

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA



**“COMPARACIÓN DEL EFECTO TERAPÉUTICO DE CÉLULAS MADRES DE
LÍQUIDO AMNIÓTICO Y PLASMA RICO EN PLAQUETAS CONTRA
MASTITIS SUBCLÍNICA EN GANADO LECHERO”**

AUTOR:

EMILY KATHERINNE JAYA BAQUERO

TUTOR:

Dr. KELLY ALVEAR GERARDO ENRIQUE

CEVALLOS – ECUADOR

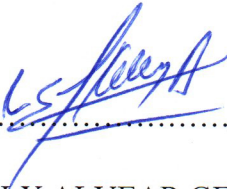
2024

CEVALLOS, 17 ENERO DEL 2024

APROBACIÓN DEL TUTOR

“COMPARACIÓN DEL EFECTO TERAPÉUTICO DE CÉLULAS MADRE DE
LÍQUIDO AMNIÓTICO Y PLASMA RICO EN PLAQUETAS CONTRA
MASTITIS SUBCLÍNICA EN GANADO LECHERO”

REVISADO POR



.....
Dr. KELLY ALVEAR GERARDO ENRIQUE

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, EMILY KATHERINNE JAYA BAQUERO, portador de cédula de identidad número: 0604737825, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: **“Comparación del efecto terapéutico de células madre de líquido amniótico y plasma rico en plaquetas contra mastitis subclínica en ganado lechero”** es original, auténtico y personal. En la virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas.



.....

Emily Katherine Jaya Baquero

0604737825

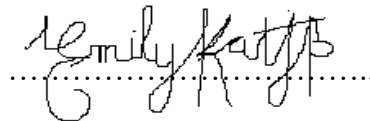
AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado “Comparación del efecto terapéutico de células madre de líquido amniótico y plasma rico en plaquetas contra mastitis subclínica en ganado lechero” como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Médico Veterinario, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él.

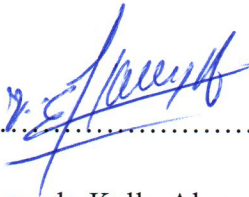
A handwritten signature in black ink, reading "Emily Katherinne Jaya Baquero". The signature is written in a cursive style and is positioned above a horizontal dotted line.

Emily Katherinne Jaya Baquero

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

“COMPARACIÓN DEL EFECTO TERAPÉUTICO DE CÉLULAS MADRE DE LÍQUIDO AMNIÓTICO Y PLASMA RICO EN PLAQUETAS CONTRA MASTITIS SUBCLÍNICA EN GANADO LECHERO”

REVISADO POR:

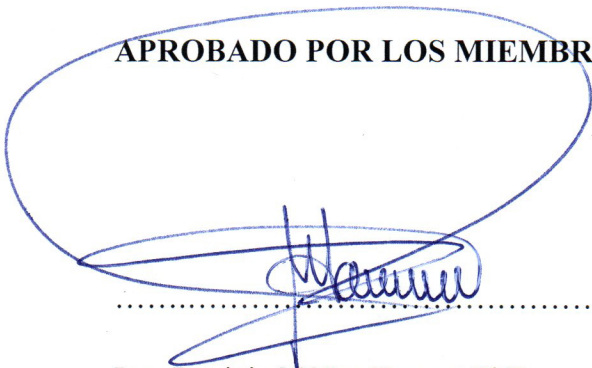


.....
Dr. Gerardo Kelly Alvear, Mg.

TUTOR

APROBADO POR LOS MIEMBROS DE CALIFICACIÓN

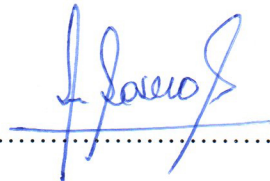
FECHA



.....
Ing. Patricio Núñez Torres, PhD.

.....
05/02/2024

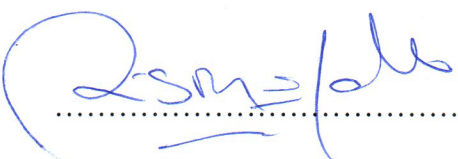
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



.....
Dr. Marco Rosero Peñaherrera, Mg.

.....
05/02/2024

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN



.....
Dr. Israel Carrillo Álvarez, Mg.

.....
05/02/2024

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

DEDICATORIA

A mis padres abuelitos Rosa Baquero y Oswaldo Jaya, que gran parte de mi vida fueron mis guías y mi apoyo incondicional.

A mi madre Leticia Jaya que con su ayuda y ejemplo me supo formar y sembrar en mí el espíritu de convicción, a Gabriel Pazmiño quien se ha convertido en mi figura paterna y me ha enseñado e impartido con su templanza los valores y conocimientos necesarios para salir adelante en la vida con su apoyo incondicional siempre.

A las personas que supieron estar en mis peores momentos, y me mostraron lo que es el cariño, lealtad y ser incondicional, pues no existían ningún obstáculo para acompañarme cuando era necesario.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, agradecer a Dios, por brindarme la vida y salud necesaria porque sin él y su voluntad no podría haber cumplido mis sueños, metas además de brindarme la inteligencia para salir adelante en mi carrera y sabiduría para tomar buenas decisiones y lograr culminarla con éxito.

Agradecer a mi familia, desde mis padres, abuelos, tíos y aquellos que siempre me han apoyado en el desarrollo y progreso de mi vida, que en todos mis sueños han sido el pilar fundamental para seguir adelante y quienes me extendieron la mano cuando sentía que me rendía.

A mis amigos que hice durante el transcurso de mi carrera, con lo que compartí conocimientos, risas, anécdotas y momentos difíciles pero que juntos logramos superar, los mismo que conservare como un buen recuerdo por el resto de mi vida.

Al Dr. Ciro Cargua que, con su ayuda y apoyo en el apartado de tecnología, instalaciones y guía, se convirtió en una persona importante y pilar fundamental para el avance y desarrollo de mi proyecto de investigación.

Al Dr. Gerardo Kelly, Dr. Marco Rosero, Dr. Efraín Lozada, excelentes profesionales y sobre todo grandes personas que además de mis profesores, se convirtieron en mis guías, con los que siempre contaba con su apoyo, atención y sembraron en mis grandes valores.

No fue nada fácil terminar esta etapa con éxito y por cual quiero dedicar un agradecimiento general a todas las personas, pues un párrafo no me es suficiente para expresar todo lo agradecida que estoy, pues siempre estuvieron junto a mí con lo mucho o poco que podían aportar, pero siempre lo hacían de corazón.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I	1
1. MARCO TEÓRICO	1
1.1. Antecedentes investigativos	1
1.2. Marco teórico	7
1.2.1. Fisiología de la glándula mamaria	7
1.2.2. Caracterización de la leche	8
1.2.3. Mastitis subclínica	8
1.2.4. Etiología	8
1.2.5. Pruebas complementarias para identificar mastitis subclínica	9
1.2.6. Componentes del tratamiento	13
1.2.7. Efecto antiinflamatorio y antibacteriano de las MSC	14
1.2.8. Centrifugación y radiación con luz led para reanimar células madres	15
1.2.9. Plasma rico en plaquetas	17
1.3. Objetivos	19
1.3.1. Objetivo General	19
1.3.2. Objetivos Específicos	19
CAPÍTULO II	20
METODOLOGÍA	20
2.1. Materiales y equipos	20
2.1.1. Material biológico experimental	20
2.1.2. Equipos	20
2.1.3. Materiales de campo	20
2.1.4. Materiales y equipos de laboratorio	21

2.1.5.	Insumos de oficina.....	21
2.1.6.	Biológicos	22
2.2.	Ubicación del experimento.....	22
2.3.	Caracterización.....	22
2.4.	Factores de estudio	23
2.5.	Manejo del experimento.....	23
2.5.1.	Unidades experimentales	23
2.5.2.	Valoración clínica.....	24
2.5.3.	Análisis de mastitis subclínica.....	24
2.5.4.	Contención y toma de muestra para estudio de la leche.....	25
2.5.5.	Muestra de la leche.....	25
2.5.6.	Antibiograma.....	26
2.5.7.	Recolección de sangre del grupo para PRP	27
2.5.8.	Recolección de líquido amniótico.....	28
2.5.9.	Muestra de células madres mesenquimatosas.....	28
2.5.10.	Tratamiento de los animales.....	29
2.6.	Variable respuesta	30
2.7.	Tratamientos	31
2.8.	Procesamiento de la información	31
2.9.	Diseño experimental	32
2.10.	2.10. Hipótesis.....	32
CAPITULO III.....		33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		33
3.1.	Resultados prueba de CMT	33
3.2.	Número de células somáticas.....	34
3.3.	Cantidad de UFC	37
CAPITULO IV		41

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	41
4.1. CONCLUSIONES	41
4.2. RECOMENDACIONES	42
BIBLIOGRAFÍA.....	43
ANEXOS	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Interpretación de los grados de CMT.....	10
Tabla 2. Caracterización de la zona de estudio	22
Tabla 3. Muestreo aleatorio estratificado con afiliación proporcional.....	23
Tabla 4. Tratamientos del estudio	31
Tabla 5. ANOVA tratamientos.....	31
Tabla 6. Análisis de la variación de Células Somáticas sobre diferentes tratamientos de antibiótico, células madre y plasma.	35
Tabla 7. Análisis de la variación de UFC sobre diferentes tratamientos de antibiótico, células madre y plasma.	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía mamaria	7
Figura 2. Ilustración de los grados de CMT	11
Figura 3. Presencia de células madres	14
Figura 4. Principales mecanismos ejercidos por las MSCs	15
Figura 5. Centrifugadora con luz led	17
Figura 6. Plasma rico en plaquetas.....	18
Figura 7. <i>Resultados prueba de CMT</i>	33
Figura 8. <i>Efecto del antibiótico, células madre y plasma sobre las células somáticas</i>	36
Figura 9. <i>Efecto del antibiótico, células madre y plasma sobre las células somáticas</i>	39

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Fotos de evidencia del proceso.....	49
Anexo 2. Antibiogramas	53
Anexo 3. ANOVA Células somática inicio	54
Anexo 4. ANOVA Células somáticas final	54
Anexo 5. ANOVA células somáticas diferencia.....	55
Anexo 6. ANOVA UFC inicio.....	55
Anexo 7. ANOVA UFC final	56
Anexo 8. ANOVA UFC diferencia.....	56

RESUMEN

En el presente estudio, se aborda la problemática de la mastitis subclínica en ganado lechero, una afección común que plantea desafíos significativos en la producción lechera. La investigación tiene como objetivo principal comparar el efecto terapéutico de células madre de líquido amniótico y plasma rico en plaquetas con un enfoque en la mejora de la salud mamaria. Para lograr este propósito, se llevó a cabo un estudio experimental con la participación de vacas lecheras divididas en tres grupos: uno de control tratado con antibiótico dependiente del antibiograma, otro grupo tratado con líquido amniótico, y un tercer grupo con plasma rico en plaquetas. La metodología implicó la administración intramamaria de los respectivos tratamientos, seguida de la evaluación de parámetros clave como el número de células somáticas y UFC. Los resultados no tuvieron diferencia significativa, sin embargo, en cuanto a número de células somáticas fueron del T1 fue 1,284,453.13, mientras que en el grupo tratado con T2 fue de 381,288.75 y T3 fue de 1,121,625.00. En términos de UFC, el T1 presentó 24.31, mientras que T2 mostró 12.38 y el grupo de T3 registró 7.25. Estos resultados subrayan la efectividad de ambas terapias en la reducción de la mastitis subclínica en ganado lechero. En conclusión, la aplicación de células madre de líquido amniótico y plasma rico en plaquetas emerge como alternativas prometedoras para mejorar la salud mamaria en el ganado lechero, ofreciendo nuevas perspectivas para la gestión de esta afección en la industria lechera.

Palabras clave: Mastitis subclínica, Células madre, Plasma rico en plaquetas, Ganado lechero

ABSTRACT

In this present study, we address the issue of subclinical mastitis in dairy cattle, a common condition that poses significant challenges in milk production. The main objective of the research is to compare the therapeutic effect of amniotic fluid-derived stem cells and platelet-rich plasma, with a focus on improving mammary health. To achieve this purpose, an experimental study was conducted involving dairy cows divided into three groups: a control group treated with antibiotic based on antibiogram, another group treated with amniotic fluid, and a third group with platelet-rich plasma. The methodology involved intramammary administration of the respective treatments, followed by the assessment of key parameters such as somatic cell count and CFU. The results showed no significant difference; however, regarding somatic cell count, T1 was 1,284,453.13, while in the T2 treated group, it was 381,288.75, and T3 recorded 1,121,625.00. In terms of CFU, T1 presented 24.31, while T2 showed 12.38, and the T3 group registered 7.25. These findings underscore the effectiveness of both therapies in reducing subclinical mastitis in dairy cattle. In conclusion, the application of amniotic fluid-derived stem cells and platelet-rich plasma emerges as promising alternatives for enhancing mammary health in dairy cattle, providing new perspectives for managing this condition in the dairy industry.

Keywords: Subclinical mastitis, Stem cells, Platelet-rich plasma, Dairy cattle

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos

Cuando se habla de mastitis, se refiere a una afección común en bovinos, la vía principal de transmisión bacteriana en la mastitis es por el conducto galactóforo bovino en el pezón. Los patógenos responsables de la afección provienen de la resistencia a antibióticos, esto conlleva a la posibilidad de una complicación en la glándula mamaria mediante el flujo sanguíneo o del sistema linfático, por causa de un problema físico en el tracto digestivo. Hoy en día, el tratamiento estándar para la mastitis bovina implica el uso de terapias con antibióticos. No obstante, la resistencia a los antimicrobianos presenta desafíos, ya que no solo contribuye a la exploración de la resistencia antibiótica, sino que también destaca la necesidad de explorar alternativas más efectivas. Diversos estudios han descrito que las células madre tienen efectos antiinflamatorios, cicatrizantes, además que las Células Madres Amnióticas (AMSC, por sus siglas en Inglés), poseen la capacidad de tratar varias enfermedades. Por lo general los residuos antibióticos, afectan a la producción de leche, pero el tratamiento con ASMC, puede inhibir la respuesta inflamatoria en el tratamiento de la mastitis bovina, su efecto tiene similitud al tratamiento con antibióticos, pero en las pruebas de células madre la medición de la calidad de la leche no se vio afectado su pH y por ende su calidad y apto consumo (**Ting et al., 2020**).

El uso de amnios y líquido amniótico (FA, por sus siglas en inglés), estas dos son fuentes abundantes de células madre mesenquimales (MSC) las cuales pueden ser cosechadas a bajo costo y no plantean conflictos éticos. En el estudio humana y veterinaria, las células madre derivadas de estos tejidos califican como candidatas mostrando potencial en el abordaje de enfermedades, específicamente por su plasticidad, su inmunogenicidad reducida y su alto potencial antiinflamatorio. Es por

ello, para analizar y estabilizar este líquido amniótico realizaron la perforación de la capa amnióticas con una jeringa de 50 ml en zona limpia para la recolección de líquido amniótico que se centrifugó a $1000\times g$ por 8 minutos. Utilizando tubos de centrifuga estériles de 100 ml, se llevó a cabo el llenado continuo del líquido amniótico en el mismo tubo de centrifuga. Posteriormente, se obtuvo el pellet celular y este fue suspendido en un medio completo de celda primaria. Las celdas se colocaron en frascos a 1×10^5 células/ml e incubadas a $37^\circ\text{C}/5\%$ de CO_2 . A las 48 h después de la siembra, lavaron dos veces las células utilizando solución salina tamponada con fosfato (PBS) sin calcio y magnesio para eliminar las células no adherentes (**García y Gingins, 1969**).

El aislamiento de células madres epiteliales (MaSC) de ratones y humanos. Las glándulas mamarias, y la evaluación de su capacidad para regenerar tejido mamario in vivo, brinda la capacidad para aplicar las células madres progenitoras en la reparación del daño posterior a la mastitis en las glándulas mamarias de los animales lecheros. El daño tisular y/o estímulos inmunes pueden activar las células progenitoras a través de factores de crecimiento o citoquinas, lo que lleva a una mayor división celular, que son importantes para el proceso de reparación. Los MaSC desempeñan un papel crucial en la regeneración del tejido mamario en cada ciclo de lactancia. Por ende, el aislamiento y la caracterización de las MaSC bovinas y sus células progenitoras resulta imprescindible. Esta investigación no solo contribuyo a la ampliación del conocimiento acerca de la regulación diversa de las MaSC entre mamíferos, sino que también posee relevancia para la industria lechera. La actividad de estas células puede incidir directamente en la persistencia de la lactancia, haciendo que su estudio sea de suma importancia (**Beale, 2010**).

Las MSC, corresponden a un tipo de células multipotentes de morfología fibroblastoide, que su origen corresponde en la capa germinal mesodérmica durante el desarrollo embrionario, se menciona que el tratamiento utilizado fue a dosis de $2,5 \times 10^7$ MSC alogénicas en donde su administración fue vía intramamaria, y el intervalo entre días fue de 10, la determinación inicial fue la evaluación de las constantes

fisiológicas en vaquillas Holstein (N=6). En donde utilizaron dos dosis con la finalidad de observar una mejor deducción con una dosis alta, al obtener los estudios de niveles de fibrinógeno, Polipirimidina Tractos (PPT) y globulinas, el registro fue dentro del intervalo referencial antes mencionado, pues el fibrinógeno podría ser un indicador de inflamación local o sistémica, además de que este tiene la capacidad de unión con el receptor de integrina CD11b, que da como resultado la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β . De igual forma el aumento de PPT y globulinas también es asociada a inflamación, en donde presentadas estas condiciones aumenta la síntesis hepática inducida por la liberación de IL-6 (**Romano, 2001**).

En el estudio de, **Harman et al. (2017)** se demostró que las MSC equinas tienen propiedades antibacterianas al detener el crecimiento de *E. coli* y *S. aureus* e impactar las membranas bacterianas *in vitro*. El estudio profundiza también en la presencia de cuatro péptidos antimicrobianos (AMP) en el secretoma de las MSC equinas, destacando la presencia de cistatina C, elafina, catelicidina y lipocalina 2. Entre estos, se destaca que la lipocalina 2 impide el crecimiento bacteriano al eliminar los sideróforos con contenido de hierro. En particular, la catelicidina, un péptido catiónico, desempeña un papel crucial al matar bacterias directamente mediante la modificación de la polarización de la membrana, generando un producto de escisión (LL-37), equivalente a un producto secretado por MSC derivadas de la médula ósea humana.

El proceso de aislamiento, junto con su descripción y las posibilidades de utilización de células madre mesenquimales de origen bovino. Las células madre mesenquimales bovinas del útero, el cordón umbilical, la médula ósea, el tejido adiposo, la placenta y los fluidos fetales han sido aislados. Después de aislarse, las células se expanden y caracterizan para probar su naturaleza mesenquimal. La capacidad de auto renovación correspondientes a estas es una característica importante que debe caracterizarse *in vitro* y puede realizarse mediante el análisis de la formación de unidades de colonias (UFC) y el tiempo de duplicación de la población (PDT). La habilidad de las células para experimentar diferenciación en linajes osteogénicos, condrogénicos y adipogénicos debe ser evidenciada. Se ha comprobado previamente que las células

bovinas aisladas exhiben positividad para algunos marcadores mesenquimales y pluripotentes, mientras que son negativas para ciertos marcadores hematopoyéticos. Tras la caracterización, estas células pueden ser inyectadas en el animal con fines terapéuticos. En este sentido, se ha propuesto el uso de las células madre mesenquimales (MSC) bovinas para tratar diversas condiciones como lesiones articulares, mastitis y lesiones óseas. Además, se plantea su aplicación en la preservación de los recursos genéticos, la manipulación de la productividad y su contribución a la biotecnología aplicada a la reproducción animal (**Hill, Bressan, Murphy, & Garcia, 2019**).

En la investigación de **Ceballos & Carmona (2018)** en la Universidad de Caldas, Colombia, se evaluó el plasma rico en plaquetas (PRP) como una alternativa al tratamiento antibiótico para la mastitis subclínica. Para obtener el PRP, se tomaron muestras de sangre de novillas blancas Orejinegro, centrifugadas para obtener plasma con una concentración de $160-1000 \times 10^3$ plaquetas/L y $0.0-4 \times 10^3$ leucocitos/L. Se utilizaron 103 vacas con mastitis subclínica causada por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus dysgalactiae*, divididas en dos grupos: uno tratado con plasma y otro con cefquinoma (Grupo Control). En el grupo tratado con plasma, se administraron 10 ml de PRP enriquecido con plaquetas junto con 1 ml de gluconato de calcio cada 12 horas intramamaria durante cuatro días. En el Grupo Control, las vacas recibieron 75 mg de sulfato de cefquinoma durante 4 días. Después del tratamiento, se tomaron muestras para cultivo bacteriológico después de 21 a 22 días. Se determinó que no hubo crecimiento bacteriano con el sulfato de cefquinoma, indicando un tratamiento exitoso en este grupo.

Guallasamín & Moreno (2013) en su estudio en la Universidad Central del Ecuador, emplearon plasma que contiene factores de crecimiento para mejorar el proceso cicatrizal de la piel en treinta caninos de uno a siete años. Con este propósito, se segregaron en tres conjuntos de diez animales, cada uno recibió un tratamiento como control, mientras que en uno se utilizó plasma rico en plaquetas y en otro plasma heterólogo. Para la obtención de muestras sanguíneas, se seleccionaron individuos que

parecían encontrarse en buen estado de salud y se les prohibió consumir agua y alimentos 12 horas antes. Por lo tanto, de los animales donantes se extrajeron 22 ml de sangre, de los cuales 20 ml fueron utilizados para la extracción de plasma y 2 mililitros para la creación de un hemograma. Se realizó la extracción de una sección longitudinal de piel de la zona cervicodorsal media en los sujetos del experimento, seguido de la aplicación de plasma y 0.05 ml de cloruro de calcio al 10% en las lesiones cutáneas abiertas. Además, al segundo día del experimento, se le administró penicilina y difenhidramina a toda la muestra. Se administró plasma durante quince días y, según un análisis citológico, se observó una disminución en la inflamación y la regeneración de tejido cicatrizal.

Lavanda (2019) llevó a cabo un estudio que evaluó el uso del PRP como terapia para como tratamiento para las úlceras corneales superficiales en perros. Estos fueron asignados a cinco grupos, incluyendo un grupo de control y cuatro tratamientos diferentes: uno con PRP, otro con PRP rico en leucocitos, otro con PRP pobre en leucocitos y el último con PRP y factores de crecimiento. Para obtener el plasma, se extrajeron 8 ml de sangre de cada animal y se centrifugó durante 15 minutos a 1500 rpm, resultando en 1 ml de plasma a partir de 4 ml de sangre. A lo largo de cinco semanas, se administraron una o dos gotas en el ojo ulcerado, obteniendo resultados positivos en el proceso de cicatrización, indicando una notable recuperación de la córnea.

Carmona et al. (2011) a través de una revisión de la literatura centrado en el uso de concentrados autólogos de plaquetas como terapia regenerativa para afecciones crónicas del sistema musculoesquelético en caballos, llegaron a la conclusión de que los concentrados autólogos de plaquetas (APC) se presentan como una opción viable para el manejo de estas patologías. Los resultados obtenidos tanto en modelos experimentales como en casos clínicos indican que, incluso a dosis tan bajas como 300.000/ μ L y con tres aplicaciones a intervalos de 2 semanas, los APC han demostrado una respuesta positiva. Las plaquetas desempeñan un papel crucial en la reparación de lesiones al liberar factores de crecimiento que favorecen procesos como quimiotaxis,

proliferación, diferenciación celular, neovascularización y formación de matriz extracelular. En este sentido, el método del tubo se presenta como una modalidad económica y sencilla para la preparación de estos concentrados autólogos.

Bonilla-Gutiérrez et al. (2017) realizaron el ensayo previo de un protocolo para obtener un Concentrado Autólogo de Plaquetas en conejos; se utilizaron diez conejos machos de Nueva Zelanda que pesaban entre 3 y 3,8 kg cada uno. La muestra de sangre se tomó mediante venopunción yugular, luego se colocó en tubos color azul y se centrifugó durante cinco minutos a 120 rpm. Esto permitió obtener plaquetas sin cambios morfológicos durante un ciclo de centrifugación.

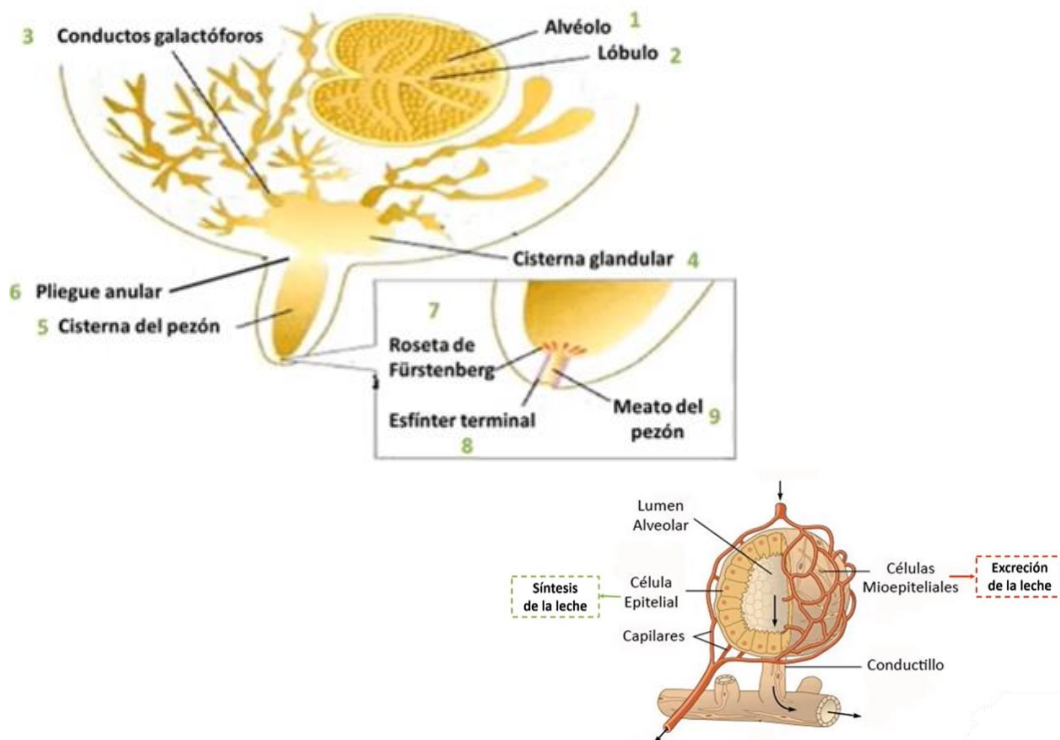
Una investigación realizada en la Universidad Nacional Evangélica en República Dominicana por **Piedra & Varela (2020)** el enfoque principal fue el uso de CM para tratar diversas enfermedades como lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, diabetes tipo I y II, artrosis, Parkinson, disfunción eréctil, entre otras. Los objetivos también incluyeron la exploración de métodos para obtener CM, utilizando fuentes como médula ósea, líquido amniótico, tejido adiposo y sangre. En el proceso de obtención, se empleó una centrifugadora PRP con rayos LED, facilitando la obtención de células madre mesenquimatosas. Los tubos LPR-P de cámara semicerrada se depositaron en la máquina y se centrifugaron a 2900 RPM durante 10 minutos con los LED encendidos, resultando en tres capas celulares en las muestras, de las cuales se extrajo la correspondiente a las células madre. En pacientes diabéticos con úlceras cutáneas, se aplicó uno de los tratamientos con CM en la piel para la regeneración de tejidos debido a su conocida capacidad de auto renovación. En pacientes con enfermedades neurológicas como Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica, se administraron tratamientos vía intratecal o endovenosa, con el objetivo de crear y reparar conexiones neuronales afectadas. Los resultados fueron positivos, mejorando la calidad de vida de los pacientes.

1.2. Marco teórico

1.2.1. Fisiología de la glándula mamaria

Es una glándula que se compone principalmente de dos partes tisulares: el estroma y los alvéolos. Los alvéolos están compuestos por una membrana propia y dos filas de células: una interna, que son las células alveolares secretoras de leche, y otra externa, que son las células mioepiteliales que producen la excreción de leche. El ciclo de lactación está controlado por hormonas. Dos categorías de hormonas están involucradas en el desarrollo y producción de la glándula: el conjunto hormonal reproductivo incluye estrógenos, progesterona, lactógeno placentario, prolactina (PRL) y oxitocina; el conjunto hormonal de apoyo incluye hormona del crecimiento, corticosteroides, tiroxina, insulina, hormona paratiroidea y leptina (Aguilar & Álvarez, 2019).

Figura 1. Anatomía mamaria



Fuente: (Faria, 2017)

Los impulsos nerviosos medulares que inducen la descarga de oxitocina a nivel neuro hipofisiario por estimulación de los núcleos hipotalámicos y la estimulación mecánica del pezón mediante la succión de la cría o el masaje manual de limpieza del pezón previo al ordeño producen la eyección de la leche (**Fernández Bolaños, Omar Fernando, 2012**).

1.2.2. Caracterización de la leche

La leche se caracteriza como un líquido complejo compuesto por tres tipos distintos de fluidos: una emulsión que contiene glóbulos de grasa y vitaminas liposolubles, una suspensión compuesta por proteínas en forma de micelas, y una solución que incluye minerales, vitaminas hidrosolubles y lactosa (**Fernández et al., 2012**).

1.2.3. Mastitis subclínica

Según **Fernández et al. (2012)** la mastitis subclínica se caracteriza por la presencia de microorganismos y un alto porcentaje de células somáticas en la leche, dando lugar a un proceso inflamatorio que no siempre requiere tratamiento con antibióticos. Aunque los cambios en la ubre no son visibles, se puede notar una disminución en el rendimiento de la leche debido a la alteración de su composición por factores inflamatorios. Esta enfermedad es común en el ganado lechero, causando pérdidas económicas significativas debido a su impacto en la producción y calidad de la leche. La detección temprana de casos de mastitis subclínica es desafiante, incluso para los ordeñadores. Para el diagnóstico preciso de esta enfermedad, se requieren técnicas de laboratorio como conteos de células somáticas y cultivos bacteriológicos.

1.2.4. Etiología

Bedolla (2017) menciona que el origen es causado por golpes, hongos o bacterias, en el caso de un patógeno contagioso empieza con la transmisión de vaca en vaca, generalmente por un mal manejo en el ordeño ya que las glándulas mamarias que se encuentren infectadas serán un reservorio principal de estos microorganismos. Los patógenos principales son el *Estafilococo áureo*, *Estafilococo agalactiae* y *Mycoplasma spp.* sin embargo, dentro de los agentes etiológicos presentes con más frecuencia es el *Staphylococcus aureus* que se presenta en casos de mastitis aguda e incluyendo la formación de abscesos, mientras que los *Staphylococcus coagulasa* negativos (SCN) es la principal agente que se puede observar en mastitis subaguda.

1.2.5. Pruebas complementarias para identificar mastitis subclínica

1.2.5.1. Prueba de California para Mastitis (CMT)

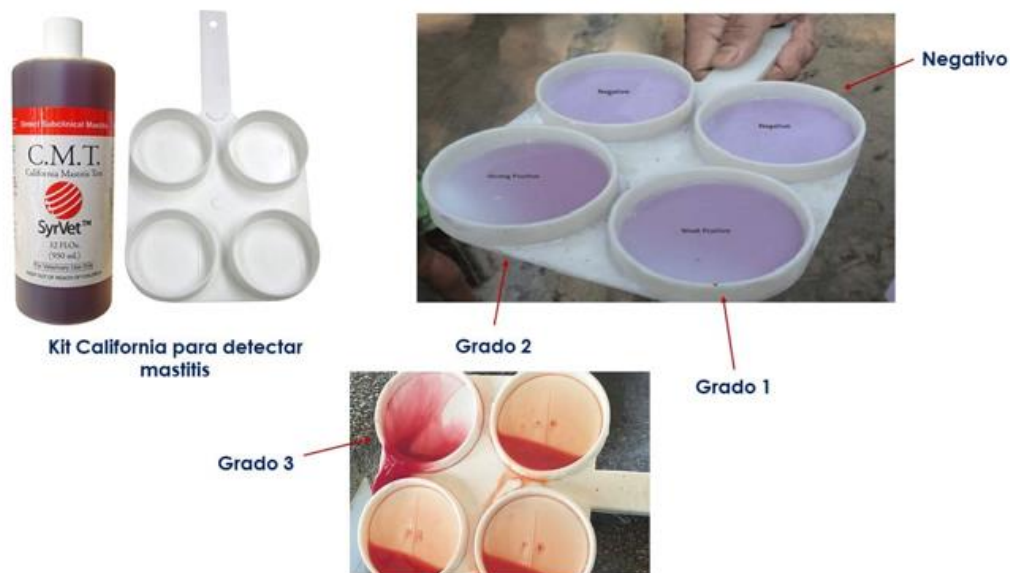
Para diagnosticar mastitis en el ganado lechero, se realizan diversas pruebas, siendo el California Mastitis Test (CMT) una de las más frecuentemente utilizadas en el ganado bovino lechero para monitorear células somáticas. Esta prueba es especialmente útil en la detección de mastitis subclínica, proporcionando una evaluación cualitativa del recuento de células en la leche. En lugar de ofrecer un resultado numérico, la prueba indica si el resultado es alto o bajo, considerándose cualquier reacción por encima de una vestigial como sospechosa (**Ruegg, 2011**).

Tabla 1. Interpretación de los grados de CMT

Grado	Tipos de reacción	Células somáticas/ml	INTERPRETACIÓN
Negativo:	Se presenta líquida y de una tonalidad azul, sin espesor en la mezcla.	0 – 200.000	Saludable
Trazas:	Su mezcla es ligeramente viscosa y de color azul. Si en los 4 cuartos se lee “rastros” se lo determina como no infección, pero si presenta 1 o 2 cuartos se sospecha de infección.	200-000 – 400.000	Mastitis Subclínica
1 (+):	Mezcla viscosa no adherida al fondo de color azul oscuro, sin tendencia de formar gel.	400.000 1.200.000	– Mastitis subclínica
2 (++):	La mezcla se vuelve inmediatamente viscosa que se adhiere, presentando un color violeta	1.200.000 5.000.000	– Entre mastitis subclínica a más inclinación a una Infección grave por mastitis
3 (+++):	Mezcla muy viscosa y se adhiere a la base formando grupos de color violeta	Más de 5.000.000	Infección grave por mastitis

Fuente: (Díaz y Baquero, 2022; Ruegg, 2011).

Figura 2. Ilustración de los grados de CMT



Fuente: (Bolaños, Graffe, Cabrera, Gallego, & Granja, 2012).

1.2.5.2. Recuento de células somáticas en leche

En los estudios, se observan células somáticas en la leche, la mayoría de las cuales son leucocitos, que incluyen neutrófilos, macrófagos y linfocitos. El recuento de células somáticas (SCC), que clasifica la cantidad de estas últimas por mililitro de leche, es un indicador de la concentración de leucocitos en la leche (Bradley y Green, 2005).

Los indicadores muestran la cantidad de células somáticas en una glándula mamaria sana que oscila entre **0 y 200.000 Rcs/ml**, mientras que los valores entre **200.00 y 400.000 Rcs/ml** y **400.000 a 1.200.000 Rcs/ml** indican un ligero aumento en la infección, categorizando estos valores dentro de una mastitis subclínica. Por lo tanto,

los valores entre **1.200.000 y 5.000.000 Rcs/ml** entran en la categoría de mastitis clínica.

Hernández y Bedolla (2008) menciona que antes de realizar el proceso de conteo de células somáticas, es importante considerar ciertos aspectos, como los siguientes:

- **Mastitis**

Está relacionada con los leucocitos, que son un mecanismo de defensa contra los microorganismos que ingresan por el pezón por múltiples causas. Cuando se presentan los leucocitos en su acción destruyen a la bacteria, hay pocas células somáticas, pero si los leucocitos no logran destruir al patógeno, se produce una infección, lo que hace que los leucocitos sean segregados constantemente y haya más células somáticas (**Gómez, 2016**).

- **Fase final de la lactación**

En bovinos, durante la fase final de lactación, un incorrecto proceso de secado puede resultar en un aumento del número de células somáticas, especialmente en los primeros y últimos días de lactancia (**García & Méndez, 2009**). La salud de la glándula mamaria en bovinos está influenciada por diversos factores, incluyendo el manejo inadecuado de la pezonera y las instalaciones de ordeño, higiene deficiente, infecciones mamarias, estrés, nutrición inadecuada, problemas genéticos, condiciones ambientales adversas y manejo del parto (**Rojas, 2017**). Estos elementos pueden provocar lesiones y aumentar el número de células somáticas en la leche. Es esencial aplicar prácticas de manejo y cuidado adecuadas para prevenir estos factores y asegurar la salud mamaria, garantizando así la calidad de la leche y el bienestar del ganado bovino.

- **Variación fisiológica**

La cantidad de células somáticas en las vacas en celo aumenta ligeramente, lo que corresponde a un nivel normal. Los ordeños en la tarde presentan un alto número de células somáticas debido al periodo de ordeño más corto y al factor estrés, lo que resulta en un alto número de células somáticas (**Osornio, 2008**).

1.2.5.3. Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC)

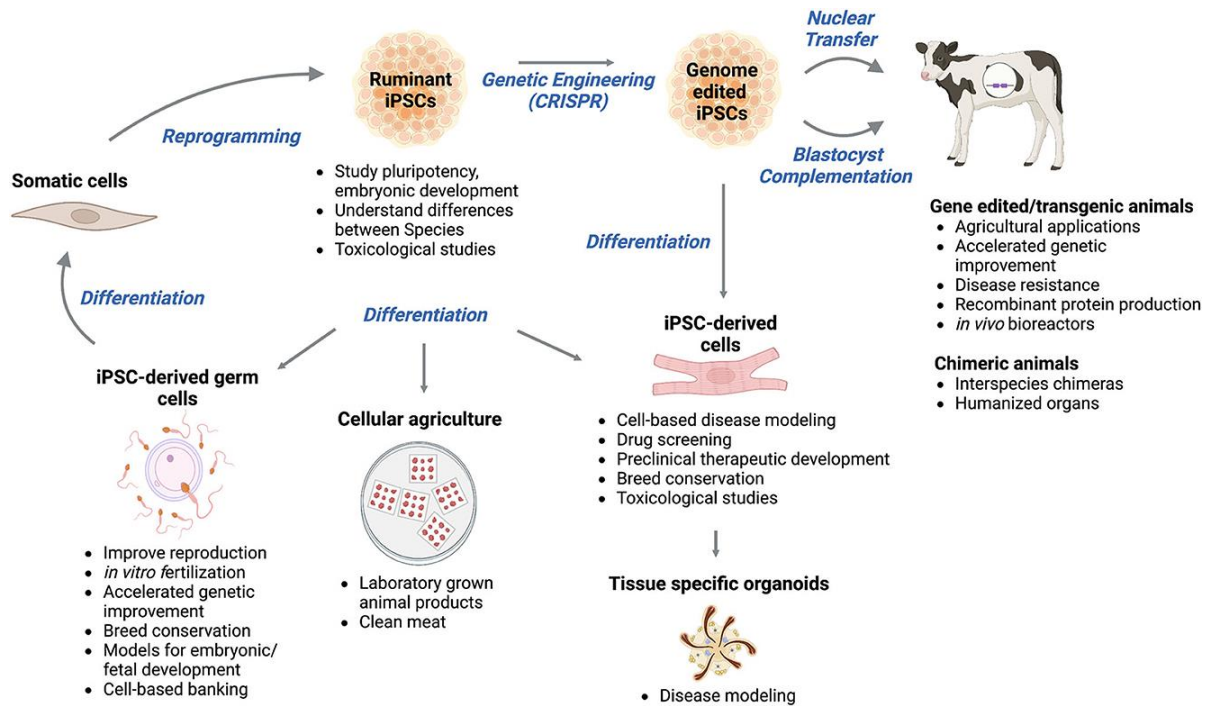
La medición y reconocimiento de los microorganismos responsables de la enfermedad son fundamentales durante la implementación de un tratamiento. Por ende, un enfoque sencillo para determinar la cantidad de bacterias y hongos implica la cuantificación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por mililitro o gramo de muestra. Este método sirve como indicador de la cantidad de microorganismos viables presentes en un líquido. Esto puede ser bacteriano o fúngico, y se determina por el número de colonias de células de un organismo en leche. El objetivo de este procedimiento es observar y evaluar el desarrollo de un cultivo celular para medir la cantidad de microorganismos presentes **(Pasachova, Ramirez, & Muñoz, 2019)**.

1.2.6. Componentes del tratamiento

1.2.6.1. Células madres mesenquimatosas

Las células madre mesenquimatosas se las puede obtener de tejido adiposo, médula ósea, líquido amniótico entre otros, en este caso se extraerán del líquido amniótico. Las células madre experimentan divisiones con el propósito de generar células adicionales conocidas como células hijas cuando el organismo tiene condiciones adecuadas. Las células descendientes tienen la capacidad de transformarse en nuevas células madre o en células especializadas de distintos tipos, desempeñando funciones específicas como la formación de células sanguíneas, neuronas, células del músculo cardíaco o células óseas. En el cuerpo, ninguna otra célula posee la habilidad intrínseca de generar nuevos tipos de células **(Alvarez, Salinas, Salinas, & Bravo, 2023)**.

Figura 3. Presencia de células madres



Fuente: (Weeratunga, Harman, & Van de Walle, 2023).

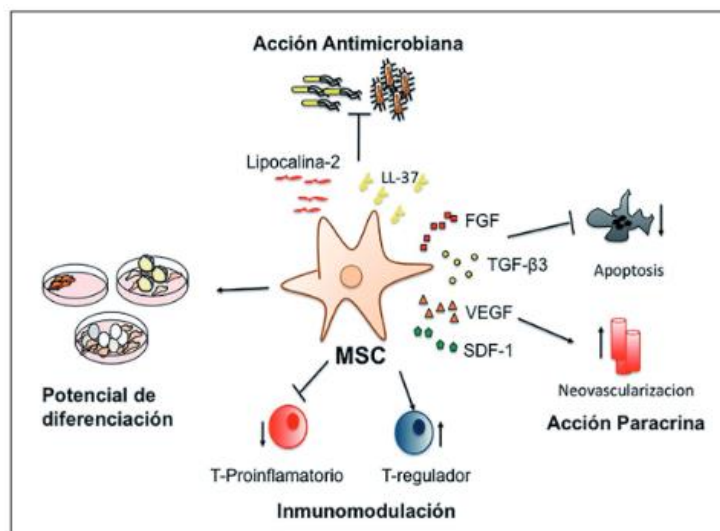
1.2.7. Efecto antiinflamatorio y antibacteriano de las MSC

El fenotipo inflamatorio que exhiben las MSC depende del medio extracelular. En particular, las MCS se polarizan para encontrarse en un estado proinflamatorio conocido como (MSC1), caracterizado por una mayor producción de quimiocinas y citoquinas de tal manera que activa las células efectoras inmunitarias, en un proceso de baja inflamación o activación leve de receptores Toll 4 (TLR4) proteínas pertenecientes a la familia de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) debido a la presencia de endotoxinas o lipopolisacáridos bacterianos (LPS) en la membrana externa de las bacterias, además es importante saber que si las MSC se encuentran en

un entorno diferente pueden mostrar también un efecto antiinflamatorio denominado como (MSC2) (Cortés-Araya et al., 2018).

De manera particular, las MSC aun cuando producen TLR. cuentan además con la capacidad de invadir, migrar y secretar factores inmunomodulares, lo que ayuda a reducir el crecimiento microbiano y tiene un impacto en su producción. La producción de péptidos antimicrobianos como lipocalina-2 y otros contribuye a los efectos antibacterianos; también se atribuye la producción de LL-37, que tiene propiedades tanto proinflamatorias como antiinflamatorias, lo que reduce el crecimiento de bacterias (Waterman, Tomchuck, Henkle, & Betancourt, 2010).

Figura 4. Principales mecanismos ejercidos por las MSCs



Fuente: (Espinoza, 2016).

1.2.8. Centrifugación y radiación con luz led para reanimar células madres

La integración de la centrifugación con radiación LED emerge como una innovación clave para revivir células madre, fusionando tecnologías avanzadas con el potencial regenerativo fundamental de estas células. Utilizando la centrifugación en gradiente de densidad en lugar de elutriación y la utilización de fototerapia de bajo nivel para promover la curación de lesiones en tejidos blandos y duros (**Bhatt, Bhatia, & Bhalla, 2023**).

La fotobiomodulación también puede afectar la liberación de ciertos mediadores celulares, como óxido nítrico y citocinas, que desempeñan un papel en la regulación de la inflamación y la respuesta inmune. En consecuencia, la terapia con luz de bajo nivel tiene aplicaciones en la reducción del dolor, la inflamación, la aceleración del proceso de cicatrización y la mejora de las funciones celulares en diversos contextos, desde la medicina humana hasta la veterinaria y la rehabilitación (**Li, Chen, & Wang, 2006**).

Las aplicaciones terapéuticas de la fototerapia de bajo nivel son cada vez más comunes. Está asociado los efectos de fotobiomodulación a la acción de niveles bajos de luz y según los datos de los experimentos: la actividad celular aumenta además del contenido de iones calcio citoplasmáticos; colaboró a la división y el crecimiento celular; activación de la síntesis de proteínas y citocinas; y estudios clínicos en seres humanos y animales in vitro. Varios tipos de células, incluidos fibroblastos, queratinocitos, linfocitos, hepatocitos y entre otras, han sido objeto de estudios de fototerapia de bajo nivel (**Li et al., 2006**).

La Irradiación Láser de Bajo Nivel (LLLI) se emplea para tratar diversas lesiones o condiciones en humanos o animales mediante el uso de luz visible, generalmente en tonos rojos, o infrarroja cercana, generada por un láser o un sistema de diodos emisores de luz (LED). La luz utilizada suele tener un espectro limitado, comprendido entre 600 y 1000 nm. La fluencia, que mide la densidad de energía, generalmente varía entre 1 y 20 J/cm², mientras que la irradiancia, que indica la densidad de potencia, fluctúa considerablemente según la fuente de luz real y el tamaño del punto. Los valores para

la estimulación y curación típicamente se sitúan entre 5 y 50 mW/cm² (**Chen et al., 2016**).

Figura 5. Centrifugadora con luz led



Fuente: (**Peña, 2018**).

1.2.9. Plasma rico en plaquetas

El PRP contienen una suspensión concentrada de la sangre que ha sido sometida a centrifugación, presentando concentraciones elevadas de trombocitos. En los últimos años, este compuesto ha sido mencionado de manera recurrente tanto en publicaciones científicas como en medios de comunicación generales, destacándose por sus propiedades que se sugiere promueven la curación y regeneración de los tejidos (**González, 2006**).

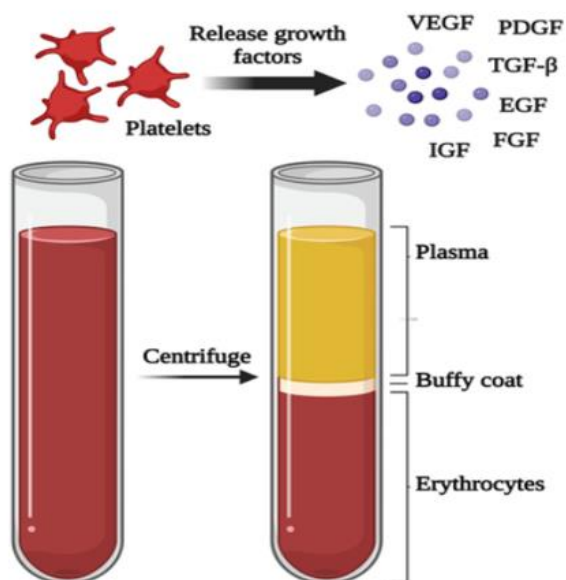
El tratamiento con PRP es un procedimiento ambulatorio de mínima invasión. Se extraen aproximadamente 20 cc de sangre del propio paciente, y esta muestra se somete a un proceso de centrifugación para separar sus componentes. Una de las fracciones resultantes es el PRP, que posteriormente se utiliza para infiltrar la zona de la piel a tratar mediante agujas muy finas. La única adición al PRP es un compuesto cálcico que se incorpora para activar las plaquetas y desencadenar la liberación de los factores de crecimiento, elementos cruciales en el proceso de tratamiento (**Moreno Díaz et al., 2015**).

1.2.9.1. Efecto en el proceso inflamatorio y antibacteriano

El PRP tiene un papel en el proceso inflamatorio al suprimir el efecto de las células B activadas mediante el factor potenciador nuclear de las cadenas ligeras Kappa. Esto se debe a su acción en la disminución de Moléculas mensajeras del sistema inmunitario que desencadenan la inflamación, como la IL-6, IL-1 β y TNF- α . Sin embargo, cuando se presenta PRP, se eleva la presencia de IL-4 y IL-10, donde esta última colabora en eliminar el NF-Kb al activar el receptor IL-1 conocido como IL-1Ra (Sánchez et al., 2021).

En el proceso antimicrobiano, el PRP contiene proteínas bactericidas conocidas como trombocidinas, las cuales se encuentran en los gránulos alfa. Además, el PRP libera otros péptidos como el factor 4 plaquetario, RANTES, péptidos 3 activadores del tejido conectivo, timosina beta 4 y fibrinopéptidos de cale A y B. Estos componentes colaboran de manera conjunta para llevar a cabo una acción eficaz contra patógenos bacterianos (Sánchez et al., 2021).

Figura 6. Plasma rico en plaquetas



Fuente: (Constant et al., 2023)

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Comparar el efecto terapéutico de células madre de líquido amniótico y plasma rico en plaquetas de sangre contra la mastitis subclínica en ganado lechero.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Verificar el efecto antibacteriano de las células madre mesenquimatosas del líquido amniótico frente a la mastitis subclínica en vacas, mediante el conteo de células somáticas y UFC.
- Registrar el efecto antibacteriano del plasma rico en plaquetas frente a la mastitis subclínica en vacas, mediante el conteo de células somáticas y UFC.
- Evaluar comparativamente, el efecto de los tratamientos en relación con el grupo testigo.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Materiales y equipos

2.1.1. Material biológico experimental

Unidades experimentales: 12 vacas

2.1.2. Equipos

- Centrífuga de laboratorio
- Incubadora de laboratorio
- Microscopio óptico
- Centrifugadora con Luz LED

2.1.3. Materiales de campo

- Caja de guantes
- Aguja calibre 18 G 1(2/1) P
- Jeringas de 20, 5 y 3 ml
- Sonda intramamaria metálica
- Tubos con citrato de sodio
- Tubos de EDTA
- Kit de California Mastitis Test
- Gradilla
- Algodón
- Alcohol

- Yodo
- Atomizador
- Cooler
- Gel refrigerante

2.1.4. Materiales y equipos de laboratorio

- Caja Petri
- Pissetas
- Hisopos
- Laminillas de 4 círculos bien delimitados de 13 mm.
- alcohol – éter
- Cloroformo
- Azul de metileno
- Cámara de Neubauer
- Mechero de alcohol
- Tubos de muestra
- Agar base sangre
- Agar E.M.B (con Eosina y Azul de Metileno)
- Agar Müller – Hinton
- Asa bacteriológica

2.1.5. Insumos de oficina

- Hojas
- Esferos
- Marcador permanente

2.1.6. Biológicos

- Sangre (muestra)
- Leche (muestra)
- Líquido amniótico (vacas preñada en faenamientos)

2.2. Ubicación del experimento

El presente estudio se realizó en la hacienda Cuadra Vieja, parroquia rural Pungalá, ubicada en el cantón Riobamba Sur oriental, al Noreste de la Provincia de Chimborazo. Comprendido entre los 78° 30´- 78° 35´ de longitud Occidental, y 1o 45´-1° 35´ de latitud Sur **GetaMap (2021)**.

2.3. Caracterización

El Sector de Pungalá, lugar donde se realizó el estudio, posee las siguientes condiciones meteorológicas.

Tabla 2. Caracterización de la zona de estudio

Caracterización	Descripción
Temperatura Media Anual	12°C
Precipitación Media Anual	1 420 mm3
Clima	90% Ecuatorial Frío de alta montaña. 10% Ecuatorial Frío Semihúmedo
Humedad relativa	71.82%
Altitud,	2. 880 msnm (promedio) 4 055 msnm (nivel máximo)

Fuente: Anuario Meteorológico INAMHI (2022).

2.4. Factores de estudio

- Líquido amniótico (células madres) a dosis 3 ml
- Fluido sanguíneo (Plasma rico en plaquetas) a dosis 5 ml
- Tratamiento control (antibiótico para mastitis)

2.5. Manejo del experimento

2.5.1. Unidades experimentales

En la hacienda se maneja una población de 30 vacas productoras, de las cuales se ha realizado una selección basada en criterios de inclusión y exclusión relacionados con su condición clínica además deben pertenecer a las razas Holstein mestizo y Jersey mestizo, tener edades comprendidas entre 3 y 5 años, y haber experimentado entre 1 y 3 partos. Se ha optado por elegir 12 vacas según un muestreo aleatorio estratificado con afiliación proporcional (Tabla 3).

Se dividieron a los animales experimentales en tres tratamientos y cuatro repeticiones, cabe destacar que el tamaño de la unidad experimental fue de un animal, dando como total doce animales experimentales.

Tabla 3. Muestreo aleatorio estratificado con afiliación proporcional

Estrato	Identificación	N° de sujetos en el estrato	Proporción	Muestra del estrato
1	Machos	0	0,0%	0
2	Hembras	30	100,0 %	12
		Correcto	100%	12

2.5.2. Valoración clínica

Todas las vacas seleccionadas pasaron por una evaluación clínica previa, iniciando con la toma de condiciones fisiológicas, para verificar que no existe alguna otra alteración adversa para el proceso a realizar. Por otro lado, se valoró la edad, si se encuentran en gestación, número de partos, antecedentes presencia de mastitis y el estado de los pezones. Cabe recalcar que se descartó animales que se encuentren en su último tercio de gestación y los últimos días de producción.

2.5.3. Análisis de mastitis subclínica

Luego de su valoración clínica a cada paciente se realizó una prueba de mastitis de California con sus siglas en ingles CMT, se debe tomar en cuenta que la mastitis subclínica no es posible observar ningún signo o síntoma visible, por el cual se procederá a realizar la prueba de CMT en la cual se obtendrá un resultado subjetivo por medio de la tabla 1.

Las vacas ingresaran a la sala de ordeño, las cuales están ya acostumbradas al manejo con la finalidad de que se encuentren con el menor estrés posible. Para la realización de la prueba de CMT se inició con la desinfección de los pezones, con el propósito de evitar la contaminación de la muestra tomada y provocar una falsa lectura de la prueba **(Ruegg, 2011)**.

- Para su desinfección se realizó un lavado con agua caliente los pezones, un enjuagado y secado de la ubre.
- Primero se desechó la leche del pre-ordeño o los dos primeros chorros de leche.
- Segundo se recolectó 3 ml de leche de cada cuarto en sus respectivas placas en la paleta.
- Tercero se añadió la misma cantidad de Lauril sulfato de sodio en cada una de las placas.

- Se mezcló por 10 seg con una leve rotación de manera circular manteniendo la paleta en posición horizontal con la finalidad de obtener la reacción.
- Se clasificó mediante la observación del resultado de cada cuadrante comparando con la Tabla 1. como indicador.
- Cabe recalcar que el tiempo de la evaluación no debe sobrepasar más de 20 seg ya que obtendremos resultados falsos.

2.5.4. Contención y toma de muestra para estudio de la leche

Luego de la prueba rápida con el CMT, se procedió con la recolección de la muestra de leche de cada pezón afectado de las 12 vacas para el estudio de conteo de células somáticas y UFC, además se incluyó para el análisis del antibiograma (**Livexlab, 2013**).

- Se recolectó en tubos estériles la cantidad de 6 ml aproximadamente, tomando de cada cuarto para su estudio individual.
- Se rotuló debidamente, con el número de vaca y cuarto por analizar.
- Se mantuvo en conservación en refrigeración hasta la llegada del laboratorio.

2.5.5. Muestra de la leche

2.5.5.1. Recuento de células somáticas por microscopio directo (RMD)

Se utilizó un microscopio óptico Olympus. El recuento se realizó según el método de Prescott y breed y dando color al frotis con el colorante de Newman Lampert (azul de metileno) con la finalidad de observar el núcleo de los leucocitos (**Zuluaga, Jaramillo, & Betancur, 2010**).

La metodología consistió en calentar la muestra a 8 °C en baño maría por no más de 10 minutos. Luego, se homogeneizó y agitó la muestra, recolectando 10 microlitros con una pipeta calibrada. Posteriormente, se colocó la pipeta en una laminilla,

añadiendo 0.01 ml de leche y secándola en estufa a 40°C. Después de retirarla, se fijó con alcohol-éter, desengrasó con cloroformo y se dejó secar al aire. La laminilla se coloreó con azul de metileno, se lavó con agua invertida y se ubicó en un lugar sin contaminación para su secado final y análisis. Después de ese proceso se observó con el microscopio en inmersión y se procederá al contero de células somáticas por campo observado.

2.5.5.2. Cultivos para el conteo de UFC

El proceso de identificación de los microorganismos se realizó por la característica y forma que presenta las colonias, para brindar la capacidad de identificar *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp* y *Escherichia coli* como las más comunes dentro de un proceso de mastitis o si solo presentas un proceso inflamatorio.

La leche fue colocada en microtubos utilizando una pipeta y se procedió a rotularlos. Se preparó el Agar base sangre y E.M.B. Un cotonete (hisopo) se mojó en leche y se colocó en un cuadrante de la caja Petri; luego, con el asa bacteriológica, se sembró en todos los cuadrantes del agar. Es importante destacar que el asa de bacterias se esterilizó en el mechero hasta que su punta mostrara un color rojo incandescente, realizando este proceso al principio y al final de la siembra. Antes de sembrar, se enfrió el asa en una esquina del agar. Posteriormente, se incubó a 37 °C durante 24 a 48 horas y se procedió a identificar la muestra.

2.5.6. Antibiograma

Este proceso se lo realizó solo a 4 pacientes la cuales se las escogió de acuerdo con la valoración de las anteriores pruebas realizadas con la finalidad de determinar que antibióticos será optimo en el grupo testigo. El proceso se lo realizó por medio de un cultivo de agar Müller Hinton dado que este ayudará a identificar a que antibiótico está susceptible o no para el paciente (**Oñate, 2016**).

2.5.7. Recolección de sangre del grupo para PRP

Para la recolección de la sangre fue dirigido para el grupo de 4 vacas del tratamiento con PRP, recalando que el plasma obtenido de la vaca fue colocado en la misma. Se procedió a la extracción de la vena yugular. Antes de la punción, se llevó a cabo la desinfección de la zona con alcohol. La extracción se realizó utilizando una aguja de calibre 18G y una jeringa de 20 ml. Posteriormente, la sangre recolectada se transfirió a cuatro tubos azules conteniendo citrato de sodio, con una capacidad total de 20 ml por muestra. Este proceso se replicó diariamente, obteniendo así las muestras necesarias para el estudio. Este protocolo garantizó la adecuada preservación y manipulación de las muestras para su posterior análisis, permitiendo obtener los 3 ml de PRP requeridos para el tratamiento.

2.5.7.1. Transporte de la muestra de sangre

Las muestras obtenidas de sangre se colocaron en la gradilla por 30 min para que la temperatura de la muestra se equipare con la del ambiente, luego se colocó en un Cooler, rotuladas a una temperatura de 4°C, mientras se transportó al laboratorio

2.5.7.2. Procesamiento de la muestra de sangre

Los tubos, debidamente rotulados, fueron colocados en una gradilla. Las muestras se sometieron a la máquina centrifugadora a 2.500 rpm durante aproximadamente 10 minutos, resultando en un total de 3ml de plasma rico en plaquetas de cada tubo de 5 ml de sangre que fueron centrifugado en los tubos de citrato de sodio con un total de 12 ml de plasma recolectado de los 20ml de sangre para el experimento de PRP. La separación del plasma rico en plaquetas y la capa leucocitaria se llevó a cabo utilizando una pipeta. Una vez obtenido el plasma rico en plaquetas, se colocó en otro tubo el cual estará listo para utilizarlo en la vaca. Finalmente, antes de su colocación, se añadieron 50 µl de gluconato de calcio por ml de plasma rico en plaquetas para reactivación del mismo.

2.5.8. Recolección de líquido amniótico

La muestra del líquido amniótico se recolectó en el centro de faenamiento camal municipal de Riobamba en el cual se procedió de la siguiente manera:

1. Recepción del útero hacia una mesa de acero inoxidable y limpieza del útero con agua eliminando restos de sangre y otros contaminantes.
2. Desinfección en el área de punción con yodo povidona con una torunda.
3. Punción con una aguja estéril atravesando el útero y la membrana amniótica.
4. Recolección del líquido amniótico con una jeringa de 50 ml estériles obteniendo 25 ml del líquido.

Este procedimiento se realizó en intervalos de 5 días por 2 veces, obteniéndola recolección total de líquido amniótico de 50 ml (**Gao et al., 2014**).

2.5.8.1. Transporte de la muestra de líquido amniótico

La muestra de líquido amniótico se recolecto en jeringas estériles las cuales se introdujeron en una Cooler donde se colocó dos compresas de hielo obteniendo una temperatura de 4 °C para ser transportado al lugar de procesamiento, luego se quitó el hielo de las compresas para que la muestra esté a temperatura ambiente y colocar a los animales (**Steigman & Fauza, 2007**).

2.5.9. Muestra de células madres mesenquimatosas

Se recolectó la muestra de líquido amniótico en 6 tubos de ensayo de 10 ml los cuales según **Shaun (2007)**, recomienda primero centrifugar por 10 min a 500 rpm a temperatura ambiente.

Luego de ese proceso se inicia la obtención de células madres:

1. Después de centrifugar se aspiró el sobrenadante y se lo retiro del tubo para proceder a desecharlo.
2. las células que se encuentran en el tubo se absorben para trasvasar a un tubo con EDTA de 4ml.
3. Se procedió a colocar la muestra de células madres en la centrifugadora con luz led para activar las células por 15 min a 2900 rpm.
4. Al finalizar se recolecto la dosis indicada para administrar en la ubre del bovino.
5. Es de destacar que el gluconato de calcio a una dosis de 50ul por ml de líquido, se administró a las dosis de 3 ml de células madres mesenquimatosas en el momento que se va a realizar la administración intramamaria en bovinos

Este procedimiento solo se lo puede realizar si la aplicación es el mismo día o si tiene medios para conservar la muestra, ya que la muestra puede durar máximo de dos a tres días influyendo en su efectividad. Adicionalmente, se recalca que se utilizó 6 tubos para la primera dosis y 6 tubos para la segunda, repitiendo el procedimiento.

2.5.10. Tratamiento de los animales

Al haber analizado los resultados hechos por la prueba de CMT realizada en campo y las pruebas de laboratorio (conteo de células somáticas y UFC) se realizó los 3 tratamientos a las vacas según el tratamiento asignado.

1. Terminado el ordeño, se realizó un lavado y secado del pezón con la finalidad de eliminar restos contaminantes.
2. Introducir con precaución y delicadeza el acero inoxidable estéril, colocar en el pezón afectado y se depositó suavemente la dosis de 5 ml de PRP suavemente y de igual manera con los 3 ml de MSC.

3. Se retiró la cánula suavemente y sin causar lesiones en el pezón afectado, se realizó leves masajes en dirección de abajo hacia arriba en los cuartos afectados de las vacas designadas, con la finalidad de que no se elimine el producto utilizado.

Oñate (2016) menciona que con 5ml obtuvo un resultado bueno contra mastitis subclínica con el plasma rico en plaquetas a esa dosis la cual se tomará como referencia para el líquido amniótico con la finalidad de comprobar sus efectos.

El tratamiento con antibiótico fue colocado después del ordeño en la mañana, tres días seguidos, en el caso del plasma rico en plaquetas a dosis de 5 ml fue colocado después del ordeño en la tarde de igual manera que el antibiótico por 3 días seguidos. Luego de ello se procedió post tratamiento las pruebas respectivas para analizar su resultado

En el caso el grupo de células madres se trató por vía intramamaria en los cuartos afectados con una dosis de 3 ml el día 1 y 6 como menciona (**Peralta et al., 2020**).

2.6. Variable respuesta

- Número de células somáticas
- Cantidad de UFC (Unidades formadoras de colonias)

2.7. Tratamientos

Tabla 4. Tratamientos del estudio

Tratamiento	Código	T.U.E	Repeticiones	U. E
T1: Control, 10 ml, antibiótico dependiente al antibiograma	T1	1	4	4
T2: 3 ml de líquido amniótico intramamario	T2	1	4	4
T3: 5 ml de plasma rico en plaquetas intramamario	T3	1	4	4
Total				12

Tabla 5. ANOVA tratamientos

Fuente de variación	Grados de libertad
Tratamientos	2
Error experimental	9
Total	11

2.8. Procesamiento de la información

El procesamiento y análisis de los datos recopilados se llevará a cabo utilizando la plataforma INFOSTAT, aprovechando sus capacidades para generar estadísticas descriptivas y gráficos que facilitarán tanto el análisis exploratorio como el análisis multivariado de los resultados obtenidos.

2.9. Diseño experimental

Diseño factorial 3x4. Para los cálculos estadísticos se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) y para la comparación de medias se utilizó la prueba de TUKEY al 5%.

2.10. Hipótesis

Ho: El uso de plasma rico en plaquetas y células madre no tienen efectos terapéuticos positivo para el control de la mastitis subclínica en vacas.

Ha: El uso de plasma rico en plaquetas y células madre tienen efectos terapéuticos positivos para el control de la mastitis subclínica en vacas.

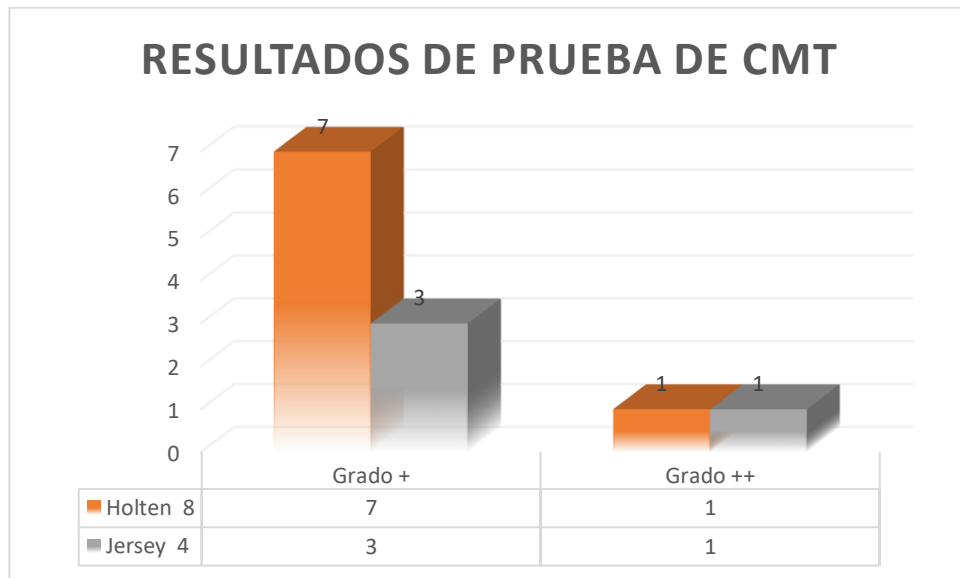
CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Resultados prueba de CMT

Se muestreo 8 vacas Holstein y 4 Jersey. En la figura 7, se puede observar que tanto en las vacas Holstein como en las Jersey, se encuentran trazas de mastitis subclínica, los resultados muestran que 7 de las vacas Holstein, 3 vacas Jersey fueron diagnosticadas como positivas para el grado 1 (+). Por otro lado, 1 vaca Holstein y 1 vaca Jersey fueron casos positivos para el grado 2 (++) indicando una mastitis subclínica más pronunciada. Este hallazgo sugiere la prevalencia de casos leves (grado 1) en ambas razas, resaltando la importancia de la detección temprana y el manejo adecuado para prevenir la progresión de la mastitis en el ganado.

Figura 7. Resultados prueba de CMT



Estos hallazgos, comparando con investigación de **Vélez (2022)**, al evaluar la eficacia del método CMT en la detección de mastitis subclínica, encontró que, de un total de

34 animales muestreados, representando el 100%, obtuvo que el 17.64% (6 animales) arrojaron resultados negativos en relación con la eficacia del método. En contraste, el 82.36% (28 muestras) dio positivo en cuanto a la eficacia del método. Por otro lado, **Rosero et al. (2022)** determinó la incidencia de mastitis bovina realizada a través del uso de la prueba de campo CMT en el cantón Montúfar, provincia del Carchi, se registró en un 35,71%, vinculado a la presencia de patógenos como *Staphylococcus aureus* y enterobacterias, los cuales pueden tener origen tanto en fuentes infecciosas como ambientales.

Escobedo (2021) menciona que la enfermedad está asociada a las condiciones ambientales semihúmedas a húmedas, lo que se refleja en los caminos húmedos por los que transitan las vacas. Esto provoca que las ubres de las vacas lleguen al ordeño sucias, lo que facilita la entrada de bacterias al interior de la glándula mamaria.

3.2. Número de células somáticas

En el estudio de tratamiento para la mastitis subclínica en ganado lechero, se llevaron a cabo tres tratamientos (T1, T2, y T3). T1 representó el control con 10 ml de antibiótico dependiente al antibiograma. T2 consistió en 3 ml de líquido amniótico intramamario, mientras que T3 incluyó 5 ml de plasma rico en plaquetas intramamario.

Para evaluar la eficacia de estos tratamientos, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) en dos momentos: inicial y final, con respecto a las células somáticas. En la Tabla 6, se observa que, en el análisis inicial, el tratamiento no mostro diferencias significativas con un p valor de 0,2168. En cambio, en lo que corresponde al análisis final y la diferencia, nuevamente no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con un p-valor igual a 0,6728 y 0,1191, respectivamente.

Tabla 6. Análisis de la variación de Células Somáticas sobre diferentes tratamientos de antibiótico, células madre y plasma.

Tratamientos	Células somáticas inicio	Células somáticas final	Células somáticas diferencia
P-valor	0,2168	0,6728	0,1191
T1	1425931,25	141577,12	1284453,13
T2	641662,5	260373,75	381288,75
T3	1331475,0	209850,00	1121625,00

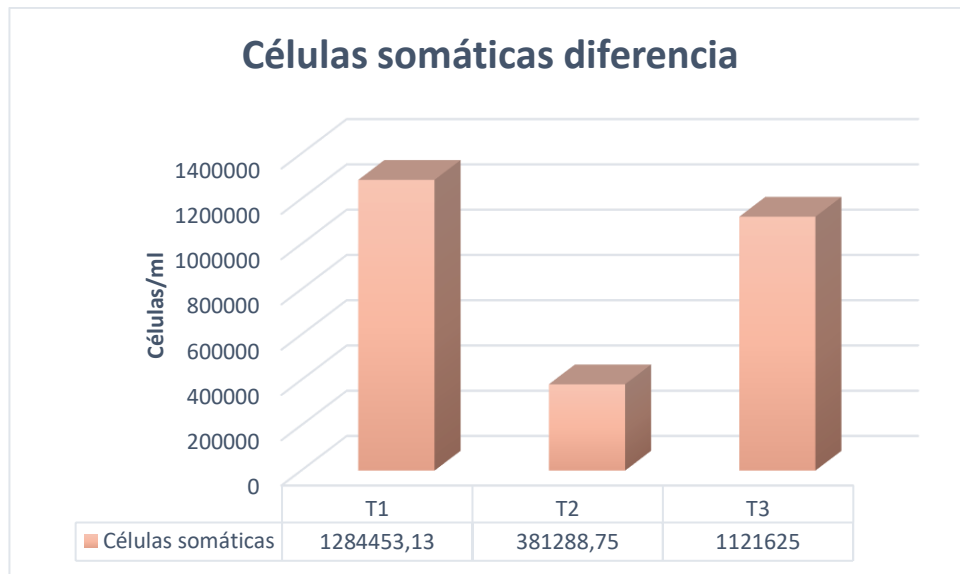
Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Adicionalmente, se llevó a cabo la prueba de Tukey para comparar las medias de las células somáticas entre los tratamientos. Se destacan las medias de células somáticas inicial, final y la diferencia para cada tratamiento. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, ya que las letras comunes indican que las medias no difieren de manera significativa ($p < 0,05$).

Sin embargo, al analizar las medias de las células somáticas, se observa que la mayor media inicial fue para el Tratamiento T1, con un valor de 1,425,931.25, mientras que la menor fue para el Tratamiento T2, con un valor de 641,662.50.

Al final del estudio, la menor media tuvo Tratamiento T2 que tenía células madre, con un valor de 381288,75, y la mayor fue para el Tratamiento T1, el antibiótico con un valor de 1284453,13. Estos resultados indican que, en términos de células somáticas, el Tratamiento T2 disminuyó la mayor cantidad de células somáticas (Figura 6).

Figura 8. Efecto del antibiótico, células madre y plasma sobre las células somáticas



Los resultados encontrados, comparados con los resultados de **Gomezcoello (2022)**, cuyo estudio arrojó un promedio del conteo de células somáticas es de 1,683,630 células por mililitro de leche, superando considerablemente los límites establecidos por los estándares por la FAO, que se sitúan en 500,000 células por mililitro. Además, comparando con la investigación de **Zurita (2021)**, se observó una concordancia en la tendencia, según Zurita, el tratamiento que implicaba la administración de 5 ml de plasma exhibió un conteo de células somáticas bajo, clasificado como negativo. En nuestro estudio, el T3, relacionado con la aplicación de plasma tuvo 1121625,00 tienen resultados dentro del rango esto sugiere la presencia de una ubre sana, ya que el recuento se situó en el rango de 0 a 200,000 células. En contraste, el tratamiento que involucraba 15 ml mostró un resultado positivo fuerte, indicando un recuento de células somáticas superior a 5,000,000. Este hallazgo es consistente con la manifestación de mastitis clínica en esta instancia del estudio.

En resumen, nuestros resultados indican que tanto el Tratamiento T1 como el T3 presentan potencial para reducir el conteo de células somáticas, aunque con enfoques diferentes. Estas observaciones ofrecen perspectivas valiosas para el desarrollo de

estrategias específicas en el manejo de la salud mamaria en bovinos, destacando la importancia de considerar la diversidad de enfoques terapéuticos en la prevención y tratamiento de condiciones como la mastitis.

3.3. Cantidad de UFC

En el análisis de la variable UFC para el estudio de mastitis subclínica en ganado lechero, se realizaron pruebas de ANOVA tanto en el inicio como al final del estudio. En la Tabla 7, los resultados muestran que el p-valor asociado al modelo y los tratamientos es de 0.7054, indicando que no hay diferencias estadísticamente significativas en las UFC iniciales entre los tratamientos, ya que este valor es mayor al nivel de significancia de 0.05.

Asimismo, el p-valor para el tratamiento final y la diferencia los tratamientos son de 0.3881 y 0,5038, sugiriendo nuevamente la ausencia de diferencias significativas en las UFC finales entre los tratamientos, ya que este valor supera el umbral de 0.05.

En el análisis de la prueba de Tukey para las medias de células somáticas entre los tratamientos (T1, T2, y T3) al inicio y al final del estudio de mastitis subclínica en ganado lechero, se observa que todas las medias comparten la misma letra "a" en ambas etapas. Esto indica que no existen diferencias significativas en las medias entre los tratamientos, ya que comparten un nivel de significancia de $p < 0.05$.

Tabla 7. Análisis de la variación de UFC sobre diferentes tratamientos de antibiótico, células madre y plasma.

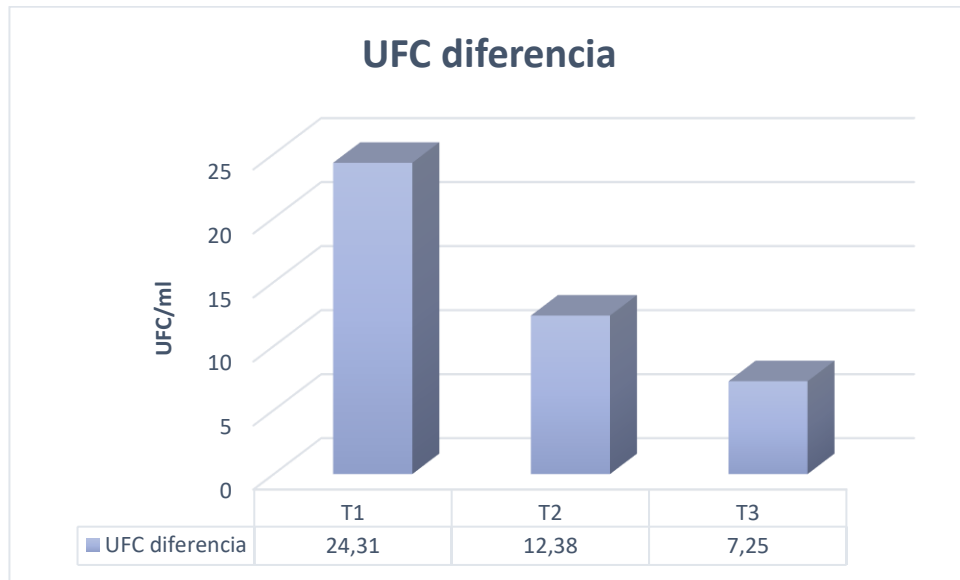
Tratamientos	UFC inicio	UFC final	UFC diferencia
P-valor	0,7054	0,3881	0,5038
T1	24,81	0,50	24,31
T2	13,50	1,13	12,38
T3	14,00	6,75	7,25

Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$)

En cuanto a los valores específicos, al inicio del estudio, la mayor media de células somáticas se encontró en el Tratamiento T1 con un valor de 24.81, mientras que la menor media correspondió al Tratamiento T2 con un valor de 13.50. Al final del estudio, el Tratamiento T3, mostro un menor conteo de UFC teniendo un 7,25 UFC, dando como resultado una media positiva para el uso del plasma. La media positiva para el uso del plasma respalda la eficacia de este tratamiento en la reducción de la carga microbiana asociada con la mastitis. Estos hallazgos son indicativos de que el Tratamiento T3 ha demostrado ser beneficioso en términos de controlar y mejorar la condición estudiada.

Al final del estudio, la menor media tuvo Tratamiento T3 que tuvo plasma, con un valor de 7,25 UFC, seguido del T2 con una media de 12.38 UFC y la mayor fue para el T1, el antibiótico con un valor de 24,31 UFC. Estos resultados indican que, en términos de UFC, el Tratamiento T3 disminuyo la mayor cantidad de células somáticas (Figura 7).

Figura 9. Efecto del antibiótico, células madre y plasma sobre las células somáticas



Estos valores en comparación los resultados de **Valle (2021)** son bajos dado que obtuvo en la leche afectada por mastitis, las principales anomalías están vinculadas a la presencia de *Staphylococcus aureus*, con un recuento de 311,333 UFC/ml, siendo identificado como el agente causal de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. Respecto a la anatomía de la ubre, los estudios revelan mediciones de ancho de 18.79 ± 0.15 y 19.64 ± 0.15 cm. Al comparar estos resultados con investigaciones previas, se evidencia que la mastitis genera inflamación en los cuartos mamarios, manifestando dolor al tacto en algunas vacas y una evidente alteración en la leche, caracterizada por la presencia de coágulos, descamaciones y ocasionalmente sangre.

Por otro lado, en la investigación de **Zurita (2021)**, implemento tres dosis diferentes de plasma (5, 10 y 15 ml). Se observó que la dosis de 10 ml mostró la mejor respuesta, con un conteo de 11,25 unidades formadoras de colonias (UFC). Estos valores son superiores a los registrados en la investigación en curso, donde la aplicación de 5 ml de plasma resultó en un conteo de 7,25 UFC.

Este contraste en los resultados resalta la importancia de la dosis utilizada en el tratamiento con plasma. Mientras que el estudio anterior identificó un óptimo en la dosis de 10 ml, la investigación actual indica una respuesta positiva con 5 ml, aunque con un conteo de UFC ligeramente inferior.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES

- El tratamiento con células madre mesenquimatosas del líquido amniótico (T2) demostró ser efectivo en la reducción de células somáticas en comparación con el tratamiento de control con antibiótico (T1). Aunque no se observaron diferencias estadísticas significativas al comparar las UFC entre los tratamientos, se destaca que el T2 presentó una disminución considerable en la carga microbiana al final del estudio.
- Aunque no se observaron diferencias estadísticas significativas al comparar las UFC entre los tratamientos, el T3 presentó una reducción notable en la carga microbiana al final del estudio. El tratamiento con plasma rico en plaquetas (T3) mostró una disminución significativa en las células somáticas en comparación con el tratamiento de control con antibiótico (T1).
- En la comparación entre los tratamientos y el grupo control, la evaluación no reveló diferencias significativas en términos de células somáticas y UFC. A pesar de la falta de diferencias estadísticas, es crucial señalar que tanto el T2 como el T3 demostraron ser igualmente eficaces o incluso superiores en la reducción de células somáticas y carga microbiana en comparación con el tratamiento de control. Estos hallazgos sugieren que los tratamientos con células madre mesenquimatosas del líquido amniótico (T2) y plasma rico en plaquetas (T3) podrían representar opciones prometedoras en el manejo de la mastitis subclínica en ganado lechero, destacando su potencial para mejorar y controlar la carga bacteriana asociada.

4.2. RECOMENDACIONES

- Aunque los tratamientos (T2 y T3) no mostraron diferencias estadísticas significativas en comparación con el grupo de control, la eficacia demostrada en la reducción de células somáticas y carga microbiana justifica el uso de ambos tratamientos.
- En la investigación recomiendo el tratamiento de plasma rico en plaquetas (T3) dado que dentro del estudio estadístico presentó tener mejores resultados en el conteo de células somáticas como UFC a diferencia del tratamiento de células madres (T2), sin embargo, con relación al tratamiento de control (T1) estuvieron casi a la par. Tomando esto en cuenta, el tratamiento (T3) es el indicado por ser un tratamiento natural a diferencial del antibiótico.
- Se recomienda realizar estudios adicionales para optimizar los protocolos de administración de los tratamientos con células madre mesenquimatosas del líquido amniótico (T2) y plasma rico en plaquetas (T3).
- Se sugiere incorporar análisis económicos para evaluar el costo-beneficio de los tratamientos propuestos. Esto implica considerar no solo la eficacia clínica, sino también los costos asociados con la implementación de los tratamientos en una escala más amplia.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, F., & Álvarez, C. A. (2019). *36.Mastitis Bovina*. Retrieved from <http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/15205/1/MASTITIS-BOVINA.pdf>
- Alvarez, E., Salinas, R., Salinas, Á., & Bravo, A. (2023). Uso y aplicación de células madre en neonatología. *Reciamuc*, 7(2), 134–142. [https://doi.org/10.26820/reciamuc/7.\(2\).abril.2023.134-142](https://doi.org/10.26820/reciamuc/7.(2).abril.2023.134-142)
- Beale, B. (2010). Artritis En Perros Y Gatos: Tratamiento Banfield. *Banfield Journal*, 10. Retrieved from https://www.banfield.com.mx/images/journal/AGyPT_final.pdf
- Bedolla, C. (2017). Etiología De La Mastitis Bovina. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 1–7. Retrieved from www.produccion-animal.com.ar
- Bhatt, A. K., Bhatia, R. K., & Bhalla, T. C. (2023). *Basic Biotechniques for Bioprocess and Bioentrepreneurship - Google Libros*. Retrieved from https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=MEsiEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Integration+of+centrifugation+with+LED+radiation+emerges+a+s+a+key+innovation+to+revive+stem+cells+mastitis&ots=dNCm5_UpdO&sig=71FXRen4mtROr44T63yQkhvoicI&redir_esc=y#v=onepage&q&
- Bolaños, F., Graffe, E., Cabrera, J., Gallego, C., & Granja, Y. (2012). MASTITIS BOVINA: GENERALIDADES Y MÉTODOS DE DIAGNOSTICO. *Revista Veterinaria REDVET*, 13(11). Retrieved from www.produccion-animal.com.ar
- Bonilla-Gutiérrez, A. F., Aragón-Urrego, C., & Aristizábal-Páez, O. L. (2017). Protocolo para la obtencion de un concentrado autologo de plaquetas en conejos: estudio piloto. *Rev. Med. Vet. Zoot*, 64(1), 24–31. <https://doi.org/10.15446/RFMVZ>
- Carmona, J. U., López, C., & Giraldo, C. E. (2011). Uso de concentrados autólogos de plaquetas como terapia regenerativa de enfermedades crónicas del aparato musculoesquelético equino. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 43(1), 1–10. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2011000100002>

- Ceballos, A., & Carmona, J. (2018). Pure platelet-rich plasma (P-PRP) composition for treatment of subclinical mastitis and methods of producing and using the same. Retrieved from <https://www.freepatentsonline.com/20180125893.pdf>
- Chen, H., Wang, H., Li, Y., Liu, W., Wang, C., & Chen, Z. (2016). Biological effects of low-level laser irradiation on umbilical cord mesenchymal stem cells. *AIP Advances*, 6(4). <https://doi.org/10.1063/1.4948442>
- Constant, C., Desrochers, A., Gagnon, C. A., Provost, C., Nichols, S., Marchionatti, E., & Gara-Boivin, C. (2023). Single-step production of autologous bovine platelet concentrate for clinical applications in cattle. *Journal of Dairy Science*, 106(1), 565–575. <https://doi.org/10.3168/JDS.2021-21108>
- Cortés-Araya, Y., Amilon, K., Rink, B. E., Black, G., Lisowski, Z., Donadeu, F. X., & Esteves, C. L. (2018). Comparison of antibacterial and immunological properties of mesenchymal stem/stromal cells from equine bone marrow, endometrium, and adipose tissue. *Stem Cells and Development*, 27(21), 1518–1525. <https://doi.org/10.1089/scd.2017.0241>
- Escobedo, J. (2021). *Comparación de dos pruebas de campo para determinar la mastitis subclínica en bovinos en la localidad de Florida Pomacochas, 2019* (Tesis de pregrado, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza). Retrieved from <https://repositorio.untrm.edu.pe/handle/20.500.14077/2341>
- Espinoza, F. (2016). Escenario actual y perspectivas de la terapia con células madre mesenquimales en medicina intensiva Overviewandperspectivesofmesenchymal stemcelltherapyinintensivecaremedicine. 222 *ARTÍCULOS Rev*, 144, 222–231.
- Faria, L. (2017). *Tecnología de productos de origen animal*. Retrieved from <http://tecnologiadepoa.blogspot.com/2017/03/ordenha-de-bufala-bufala-aoparir-produz.html>
- Fernández, O., Trujillo, E., Peña, J., Cerquera, J., Granja, T., & Yury, T. (2012). MASTITIS BOVINA: GENERALIDADES Y MÉTODOS DE DIAGNOSTICO. *Revista Veterinaria REDVET*, 13(11). Retrieved from www.produccion-animal.com.ar

- Gao, Y., Zhu, Z., Zhao, Y., Hua, J., Ma, Y., & Guan, W. (2014). Multilineage potential research of bovine amniotic fluid mesenchymal stem cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(3), 3698–3710. <https://doi.org/10.3390/ijms15033698>
- Garcia, C. L., & Mendez, K. P. (2009). Tratamiento de la mastitis subclínica en dos hatos lecheros del Valle de Ubaté con un producto homeopático phytolaca. *Medicina Veterinaria*. Retrieved from https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria/307
- Gómez, M. (2016). *Demostrar el impacto económico de la mastitis en la producción de leche de la finca el Edén del municipio de Yarumal Antioquia por medio de un programa de control preventivo*. (Tesis de pregrado, Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD). Retrieved from <https://repository.unad.edu.co/handle/10596/11459>
- Gomezcoello, M. (2022). *Prevalencia de mastitis mediante el recuento de células somáticas en bovinos de producción láctea* (Tesis de pregrado, Universidad Politécnica Salesiana). Retrieved from <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/23969>
- González, J. (2006). Plasma rico en plaquetas. *Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial*, 28(2). Retrieved from https://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1130-05582006000200001&script=sci_arttext
- Guallasamín, O., & Moreno, V. (2013). *Uso de plasma rico en factores de crecimiento autologo y heterologo sobre el proceso cicatrizal. Estudio experimental en caninos* (Tesis de pregrado, Univesidad Central del Ecuador). Retrieved from <https://core.ac.uk/download/pdf/71901853.pdf>
- Harman, R. M., Yang, S., He, M. K., & Van De Walle, G. R. (2017). Antimicrobial peptides secreted by equine mesenchymal stromal cells inhibit the growth of bacteria commonly found in skin wounds. *Stem Cell Research and Therapy*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0610-6>
- Hill, A. B. T., Bressan, F. F., Murphy, B. D., & Garcia, J. M. (2019). Applications of mesenchymal stem cell technology in bovine species. *Stem Cell Research and*

Therapy, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1145-9>

- Lavanda, N. (2019). *Uso de plasma rico en plaquetas (prp) para el tratamiento de úlceras corneales superficiales en caninos* (Tesis de pregrado, Universidad de Guayaquil). Retrieved from [http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/39298/1/2019-Lavanda Larco%2C Lissette.pdf](http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/39298/1/2019-Lavanda%20Lissette.pdf)
- Li, W. T., Chen, H. L., & Wang, C. Te. (2006). Effect of light emitting diode irradiation on proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of Medical and Biological Engineering*, 26(1), 35–41.
- Moreno Díaz, R., Carreño, M. G., Torres, J. J., Herreros, J. M. A., Villimar, A., & Sánchez, P. L. (2015). Técnicas de obtención del plasma rico en plaquetas y su empleo en terapéutica osteoinductora. *Farmacia Hospitalaria*, 39(3), 130–136. <https://doi.org/10.7399/FH.2015.39.3.7998>
- Osornio, A. (2008). “*Manual De Procedimientos Para El Control De La Mastitis En Vacas Lecheras*”. (Tesis de licenciatura, Universidad Autonama de Queretano). Retrieved from <https://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/9631>
- Pasachova, J., Ramirez, S., & Muñoz, L. (2019). Staphylococcus aureus: generalities, mechanisms of pathogenicity and cell colonization. *Nova*, 17(32), 25–38. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v17n32/1794-2470-nova-17-32-25.pdf>
- Peña, D. L. J. C. (2018). *Protocolo de Extracción de Médula Ósea con Driver*. 01, 1–23.
- Rojas, C. (2017). *Factores asociados con la mastitis subclínica bovina en fincas lecheras de Zipaquirá, Cundinamarca* Maestría en Epidemiología (Tesis de maestría, Universidad del Rosario). Retrieved from <https://repository.urosario.edu.co/server/api/core/bitstreams/b22ad410-57a3-48b4-b8e7-b6c0e0d15dbf/content>
- Romano, S. (2001). *Anatomia Y Fisiologia De La Miccion*.
- Rosero, E., Montenegro, D., Abad, R., & Ordoñez, D. (2022). Mastitis bovina en el

cantón Montufar – Carchi. Prevalencia, agente causal y factores de riesgo. *AXIOMA*, 1(26), 5–10. <https://doi.org/10.26621/RA.V1I26.735>

Ruegg, P. L. (2011). California Mastitis Test (CMT) Fact Sheet 1 California Mastitis Test (CMT) Fact Sheet 1. *Milk Money*, (2 cc), 16–18. Retrieved from <http://milkquality.wisc.edu/wp-content/uploads/2011/09/california-mastitis-test-fact-sheet.pdf>

Sánchez, R., Izquierdo, J., Gutiérrez-Mendoza, I., Rodríguez, Á., Carrillo, J. L., García, M., ... Ramón. (2021). Plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en la ortopedia, un camino hacia la ortobiología en México. *Ortho-Tips*, 17(4), 222–236. <https://doi.org/10.35366/102221>

Steigman, S. A., & Fauza, D. O. (2007). Isolation of mesenchymal stem cells from amniotic fluid and placenta. *Current Protocols in Stem Cell Biology*, Chapter 1. <https://doi.org/10.1002/9780470151808.sc01e02s1>

Ting, W. J., Shaw, S. W., Hii, L. Y., Lin, T. Y., Chang, S. C., Liu, K. Y., ... Peng, S. Y. (2020). Therapeutic effects of conditioned – DPBS from amniotic stem cells on lactating cow mastitis. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 59(4), 520–526. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2020.05.009>

Valle, K. E. (2021). *Mastitis y calidad de la leche en bovinos lecheros*. (Tesis de pregrado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo). Retrieved from <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/16278>

Vélez, J. D. (2022). *Incidencia de mastitis bovina subclínica mediante la prueba de california mastitis test (CMT) con identificación del agente etiológico*. (Escuela Superior Politécnica de Chimborazo). Retrieved from <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/17844>

Waterman, R. S., Tomchuck, S. L., Henkle, S. L., & Betancourt, A. M. (2010). A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: Polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS ONE*, 5(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010088>

Weeratunga, P., Harman, R. M., & Van de Walle, G. R. (2023). Induced pluripotent

stem cells from domesticated ruminants and their potential for enhancing livestock production. *Frontiers in Veterinary Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2023.1129287>

Zuluaga, J. J. E., Jaramillo, M. G., & Betancur, L. F. R. (2010). Evaluación comparativa de dos metodologías de diagnóstico de mastitis en un hato lechero del Departamento de Antioquia. (Spanish). *Comparative Evaluations of Two Diagnose Methods for Mastitis in a Dairy Herd from the Antioquia Province. (English)*, 7(1), 49–57. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=54861620&lang=es&site=ehost-live>

Zurita Oñate, M. A. (2021). *Uso de plasma autólogo como terapia regenerativa de glándulas mamarias en vacas con mastitis subclínica* (Tesis de pregrado, Universidad Técnica de Ambato). Retrieved from <https://repositorio.uta.edu.ec:8443/jspui/handle/123456789/33316>

ANEXOS

Anexo 1. Fotos de evidencia del proceso



Prueba de mastitis



Prueba de California



Conteo de células somáticas



Proceso de cultivo de Mueller Hilton para el grupo testigo



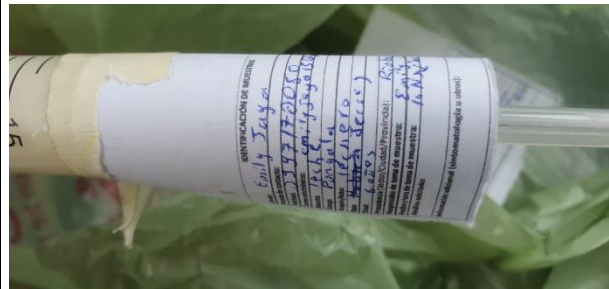
Cultivo del grupo testigo



Tubos de citrato de sodio con el plasma rico en plaquetas



Colocación del PRP con sonda intramamaria



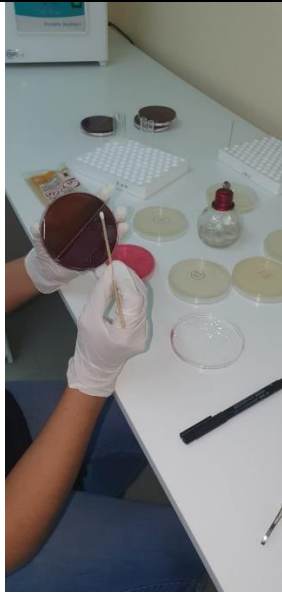
Muestras etiquetadas de cada vaca



Obtención del líquido amniótico



Conteo de unidades formadoras de colonias



Proceso de cultivo para el conteo de UFC



Colocación del tratamiento de células madre



Muestras de leche para el estudio en el laboratorio



Cultivo para conteo de UFC

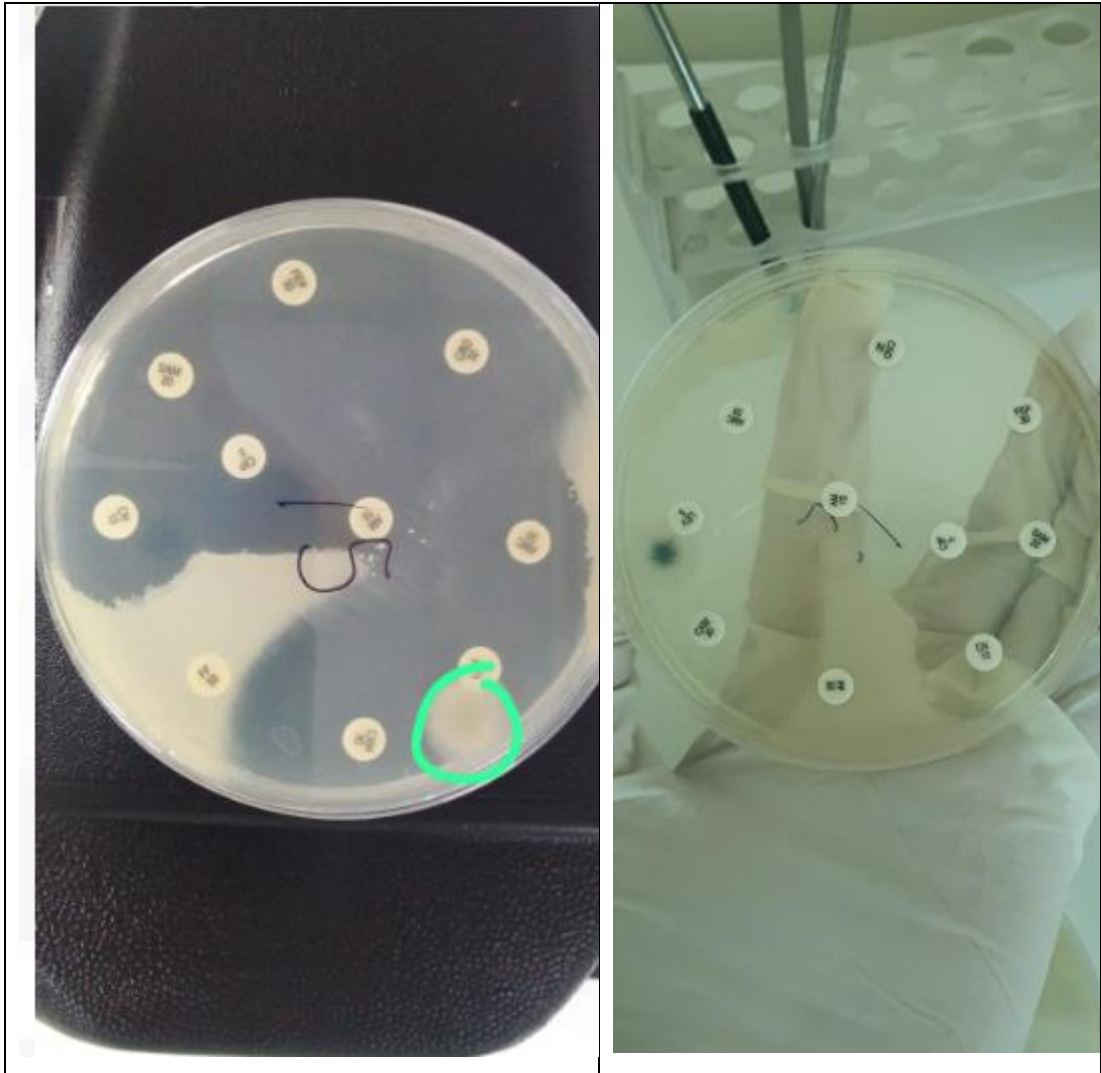


Estufa para preparación de conteo de células somáticas



Lugar de estudio

Anexo 2. Antibiogramas



Anexo 3. ANOVA Células somática inicio

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
CELULAS SOMATICAS INICIO	12	0,29	0,13	56,01

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1466454320729,17	2	733227160364,58	1,82	0,2168
TRATAMIENTOS	1466454320729,17	2	733227160364,58	1,82	0,2168
Error	3624458906093,75	9	402717656232,64		
Total	5090913226822,92	11			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1252857,34767

Error: 402717656232,6389 gl: 9

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.
ANTIBIOTICO T3	1425931,25	4	317300,20 A
PLASMA T1	1331475,00	4	317300,20 A
CELULAS M T2	641662,50	4	317300,20 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Anexo 4. ANOVA Células somáticas final

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
CELULAS SOMATICAS TRATAMIE..	12	0,08	0,00	90,85

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	28435297181,63	2	14217648590,81	0,41	0,6728
TRATAMIENTOS	28435297181,63	2	14217648590,81	0,41	0,6728
Error	308908040497,94	9	34323115610,88		
Total	337343337679,56	11			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=365758,67934

Error: 34323115610,8819 gl: 9

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.
CELULAS M T2	260373,75	4	92632,49 A
PLASMA T1	209850,00	4	92632,49 A
ANTIBIOTICO T3	141577,13	4	92632,49 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Anexo 5. ANOVA células somáticas diferencia

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
CELULAS SOMATICAS DIFERENC..	12	0,38	0,24	62,83

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1853474136948,29	2	926737068474,15	2,72	0,1191
TRATAMIENTOS	1853474136948,29	2	926737068474,15	2,72	0,1191
Error	3066413881022,94	9	340712653446,99		
Total	4919888017971,23	11			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1152379,22539

Error: 340712653446,9930 gl: 9

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.
ANTIBIOTICO T3	1284354,13	4	291852,98 A
PLASMA T1	1121625,00	4	291852,98 A
CELULAS M T2	381288,75	4	291852,98 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 6. ANOVA UFC inicio

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
UFC AL INICIO	12	0,07	0,00	121,70

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	326,84	2	163,42	0,36	0,7054
TRATAMIENTOS	326,84	2	163,42	0,36	0,7054
Error	4052,92	9	450,32		
Total	4379,77	11			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=41,89519

Error: 450,3247 gl: 9

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.
ANTIBIOTICO T3	24,81	4	10,61 A
PLASMA T1	14,00	4	10,61 A
CELULAS M T2	13,50	4	10,61 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 7. ANOVA UFC final

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
UFC FINAL	12	0,19	0,01	240,28

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	94,79	2	47,40	1,05	0,3881
TRATAMIENTOS	94,79	2	47,40	1,05	0,3881
Error	404,94	9	44,99		
Total	499,73	11			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=13,24262

Error: 44,9931 gl: 9

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.
PLASMA T1	6,75	4	3,35 A
CELULAS M T2	1,13	4	3,35 A
ANTIBIOTICO T3	0,50	4	3,35 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 8. ANOVA UFC diferencia

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
UFC DIFERENCIAS	12	0,14	0,00	138,94

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	613,20	2	306,60	0,74	0,5038
TRATAMIENTOS	613,20	2	306,60	0,74	0,5038
Error	3726,61	9	414,07		
Total	4339,81	11			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=40,17325

Error: 414,0677 gl: 9

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.
ANTIBIOTICO T3	24,31	4	10,17 A
CELULAS M T2	12,38	4	10,17 A
PLASMA T1	7,25	4	10,17 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)