - (LED's) com comprimento de onda na faixa espectral do vermelho ao infravermelho próximo, para tratamento e prevenção de hiperqueratose de teto em rebanho de leite. Mais além, verificou-se o efeito uso do dispositivo na incidência de mastite subclínica por meio do monitoramento da contagem de células somáticas em animais submetidos ou não ao tratamento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Anatomia da Glândula mamária

2.1.1 Anatomia do úbere

O úbere, conjunto de quatro glândulas mamárias individuais, encontra-se no terço caudal da superfície ventral do abdome. Dispõem de dois ligamentos (lateral e mediano) como estruturas primárias de suporte e ligamentos suspensórios laterais que penetram na glândula e se tornam contínuas com o tecido intersticial do úbere (Dyce, 1996; Moraes, 2002).

As duas metades do úbere (direita e esquerda) recebem suprimento sanguíneo das artérias ipsilaterais existentes (artéria pudenda externa direita e esquerda). A drenagem sanguínea do úbere da vaca é feita pelas veias pudendas externas de cada lado. Elas recebem o sangue dos quartos mamário cranial e caudal do mesmo lado e drenam para a veia epigástrica superficial caudal do mesmo lado, que por sua vez, drena caudalmente para a veia perineal. Um intenso fluxo sanguíneo é a condição para uma alta produção secretória das glândulas mamárias (Dyce, 1996; Moraes, 2002).

2.1.2 Anatomia do Teto

Os tetos são formados pelo canal do teto e por uma cisterna que tem ligação direta com a cisterna da glândula. A parede dos tetos é composta por três camadas: a parte externa composta por pele glabra desprovida de glândulas; a camada intermediária que é composta por tecido conjuntivo, músculo liso e uma quantidade considerável de veias que fazem parte do plexo venoso e a camada interna que é composta por um epitélio com duas camadas, sendo uma colunar e outra cuboidal (Dyce, 1996).

O leite é drenado dos ductos principais para a cisterna da glândula e daí passivamente para a cisterna do teto onde fica retido. A cisterna da glândula comunica-se com a cisterna do teto através de uma crista circular (ânulo) que contém uma veia e algumas fibras musculares lisas. A cisterna do teto comunica-se com o exterior por uma abertura estreita no final da teta, chamada de ducto papilar (canal do teto). O óstio papilar dispõe de fibras musculares lisas. A estrutura primária responsável pela retenção do leite é um esfíncter muscular que rodeia o canal do teto (Dyce, 1996; Moraes, 2002). O orifício do teto é mantido fechado por meio de um grupo de fibras musculares que formam o esfíncter do teto (Hachem, 2005). A camada mais externa é a camada córnea, onde só existem células cornificadas, achatadas, mortas, desprovidas de núcleo ou organelas citoplasmáticas com queratina no interior (Junqueira e Carneiro, 1995).

2.1.2 Noções básicas sobre causas e classificação de mastite

A mastite é definida como uma inflamação da glândula mamária, que frequentemente tem origem bacteriana (Peeler et al., 2003; Sondergaard et al., 2003; Santos et al., 2004). Embora as mastites possam ter como origem causas físicas, químicas, fisiológicas ou microbiológicas, a sua origem é considerada multifatorial. Como exemplo de traumatismos físicos cita-se as lesões

provocadas pela ordenhadeira, a hiperqueratose do epitélio secundária a injúrias primárias e a excessiva dilatação do canal do teto devido a administrações medicamentosas intramamárias. (Teixeira et al., 2008)

As mastites são classificadas como clínicas e subclínicas dependendo da intensidade do processo inflamatório e comprometimento do parênquima mamário. A mastite clínica é caracterizada por leite anormal, inchaço ou dor na glândula mamária, podendo ser acompanhada por sinais sistêmicos tais como elevação da temperatura retal, letargia ou anorexia. Além do declínio da produção láctea, há presença de bactérias no leite, aumento da contagem de células somáticas e alterações significativas de sua composição (Harnon, 1994). Nas mastites subclínicas, a infecção do úbere não evidencia sinais externos, sendo identificadas somente pelas provas laboratoriais, tais como da contagem de células somáticas (CCS) ou da realização do teste californiano de mastites (CMT) e entre outros (Santos, 2004).

Mais de 80 espécies diferentes de microorganismos foram identificadas como agentes causadores de mastite bovina, sendo que as espécies mais frequentemente isoladas são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli* (Holtenius, 2004). Segundo Santos et al., (2004) a colonização da glândula mamária bovina por bactérias patogênicas resulta em eventos que conduzem à alterações na composição do leite. Inicialmente ocorrem níveis elevados de bactérias patogênicas, seguido pelo aumento marcante do número de células somáticas.

A mastite bovina corrobora com significantes perdas da quantidade e qualidade do leite produzido, o que, aliados aos investimentos em tratamentos, acarreta para os produtores aumento do custo de produção de leite (Almeida et al., 2006; Aida et al., 2008; Freitas et al., 2009; Ruegg, 2010). No mundo estima-se que as perdas econômicas associadas com essa doença estejam em cerca de U\$ 35 bilhões anuais (Bannermam et al., 2009).

Para reduzir as perdas econômicas acarretadas pela mastite, programas que utilizam diferentes estratégias para garantir a saúde do úbere têm sido implementadas em diversos países. Entretanto a mastite continua sendo um dos principais problemas de saúde na produção do leite (Jansen et al., 2010; Lam et al., 2011)

2.1.3 Bases do sistema imunológico da glândula mamária

Os mecanismos de defesa do úbere contra as bactérias envolvem mecanismos anatômicos, celulares e fatores de proteção solúveis. O canal do teto é a primeira e a principal defesa anatômica do úbere. Assim que as bactérias ultrapassam o canal do teto entram em contato com células do sistema imunológico, que têm um papel importante na resposta inflamatória a ser iniciada (Sordillo et al., 1997). A glândula mamária é protegida por uma variedade de

mecanismos naturais de defesa às infecções. Esses mecanismos podem ser imunológicos (específicos) ou não imunológicos (inespecíficos)(Sompayrac, 1999).

2.1.4 Teto

Os tetos dos bovinos são estruturas altamente especializadas, tendo como funções libertar o leite armazenado nas cisternas do úbere e impedir a invasão de microrganismos. Os tetos podem ter posição, orientação, tamanho e forma muito variável, medindo em média, 8 cm de tamanho com uma parede de 6 mm de espessura (Dyce, 1996).

As principais barreiras físicas são o canal e o esfíncter do teto, a qual possui propriedades defensivas como um mecanismo de oclusão relativamente eficiente, a roseta de “Furtenberg’s” e ainda, proteínas bactericidas. O esfíncter do teto mantém-se fechado entre as ordenhas, entretanto após a sua realização o canal do teto torna-se dilatado e permanece assim de trinta a cento e vinte minutos. Diante disto torna-se necessário alimentar o animal logo após a ordenha de forma a estimulá-lo a ficar em estação, pois o esfíncter se fechará em menos de duas horas (Prestes et al., 2002). A queratina, composta por células epiteliais descamadas, ácidos graxos e proteínas catiônicas, atua na defesa inespecífica da glândula mamária. É encontrada na cisterna do teto e no ducto papilar, tendo papel de vedação do último (Araújo e Gheller, 2005). A queratina tem a função de adsorver as bactérias, prendendo-as e removendo-as juntamente com parte da camada de queratina durante o processo de ordenha. Os ácidos graxos queratinizados agem como bactericidas e bacteriostáticos, todavia, os ácidos esteárico, oléico e linolêico favorecem a susceptibilidade à infecção intra-mamária. Aos ácidos graxos queratinizados estão ligados a proteínas que causam lise em algumas células bacterianas gram positivas. Fatores que afetam a integridade da camada de queratina podem, portanto, afetar a susceptibilidade a infecções (Prestes et al., 2002).

2.1.5 Outras formas de defesa

A lactoferrina é uma glicoproteína produzida pelas células fagocitárias e pelas células do sistema de defesa do úbere (Wang e Hurley, 1998). A sua função mais importante é a capacidade para sequestrar íons de ferro, competindo com algumas bactérias aeróbias por este mineral, que regula o crescimento bacteriano. Para os estafilococos e para os coliformes, o ferro é um componente fundamental das enzimas da cadeia respiratória bacteriana, sendo por isso sensíveis à presença da lactoferrina (Sandholm et al., 1995).

A lactoperoxidase é uma enzima que requer a presença de tiocianato e de peróxido de hidrogênio para poder oxidar determinadas estruturas da parede celular das bactérias. Assim é bactericida para bactérias gram negativas e bacteriostática para a generalidade das bactérias gram positivas (Sordillo et al., 1997).

Xantina Oxidase: é uma enzima existente no epitélio do canal do teto e no tecido glandular, que na presença de oxigênio e hipoxantina produz peróxido de hidrogênio (Collins et al., 1988).

A lisozima é uma proteína bactericida, presente no leite, capaz de criar fissuras na parede celular das bactérias, atuando sobre os peptidoglicanos e provocando a lise osmótica das bactérias (Sordillo et al., 1997). Os fragmentos dos peptidoglicanos da parede celular resultantes da ação da lisozima também são importantes ativadores da resposta inflamatória (Zecconi e Smith, 2000).

O sistema complemento constitui um conjunto de proteínas presentes no leite e no plasma que reconhecem e destroem microorganismos, iniciam e aumentam a resposta dos anticorpos e desagregam precipitados complexos de imunoglobulinas (Korhonen et al., 2000).

São quatro os tipos de anticorpos que estão envolvidos normalmente na defesa da glândula mamária: IgG1, IgG2, IgA e IgM. Estas imunoglobulinas têm funções diferentes entre si, sendo que a sua concentração no leite varia com o estado de sanidade do úbere e da fase da lactação (Zecconi e Smith, 2000).

Hospido e Sonesson (2005) descrevem diferentes classificações da mastite relacionadas à intensidade da infecção. Mastite clínica: caracterizada pela presença de sinais intensos de inflamação e subdividida em subaguda e aguda. Mastite subclínica: caracterizada pela modificação na composição do leite, mas sem sinais intensos de inflamação do úbere ou de anormalidades no leite. Mastite crônica: processo inflamatório que se estende pelos últimos meses de lactação e se prolonga até a lactação seguinte.

2.1.6 Mastite Subclínica

É caracterizada pela aparência normal do leite, com aumento da CCS. Dentre os métodos mais usuais de diagnóstico de mastite subclínica destacam-se a contagem de células somáticas (CCS) e o isolamento e identificação de patógenos causadores dessa patologia (Ruegg, 2003; McCarthy e Sears, 2003; Almeida et al., 2006). A incidência da mastite subclínica frequentemente surpreende os produtores. Para evitar as penalidades ou manter a CCS baixa, a fim de garantir os pagamentos por qualidade, tornou-se fundamental a identificação da infecção e o controle dos níveis de CCS nos rebanhos (McCarthy e Sears, 2003).

Para detectar a mastite subclínica são necessários exames complementares, geralmente baseados no conteúdo celular do leite (Dias, 2007). A CCS é considerada um teste com boa estimativa quantitativa do grau de inflamação (McCarthy e Sears, 2003). Assim Osteras, Reksen e Solverod (2008) descrevem a existência de uma forte relação entre o diagnóstico microbiológico dos patógenos da mastite e os valores de CCS.

2.1.7 Contagem de células somáticas (CCS)

As células somáticas são representadas pelas células brancas do sangue e ocasionalmente células epiteliais de descamação. Em glândulas mamárias não infectadas as células encontradas são neutrófilos (1-11 %), macrófagos (66-88 %), linfócitos (10-27 %) e células epiteliais (0-7 %). Em vacas com mastite mais de 90 % das células encontradas são neutrófilos. Quando a bactéria

invade e coloniza a glândula mamária uma resposta inflamatória se inicia, atraindo inicialmente neutrófilos que atuam engolfando e destruindo bactérias (Ruegg, 2003). Ao coletar amostra para a realização da análise de CCS existe o problema quanto a identificação do quarto que se apresenta contaminado. Pois as amostras são coletadas por animal (quatro quartos). Dessa forma a CCS pode ser diluída com o leite dos outros quartos mamários não infectados e o animal acaba sendo diagnosticado como se a glândula mamária estivesse saudável. (Reneau, 1986; Ruegg, 2003).

A CCS é um parâmetro frequentemente usado para indicar a situação de mastite subclínica em um rebanho leiteiro e a porcentagem de vacas com CCS maior que 250.000/mL é um excelente meio para resumir a situação subclínica de um rebanho (Lievaart et al., 2007)

2.1.8 Hiperqueratose

Quando há remoção excessiva da queratina, a sua produção no canal do teto é estimulada. Como resultado desse estímulo podem se formar projecções de queratina em torno do final do teto. Isso pode ser acompanhado também pela formação de um anelao redor do orifício. Quando esta queratina ou o excesso de estimulação de sua produção torna-se grave, pode ser verificado um aumento de casos de mastite clínica e subclínica. Por esta razão, vários sistemas de avaliação e pontuação para hiperqueratose foram desenvolvidos (Kirk, 2005). O método mais usado é o sistema de escore para lesão de hiperqueratose que possui 4 classificações: Escore 1- sem anel, o final do teto liso e com o orifício pequeno; Escore 2- Liso ou ligeiramente áspero com um anel projetando a partir do orifício; Escore 3- anel com relevo, áspero com folhagem de queratina de 1-3 mm do orifício; Escore 4- Muito áspero ao toque com queratina superior a 4 mm, muitas vezes quebradiça (Mein, 2001).

Outras formas mais objetivas tem sido usadas para avaliar a condição de tecido do teto, incluindo medição da espessura do teto por ultra-sonografia, avaliação da tensão de oxigênio sub-cutânea (Hamann, 2000) e uso de oxímetro de pulso (Maltz, 2000). Essas técnicas variam de acordo com a praticidade de seu uso no campo, com a perícia do técnico, com os custos necessários para usá-las, e com suas repetibilidade e precisão demonstradas. Métodos mais simples para quantificar os efeitos a curto ou médio prazo de ordenha em tetos foram propostos (Hillerton et al., 2000).

Em um rebanho leiteiro o limite considerado aceitável de animais com o nível alto (escore 3 e 4) de hiperqueratose é $\leq 20\%$ (Mein et al., 2001). A quantidade de animais que podem ter hiperqueratose num rebanho varia muito, podendo chegar em alguns casos a 80% dos animais (Shearn e Hillerton, 1996). Em um estudo feito em 16 fazendas produtoras de leite pesquisou-se a incidência de hiperqueratose, verificando-se que em 71% dessas fazendas havia uma porcentagem de tetos com lesões consideradas altas (escore 3 e 4), superior a 20% (Sousa, 2008).

2.1.9 Fatores predisponentes da hiperqueratose

Vários agentes e mecanismos podem alterar a condição das tetas das vacas leiteiras. A alteração no final da teta pode ocorrer em períodos curtos, médios ou longos. As alterações que ocorrem em períodos curtos (após uma única ordenha) estão relacionadas a mudanças na coloração, edemas, bem como modificações no grau de abertura do orifício do teto. Os efeitos que ocorrem em tempo médio (poucos dias a semanas) relacionam-se a alterações na pele do teto e a incidência de pequenas hemorragias. As alterações mais significantes são as que ocorrem em longos períodos (ocorrem em 2-4 semanas) e são modificações relativas a hiperqueratose do orifício do teto (Kirk, 2005)

O nível do vácuo de ordenha é um fator que influencia a hiperqueratose porque altera a velocidade de fluxo do leite (Williams e Mein 1986), de forma que a pressão aplicada pelo leite sobre a queratina do canal do teto é diretamente proporcional à velocidade de fluxo de leite. Aumentando-se o vácuo da ordenha aumenta-se também a quantidade de queratina arrastada pelo leite na sua passagem, estimulando a hiperqueratose (Williams e Mein, 1986).

Um conceito importante na compreensão do papel das teteiras sobre os tetos é a sobrepressão. A sobrepressão consiste na força aplicada pelas teteira colapsada sobre o teto (Mein et al., 2003). A exposição dos tetos a valores elevados de sobrepressão causa a interrupção da circulação aumentando a pressão local. Desta forma, à nível do extrato córneo do canal do teto, ocorrem microfissuras que aumentam a produção de queratina por este (Mein et al., 2003).

Outro fator agravante da hiperqueratose é a sobreordenha que é caracterizada pela permanência do conjunto de ordenha acoplado aos tetos dos animais após o término do fluxo de leite, ou seja, atraso na retirada das teteiras após o termino da ordenha. Os tetos anteriores têm, normalmente, mais calosidade que os posteriores, porque permanecem mais tempo em sobreordenha, em virtude do fluxo de leite acabar primeiro neles, em relação aos tetos posteriores, que se beneficiam do amortecimento fornecido pelo leite ainda presente (Neijenhuis et al., 2000)

2.1.10 Relação entre hiperqueratose e mastites

O aumento da espessura das camadas do epitélio constitui uma resposta fisiológica do canal dos tetos aos traumas ocorridos durante a ordenha, inclusive alguns animais ordenhados à mão e vacas de corte amamentando bezerro também apresentam hiperqueratose, só que em menor proporção em relação aos animais ordenhados mecanicamente (Mein et al., 2003). Vários trabalhos provaram que casos graves de hiperqueratose, ou seja, tetos muito espessos e rugosos, levam a uma maior incidência de mastites (Fox, 1996., Lewis, 2000). Em casos graves de hiperqueratose o canal do teto pode se tornar uma barreira mais fácil para que as bactérias atravessem e ainda sirvam de local para colonização do teto de uma maior quantidade de bactérias (Neijenhuis *et al.*, 2004), uma vez que algumas delas encontram em grandes quantidades de queratina os nutrientes e o ambiente que necessitam para se desenvolver (Newbould e Neave, 1965).

2.2.1 Uso do LED

O LED é um diodo constituído por junções p-n (p- positivo; n- negativo) que, ao ser diretamente polarizado, faz com que os elétrons cruzem a barreira de potencial e se recombinem com as lacunas. Após a recombinação espontânea de pares elétron-lacuna, ocorre a emissão simultânea de fótons. O mecanismo físico pelo qual o LED emite luz é a emissão espontânea de luz. Os diodos emissores de luz convertem a corrente elétrica em um espectro de luz. A emissão da luz a partir de um material sólido, em resposta a aplicação de uma fonte elétrica de energia é um processo denominado eletroluminescência (Schubert, 2003).

Na década de 1990, teve início sua aplicação como recurso terapêutico em estudos experimentais e clínicos. Os trabalhos foram desenvolvidos primeiramente pela NASA. Os pesquisadores notaram que um comprimento de onda específico da luz LED era capaz de acelerar o crescimento de plantas em longas viagens espaciais. Posteriormente, investigaram o uso da terapia com LED na cicatrização de feridas e obtiveram resultados positivos (Whelan et al. 1999).

Diante das evidências demonstradas pela NASA na aplicação do LED, a Food and Drug Administration (FDA) aprovou testes clínicos da aplicação de LEDs na cicatrização de feridas em humanos, devido ao insignificante risco de lesões na pele (Whelan, 2001).

A pesquisa teve continuidade e surgiram novos LEDs que são usados atualmente como recurso terapêutico em diversas áreas (Weiss *et al.*, 2005; Araújo et al., 2007; Casalechi et al., 2009; Yeh et al., 2010). Trabalhos desenvolvidos no Brasil demonstram a eficiência deste recurso para o tratamento de diversos tipos de úlceras (Corazza, et al., 2005).

Em um trabalho, Yeh, 2010 concluiu que LEDs permitem o controle da intensidade da luz. Eles têm a capacidade de produzir altos níveis de luz com liberação de baixo calor radiante. Sistemas baseados em LED pode fornecer uma dose de luz de intensidade homogênea ótima. Os lasers proporcionam estímulos que aumentam a atividade do tecido celular durante cicatrização de feridas porém, têm limitações de comprimentos de onda. É difícil para o laser produzir a combinação de comprimento de onda ótima para a cicatrização de feridas. Em contraste, os LEDs permitem o controle da composição da luz e podem ser produzidos de todos os tamanhos para o tratamento de áreas pequenas ou grandes. LEDs oferecem uma alternativa eficaz para as fontes de luz convencionais, também para pelas seguintes razões: Usando fonte de luz LED matriz para os dispositivos médicos é muito mais econômico do que usar fontes de luz intensa pulsada ou laser. Os LEDs são altamente duráveis e, assim, são menos dispendiosos de longo prazo. Seus protótipos são mais leves e compactos. Os comprimentos de onda gerados por LEDs vão do parcial ultravioleta, no infravermelho próximo, e quase todas as bandas visíveis e produzem menos calor do que as lâmpadas de alta pressão e, assim, efeito de aumento de temperatura que podem ser induzidas pelas fontes de luz de alta intensidade são evitados. Como resultado, os LEDs podem ser colocados mais de perto das áreas de tratamento do que outras

fontes de luz para que haja será menor distância para diminuir a intensidade requerida. O comprimento de onda do LED pode ser sintonizado de maneira ótima, de modo a corresponder ao tratamento exigência e elimina assim comprimentos de onda que não são necessários para a terapia. Células imunoinflamatórias semelhantes a macrófagos e linfócitos são capazes de produzir citocinas e fatores de crescimento que controlam a funcionalidade de outras células e regulam o processo de angiogênese e fibroplasias. Com relação aos efeitos fotobiomoduladores, a luz LED pode ser tão eficaz quanto a luz LASER, pois ambos apresentam efeitos fisiológicos semelhantes.

Células imunoinflamatórias semelhantes a macrófagos e linfócitos são capazes de produzir citocinas e fatores de crescimento que controlam a funcionalidade de outras células e regulam o processo de angiogênese e fibroplasias além de incremento à produção de ATP, aumento da proliferação de fibroblastos e da síntese de colágeno, aumento da síntese de RNA e DNA, estímulo à angiogênese e alterações induzidas sobre as aferências nociceptivas (Clark et al., 2003).

Um fator indispensável para a recuperação de feridas é pelo estímulo do sistema linfático. O efeito antiedematoso da superfície irradiada é somente evidente se ocorrer estase venoso-linfática, este é notório em edema na síndrome varicocele, linfedema e outras situações clínicas (Longo, 2000).

Utilizando um LED infravermelho(904nm) em pós operatório de tendões digital flexores em humanos, apresentou efeito positivamente favorável para a redução do edema (Ozkan, 2004).

2.2.2 Fundamentos para ação biológica dos LEDs.

A profundidade de penetração no tecido é relacionada ao comprimento de onda da radiação, sendo de 0,5 a 4 mm para a luz vermelha a infravermelha (Pontinen, 2000; Low e Reed, 2001). Em tecidos escuros, com elevado índice de melanina, a energia luminosa é altamente absorvida (Snyder –Mackler e Seitz, 1990).

O mecanismo de ação da luz em nível celular é baseado em reações fotobiológicas. Uma reação fotobiológica envolve a absorção de um comprimento de onda específico da luz por moléculas fotorreceptoras. Diante da luz absorvida com determinado comprimento de onda, essas moléculas assumem um estado excitado eletronicamente que desencadeiam efeitos biológicos (Karu, 1999). Há evidências que os comprimentos de onda da luz na faixa espectral do vermelho ao infravermelho próximo são absorvidos pela citocromo c oxidase (Karu, 2003). No estudo de Karu e Kolyakov (2005) observaram também a absorção pela citocromo c oxidase nas quatro regiões. Concluíram que a citocromo c oxidase consegue absorver a luz em diferentes faixas espectrais (vermelho e infravermelho próximo). A excitação de certos cromóforos na molécula citocromo C oxidase participa de uma estrutura chave na regulação das vias metabólicas (Karu, 2003).

As reações fotobiológicas podem ser classificadas em primárias e secundárias. As reações primárias derivam da interação entre os fótons e o fotorreceptor, essas são observadas em poucos segundos ou minutos após a irradiação da luz. Por outro lado, as secundárias são efeitos que ocorrem em resposta às reações primárias, sendo em horas ou até dias após o procedimento de irradiação (Karu, 1987; Karu, 2003).

As reações primárias de ação da luz no fotorreceptor ainda não estão claramente estabelecidas, mas há algumas hipóteses. Após a absorção da luz no comprimento de onda irradiado, a citocromo c oxidase assume um estado eletronicamente excitado, a partir do qual altera seu estado redox e ocasiona a aceleração de transferência de elétrons na cadeia respiratória (Karu, 1988). Outra hipótese seria que uma parte da energia do estado eletronicamente excitado é convertida em calor, provocando um aquecimento local e transiente no fotorreceptor (Karu et al., 1991). Há uma hipótese que quantas de espectro de luz vermelha absorvidos por porfirinas e flavo proteínas são responsáveis pela geração de O_2 , portanto estimulam a síntese de DNA e RNA (Karu, 2003). Ainda há outra hipótese que a reação seria que, ao ativar o fluxo de elétrons na cadeia respiratória, por meio da irradiação luminosa, pode-se esperar o aumento da produção de ânion superóxido (Karu et al., 1993). Uma quarta reação formula que as porfirinas e as flavoproteínas absorvem os fótons e geram espécies reativas de oxigênio simples (Karu et al., 1981).

Contudo, há uma hipótese sobre a modificação no modelo de Karu. Acredita-se que a luz vermelha é absorvida pela citocromo c oxidase na mitocôndria, ao passo que o comprimento de onda infravermelho é absorvido por proteínas específicas da membrana celular que afetam diretamente a permeabilidade da membrana sendo que ambos conduzem à mesma resposta fotobiológica final (Ribeiro e Zezell, 2004).

Todas as hipóteses anteriores estão relacionadas com as reações primárias após a absorção da luz na mitocôndria.

O mecanismo de reações fotobiológicas secundárias é definido pela transdução (transferência de energia de um sistema para outro) e amplificação do fotosinal que conduz a uma fotoresposta. Isso significa que efeitos decorrentes das reações primárias são amplificados e transmitidos a outras partes da célula, conduzindo a efeitos fisiológicos, tais como alteração na permeabilidade da membrana celular com alterações nos níveis de cálcio intracelular, aumento do metabolismo celular, síntese de DNA e RNA, proliferação de fibroblastos, ativação dos linfócitos T, macrófagos e mastócitos, aumento na síntese de endorfinas e diminuição da bradicinina (Karu, 1999).

As reações secundárias são as responsáveis pela conexão entre a resposta à ação da luz pelos fotorreceptores localizados na mitocôndria e os efeitos localizados no núcleo ou outros fenômenos em outros componentes da célula. Esse processo torna possível a aplicação de uma dose muito pequena de luz produzir efeitos clinicamente significativos nos tecidos (Karu, 1998).

Em suma, a absorção da luz, dependente do comprimento de onda, ocasiona reações primárias na mitocôndria. Essas são seguidas por uma cascata de reações secundárias (transdução e amplificação do fotosinal) que ocorrem no citoplasma, na membrana e no núcleo.

3. Material e Métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais, protocolo 196/07.

Os protótipos específicos para rebanho de leite foram aplicados nos tetos, com vista a testar, em situação real, a eficiência dos dispositivos luminosos, desenvolvidos em função dos testes e análises laboratoriais, na prevenção e no tratamento de hiperqueratose dessas estruturas.

3.1 Caracterização da Fazenda

O experimento foi realizado no período Outubro a Novembro de 2010 com um retorno em Maio de 2011, em uma Fazenda a 80 km de Belo Horizonte. A propriedade produzia em média 35 mil litros por dia, com cerca de 1200 vacas em lactação. A partir dessa população, foi possível escolher com bastante critério os animais para entrar no experimento.

O equipamento de ordenha era da marca DeLaval, em linha baixa, um duplo 24/48, com extratores automáticos. A empresa fazia revisão programada regularmente, a cada quatro meses, em todo o equipamento. Todos os funcionários passaram por treinamento na própria fazenda antes de começarem a trabalhar com os equipamentos.

Os animais ficavam estabulados em free stall com dieta equilibrada e eram três ordenhas ao dia e produzindo em média 29 litros de leite por animal por dia.

Inicialmente, com o intuito de se entender a dinâmica e a epidemiologia da hiperqueratose no rebanho, realizou-se um experimento visando estudar a incidência dessa lesão em diferentes categorias de vacas, considerando-se os diferentes meses de lactação.

3.2 Experimento I – Avaliação do efeito do tempo de exposição à ação da ordenhadeira no aparecimento e progressão da hiperqueratose de teto 2 pesquisadores acompanharam a ordenha de todas as vacas em um único dia, classificando a presença de hiperqueratose nos tetos em graus de um a quatro. Para tanto, utilizou-se a escala proposta por Mein, (2001) e ilustrada na Figura 1. Grau 1, normal, a ponta do teto se apresenta lisa e possui um orifício pequeno. Grau 2, a ponta do teto é lisa ou ligeiramente áspera e apresenta uma ligeira calosidade em forma de anel, projetando-se a partir do orifício. Grau 3, a calosidade está em relevo destacado, com superfície áspera e com camada de queratina de 1-3 mm acima do orifício. Grau 4, calosidade apresenta superfície muito áspera, com camada de queratina superior a 4 mm, muitas vezes quebradiça. As avaliações seguiram as recomendações descritas no *Latest Thoughts on Methods for Assessing Teat Condition* elaboradas pelo *Teat Club International* (Reinemann, s.d; .Neijenhuis et al, 2001).

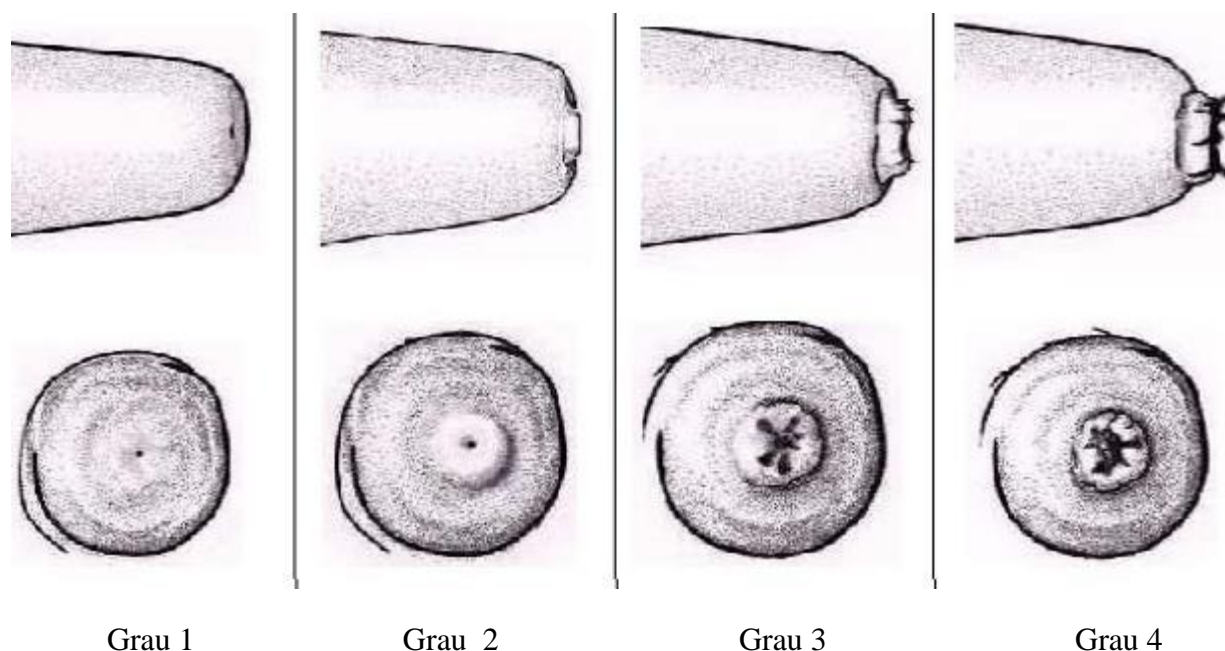


Figura 1. Ilustração dos sistema de escores, demonstrando os quatro graus de hiperqueratose de teto, Adaptado de Mein (2001).

Posteriormente, as vacas foram classificadas quanto ao número de partos e o mês de lactação, de forma a verificar o efeito do tempo de exposição à ação da ordenhadeira no aparecimento e progressão da hiperqueratose de teto ao longo da primeira, da segunda e da terceira lactação.

3.3 Experimento II – Avaliação do possível efeito preventivo da fototerapia sobre o desenvolvimento da hiperqueratose de teto

Com base nos resultados do experimento I, foram selecionadas 60 primíparas em início de lactação (entre 8 e 78 dias), sem histórico ou sinais clínicos de qualquer tipo de afecção mamária, com todos os quartos funcionais e negativos para a presença de mastite clínica pelo teste da caneca de fundo preto. Tais primíparas foram divididas aleatoriamente em dois grupos de 30 animais, um controle e um tratado.

Ao longo da realização do experimento 1 animal do grupo tratado foi descartado do experimento por ter machucado e por manejo da fazenda foi trocado o local de ordenha.

Os animais do grupo tratado tiveram o teto cranial esquerdo submetido à fototerapia, com a utilização do protótipo de fotobiomodulação denominado Tetus. O desenvolvimento do protótipo de fotobiomodulação é parte integrante do projeto de pesquisa FAPEMIG – Edital 021/2007 Pape Subvenção, processo nº 0643-6.01/08, fruto da parceria do Laboratório de Bioengenharia (Labbio) com a empresa Bios Serviços e Comércio Ltda e atualmente se encontra em processo de reconhecimento de patente. A ação do protótipo se baseia na emissão de luz do tipo LED, por emissores posicionados em torno do óstio do teto. O teto cranial direito do grupo tratado, apesar

de não receber tratamento, também foi avaliado no sentido de verificar um possível efeito da fototerapia contralateral.

Para tanto, em um período máximo de duas horas após a ordenha, os animais do grupo tratado foram contidos em tronco para que o protótipo fosse aplicado por um período de 2 minutos. Este procedimento foi repetido três vezes por semana por um período de seis semanas (18 aplicações). Antes de cada aplicação, como os tetos chegavam com a solução antisséptica, esta solução era retirada com o papel toalha e após a aplicação era novamente colocada.

Durante todo o período experimental, ambos os grupos permaneceram no mesmo lote de vacas, recebendo o mesmo tipo de alimentação e manejo e sendo ordenhadas em conjunto nas mesmas instalações e com o mesmo equipamento. Como medida de prevenção de mastite, antes da ordenha, os tetos eram limpos com solução de cloro 1%, feito o teste da caneca de fundo preto, imersos na mesma solução de cloro 1%, deixado agir por 30 segundos era retirado com papel toalha e imediatamente era colocado o conjunto de ordenha. Imediatamente após a ordenha, os tetos de todos os animais foram imersos em solução iodo glicerinado, 1% de iodo ativo. Como medida de controle, a Fazenda realizava mensalmente a contagem de células somáticas de todas as vacas em lactação.

Antes do início, durante o experimento, semanalmente por 6 semanas consecutivas, e seis meses após o final, os tetos craniais das vacas de ambos os grupos foram fotografados pelo mesmo pelo mesmo pesquisador, a fim de classificar a hiperqueratose pelo sistema de escores descrito no experimento I (Figura 1).

Mais além, nos mesmos intervalos, a extremidade distal dos tetos craniais de todos os animais foi fotografada com intuito de se realizar a morfometria da lesão. As fotografias foram obtidas de forma padronizada por meio de uma câmera EOS Rebel XS (Canon, EUA), 10.1 megapixels, com lente de 18 x 55 mm, a uma distância constante de 30 cm (mantida sempre na lente de 55mm com o estabilizador e com o foco no modo automático). Para se manter a distância constante até a lesão, uma régua metálica (Figura 2) dotada de um gabarito de 1 cm² (Figura 3) foi adaptada à base da câmera. Em cada tempo, foram realizadas 2 imagens de boa qualidade por teto avaliado.



(A)

(B)

Figura 2 .(A) Momento da obtenção da imagem. Observe a régua metálica, fixada à base da câmera, que serviu para padronização da distância. (B) Logo após a captura da imagem, ela era conferida, a fim de verificar a possibilidade de realização de mensuração.

As imagens capturadas foram transferidas para um computador pessoal para serem posteriormente analisados por meio do programa computacional MATLAB 7.0.1, para obtenção das áreas externas e internas da lesão (Figura 3). Este procedimento foi realizado por três pessoas independentes e cegas quanto a identificação do grupo ou tempo da imagem analisada.



Figura 3. Imagem do Programa MATLAB 7.0.1 mostrando o gabarito de 1cm² montado na extremidade da régua metálica, que serviu como referência para a calibragem do programa computacional. Observa-se a delimitação das áreas externas e internas da lesão de hiperqueratose. Com intuito de verificar o efeito da fototerapia sobre a ocorrência de mastite subclínica, as contagens de células somáticas realizadas pela própria fazenda foram monitoradas e registradas durante todo o período do experimento. Além da comparação dos valores de CCS em cada um dos grupos e tempos, também comparou-se a incidência de mastite subclínica (CCS>250.000 células/mL) em ambos os grupos durante o tempo de tratamento.

3.4 Experimento III – Avaliação do possível efeito terapêutico da fototerapia sobre a cicatrização da hiperqueratose de teto.

Para este experimento foram selecionadas 30 vacas de segunda lactação, que já apresentavam lesão de hiperqueratose prévia. Com base nos resultados do experimento I, as todas as vacas iniciaram no experimento entre 156 e 256 dias de lactação, quando a lesão de hiperqueratose já estava estabilizada. De forma semelhante ao experimento II as vacas possuíam todos os quartos funcionais, sem sinais clínicos de qualquer tipo de afecção mamária e negativos para a presença de mastite clínica pelo teste da caneca. Estas vacas foram divididas aleatoriamente em dois grupos de 15 animais, um controle e um tratado.

Durante o experimento foram retirados 2 animais, sendo 1 animal tratado e outro controle, eles ficaram mais de 1 semana em outra ordenha para tratamento de mastites recorrentes.

O tratamento e as avaliações foram realizados da mesma forma que nas primíparas do experimento II, com exceção do último tempo de avaliação de seis meses após o final, não realizado no experimento III.

Tabela 1. Características da luz

Comprimento de onda	860nm
Modo pulsado (Onda quadrada)	
Frequência	100hz
Ciclo	50%
Potência de pico por LED	80mW
Potência média por LED	40mW
Tempo de aplicação	120s
Foi considerado para os Cálculos	
Diâmetro do Aplicador	2,5 cm
Diâmetro do teto	1,5 cm
	Área total por aplicador
Aplicador P	15,8 cm ²
Aplicador M	20,5 cm ²
Aplicador G	25,4 cm ²
	Densidade de potência
Aplicador P	30,4 mW/cm ²
Aplicador M	31,2 mW/cm ²
Aplicador G	31,6 mW/cm ²
Dose	3,7 J/cm ²

3.5 Análise Estatística

Os dados do experimento I foram tabulados, calculando-se médias e desvios padrões de acordo com os diferentes meses de lactação, considerando-se separadamente categorias de vacas de primeira, segunda e terceira lactações. Esses dados foram representados em forma de gráficos de linhas para visualizar a evolução das lesões nas diferentes categorias.

Os dados dos experimentos II e III foram tabulados e apresentados em forma de médias e erros padrões. No caso dos escores para hiperqueratose, verificou-se o efeito do tratamento em cada tempo por meio do teste de Kruskal Wallis, seguido pelo teste de Dunn para comparar as médias do teto tratado (esquerdo) e controle (direito) do grupo controle juntamente com os tetos esquerdo (controle 1) e direito (controle 2) do grupo controle. Para comparação dos diferentes tempos em cada teto, usou-se do teste de Friedman seguido pelo teste de Dunn.

Para os dados paramétricos (medidas interna e externa e CCS) utilizou-se ANOVA inteiramente casualizado para o efeito do tratamento entre tempos e ANOVA em blocos ao acaso para comparação de tempos em cada teto. Em ambos os casos, comparou-se médias pelo teste de Tukey. No caso das medidas internas e externas o valor de cada teto foi representado pela média aritmética dos três avaliadores.

Para a comparação da incidência de mastite subclínica ($\text{CCS} > 250$ células/mL) entre grupos durante o período experimental, usou-se o teste exato de Fisher nos dois experimentos. Para a comparação da incidência de mastite subclínica ($\text{CCS} > 250$ células/mL) entre grupos durante o período experimental, usou-se o teste exato de Fisher nos dois experimentos. Quando o teste de Fisher foi significativo, calculou-se a razão de chances (odds ratio) e seu intervalo de confiança a 95%.

Para todos os testes estatísticos considerou-se um nível de significância de $P \leq 0,05$.

4. Resultados e discussão

4.1 Experimento I

A incidência geral de hiperqueratose nessa população foi de 95,6% dos tetos afetados (Tabela 1), sendo que mais de um terço (35,3%) de todos os tetos apresentavam graus 3 e 4, ou seja já apresentavam predisposição para ocorrência de mastites. Estes resultados são elevados, uma vez que estão acima do limite aceitável que é de < 20% de graus 3 ou 4 de acordo com Meinn 2001. Embora a fazenda tenha excelentes equipamentos com revisão regular, a produção de leite por animal é alta, em média 29 litros ao dia, e de acordo com Bristool, 1989 e Blood et al. 1995, a gravidade de lesões de hiperqueratose são mais graves principalmente em animais de alta produção.

Tabela 2. Incidência dos diversos graus de hiperqueratose em um rebanho de vacas leiteiras submetidas a três ordenhas diárias.

Escore	Teto	%
1	175	4,4%
2	2390	60,3%
3	1272	32,1%
4	127	3,2%
Total	3964	100%

As médias e os desvios padrões dos graus de hiperqueratose nos diferentes meses de lactação nas categorias de vacas de primeira, segunda e terceira lactação estão representados na Figura 4. Como se pode observar, as primíparas mesmo no primeiro mês de lactação já apresentam algum grau de hiperqueratose, alcançando média 1,5, enquanto que o normal seria 1.

Nas primíparas, observa-se um aumento crescente nos valores dos escores médios, que atingem o valor máximo aos 10 meses de lactação. No caso das vacas de segunda e terceira lactação, os tetos se iniciam em média com grau 2, apresentando aumento progressivo até os 4 a 5 meses de lactação, quando as médias se estabilizam. Esses resultados foram fundamentais verificar a evolução da hiperqueratose nas diferentes categorias e para o delineamento dos experimentos II e III. No caso do experimento II, cujo objetivo era verificar o efeito preventivo, o tratamento teve início até 2,5 meses de lactação, antes do grau máximo de desenvolvimento da hiperqueratose. Nesse experimento os animais foram reavaliados também no final da lactação, afim de verificar se o protocolo instituído no início impediu a evolução da lesão.

Já no experimento III, que objetivava verificar possível efeito curativo, o tratamento foi iniciado depois do quinto mês de lactação de 2ª ordem de parto, quando já havia estabilização da progressão da hiperqueratose nas categorias de segunda e terceira lactação.

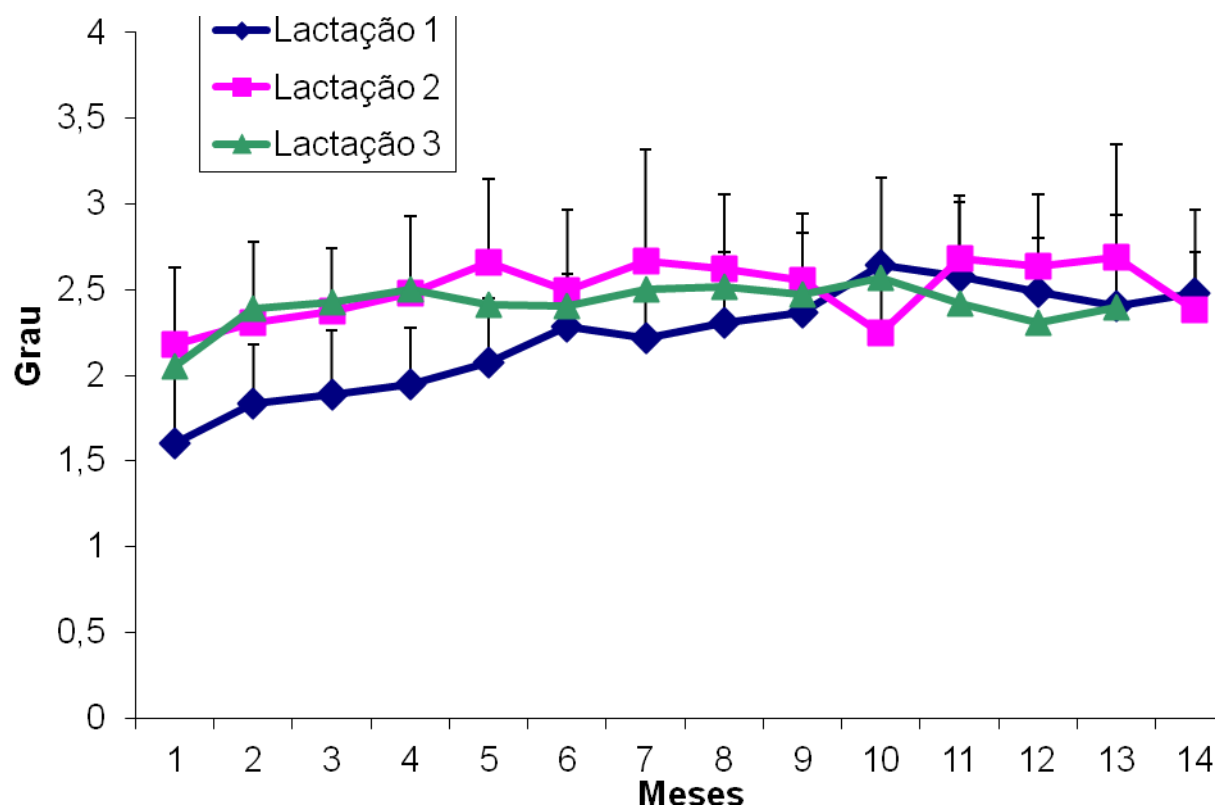


Figura 4. Médias e desvios padrões dos graus de hiperqueratose segundo o número de partos e o tempo de lactação em vacas da raça HPB.

4.2 Experimento II

Os valores médios para áreas internas e externas e graus de hiperqueratose dos tetos tratado (esquerdo) e contralateral (direito) do grupo tratado e os dois tetos do grupo controle (controles 1 e 2) estão representados respectivamente nas Figuras 5, 6 e 7.

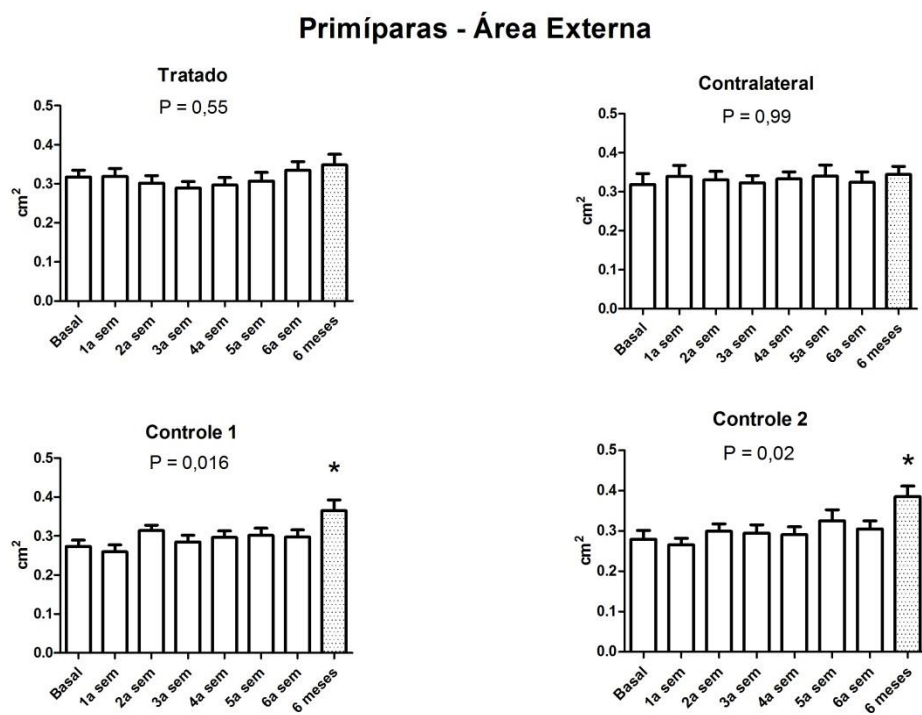


Figura 5 – Médias e erros padrões das áreas externas de hiperqueratose de tetos em primíparas submetidas ou não à terapia fotobiomoduladora.

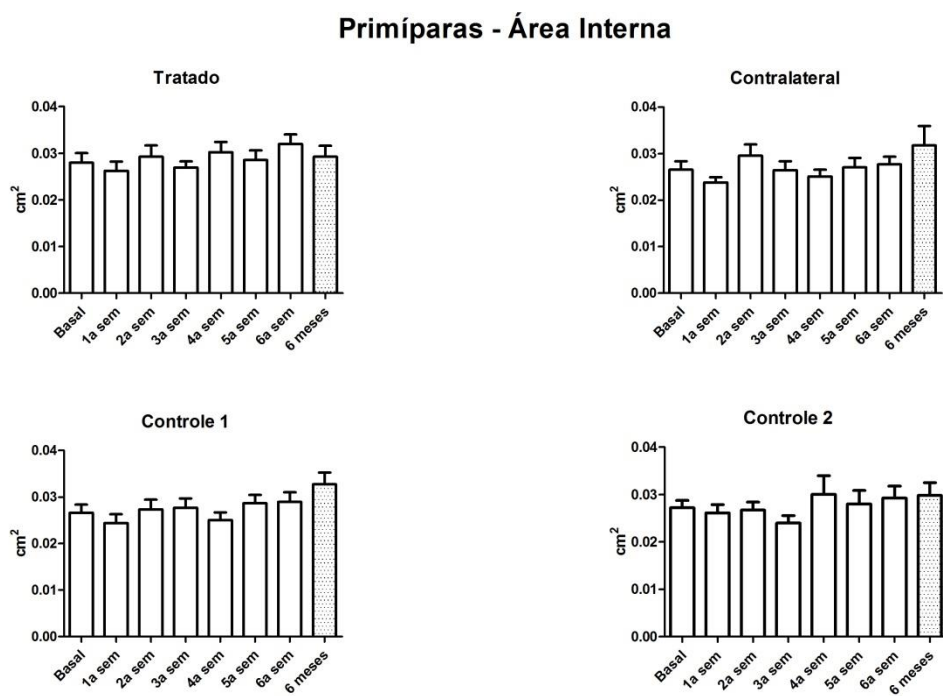


Figura 6. Médias e erros padrões das áreas externas de hiperqueratose de tetos em primíparas submetidas ou não à terapia fotobiomoduladora.

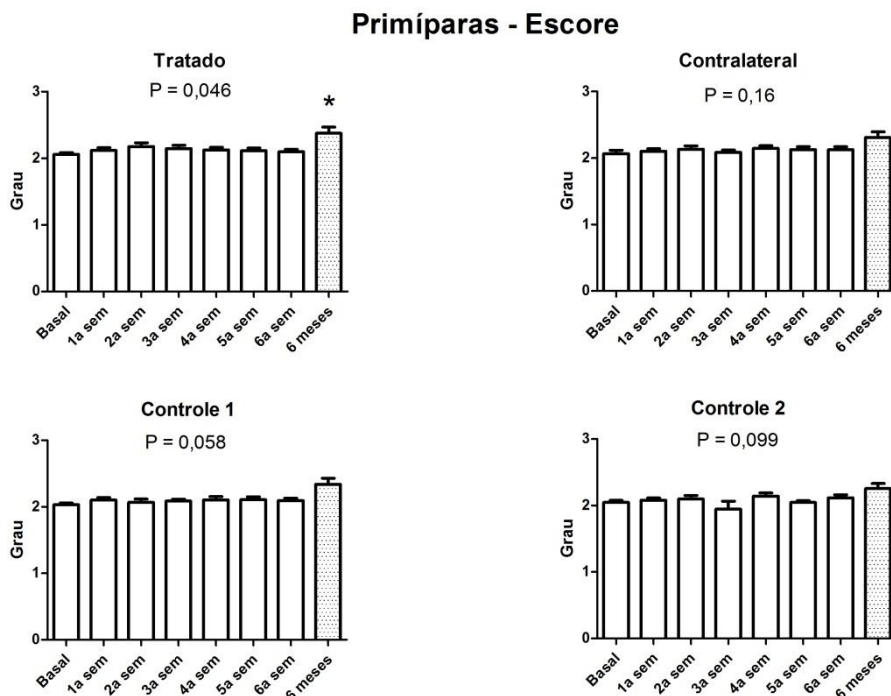


Figura 7 – Médias e erros padrões dos graus de hiperqueratose de tetos em primíparas submetidas ou não à terapia fotobiomoduladora.

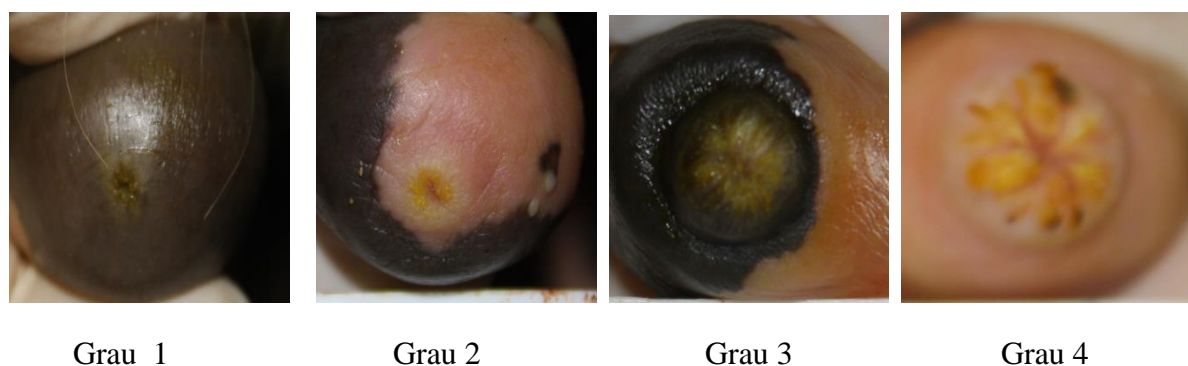


Figura 8. Classificações das imagens realizadas pelo avaliadores do experimento .

Conforme pode-se observar na Fig. 5, o diâmetro externo das lesões permaneceu constante nos tetos do grupo tratado durante o tratamento, não havendo aumento significativo mesmo 6 meses após o final. O mesmo não foi verificado no grupo controle, que apesar de se manter constante durante as primeiras semanas, apresentou aumento significativo ao final da lactação. A ausência

de aumento da área externa de lesão ao final do período de lactação no grupo tratado indica efeito benéfico da fototerapia, que se manifestou não apenas no teto tratado, mas também no teto contralateral.

Corroborando os efeitos aqui observados outros pesquisadores encontraram efeitos de cicatrização em feridas crônicas como úlceras de pressão em equino (Araújo et al., 2008) e as úlceras de decúbito em humanos (Araújo et al., 2009) estes 2 casos usando laser. Silva et al (2009), usando LED trataram úlceras crônicas em humanos com resultados positivos. Em traumas mamilares em humanos, houve redução no tempo de cicatrização e alívio da dor no paciente (Chaves et al., 2012).

De algum modo, o tratamento neste experimento minimizou o crescimento das lesões na área externa da hiperqueratose, os resultados encontrados por alguns pesquisadores, colaboram com o resultado encontrado, Sampaio et al. (2012) com tratamentos com laser ou LED em feridas cutâneas produzidas em ratos e encontraram aumento significativo no número de fibroblastos. E Clark et al. (2003) afirmaram que o tratamento fotobiomodulador aumenta o incremento à produção de ATP, aumento da proliferação de fibroblastos e da síntese de colágeno, aumento da síntese de RNA e DNA, estímulo à angiogênese e alterações induzidas sobre as aferências nociceptivas.

Provavelmente a soma destes benefícios minimizou o agravamento da lesão e também pode ter causado efeitos no teto contralateral.

Apesar do efeito benéfico na área externa, a fototerapia não foi suficiente para inibir a evolução do grau de lesão nos tetos tratados. Conforme observado na Figura 7, houve aumento significativo do escore para lesão ao final da lactação (seis meses após o período de tratamento) no teto tratado. Apesar dos tetos contralateral e controles não apresentarem aumento significativo, também observou valores superiores ao final do experimento. Os valores de P muito próximos do nível de significância nos tetos contralateral e controles e a ausência de diferença significativa na comparação dos tratamentos no tempo final, demonstra que os aumentos foram clinicamente semelhantes em todos os tetos, ocorrendo de forma independente do tratamento utilizado.

De acordo com Neijenhuis et al. 2001, o grau de hiperqueratose piora com os dias de lactação e ordem de parto. E neste experimento com o P ficou sempre próximo de 0,05 nos 6 meses de lactação dentro. Os fatores envolvidos no aumento do grau de hiperqueratose não foram removidos em nenhum momento, os animais continuaram sendo ordenhados normalmente, embora as condições dos equipamentos, da estrutura da fazenda, condições dos funcionários foram boas, ainda existiu os principais fatores que não podem ser removidos, a alta média de produção, o vácuo, a sobreordenação, principalmente nos tetos anteriores por darem menos leite, os escores de hiperqueratose continuaram aumentando. Nestas condições de ordenha a hiperqueratose pode ser no máximo minimizada e não retirada.

Os valores médios de CCS nas primíparas dos grupos tratado e controle nos meses durante e após o experimento estão representados na Figura 9 e a incidência de mastite subclínica nos dois grupos está na Figura 10.

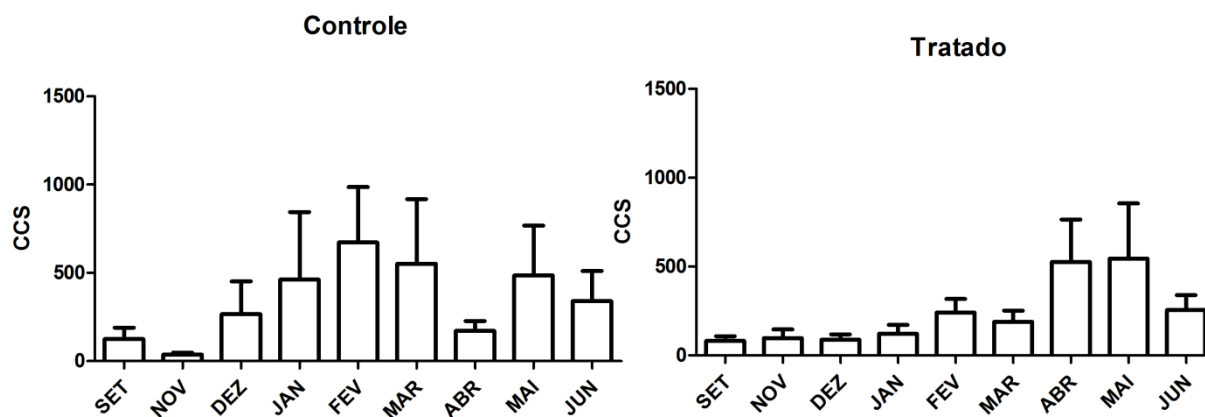


Figura 9. Médias e erros padrões de CCS de primíparas submetidas ou não à terapia fotobiomoduladora nos meses durante e após o tratamento.

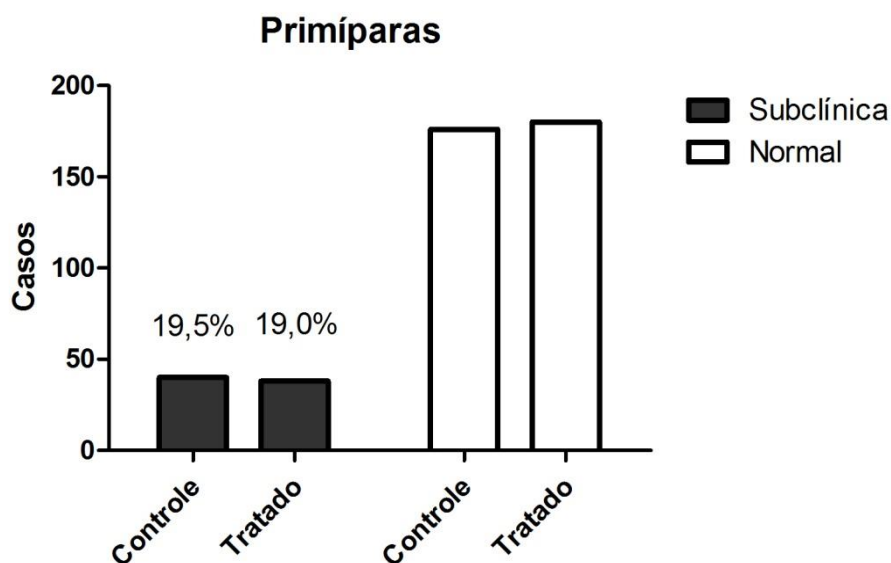


Figura 10. Incidência de CCS normais ou acima de 250 células/mL (mastite subclínica) em primíparas submetidas ou não à terapia fotobiomoduladora nos meses durante e após o tratamento.

Não houve diferença estática entre os animais tratados e os animais controle.

A mastite contagiosa, ou subclínica é a responsável pelo o aumento da CCS. O momento de contaminação é na ordenha, um animal contaminado com bactérias causadoras de mastites subclínicas, ordenhado anteriormente de um animal sadio, através do equipamento é o principal modo de infecção (Barret, 2002). Na propriedade deste experimento, as primíparas eram as primeiras a serem ordenhadas, o que diminui o contágio, este fator juntamente com outras medidas de controle foram suficientes para manter a CCS e a mastite subclínica baixas.

Vale lembrar que estes foram os primeiros experimentos e que vários parâmetros da luz devem ainda ser estudados, como: Potência, comprimento de onda, tempo de exposição, tempo de tratamento, quando fazer o tratamento, etc.

4.3 Experimento III

Os valores médios para áreas internas e externas e graus de hiperqueratose dos tetos tratado (esquerdo) e contralateral (direito) do grupo tratado e os dois tetos do grupo controle (controles 1 e 2) estão representados respectivamente nas Figuras 11, 12 e 13.

Vacas - Diâmetro Externo

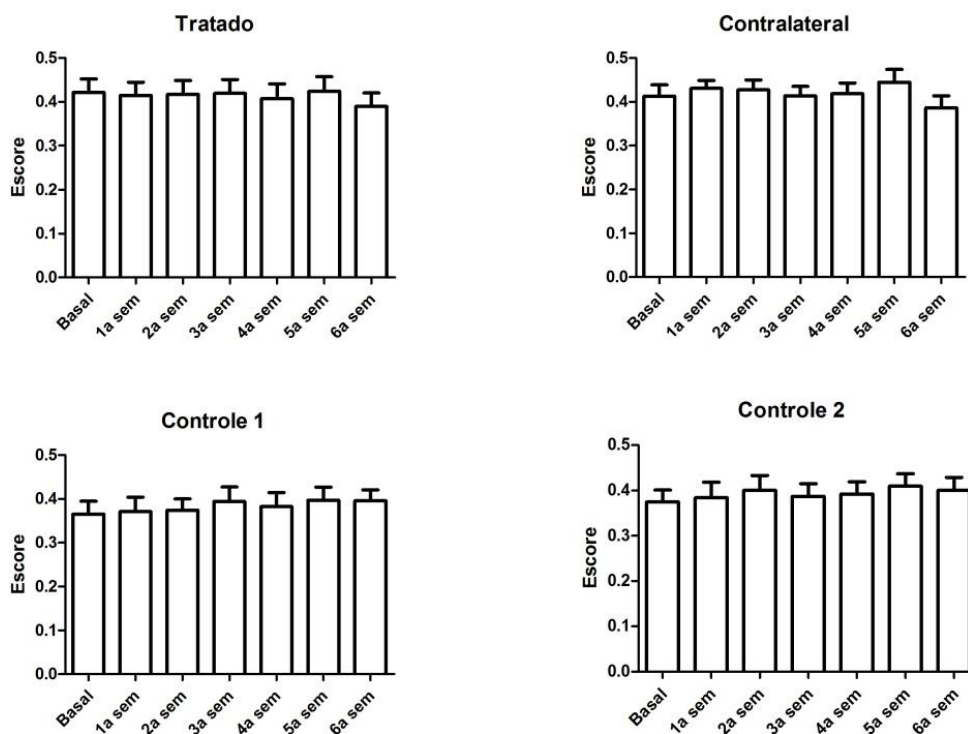


Figura 11. Médias e erros padrões das áreas externas de hiperqueratose de tetos em vacas submetidas ou não à terapia fotobiomoduladora.

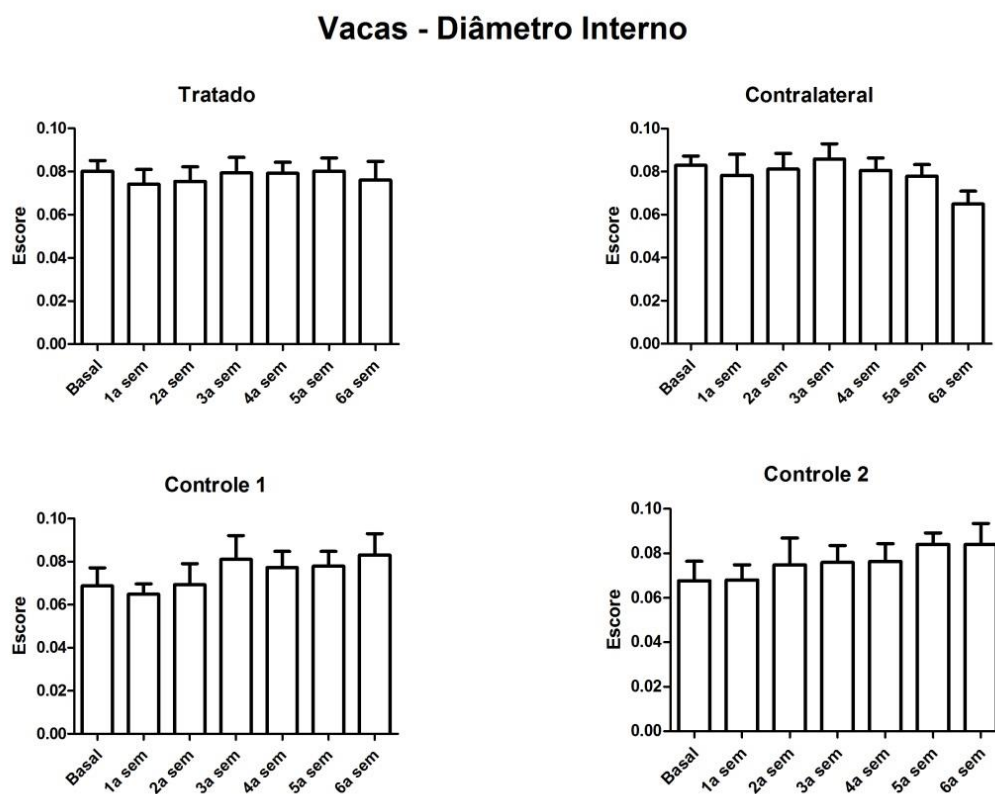


Figura 12. Médias e erros padrões das áreas internas de hiperqueratose de tetos em vacas submetidas ou não à terapia fotobiomoduladora.

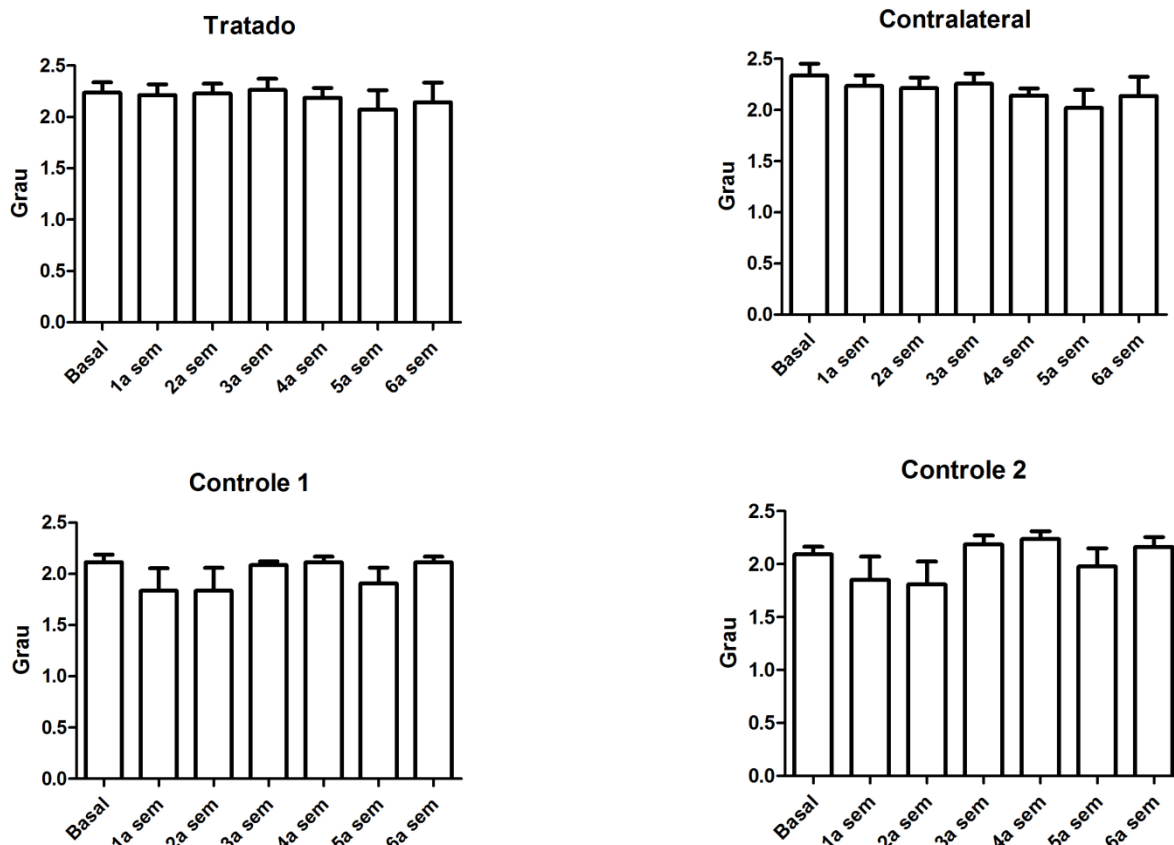


Figura 13. Médias e erros padrões dos escores para hiperqueratose de tetos em vacas submetidas ou não à terapia fotobiomoduladora.

Neste experimento não se verificou qualquer diferença estatística ou sinal clínico que evidenciasse algum efeito curativo da fototerapia sobre a morfologia e aparência externa das lesões de hiperqueratose. Conforme esperado e com base nos dados do experimento I, não houve progressão do tamanho ou do grau de hiperqueratose nas vacas após os cinco meses de lactação.

Estes achados demonstram, que apesar o protocolo de fototerapia aqui utilizado, apresentar algum efeito preventivo em primíparas (experimento II), não reverteu ou alterou a aparência das lesões de hiperqueratose já instaladas.

Quanto aos efeitos do protocolo de fototerapia aqui testado sobre os valores de CCS e incidência subclínica de mastite, alguns efeitos foram observados, conforme observado nas Figuras 14 e 15.

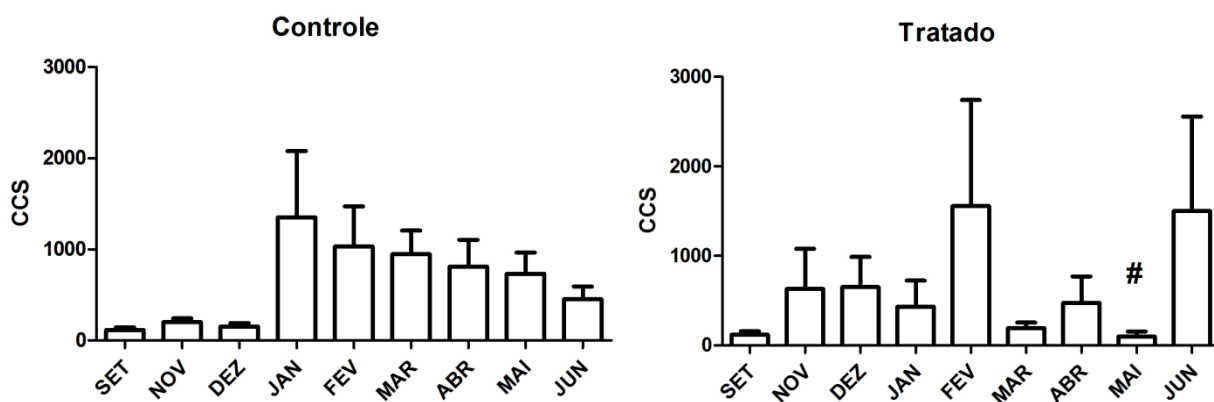


Figura 14. Médias e erros padrões de CCS de vacas submetidas ou não à terapia fotobiomoduladora nos meses durante e após o tratamento. # Difere do controle no mesmo tempo ($P < 0,05$).

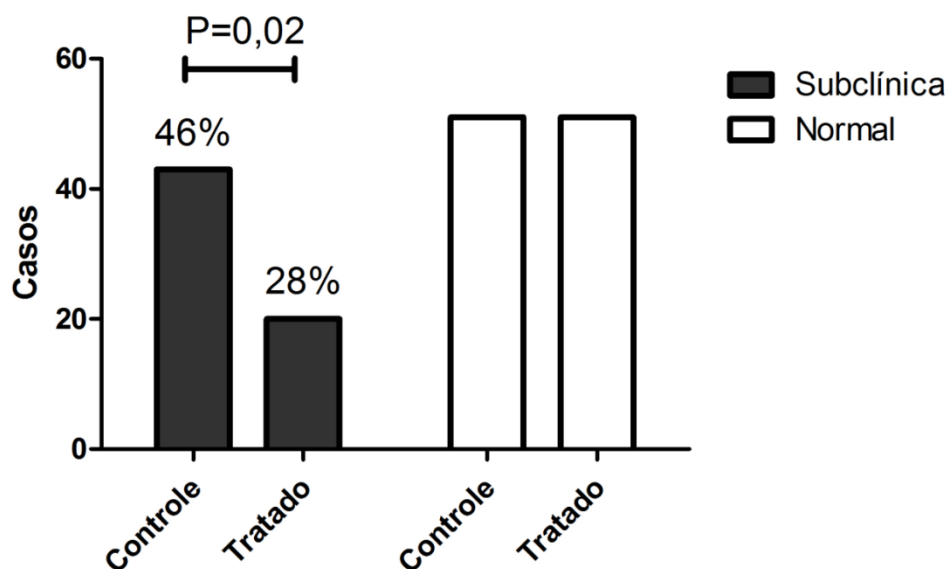


Figura 15. Incidência de CCS normais ou acima de 250 células/mL (mastite subclínica) em vacas submetidas ou não à terapia fotobiomoduladora nos meses durante e após o tratamento.

Na CCS média ao longo do tempo, no T6 a diferença estatística entre grupos, no grupo tratado a CCS no T6 é menor do que no grupo controle.

Danhof (2000) mostra que a luz pode trabalhar diretamente na permeabilidade da membrana celular, facilitando a mobilidade iônica (Cálcio, Sódio e Potássio) aumentando indiretamente a produção de ATP, que assim tecidos imunodeficientes poderão ser favorecidos, melhorando o metabolismo celular. Colabora com a melhora na imunologia do animal, que a exposição a luz faz com que os macrófagos estimula a liberação de fatores de crescimento (Young, 1989) e

Com isto, os possíveis efeitos do fotobiomodulador para abaixar a CCS são diversos. Provavelmente o conjunto destes fatores, diretos e indiretos, melhorou as condições do animal e que levou a diferença de $P= 0,02$ em relação aos casos de mastite subclínica, observado na melhora da qualidade do leite com a diminuição de células inflamatórias.

Nas vacas de segunda cria já era esperado um maior número de animais com mastites subclínicas, no caso dos animais tratados o número de casos foi estatisticamente menor, devido ao menor número de novos casos e maior cura.

No teste de Odds Ratioo resultado foi de 2,15. Com isto, com 95% no intervalo confiança, a chance do animal tratado se infectar com mastite subclínica diminuem entre 1,11 a 4,15 vezes sem relação ao animal não tratado.

5- Conclusões

Nas condições desses experimentos pode-se afirmar que:

Apesar de não impedir a evolução da lesão em primíparas, este protocolo fototerápico preveniu o aumento de seu diâmetro externo.

O protocolo fototerápico não reduziu a lesão ou alterou a forma de hiperqueratose de teto já instalada vacas de segunda cria. Contudo, sua implementação reduziu a incidência de mastites subclínicas.

Os achados do presente estudo demonstram o potencial de uso do protótipo Tetus como adjuvante na prevenção do desenvolvimento de hiperqueratose de teto em primíparas e como forma de reduzir a ocorrência de mastite subclínicas em vacas leiteiras de alta produção portadoras dessa enfermidade.

O protocolo de fototerapia não substitui a qualificação de mão de obra e as boas práticas de higiene.

6- Considerações finais

Com os resultados destes experimentos é importante, testar e analisar os efeitos do fotobiomodulador na qualidade do leite, e realizar exames de CCS por quarto mamário e cultura microbiológica para melhor entendimento da situação.

É provável que ao testar variações da luz, comprimento, potência, tempo de aplicação, quantidade de sessões etc.

Para facilitar o uso testar um emissor de luz junto com as teteiras da ordenhadeira, já é comprovado que não interfere no leite.

A mastite subclínica é uma das principais causas de prejuízos em fazendas leiteiras, por exemplo: A empresa que capta o leite na propriedade do experimento chega paga R\$0,04 por litro de leite para a CCS do tanque < 250.000 por ml, e pode penalizar, para CCS > 750.000 por ml, em - R\$0,02 por litro, uma diferença de até R\$0,06. Esta fazenda produzia 35 mil litros por dia, portanto a diferença apenas por causa da CCS poderia chegar, em situações extremas até a R\$ 2100,00 por dia, R\$ 766500,00 ao ano.

7. Referências

- AIDA, Y.; CHEN, J.; MATSUMOTO, Y. et al. Evidence for cattle major histocompatibility complex (BoLA) class II DQA1 gene heterozygote advantage against clinical mastitis caused by Streptococci and Escherichia species. *J. Com. Blac. Munk.-Tissue Antigens* n.72, p. 525–531, 2008.
- ALMEIDA, A.C.; CARDOSO, C.C.; FIORINI, J.E. et al. Efeito da aplicação intramamária da mistura gasosa oxigênio-ozônio no tratamento da mastite subclínica em vacas. *Ver. Inst. Latic.* v. 61, n.350, p.17-23, 2006.
- ARAÚJO D. K. G.; GHELLER V.A. Aspectos morfológicos, celulares e moleculares da imunidade da glândula mamária de búfalas (*Bubalus bubalis*): revisão de literatura. *Rev. Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, v.29, n.2, p.77-83, 2005.
- ARAUJO, A.R.; CHAVES, M.E.A.; TIZON, A.F.F. et al. Tratamento de úlceras de decúbito com laser de baixa intensidade. *Fisioterapia Brasil* - Volume 10 - Número 2 - março/abril de 2009.
- ARAÚJO, A.R.; SALEME, C.S.; CORRÊA, M.F.S. et al. Development of a LED cluster device able to treat mammila injury emitting in the infrared wavelength. In: *19th International Congress of Mechanical Engineering*, 2007.
- ARAÚJO. et al., Efeitos potenciais do laser de baixa potência no tratamento de úlceras de pressão em um equino: um estudo de caso. *Fisioterapia Brasil*; 9(1):59-63 – jan/fev 2008.
- BANNERMAN, D.D.; CATES, E.A.; CONNOR, E.E. et al. Functional characterization of bovine TIRAP and MyD88 in mediating bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial NF-kB activation and apoptosis. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* n. 32, p. 477-490, 2009.
- BLOOD, D.C.; RADOSTIS, O.M.; GAY, C.C. *Veterinary Medicine*, 8. ed. London: Book society, 1995. p. 379-386.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO-MAPA. *Projeções do agronegócio 2009/10 a 2009/20*. Brasília, 2010. 48p.
- BRISTOL, D.G. Teat and udder surgery in dairy cattle – part. I. *Compendium Continuing Education Practice Veterinay.* v. 11, n. 7, p. 868-873, 1989.
- CAPUCO, A.V.; MEIN, G.A.; NICKERSON, S.C. et al. Influence of pulsationless milking on teat canal keratin and mastitis. *Journal of Dairy Science.* 77: 64-7,1998.

CASALECHI, H.L.; NICOLAU, R.A.; CASALECHI, V.L. et al. The effects of low-level light emitting diode on the repair process of Achilles tendon therapy in rats. *Lasers Med. Sci.*, v.24, n.4, p.659-665, 2009.

CHAVES, M. E. A.; ARAÚJO, A. R.; SANTOS, S. F. et al. LED Phototherapy Improves Healing of Nipple Trauma: A Pilot Study. *Photomedicine and Laser Surgery*. Volume 30, Number 3, 2012

CLARK, C.; BRYDEN, A.; DAWE, R. Topical 5-aminolaevolinic acid photodynamic therapy for cutaneous lesions: outcome and comparison of light sources. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, v.19, p.134-141, 2003.

COENTRÃO, C.M.; SOUZA, G.N.; BRITO, J.R.F. et al. Fatores de risco para mastite subclínica em vacas leiteiras. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, v. 60, 2, p. 283-288, 2008.

COLDEBELLA, A.; MACHADO, P.F.; DEMÉTRIO, C.G.B. et al. Contagem de células somáticas e produção de leite em vacas holandesas confinadas. *Rev. Bras. Zootec.*, v.33, p.623-634, 2004.

COLLINS R.A.; PARSONS, K.R.; FIELD, T. R. et al. Histochemical localization and possible antibacterial role of xanthine oxidase in the bovine mammary gland. *Journal of Dairy Research*. 55: 25-32, 1988.

CORAZZA, A.V. et al. (2005). Comparative pilot-study of the effect of low level laser treatment and light emitting diode in the healing of induced wounds in rats. *Photomedicine and Laser Surgery* v. 23, n. 1, p.89-151. February from 5 th WALT CONGRESS, São Paulo, Brazil.

CORREIA, F.I. et al. O uso do laser de HeNe (632,8nm) no fechamento de feridas. *Fisioterapia Brasil*, v. 4, n. 2, p.144-148, 2003.

DANHOF, G. (2000). In: SIMUNOVIC, Z. (Ed.). Lasers in medicine and dentistry: basic up-to-date clinical application of low energy-level laser therapy LLLT. *Biological effects of the laser beam*. Croatia: Rijeka; Vitgraf. P.127-152.

DIAS, R.V.C. Principais Métodos de Diagnóstico e Controle da Mastite Bovina. *Acta Vet. Brasil.*, v.1, n.1, p. 23-27, 2007.

DYCE, K.M. Tratado de Anatomia Veterinária. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 567-573, 1996.

FOX, L. K.; NAGY J. A.; HILTERS J. K. et al. Effects of post milking teat treatment on the colonization of *Staphylococcus aureus* on chapped teat skin. *American Journal of Veterinary Research*. 52, 6: 799-802. 1996.

FREITAS, M.F.L.; MEDEIROS, E.S.; MOTA, R.A. et al. Perfil de sensibilidade microbiana in vitro de linhagens de *Staphylococcus spp.* isoladas de vacas com mastite subclínica. *Pesq. Vet. Bras.* v.7, n.29, p.569-574, 2009.

HACHEM, N.I. MASTITE BOVINA: Descrição dos tipos mais frequentes e métodos de prevenção e tratamento visando a melhoria da qualidade do leite e saúde dos rebanhos. 2005. Dissertação (*Pós-Graduação Lato Sensu em Processamento e Controle de Qualidade em Carne, Leite, Ovos e Pescado*) UFLA - Lavras – MG.

HAMANN, J. Teat tissue resistance mechanisms with special regard to machine milking. *Proceedings IDF symposium on immunology of ruminant mammary gland*. Stresa. Italy. 2000. p.102-111

HARNON, R.J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell count. *Journal of Dairy Science*, v. 77, p. 2103-2112, 1994.

HILLERTON, J.E; MORGAN, W.F.; FARNSWORTH, R. et al. Evaluation of Bovine Teat Condition In Commercial Dairy Herds: 2. Infectious Factors And Infections. *Proceedings, AABP-NMC International Symposium on Mastitis and Milk Quality*, Vancouver, BC, Canada. 2001.

HOLTENIUS K.; PERSSON W.K.; ESSEN-GUSTAVSSON B., HOLTENIUS P. et al. Metabolic parameters and blood leukocyte profiles in cows from herds with high or low mastitis incidence. *Vet. J.* p .65-73, 2004.

HOSPIDO, A; SONESSON, U. The environmental impact of mastitis: a case study of dairy herds. *Sci. Tot. Envir.* n.343, p. 71– 82, 2005.

IBGE, *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária* Municipal, 2009. <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2009/tabelas_pdf/tab23.pdf>. Acessado em 20 de março de 2011.

JANSEN, J.; RENES, R.J.; STEUTEN, C.D.M. et al. Debunking the myth of the hard-to-reach farmer: Effective communication on udder health. *J. Dairy Sci.* v.93, n.3, p. 1296-1306, 2010.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO J. Histologia Básica. *Guanabara/ Koogan* 8ª Ed. Rio de Janeiro. Cap. 18. p.301-312, 1995.

KANA, J.S. et al. Effect of low-power density laser radiation on healing of open skin wounds in rats. *Arch Surg*, v.116, p. 293-296, 1981.

KARU, T.I. Low-power laser therapy. In: VO-DINH, T., editor. *Biomedical photonics handbook*. Florida: CRC Press, cap. 48, 2003.

KARU, T.I. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low intensity laser radiation. *Lasers Life Sci.*, v.2, p.53-74, 1988.

KARU, T.I. Special issue papers photobiological fundamentals of low-power laser. *Journal of Quantum Electronics*, v.QE-23, n.10, 1987.

KARU, T.I.; KOLYAKOV, S.F. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. *Photomedicine and Laser Surgery*, v.23, n.4, p. 355-361, 2005.

KIRK, J. H. A System for Scoring Teat End Condition. 2005

Korhonen, H. Marnila, P. & Gill, H. S. Milk immunoglobulins and complement factors. *British Journal of Nutrition*. 84 Suppl. 1: S75-S80, 2000.

LAGAN, K.M. et al. A case report of low intensity laser therapy (LILT) in the management of venous ulceration: potential effects of wound debridement upon efficacy. *J Clin Laser Med Surg*, v.18, n.1, p.15-22, 2000.

LAM, T. J. G. M.; RIEKERING, R. G. M. O.; VAN VEERSEN, J. C. L. et al. On- farm udder health monitoring. *Tierärztl Prax Großtiere*. v. 39, p. 95–100, 2011.

LEWIS, S. The likelihood of subclinical mastitis in quarters with different types of teat lesions in dairy cows. *BCVA Cattle practice*. 8, part. 3: p.293-299, 2000.

LONGO, L. (2000). In: SIMUNOVIC, Z. (Ed.). Lasers in medicine and dentistry: basic up-to-date clinical application of low energy-level laser therapy LLLT. *Laser phlebology and lymphology*. Croatia: Rijeka; Vitgraf. P.373-380.

LOW, J.; REED, A. (2001). Eletroterapia explicada: princípios e prática. São Paulo: Manole, p. 472.

LUCAS, C.; GEMERT, M.J.C.; HAAN, R.J. Efficacy of low-level laser therapy in the management of stage III decubitus ulcers: a prospective, observer-blinded multicentre randomized clinical trial. *Laser Med Sci*, v.18, p.72-77, 2003.

MALTZ, E.D.J. REINEMANN e M.A. DAVIS, Blood flow and oxygen concentration of teat-end tissue before and after machine milking. Paper 003012. *ASAE Annual International Meeting*, Milwaukee, Wiscosin, 2000

MATERA, J. M.; TATARUNAS, A.C.; Oliveira S.M. Uso do Laser de arseneto de gálio (904 nm) após excisão artroplástica da cabeça do fêmur em cães. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.18, mar/abr, p.102-106, 2003.

MCCARTHY, K. K. e SEARS, P. M. Diagnosis of mastitis for therapy decisions. *Vet. Clin. Food. Anim.* n. 19, p.93–108, 2003.

MEIN, G., WILLIAMS, D.; REINEMANN, D. Effects of milking on teat end hyperkeratosis: 1. Mechanical forces applied by the teatcup liner and responses of the teat. *National mastitis council annual meeting proceedings*. Fort worth. USA. p.114-123, 2003.

MEIN, G.A. et al. AABP-NMC *International Symposium on Mastitis and Milk Quality in Vancouver*. Canada, September, p.13-15, 2001.

MITIEDRO, A.M.A. Potencial do uso de homeopatia, bioterápicos e fitoterapia como opção na bovinocultura leiteira: avaliação dos aspectos sanitários e de produção. 2002. 119p. Dissertação (Mestrado em Agrossistemas) – *Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina*, Florianópolis.

MORAES, I.A. GLÂNDULA MAMARIA. *Home page da disciplina de Fisiologia Veterinaria da UFF*, Rio de Janeiro, 2002 Disponível em <www.uff.br/fisiovet/Conteudos/glandula_mamaria.htm> Acesso 20 de março de 2011.

MORAES, I.A. Glândula Mamária. *Home page da disciplina de Fisiologia Veterinaria da UFF*, Rio de Janeiro, 2002 Disponível em <www.uff.br/fisiovet/Conteudos/glandula_mamaria.htm> Acesso 20 de março de 2011.

NEIJENHUIS, F. *et al.* Classification and longitudinal examination of callused teat ends in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83:2795-2804, 2000.

NEIJENHUIS, F.; HILLERTON, J.E.; PAULRUD, C. O. et al. Teat condition and mastitis. *National mastitis council annual meeting proceedings*. Charlotte. USA. p.122-131, 2004.

NEIJENHUIS, J. Paper Presented at the Proceedings, *AABP-NMC International Symposium on Mastitis and Milk Quality*, Vancouver, BC, Canada. 2001.

NEWBOULD, F. H.; NEAVE, F. K. The effect of inoculating the bovine teat duct with small numbers of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Dairy Research*. V 32, p.171-179, 1965

OSTERAS, O., SOLVEROD, L.; REKSEN, O. Relationships between milk culture results and composite milk somatic cell counts in norwegian dairy cattle. *J. Dairy Sci.* n. 91 p. 3102–3113, 2008

OZKAN, N. et al. (2004). Investigation of the supplementary effect of GaAs laser therapy on the rehabilitation of digital flexor tendons. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, New York, v.22, n.2, p. 105-110.

PEELER E.J., GREEN M.J., FITZPATRICK J.L. et al. The association between quarter somatic-cell counts and clinical mastitis in three British dairy herds. *Prev. Vet. Med.* V.59, p.169-180, 2003.

PONTINEM, P.J. (2000). In: SIMUNOVIC, Z. (Ed.). Lasers in medicine and dentistry: basic and up-to-date clinical application of low energy-level laser therapy LLLT. *Laseracupuncture*. Croatia: Rijeka; Vitgraf. P.455-475.

PRESTES, D.S. et al. Susceptibilidade à mastite: fatores que a Influenciam – uma revisão Rev. Fac. Zootec. Vet.Agro.Uruguiana, v. 9, n.1, 2002

PRESTES, D.S. et al. Susceptibilidade à mastite: fatores que a Influenciam – uma revisão. Rev. Fac. Zootec. Vet.Agro.Uruguiana, v. 9, n.1, 2002

REINEMANN, D. Latest thoughts on methods for assessing teat condition (s.d.) Disponível em www.uwex.edu/uwmril/pdf/MilkMachine/TeatConditionEval/07%20NMC%20TCI%20Case%20Study%5B1%5D.pdf. Acessado em 16 de janeiro de 2013.

RENEAU, J.K. Effective Use of Dairy Herd Improvement Somatic Cell Counts in Mastitis Control. *J. Dairy Scie.* v. 69, n. 6, p. 1708-1720, 1986.

RUEGG, P.L. Investigation of mastitis problems on farms. *Vet. Clin. Food Anim.* n. 19, p. 47-73, 2003.

RUEGG, P.L. The application of evidence based veterinary medicine to mastitis therapy. *XXVI World Buiatrics Congress*, p.78-93, 2010.

SAMPAIO, S, C,P; MONTEIRO, J, S, C; CANGUSSÚ, M, C, T. et al. Effect of laser and LED phototherapies on the healing of cutaneous wound on healthy and iron-deficient Wistar rats and their impact on fibroblastic activity during wound healing. *Lasers Med Sci.* DOI 10.1007/s10103-012-1161-9. 2012.

SANDHOLM, M.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; KAARTINEN, L. et al. 1995. The bovine udder and mastitis. *University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine*.

SANTOS, J.E.P.; CERRI, R.L.; BALLOU, M.A. et al. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. *Animal Reproduction Science*, v. 80, p. 31-45, 2004.

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

SAY, K.G. et al. O tratamento fisioterapêutico de úlceras cutâneas venosas crônicas através da laserterapia com dois comprimentos de onda. *Fisioterapia Brasil*, v. 4, n. 1, p. 39-47, 2003.

SCHUBERT, E.F. Light Emitting Diodes. New York: *Cambridge University Press*, 2003.

SHEARN, M.; HILLERTON, J.E. Hiperkeratosis of the teat duct orifice in the dairy cow. *Journal of Dairy Research*. V.63, p.525-532, 1996.

SIQUEIRA, F.C.H.N. et al. Uso de laser de baixa intensidade, AsAlGa, 830nm, em pacientes portadores de úlceras de pressão. *Reabilitar*, v.23, n. 6, p.10-15, 2004.

SOARES, J.H. et al. Aspectos morfológicos e histométricos da reparação tecidual das feridas cutâneas de ratos após irradiação com o Laser de Hélio-Neônio. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 4, p.56-60, 1989.

SOMPAYRAC, L. How the immune system works. *Malden: Blackwell Science, Inc.*; 1999.

SONDERGAARD, E., SORENSEN, M.K., MAO, I.L. et al. Genetic parameters of production, feed intake, body weight, body composition, and udder health in lactating *Dairy cows*. *Livest. Prod. Sci.* V.77, p.23-34, 2003.

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

SOUSA, J.M.B. A hiperqueratose do canal do teto nas explorações leiteiras portuguesas. Causas e efeitos microbiológicos. Dissertação de Mestrado em Saúde Pública. Lisboa: *Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa*. 2008 .

TAKEZAKI. et al. Light-emitting Diode Phototherapy at 630 - 3 nm Increases Local Levels of Skin-homing T-cells in Human Subjects. *J Nippon Med Sch. vol 73 (2)*, 75-81, 2006.

TATARUNAS, A. C. et al. Estudo clínico e anatomopatológico da cicatrização cutânea no gato doméstico - Utilização do laser de baixa potência GaAs (904 nm). *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 13, p.86-96, 1998.

TEIXEIRA, P; RIBEIRO, C; SIMÕES, J. Prevenção de Mamites em Explorações de Bovinos Leiteiros. *Da Teoria à Prática*. p. 6-7. 2008

WANG, H.; HURLEY, W.L. Identification of lactoferrin complexes in bovine mammary secretions during gland involution. *Journal of Dairy Science*. V.81, p.1896-1903, 1998.

WEISS, R.A.; MCDANIEL, D.H.; GERONEMUS, R.G.; WEISS, M.A. Clinical trial of a novel non-thermal LED array for reversal of photoaging: clinical, histologic and surface profilometric results. *Lasers in Surgery and Medicine*, v.36, p.85-91, 2005.

WHELAN, H.T. et al. (2001). Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. *Journal of clinical laser Medicine & Surgery*, New York, v.19, n.6, p.305-314.

WHELAN, H.T., BUCHMAN, E.V., DHOKALIA, A. et al. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on molecular changes for wound healing in diabetic mice. *J. Clin. Laser Med. Surg.*, v.21, p.67-74, 2003.

WHELAN, H.T.; SMITS, R.L.; BUCHMAN, E.V. et al. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. *J. Clin. Laser Med. Surg.*, v.19, n. 6, p.305-314, 2001.

WILLIAMS, D.M.; MEIN, G.A. The bovine teat canal: information for measurement of velocity of milk flow from the teat. *Journal of Dairy Research*. V.53, p.179-185, 1986.

YEH, N.G.; WU, C.; CHENG, T.C. Light-emitting diodes - their potential in biomedical applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.14, p. 2161-2166, 2010.

YOUNG, S. et al. (1989). Macrophage responses to light therapy. *Lasers in Surgery and Medicine*, New York, v.9, p. 497-505.

ZECCONI, A. & SMITH, K. L. IDF position paper on ruminant mammary gland immunity. *Symposium on immunology of ruminant mammary gland*. Stresa. Italy. 2000.