

Universidad Católica de Santa María

Escuela de Post-Grado

Maestría en Producción y Salud Animal



“APLICACIÓN INTRAUTERINA DE PLAQUETAS AUTÓLOGAS LISADAS CON OZONO PARA LA RESOLUCIÓN DE ENDOMETRITIS SUBCLÍNICA EN VACAS LECHERAS, DISTRITO DE MAJES, AREQUIPA. 2018”.

Tesis presentada por la Bachiller:

Calderón Portugal, Cristina Margoth

Para optar por el Grado Académico de:

Maestro en Producción y Salud Animal

Asesor:

Dr. Fernández Fernández, Fernando

Arequipa – Perú

2022

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
ESCUELA DE POSTGRADO
DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR DE TESIS

Arequipa, 23 de Septiembre del 2021

Dictamen: 003642-C-EPG-2021

Visto el borrador del expediente 003642, presentado por:

2017009562 - CALDERON PORTUGAL CRISTINA MARGOTH

Titulado:

**APLICACIÓN INTRAUTERINA DE PLAQUETAS AUTÓLOGAS LISADAS CON OZONO PARA LA
RESOLUCIÓN DE ENDOMETRITIS SUBCLÍNICA EN VACAS LECHERAS, DISTRITO DE MAJES,
AREQUIPA. 2018**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

**1051 - VILLANUEVA SALAS JOSE ANTONIO
DICTAMINADOR**



**6111 - VASQUEZ PEREZ CARLOS SANTIAGO
DICTAMINADOR**



**6550 - MEDINA ESCALANTE CYNTHIA KARIN
DICTAMINADOR**



UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
ESCUELA DE POSTGRADO
MAESTRIA CON TESIS
DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR DE TESIS

Arequipa, 27 de Julio del 2021

Dictamen: 003642-B-EPG-2021

Visto el borrador de tesis del expediente 003642, presentado por:

2017009562 - CALDERON PORTUGAL CRISTINA MARGOTH

Titulado:

**APLICACIÓN INTRAUTERINA DE PLAQUETAS AUTÓLOGAS LISADAS CON OZONO PARA LA
RESOLUCIÓN DE ENDOMETRITIS SUBCLÍNICA EN VACAS LECHERAS, DISTRITO DE MAJES,
AREQUIPA. 2018**

El dictamen es:

APROBADO

1884 - FERNANDEZ FERNANDEZ FERNANDO
DICTAMINADOR



DEDICATORIA

A mi hijo Janick, que con su amor, comprensión y alegría me motiva a cumplir mis metas para ofrecerle siempre lo mejor.

A mis padres, quienes me brindan apoyo y fortaleza para cumplir mis metas.

A mis hermanos, Jimmy, Melina, Yaqueline y Jonny por su amor, compañía y comprensión.

A mis tíos y primos por su apoyo, consejos y cariño incondicional que me brindan.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor de tesis Dr. Fernando Fernández Fernández, por su paciencia, dedicación, orientación y asesoría para el desarrollo del presente trabajo. Mi reconocimiento y gratitud, por su apoyo incondicional durante este tiempo.

A mis jurados: Dr. José Antonio Villanueva Salas, Dr. Carlos Santiago Vásquez Pérez y a la Dra. Cyntia Karín Medina Escalante por sus aportaciones para el desarrollo del trabajo de investigación.

Al señor propietario del estable donde se desarrolló el presente estudio.

La ciencia y la vida ni pueden ni deben estar separadas. Para mí la ciencia da una explicación parcial de la vida. Tal como es se basa en los hechos, la experiencia y los experimentos.

Estoy de acuerdo en que la fe es fundamental para tener éxito en la vida, pero no acepto tu definición de fe, la creencia de que hay vida tras la muerte.

En mi opinión, lo único que necesita la fe es el convencimiento de que esforzándonos en hacer lo mejor que podemos nos acercaremos al éxito, y que el éxito de nuestros propósitos, la mejora de la humanidad de hoy y del futuro, merece la pena conseguirse.

Rosalind Franklin

ÍNDICE

RESUMEN	
ABSTRACT	
I. INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS:	5
OBJETIVOS:	5
OBJETIVO GENERAL:	5
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	5
CAPÍTULO I:	6
MARCO TEÓRICO	6
1. Anatomía y fisiología reproductiva de la hembra bovina	7
1.1 Histología del útero bovino:	8
1.2 Fisiología del puerperio	10
1.3 Involución uterina	10
1.4 Regeneración del endometrio	11
1.5 Reanudación de la actividad ovárica	12
1.6 Contaminación bacteriana	13
1.7 Bacterias contaminantes del útero	15
1.8 Mecanismos de defensa uterina	15
2. Endometritis	18
2.1 Etiología y patogenia	18
2.2 Clasificación:	19
3. Endometritis subclínica	20
3.1 Técnicas de diagnóstico de endometritis clínica y subclínica	20
3.2 Técnica de Cytobrush	22
4. Plaquetas	23
4.1 Génesis fisiología y bioquímica de las plaquetas	23
4.2 La membrana de las plaquetas y sus receptores	24
4.3 Citoplasma y gránulos de las plaquetas	25
4.4 Respuesta plaquetaria	26
4.5 Métodos utilizados para la preparación de concentrados autólogos de plaquetas	29
4.6 Fundamentos biológicos de reparación tisular	30
4.7 Usos de las plaquetas en diferentes especialidades	32
4.8 Métodos de activación plaquetaria	33
5. Antecedentes bibliográficos:	34
CAPÍTULO II:	37
METODOLOGÍA	37

6. MATERIALES: _____	38
7. MÉTODOS: _____	39
8. CAMPO DE VERIFICACIÓN: _____	47
8.1 Ubicación Espacial _____	47
9. UNIDADES DE ESTUDIO: _____	47
<i>CAPÍTULO III:</i> _____	48
<i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i> _____	48
<i>CONCLUSIONES</i> _____	61
<i>RECOMENDACIONES</i> _____	62
<i>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:</i> _____	63
<i>ANEXOS</i> _____	75
<i>ANEXO N° 1:</i> _____	76
<i>Análisis estadístico</i> _____	76
<i>ANEXO N° 2:</i> _____	80
<i>Matriz de registros</i> _____	80
<i>ANEXO N° 3:</i> _____	87
<i>Fichas de observación</i> _____	87
<i>ANEXO N° 4:</i> _____	100
<i>Secuencias fotográficas</i> _____	100

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO N° 1: Factores de crecimiento y quimiocinas contenidas en los gránulos α de las plaquetas -----	27
CUADRO N° 2: Proteínas contenidas en los gránulos plaquetarios -----	30
CUADRO N° 3: Prevalencia de endometritis subclínicas diagnosticadas mediante citología endometrial en función de la semana del postparto en la que se hizo el diagnóstico, del punto de corte y de la técnica empleada para obtener la muestra -----	46



ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N° 1: Porcentaje de PMN-N en vacas lecheras con endometritis subclínica del Distrito de Majes - 2018 _____	49
TABLA N° 2: Porcentaje de Polimorfonucleares - Neutrófilos aplicando 5 mL de plaquetas lisadas con ozono disueltas en 100 mL de cloruro de sodio al 9 ‰ mediante infusión intrauterina por única vez _____	51
TABLA N° 3: Porcentaje de Polimorfonucleares – Neutrófilos aplicando 5 mL de plaquetas lisadas con ozono disueltas en 100 mL de cloruro de sodio al 9 ‰ mediante infusión intrauterina dos veces con un intervalo de 3 días entre cada aplicación _____	52
TABLA N° 4: Porcentaje de Polimorfonucleares – Neutrófilos aplicando 10 mL de plaquetas lisadas con ozono disueltas en 100 mL de cloruro de sodio al 9 ‰ mediante infusión intrauterina por única vez _____	53
TABLA N° 5: Porcentaje de Polimorfonucleares – Neutrófilos aplicando 10 mL de plaquetas lisadas con ozono disueltas en 100 mL de cloruro de sodio al 9 ‰ mediante infusión intrauterina dos veces con un intervalo de 3 días entre cada aplicación _____	54
TABLA N° 6: Comparación del porcentaje de PMN-N entre grupos luego de la aplicación de plaquetas autólogas lisadas con ozono _____	55
TABLA N° 7: Comparaciones múltiples por grupo _____	56

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N° 1: Corte histológico del útero e imagen ecográfica en un corte transversal en donde se puede apreciar las diferentes capas de la pared uterina _____ 8

FIGURA N° 2: Formación de plaquetas _____ 24

FIGURA N° 3: Micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) de una plaqueta equina normal (A) y de una plaqueta equina activada. MP: membrana plasmática. G: glicógeno. α : gránulos alfa. P: pseudópodo. MT: mitocondria. T: microtúbulos. La barra representa 1 μ m _____ 26



LISTA DE ABREVIATURAS

ES: Endometritis subclínica

PMN-N: Polimorfonucleares – Neutrófilos

FC: Factores de crecimiento

FNT: Factor de necrosis tumoral

IL: Interleuquinas

PGF2 α : Prostaglandina F2 alfa

PLTs: Plaquetas

GFs: Factores de crecimiento

α : Alfa

PDGF: Factor de crecimiento derivado de la plaqueta

β : Beta

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropina

FSH: Hormona foliculoestimulante

LH: Hormona luteinizante

BEN: Balance energético negativo

PGE2: Prostaglandina E2 (dinoprostona)

FCV: Flujo cervicovaginal

CB: Técnica de cytobrush

Ca²⁺: Calcio

ADP: Adenosin difosfato

ATP: Adenosin trifosfato

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta

β -TG: Beta-tromboglobulina

FV: Factor de coagulación proacelerina

FVIII: Factor antihemofílico A

MKs: Megacariocitos

CD34+: Cúmulo de diferenciación 34 positivo

vWF: Factor von Willebrand

ECM: Matriz Extracelular

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

IGF-I: Factor de crecimiento insulínico tipo 1

HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos

APCs: Concentrados autólogos de plaquetas

PSGL-1: Gliproteína ligando de P-selectina – 1

IgG: Inmunoglobulina G

CD40: Cúmulo de diferenciación 40

TLRs: Receptores tipo Toll (Toll-like receptors)

PF-4: Factor plaquetario 4

IgA: Inmunoglobulina A

IgM: Inmunoglobulina M

bFGF: Factor de crecimiento fibroblástico básico

NGF: Factor de crecimiento nervioso

PSGL-1: Gliproteína ligando de P-selectina

PRP: Plasma rico en plaquetas

CaCl₂: Cloruro de calcio

COX2: Prostaglandina-endoperóxido sintasa 2

TP53: Proteína tumoral p53

ER- α y ER- β : Receptores de estrógenos

PR: Receptor de progesterona

c-Myc: Protooncogenes

LPS: Lipopolisacárido de endotoxina bacteriano

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

PTGS2: Prostaglandina-endoperóxido sintasa 2

PMIE: Endometritis persistente inducida por el apareamiento

IA: Inseminación artificial

FLU: Líquido intrauterino

CYT: Citología uterina

HIS: Biopsia

EPPC: Endometritis persistente pos-cobertura

mL: Mililitros

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue aplicar mediante infusión intrauterina plaquetas autólogas lisadas con ozono para la resolución de endometritis subclínica en vacas lecheras. Se realizó en el Distrito de Majes, en un establo lechero de 180 vacas en un sistema de crianza intensivo, para lo cual se seleccionaron 12 vacas lecheras sin patologías uterinas (vacas con útero involucionado y sin secreciones vaginales anormales) de entre 3 y 4 partos, 130 y 168 DEL, 70 días IPPS, las cuales mostraron repetición de celo (3 y 4 número de servicios) y con un promedio de producción de 47 kg de leche al día; a todas ellas se les tomó una muestra citológica de endometrio mediante la técnica de Cytobrush. Los frotis se procesaron con la tinción de Diff-Quick. Se determinó la proporción de células Polimorfo Nucleares - Neutrófilos (PMN-N), para determinar la presencia de endometritis subclínica, valores $\geq 4\%$ de PMN se consideraron positivos, el porcentaje promedio (PMN-N) hallado fue de 8.22 % con valores extremos de 4.50 % y 22.70 % demostrando que todas las vacas del estudio fueron positivas a endometritis subclínica. Se extrajo sangre de la vena coccígea media de cada una de las vacas en tubos de 3.5 mL con citrato de sodio al 3.2 %, del grupo T1 se obtuvo 35 mL, del grupo T2 70 mL, del grupo T3 35 mL y del grupo T4 70 mL, los tubos con sangre fueron centrifugados a 5000 rpm durante 10 minutos, la centrifugación permitió separar la sangre para obtener el plasma rico en plaquetas (PRP), el cual fue recolectado en jeringas de 20 mL con aguja N° 21G X 1½", obteniendo de los grupos T1 y T3 15 mL de PRP de cada vaca y de los grupos T3 y T4 30 mL de PRP por vaca, el PRP obtenido de cada una se depositó en tubos Falcon estériles previamente rotulados, se procedió a la ozonificación del plasma durante 10 minutos para promover la degranulación plaquetaria, acentuar la liberación de los factores de crecimiento y seguidamente aplicarlo mediante infusión intrauterina. Se efectuó los tratamientos, y los resultados fueron sometidos a la prueba f de Fisher para comparación de medias, el porcentaje promedio de PNM-N en el grupo de tratamiento (T1) vacas tratadas con 5 mL de plaquetas autólogas lisadas con ozono mediante infusión intrauterina por única vez fue de 11,27 %, mientras que en el grupo (T2) vacas tratadas con 5 mL de plaquetas autólogas lisadas con ozono mediante infusión intrauterina 2 veces con un intervalo de 3 días tuvo una reducción en el porcentaje siendo de 1.93 %, en tanto que en el grupo (T3) vacas tratadas con 10 mL de plaquetas autólogas lisadas con ozono mediante infusión intrauterina por única vez

fue de 17,27 % y en el grupo (T4) vacas tratadas con 10 mL de plaquetas autólogas lisadas con ozono mediante infusión intrauterina 2 veces con un intervalo de 3 días fue de 11,80 %, al comparar los resultados post tratamiento de los 4 grupos según el análisis de la varianza ($f = 6.17$) muestra que el porcentaje de Polimorfonucleares - Neutrófilos promedio entre grupos luego de la aplicación de plaquetas lisadas con ozono presentó diferencia estadística significativa ($P < 0.05$). Mientras que en la prueba de Tukey se muestra que el porcentaje de Polimorfonucleares - Neutrófilos promedio entre grupos luego de la aplicación de plaquetas lisadas con ozono en la dosis de 5 mL aplicada 2 veces (T2) presentó mayor diferencia en el resultado, en relación a los demás grupos en estudio.

Palabras clave: Plaquetas autólogas, endometritis subclínica, cytobrush, infusión intrauterina.

ABSTRACT

The objective of the present study was to apply by intrauterine infusion autologous platelets lysed with ozone for the resolution of subclinical endometritis in dairy cows.

It was carried out in the Majes District, in a dairy barn of 180 cows in an intensive rearing system, for which 12 dairy cows without uterine pathologies (cows with regressed uterus and without abnormal vaginal secretions) of between 3 and 4 calvings were selected. , 130 and 168 DEL, 70 days IPPS, which showed repetition of heat (3 and 4 number of services) and with an average production of 47 kg of milk per day; A cytological endometrial sample was taken from all of them using the Cytobrush technique. Smears were processed with Diff-Quick staining. The proportion of Polymorph Nuclear-Neutrophil cells (PMN-N) was determined, to determine the presence of subclinical endometritis, values $\geq 4\%$ of PMN were considered positive, the average percentage (PMN-N) found was 8.22 % with extreme values 4.50 % and 22.70 % showing that all cows in the study were positive for subclinical endometritis.

Blood was extracted from the middle coccygeal vein of each of the cows in 3.5 mL tubes with 3.2 % sodium citrate, 35mL was obtained from group T1, from group T2 70 mL, from group T3 35 mL and from group T4 70 mL, the tubes with blood were centrifuged at 5000 rpm for 10 minutes, centrifugation allowed the blood to be separated to obtain platelet-rich plasma (PRP), which was collected in 20 mL syringes with needle No. 21G X 1½ ”, obtaining from groups T1 and T3 15 mL of PRP from each cow and from groups T3 and T4 30 mL of PRP per cow, the PRP obtained from each one was deposited in previously labeled sterile Falcon tubes, the plasma was ozonized for 10 minutes to promote platelet degranulation, accentuate the release of growth factors and then apply it by intrauterine infusion. The treatments were carried out, and the results were subjected to Fisher's f test for comparison of means, the average percentage of PNM-N in the treatment group (T1) cows treated with 5 mL of autologous platelets lysed with ozone by intrauterine infusion by only time was 11.27 %, while in the group (T2) cows treated with 5 mL of autologous platelets lysed with ozone by intrauterine infusion 2 times with an interval of 3 days had a reduction in the percentage being 1.93 %, in so much so that in group (T3) cows treated with 10 mL of autologous platelets lysed with ozone by intrauterine infusion for a single time was 17.27 % and in group (T4) cows treated with 10 mL of autologous platelets lysed with ozone by intrauterine infusion 2 times with an interval of 3 days it was 11.80 %, when comparing the post-treatment results of the 4 groups according to the analysis of variance ($f = 6.17$), it shows that the percentage of Polymorphonuclear cells - Neutrophil The average s between groups after the application of ozone-lysed platelets

showed a statistically significant difference ($P < 0.05$). While the Tukey test shows that the average percentage of Polymorphonuclear - Neutrophils between groups after the application of platelets lysed with ozone in the dose of 5 mL applied 2 times (T2) presented a greater difference in the result, in relation to the other groups under study.

Key words: Autologous platelets, subclinical endometritis, cytobrush, intrauterine infusion



I. INTRODUCCIÓN

Los sistemas ganaderos de producción lechera persiguen como uno de sus principales objetivos el de lograr la máxima rentabilidad productiva y por ende económica, de sus hatos en general y de sus vacas en particular. Esta mayor productividad se ve reflejada como consecuencia de una correcta interacción de factores principalmente genéticos, nutricionales, sanitarios, y de manejo. La salud reproductiva constituye el núcleo de estudio de la mayor parte de las investigaciones por desempeñar un importante rol para alcanzar una correcta performance reproductiva¹.

Las endometritis en el postparto son enfermedades multifactoriales con gran impacto económico, ya que tanto endometritis clínica como subclínica reducen la eficiencia reproductiva del ganado lechero², debido a que las vacas con endometritis subclínica desarrollan una falla embrionaria temprana por una alteración en la calidad del embrión³. En estudios recientes se ha observado que la endometritis subclínica modifica las concentraciones de esteroides ováricos afectando la calidad del ovocito, y esto podría explicar en parte, las tasas de concepción más bajas y el mayor intervalo entre el parto y la concepción que se asocian a menudo con endometritis subclínica⁴.

La endometritis subclínica es una de las principales enfermedades de alto impacto económico en las explotaciones lecheras con alta prevalencia en la etapa de postparto, debido básicamente a la alteración en la fertilidad de las vacas las cuales se han relacionado con retrasos en el reinicio de la actividad ovárica postparto, el aumento del intervalo entre el partos y la primera inseminación, el aumento de los días abiertos, el declive de la tasa de concepción e incremento en las tasas de eliminación. Las endometritis subclínicas también han sido relacionadas con el síndrome de repetición de celos en vacas⁵. Cabe mencionar que las endometritis, además de los posibles efectos sobre la reproducción, afectan negativamente a la producción de leche⁶.

Existen discrepancias en lo que se refiere a los efectos de la endometritis subclínica sobre la reproducción, encontrando algunos autores que no aprecian ningún efecto significativo⁷,⁸, otros que solo los observan en animales con citología positiva acompañada de secreción vaginal y/o fluido en el útero⁹ y otros que describen numerosas implicaciones negativas sobre la fertilidad.

La endometritis subclínica (ES) es aquella inflamación del endometrio con ausencia de síntomas clínicos. Esta patología se caracteriza por presentar un infiltrado de polimorfonucleares neutrófilos (PMN) sin o con un mínimo de exudado acumulado en el útero^{10, 11} y en muchos casos sin que se pueda demostrar la existencia de un agente agresor^{12,13, 14}.

Los métodos empleados para diagnosticar este proceso son la ecografía, la citología endometrial y, en menor medida, la biopsia uterina¹⁵. Además, en la actualidad se considera la citología endometrial como la técnica “gold estándar” para el diagnóstico de esta patología¹⁶.

La citología endometrial es una práctica que recientemente se ha comenzado a utilizar para la evaluación de la salud uterina en bovinos. Se caracteriza por ser rápido, específico, sensible y económico, lo que la hace una herramienta valiosa para la investigación sobre el rol y la importancia de la endometritis una enfermedad reproductiva¹⁷.

En la mayoría de los casos, los microorganismos aislados del interior del útero de vacas con endometritis subclínica no difieren de la población bacteriana presente en el útero de vacas sanas¹⁴. Por lo tanto, parece que el proceso inflamatorio, más que la infección bacteriana, cobra especial importancia en la patogenia de la endometritis subclínica. La inflamación del endometrio está asociada a la liberación de sustancias mediadoras de la inflamación, como por ejemplo el factor de necrosis tumoral (TNF) y diversas interleukinas (IL)¹⁸, que podrían tener efectos negativos sobre la reproducción, actuando a diferentes niveles. En vacas se han descrito efectos de los mediadores de la inflamación sobre el ovario que intervendrían en la foliculogénesis, ovulación, luteinización y luteólisis¹⁹. También se ha descrito un efecto directo sobre el embrión, lo que reduciría su viabilidad y, en consecuencia, las tasas de concepción^{20, 21}.

El tratamiento de la ES con PGF2 α o sus análogos, aplicación de antibióticos intrauterinos y/o enzimas proteolíticas mostraron resultados heterogéneos en las diversas investigaciones²².

Estudios más recientes concluyeron que hasta el momento, ninguno de los tratamientos probados por los diferentes grupos de investigación ha podido poner a la luz resultados convincentes para endometritis subclínica²³.

En los últimos años, ha incrementado el interés, tanto de grupos de investigadores como de profesionales, para desarrollar y aplicar de tratamientos específicos y efectivos para la endometritis subclínica. El empleo de las plaquetas en la medicina regenerativa ha establecido una nueva revolución científica en el campo de la medicina. Desde su inicio se han ido incrementando las afecciones en las que han aportado nuevas perspectivas y esperanzas, por lo que su uso ha ascendido rápidamente a lo que se suma que es un procedimiento seguro, simple y económico.

Se ha producido un extraordinario avance en los conocimientos relacionados con la medicina regenerativa. El elemento básico de este tipo de medicina, es que se sustenta en las mismas conductas que el organismo emplea para remplazar por células sanas a las dañadas por diversos procesos en determinados tejidos. Ella se apoya en la terapia celular, la administración de factores bioactivos, la ingeniería de tejidos y la terapia génica^{24, 25}. Entre los factores bioactivos se encuentran los factores de crecimiento derivados de las plaquetas, los que han demostrado su potencialidad en la reparación de diferentes tejidos²⁶.

Las plaquetas contienen múltiples proteínas que ejercen acciones sobre diferentes aspectos de la reparación tisular. Actualmente, son consideradas como una bomba o coctel de moléculas bioactivas (factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas, incluso algunas moléculas aún no descritas) y de otras proteínas en proporciones fisiológicas. La hipótesis de que los factores solubles liberados por las células madre implantadas con fines regenerativos desempeñan una acción importante en la reparación y regeneración de los tejidos y las ventajas del uso de las plaquetas como fuente de FC, han sido señaladas en los últimos años²⁷.

Las plaquetas (PLTs) desempeñan un papel primordial en la cicatrización de las heridas, ya que estos fragmentos citoplásmicos además de poseer propiedades hemostáticas²⁸ también poseen propiedades proinflamatorias, reguladoras²⁹ y acciones regenerativas, las cuales están mediadas por la interacción con células (neutrófilos y células endoteliales) y por la liberación de GFs, quimiocinas y otras moléculas³⁰. Estas producen y son sensibles a una infinidad de moléculas, que permiten, en condiciones fisiológicas, la reparación e incluso la regeneración de los tejidos lesionados³¹.

Entre los pilares que sustentan la medicina regenerativa se encuentra la utilización de los factores solubles que intervienen en los procesos biológicos. La participación de los factores de crecimiento en la regeneración de diferentes tejidos ya fue demostrada, y las

plaquetas contienen una gran cantidad de factores de crecimiento (FC), que son liberados después de su activación²⁶.

Durante la activación plaquetaria se liberan los componentes de los gránulos α (alfa), estos factores liberados influyen sobre otras células. Uno de ellos es el factor de crecimiento derivado de la plaqueta (PDGF, del inglés platelet derived growth factor), potente agente quimiotáctico que estimula la proliferación celular, otro es el factor de crecimiento transformante β que estimula el depósito de matriz extracelular; ambos han demostrado tener una función significativa en la regeneración y reparación del tejido conectivo. Otros factores de crecimiento producidos por las plaquetas y asociados a los procesos curativos incluyen: factor de crecimiento básico del fibroblasto, factor de crecimiento-1 asociado a la insulina, factor de crecimiento del epitelio, factor de crecimiento del hepatocito y el factor de crecimiento del endotelio vascular³².

Es por ello que se ha empleado las plaquetas como alternativa para el tratamiento de endometritis subclínica, ya que en la actualidad el uso de los hemoderivados han resultado ser eficientes para el tratamiento de distintas alteraciones orgánicas.

HIPÓTESIS:

Dado que las plaquetas poseen mediadores químicos de procesos inflamatorios, es probable que, la aplicación intrauterina de plaquetas autólogas lisadas con ozono pueda favorecer la resolución del proceso inflamatorio de la endometritis subclínica.

OBJETIVOS:

OBJETIVO GENERAL:

- Aplicar mediante infusión intrauterina plaquetas autólogas lisadas con ozono para la resolución de endometritis subclínica en vacas lecheras.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Diagnosticar la endometritis subclínica en vacas lecheras, mediante el uso de cytobrush determinando el porcentaje de PMN-N.
- Determinar el porcentaje de PMN-N en vacas lecheras luego de la aplicación intrauterina de plaquetas autólogas lisadas con ozono en sus respectivos grupos.
- Comparar el porcentaje de PMN-N entre los grupos luego de la aplicación de plaquetas autólogas lisadas con ozono.



1. Anatomía y fisiología reproductiva de la hembra bovina

Los ovarios se encuentran en la parte más alta de la cavidad abdominal cerca de los cuernos uterinos unidos por el ligamento ovárico que forma parte del ligamento ancho, su forma es ovoide ocasionalmente planos lo que produce una variación en el tamaño de sus folículos y cuerpo lúteo. Por lo general tienen de 32 a 42 mm de longitud, 19 a 32 mm de altura y de 13 a 19 mm de ancho. El ovario está constituido por medula y corteza rodeada por epitelio superficial. La médula ovárica consiste en tejido conectivo fibroelástico irregularmente dispuesto y extensos sistemas vascular y nervioso que llegan al ovario a través del hilio, las arterias están dispuestas en una espiral bien definido. Los ovarios son glándulas que tienen básicamente dos funciones: una exocrina, que es la liberación de óvulos, y otra endocrina, que es la producción y secreción de hormonas³³.

El útero es el componente fundamental del aparato genital femenino que tiene como función el asentamiento e implantación del óvulo en caso de ser fecundado, regula la funcionalidad del cuerpo lúteo a través de la secreción de prostaglandinas F2-alfa, se encarga de producir sustancias para la nutrición del embrión, desarrolla la parte materna de la placenta. Además, modifica su tamaño y estructura para adaptarse a las necesidades del feto permitiendo su desarrollo hasta el parto, momento en que ayuda con las contracciones a la expulsión del feto³⁴.

El cuerpo del útero es cilíndrico, parece mayor de lo que es en realidad, debido a que las porciones caudales de los cuernos están cubiertas por un peritoneo común (perimetrio). Su longitud es de 2 a 5 cm. El fondo del cuerpo uterino es la porción craneal, de la cual divergen los cuernos uterinos, y se comunican cada uno independiente, por una abertura³⁵.

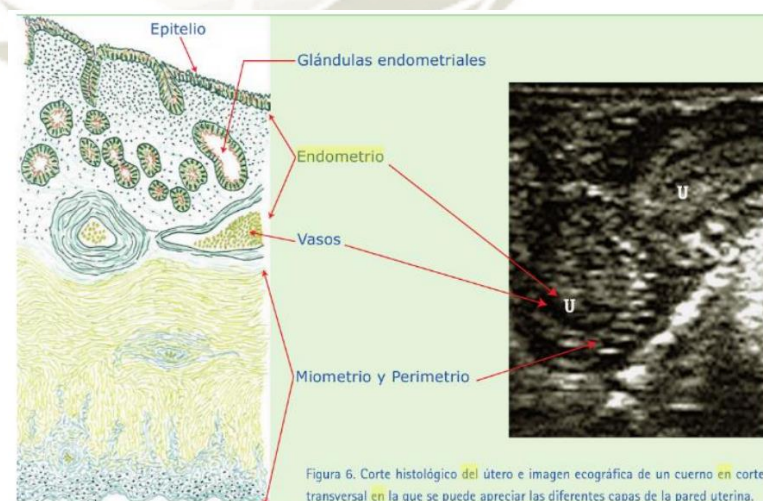
El útero se encuentra situado en la cavidad pélvica entre el recto (dorsal) y la vejiga urinaria (ventral); los cuernos uterinos pueden sobrepasar la cresta del pubis hacia el abdomen. En vacas que han estado en gestación varias veces, el útero se sitúa casi completamente en la cavidad abdominal y solo el cuello se encuentra sobre el pubis³⁶. El útero de las vacas es bipartido; cada cuerno tiene 40 cm de longitud y un diámetro de 3 cm en la porción intermedia, pero la estructura se estrecha a medida que se aproxima al oviducto³⁴. Los cuernos están orientados en dirección craneal y hacen una inflexión en tanto pasan ventral, caudal y dorsalmente, sostenidos por el

ligamento ancho. Los ligamentos anchos se fijan dorsolateralmente en la cavidad pélvica, y dorsalmente en la cavidad peritoneal. La porción fija al borde lateral de los cuernos y el cuerpo, recibe el nombre de mesometrio (mitad del útero). La presencia de fibras musculares en los ligamentos suspensorios, indica un papel activo de estos en el acomodamiento y desplazamientos del útero. El ligamento redondo se encuentra en los pliegues laterales del mesometrio y ayuda a mantener en su sitio al útero. La irrigación vascular proviene de la arteria uterina, que se origina en la aorta y se ramifica para llevar sangre al ovario, el oviducto, el cuello uterino y la vagina³⁷.

1.1 Histología del útero bovino:

La pared del útero está formada de tres capas de tejido muscular liso, dos capas longitudinales entre ellas otra capa circular y la mucosa uterina. La mucosa o endometrio, muscular o miometrio y serosa o perimetrio³⁵. Estas capas son el componente fundamental del aparato genital femenino que tiene como función el asentamiento e implantación del óvulo en caso de ser fecundado, así como el desarrollo de la placenta y el feto³⁴.

FIGURA N° 1: Corte histológico del útero e imagen ecográfica en un corte transversal en donde se puede apreciar las diferentes capas de la pared uterina¹⁵



El endometrio consta del estroma, que contiene el sistema vascular, glándulas, y un epitelio. Constituye hasta dos tercios del espesor de la pared uterina. La mucosa del útero esta provista de glándulas uterinas y de

numerosos cotiledones salientes. En el animal prepuber son muy escasas, pero se desarrollan con rapidez cuando se inicia la pubertad y la actividad hormonal³⁷. Está formado por dos capas, una superficial y otra profunda. La lámina epitelial de la mucosa presenta epitelio cilíndrico simple. En la vaca se puede encontrar porciones de epitelio de tipo cilíndrico pseudoestratificado o cúbico, dependiendo de la zona anatómica del órgano. Debajo de la lámina propia epitelial se encuentra la lámina propia submucosa de tejido conjuntivo laxo areolar muy vascularizado, donde se encuentran macrófagos, células cebadas, eosinófilos, neutrófilos, linfocitos y células plasmáticas; dentro de la lámina propia submucosa existen glándulas de tipo tubular que pueden ser simples o ramificadas, dichas glándulas están revestidas por un epitelio de tipo cilíndrico simple y proliferan durante la fase progestacional del ciclo estral; estas glándulas secretan la llamada “leche uterina” contenida principalmente por proteínas séricas, factores de crecimiento y factores inmuno-inhibidores, cuya responsabilidad es facilitar la implantación y el crecimiento embrionario³³. Las carúnculas son engrosamientos circunscriptos del endometrio libres de glándulas, que se ubican en cuatro hileras por cuerno de aproximadamente quince carúnculas cada una, y son en forma de cúpula en el caso de la vaca³⁸.

El miometrio está compuesto por músculo liso, aunque no son fácilmente discernibles, consta de dos capas: una interna circular y una externa longitudinal, entre ellas se puede reconocer una capa vascular. Las fibras musculares se continúan con las del cuello uterino y con las de los ligamentos uterinos³⁹. Dicha red es muy activa bajo la influencia de los estrógenos, en el momento del estro, lo que ayuda a los espermatozoides a ascender por el aparato reproductor. Al contraerse, producen un movimiento de amasar, que a su vez ocasiona la agitación del líquido y el transporte consecuente de los espermatozoides⁴⁰. Durante la fase lútea, cuando se produce progesterona, las fibras musculares permanecen latentes, lo que permite la fijación de las membranas embrionarias al útero y la preñez³⁷.

La capa más externa del útero es la serosa o perimetrio, compuesta por una capa fina de tejido conjuntivo laxo, algunas fibras musculares lisas y un epitelio plano mesotelial el cual se continúa con el mesotelio peritoneal. A

su vez, el perimetrio se continúa hacia los lados con los ligamentos anchos uterinos⁴⁰.

1.2 Fisiología del puerperio

Es un proceso fisiológico de modificaciones que ocurren en el útero inmediatamente luego del parto hasta la completa involución uterina y la restauración de la capacidad reproductiva⁴¹. Esta restauración del aparato reproductor comprende: Involución uterina completa, regeneración del tejido endometrial, el retorno a la ciclicidad ovárica y eliminación de la contaminación bacteriana presente en el útero⁴². La restitución fisiológica y física del aparato reproductor del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, se consideran principales aspectos de la fisiología del puerperio que ocurren simultáneamente, pero son independientes entre sí. Después del parto, el útero retoma la forma, las dimensiones y la estructura que tenía antes de la gestación. El útero es de nuevo capaz de recibir un óvulo fecundado después de tres meses tras el parto. El puerperio termina cuando los cambios del útero permiten una ovulación acompañada de celo y la formación de un cuerpo lúteo de duración normal³³.

1.3 Involución uterina

La regresión uterina comienza en los cuernos, después se extiende al cuerpo, para terminar en el cérvix, que regresa a sus características iniciales solo después de 40 - 50 días desde el parto⁴¹. Después del parto, el útero contiene las envolturas fetales junto con residuos de los líquidos fetales y de las células de origen trofoblástico y sanguíneo, las envolturas fetales son expulsadas en las 6 – 12 horas en el transcurso de la secundinización, pero el resto de elementos permanecen más tiempo en el útero, constituyendo los loquios. El útero posparto tiene un peso aproximado a los 10 kg y al completarse la involución el mismo debe llegar a un peso cercano a 1 kg; lo que ocurre en un tiempo relativamente breve, que no rebasa los 30 días los primeros cambios se producen inmediatamente después del parto, el útero disminuye la mitad de su diámetro en 5 días y a la mitad de su tamaño en 15 días asociada con esta fase de involución rápida esta la descarga de loquios⁴⁴.

El momento más anticipado del término de la involución es casi 3 semanas cuando los cuernos uterinos pueden alcanzar un diámetro de 3-4 cm. Después de este tiempo los cambios son casi imperceptibles⁴³. Sin embargo, la involución no está completa hasta las 4-5 semanas posparto con un diámetro cervical menor de 5 cm¹¹.

La involución uterina retardada es un factor importante que limita la fertilidad en la vaca. La involución se retarda por enfermedades en el posparto, que incluyen hipocalcemia, retención de placenta e infecciones uterinas (endometritis y metritis), también puede haber retardo en vacas viejas y en partos gemelares. La involución puede ser juzgada por palpación rectal (subjetiva) o por ecografía (objetiva). Aunque el diagnóstico por palpación rectal es subjetivo, la técnica se ha utilizado por muchos años, y aun se considera como una técnica muy efectiva para hacer el seguimiento de involución uterina posparto y para reconocer estructuras ováricas en la vaca⁴⁴.

1.4 Regeneración del endometrio

Después del desprendimiento del alantocorion (8 - 12 horas pospartos) se inicia el proceso de necrosis de las carúnculas y la eliminación del tejido necrótico. El principal constituyente de los loquios proviene del desprendimiento de este tejido necrótico, lo que contribuye con la rápida reducción del tamaño del útero los primeros días posparto, porque las carúnculas constituyen la mitad de su peso⁴⁴.

Los loquios son la secreción uterina que se representa durante la etapa del puerperio. Está conformado por moco, sangre, líquidos y restos de membranas fetales y de tejido materno (carúnculas). La mayor cantidad de descarga ocurre los primeros 2 - 3 días, a los 8 días está reducida y ha desaparecido a los 14 - 18 días pospartos. Esta descarga uterina en el curso de la involución cambia, desde un fluido rojizo-marrón a un material amarillo-blancuzco más viscoso¹¹.

Después de 10 días del parto la mayor parte del tejido necrótico de las carúnculas se han desprendido y a los 15 días el desprendimiento es

completo³². La revitalización de las carúnculas se completa a los 25 días. Mientras estos cambios ocurren las carúnculas se vuelven más pequeñas y a los 40 o 60 días solo miden 4 a 8 mm de diámetro y de 4 a 6 mm de ancho, comparadas con los 40 a 70 mm de diámetro y 25 mm de alto durante la preñez⁴³.

La regeneración del endometrio se inicia inmediatamente después del parto y se completa antes en áreas intercarunculares que no han sido seriamente dañadas y se requiere más tiempo para regenerar las áreas carunculares en el cuerno que ha estado grávido que en el que no lo estuvo. La regeneración epitelial está completa alrededor de los 25 días posparto, pero las capas más profundas de tejido no están completamente restauradas hasta 6 o 8 semanas posparto⁴⁵.

1.5 Reanudación de la actividad ovárica

La reanudación precoz de la actividad ovárica y la continuación de los ciclos estrales es el preludeo de una buena fertilidad tras el parto⁴¹. La primera ovulación posparto es el signo de que se ha superado el bloque producido por la preñez previa, si se produce ovulación se formará un cuerpo lúteo lo que anuncia el retorno de la ciclicidad ovárica⁴². El bloqueo se debe a los niveles elevados de progesterona durante la gestación que producen una continua retroalimentación negativa sobre la hipófisis determinando que sea refractaria a GnRH después del parto, lo que se revierte con el tiempo⁴⁴.

La emergencia periódica de ondas foliculares anovulatorias, durante la preñez ocurre en respuesta a ondas de FSH, excepto por los últimos 21 días de preñez debido a la alta concentración de progesterona y estrógeno en la sangre⁴⁵. Después del parto la concentración de las hormonas esteroides desciende a niveles basales⁴⁴.

Debido a la liberación esporádica y progresiva de GnRH se produce un incremento en la concentración del FSH plasmático, conforme la involución uterina progresa. Esto es seguido por la emergencia de varios folículos con

diámetro mayor de 4 mm, con la consiguiente selección de un folículo dominante y atresia de los subordinados⁴⁴.

El primer folículo es seleccionado alrededor del día 10 - 12 posparto. Este evento ocurre en todas las vacas independientes de enfermedad uterina, deficiencias nutricionales y ambientales⁴⁶.

Sin embargo, el primer folículo dominante tiene tres posibles destinos: ovulación y formación del primer cuerpo lúteo (retorno a la ciclicidad ovárica), atresia con la emergencia de una o más ondas foliculares sin ovulación (anestro) o la formación de un quiste ovárico. El folículo más grande del grupo adquirirá receptores de LH en las células granulosas resultando en un continuo crecimiento, mientras que los folículos subordinados regresionarán. El folículo dominante puede ovular tan pronto como a los 10 - 15 días después del parto, esta ovulación ocurre en un momento cuando el útero no está listo para una nueva concepción. El factor principal que determina el destino de los folículos dominantes es la frecuencia de pulso de LH, la ovulación generalmente ocurre cuando la frecuencia de pulso LH es uno por hora. Por lo tanto, factores que suprimen la frecuencia de pulso en el periodo posparto pueden retardar el retorno a la ciclicidad ovárica. El principal factor que causa anestro en vacas lecheras es el balance energético negativo (BEN)⁴⁷. El útero también tiene efectos específicos sobre la actividad ovárica posparto. Los folículos dominantes tienen menos probabilidad de ser seleccionados en el ovario ipsilateral al cuerno previamente grávido, pero si son seleccionados, el intervalo parto concepción se reduce. La contaminación uterina después del parto es inevitable y un alto nivel de contaminación puede deprimir la selección folicular, el efecto es mayor en el cuerno uterino previamente grávido⁴⁸.

1.6 Contaminación bacteriana

El lumen uterino se encuentra estéril antes del parto, pero durante y después del parto, las barreras físicas de la cervix vagina y vulva son comprometidas proporcionando la oportunidad para que las bacterias ascienden al tracto genital provenientes del ambiente, de la piel del animal y de las heces^{10, 45}. Esta contaminación se produce en el 90 % de las vacas y la mayoría de las

bacterias contaminantes son removidas normalmente por diversos mecanismos de defensa del útero⁴⁹.

Aunque la sangre, restos de tejido caruncular y debris celulares proveen un medio ideal para el crecimiento bacteriano, las bacterias que contaminan el útero no producen enfermedad uterina necesariamente. Que la contaminación se convierta en infección depende de la virulencia de los microorganismos de la condición del útero y de sus mecanismos de defensa¹¹.

La infección que se produce en el útero después del parto es inespecífica porque el inicio de la colonización bacteriana y los signos de la infección causados por bacterias específicas no se conocen⁵⁰, la infección implica adherencia de microorganismos patógenos a la mucosa, colonización o penetración del epitelio y/o liberación de toxinas bacterianas que conducen al establecimiento de enfermedad uterina⁵¹.

Una vaca con un posparto normal resuelve la infección uterina mediante la descarga del contenido uterino y movilización de las defensas naturales, incluyendo moco, anticuerpos y células fagocíticas⁵². El principal mecanismo involucrado en la eliminación de bacterias es la fagocitosis por leucocitos migrantes, en este sentido el retorno temprano a la ciclicidad ovárica es importante porque el ambiente uterino dominado por estrógeno es más resistente a la infección debido a que los niveles elevados de estradiol promueven la leucocitosis en el útero y en general en el tracto reproductivo¹¹.

La presencia de bacterias patógenas en el útero causa inflamación, lesiones histológicas del endometrio y retraso de la involución uterina y puede ser lo suficientemente grave como para sobrepasar los mecanismos de defensa uterina y provocar una infección que ponga en riesgo la vida del animal⁴⁵. Además, los productos bacterianos o la inflamación asociada, afectan la secreción de LH por la hipófisis y alteran el desarrollo folicular ovárico posparto, alterando la ovulación en los bovinos⁵¹.

En el 90 % de las vacas se produce desde una leve a severa endometritis durante la segunda y cuarta semana posparto⁵³.

Esta endometritis es considerada no patológica y parece ser característica de la involución uterina normal⁵⁰. La resolución de la inflamación se produce en el transcurso del tiempo, siendo restaurado en vacas normales dentro de los 40 – 60 días después del parto⁵¹.

1.7 Bacterias contaminantes del útero

En los animales vivos, existe una flora microbiana fluctuante en el útero en las primeras 7 semanas posparto debido a la contaminación espontánea, limpieza y recontaminación⁴⁵. Una variedad de especies bacterianas, gramnegativas y grampositivas, aerobias y anaerobias, la mayoría de estas contaminantes ambientales pueden ser aisladas y son eliminadas gradualmente del útero en este periodo⁵¹.

Una gran variedad de bacterias puede ser aisladas de todas las vacas durante los primeros 10 - 14 días posparto. La incidencia y especies de bacterias decrecen gradualmente conforme avanzan los días, así la presencia de bacterias es esporádica a los 20 - 35 días posparto y la cavidad uterina debe retornar a la esterilidad después de eso, aproximadamente a las 4 semanas el útero debe estar estéril en vacas normales¹⁰.

En los primeros 10 días después del parto se aislaron mayormente *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* y *Bacillus spp.* Del útero de vacas sin signos clínicos visibles. Mientras que *Archaeobacterium pyogenes*, *Prevotella melaninogenicus*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum* y *Bacteroides spp.* fueron aisladas de vacas clínicamente enfermas y se les asocia usualmente con la infección uterina en bovinos⁴⁵.

1.8 Mecanismos de defensa uterina

Dado que la resistencia eficaz a la infección es esencial, el organismo no puede depender de un único mecanismo de defensa, sino que deben estar disponibles varios mecanismos de defensa para garantizar su efectividad y seguridad⁵⁴. Los mecanismos de defensa uterinos pueden ser anatómicos, a

modo de barrera como es el cierre de la vulva y cérvix que impiden la entrada de microorganismos al útero⁵⁵. A su vez las capas circulares del musculo uterino proveen propulsión física del contenido favoreciendo la expulsión de microorganismos, esta acción es provocada por estrógenos presentes en el celo y PGF2 alfa, que tiene secreción masiva continúa en las 3 primeras semanas postparto. Las células epiteliales son las primeras en hacer contacto con los agentes patógenos potenciales y también forman parte de los mecanismos de defensa del útero^{56, 57}.

Tanto las barreras anatómicas y funcionales, así como la respuesta inmune específica y no específica son elementos fundamentales del mecanismo de defensa contra la invasión de microorganismos ambientales del tracto reproductivo de la vaca. Cualquier alteración de estos mecanismos de defensa permite a los patógenos oportunistas, mayormente microorganismos del tracto gastrointestinal posterior y que se encuentran alrededor del área perineal colonizador el endometrio y causar enfermedad uterina¹⁰.

Los cambios hormonales producidos en la fase folicular del ciclo estral, la presencia de estrógenos; aumenta la mayor migración de neutrófilos y se encuentra al útero muy resistente a infecciones⁴³ por el contrario, se torna susceptible en la fase lútea, cuando se encuentra bajo la influencia de la progesterona que reduce la migración de neutrófilos, suprime el sistema inmunológico, ocasiona atonía uterina que resulta en un útero sensible a infecciones. La formación local de anticuerpos y la influencia leucocitaria del estro, contribuyen a terminar con la mayoría de las infecciones de los ciclos estrales⁴⁶.

Los mecanismos de defensa inmunológicos están conformados por la respuesta celular cuya barrera fagocítica principal es proporcionada por la invasión de neutrófilos en respuesta al desafío bacteriano, y la respuesta humoral, es decir la protección proporcionada por los anticuerpos, pero el grado de interacción entre estas dos respuestas no es claro. Las barreras inflamatorias incluyen las moléculas no específicas de defensa tales como la lactoferrina, defensinas y las proteínas de fase aguda⁴⁵.

Existe también una respuesta inmunológica que incluye la de tipo celular y humoral⁵⁵. Los macrófagos, linfocitos, así como neutrófilos eosinófilos y células cebadas son grupos celulares que participan en la protección uterina. Kasinmanickam et al. en 2004 destacan a los neutrófilos como la primera línea de defensa ante la invasión de microorganismos patógenos en el útero durante el posparto, con una acción conocida como fagocitosis¹⁵. Esta acción polimorfonuclear a lado de los macrófagos tiene las funciones de: a) inducción y regulación de la respuesta inmune, b) fagocitosis y destrucción de microorganismos, c) eliminación de desechos⁵⁸.

La producción de sustancias inespecíficas favorece la inhibición del crecimiento bacteriano y favorecen la eliminación de microorganismos. En la respuesta celular también intervienen monocitos sanguíneos y macrófagos tisulares, su función principal es la de fagocitosis, Alrededor de 48 horas después de un parto normal los leucocitos se encuentran acumulados en el lumen uterino juntamente con las bacterias, esto marca el inicio de un proceso de limpieza y de involución normal en el útero. Las células epiteliales del útero también juegan un papel importante en la defensa uterina al ser las primeras en hacer contacto con los potenciales patógenos que invaden este órgano. Se sabe que las interacciones que se producen entre las células epiteliales y del estroma son críticamente importantes para la función endometrial y que estas células detectan y responden a las bacterias, lo cual afecta su función endocrina. Las células epiteliales luminales y glandulares del endometrio producen numerosas citoquinas. Estas citoquinas son reconocidas como los componentes principales de la comunicación entre células en el útero, que tienen patrones de liberación durante el ciclo estral y podrían estar reguladas por las hormonas sexuales. La liberación de citoquinas por el endometrio y las células del estroma producen el incremento de las secreciones del PGF2 a y PGE2. Además, las células epiteliales uterinas producen un espectro de antimicrobianos que incluyen lactoferrina, isoenzimas y complemento, que entran al lumen uterino junto con las inmunoglobulinas⁵¹.

2. Endometritis

La endometritis es la inflamación del endometrio, la capa más interna del útero, usualmente debido a la persistencia de una infección moderada o al retraso en la involución uterina^{11, 53}.

2.1 Etiología y patogenia

Esta infección se da por una gran variedad de bacterias aeróbicas y anaeróbicas, entre otros microorganismos, siendo los más comunes *Escherichia coli*, *Arcanobacter pyogenes*, *Corynebacterium bovis*, *Pseudomona spp.*, *Clostridium perfringens*, *Fusobacterium necrophorum*, *Bacterioides melaninogenicus*, *Prevotella spp.*, *Streptococcus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Staphilococcus epidermidis*, *Micrococcus spp.*, y *Herpesvirus* bovino tipo 4^{15, 23, 53, 55, 59}.

La endometritis es la inflamación del endometrio debido a la persistencia de una infección moderada o al retraso en la involución uterina. Al parecer estas infecciones bacterianas y sus toxinas hacen que se secreten concentraciones anormalmente más elevadas de prostaglandina, lo que demora el inicio del ciclo hasta que la infección ceda^{10, 60}.

Con frecuencia, las bacterias patógenas resisten a los mecanismos de defensa causando inflamación uterina, una de las principales causas de infertilidad¹¹. Esta resistencia a los mecanismos de defensa ocurre en aproximadamente un 10 % de los animales provocando una infección con la consecuente inflamación del endometrio sin afectar el resto de las tunicas²³.

La mayor parte de estas infecciones son resueltas, en general, por mecanismos de defensa del útero⁶¹. Mecanismos que pueden ser anatómicos, a modo de barrera como es el cierre de la vulva y el cérvix; o bien, inmunológicos incluyendo una respuesta de tipo celular y humoral⁵⁵.

El desequilibrio entre la infección uterina y los mecanismos de defensa antimicrobianos propios del útero pueden desencadenar el desarrollo de patologías como la metritis puerperal, piómetra, endometritis clínica, y

endometritis subclínica. Todos los procesos inflamatorios del útero afectan al endometrio, pudiendo o no extenderse al miometrio y al perimetrio¹⁰.

La inflamación de la mucosa uterina como entidad mórbida se puede clasificar, de acuerdo a su presentación, en endometritis clínica y endometritis subclínica según la presencia o ausencia de signos clínicos asociados. Así, la endometritis es la inflamación del endometrio debido a la persistencia de una infección moderada o al retraso en la involución uterina⁶².

En ausencia de signos clínicos evidentes de endometritis, las modificaciones del endometrio uterino pueden ser definidas como endometritis subclínicas⁵⁵. Sheldon y col. en 2009, a su vez, describen como característica principal de la endometritis subclínica a la presencia de PMN-N en el endometrio en ausencia de bacterias⁵⁹.

Los PMN-N provenientes de la sangre circulante, atraídos por citoquinas y quimiocinas, son los principales encargados de la eliminación de los agentes microbianos del útero en el postparto⁵⁹, pero por la disminución de la actividad fagocítica que sufren los leucocitos en el periparto se produce una mayor susceptibilidad al desarrollo de endometritis en las vacas lecheras. El balance energético negativo que padecen las vacas durante el posparto también provoca un deterioro en las funciones de la inmunidad innata dificultando la respuesta ante las infecciones uterinas en el posparto¹.

2.2 Clasificación:

Se ha propuesto una clasificación general de endometritis:

a. Endometritis Clínica: Enfermedad en la cual los animales después de los 21 días del parto presentan contenido o descarga vaginal visible, ya sea de tipo moco purulento (50 % moco + 50 % pus) o purulento (>50 % pus)¹¹.

b. Endometritis Subclínica: Definida por citología endometrial cuyo resultado indica un porcentaje de neutrófilos mayor al 18 % entre los días 21 a 33 postparto, o un resultado mayor al 10 % entre los días 35 y 47

postparto. Para esto, se realiza un conteo mínimo de 100 células endometriales, polimorfo nucleares y células escamosas¹¹.

Los animales con endometritis subclínica no muestran descargas uterinas, pero se acepta que pueden tener un grado de infección suficiente como para alterar su desempeño reproductivo¹¹.

3. Endometritis subclínica

La endometritis subclínica (ES) define como la inflamación superficial del endometrio (no más allá del *stratum spongiosum*), evidenciada por el aumento relativo (porcentaje) del número de neutrófilos polimorfonucleares (PMN; en relación a células epiteliales endometriales) en la luz uterina, sin signos clínicos visibles, pero que perjudica significativamente la fertilidad^{11, 15, 63}. La endometritis subclínica es, de hecho, una de las causas de ineficiencia reproductiva más importantes en vacas lecheras estudiadas en la última década⁶⁴ ya que juega un papel muy crítico en la industria láctea moderna, es altamente prevalente, asintomática y tiene un profundo efecto perjudicial sobre el rendimiento reproductivo^{11, 65}.

3.1 Técnicas de diagnóstico de endometritis clínica y subclínica

Entre las técnicas más difundidas se pueden mencionar la palpación transrectal, vaginoscopía, ultrasonografía, biopsia endometrial, y la citología endometrial (cytobrush y lavaje uterino). Algunas de ellas están más difundidas que otras, ya sea por su practicidad, disponibilidad y/o conocimiento. En los tambos, la técnica más utilizada y difundida es la palpación transrectal cuya realización ofrece al personal interviniente datos del útero tales como el tamaño de los cuernos, simetría, textura, tono, contenido luminal, y estructuras ováricas. Otra técnica de diagnóstico, menos empleada es la vaginoscopía, la ultrasonografía tomó importancia y difusión en los últimos años, y junto a la palpación transrectal permite observar el grosor de la pared uterina, la presencia de contenido en la luz y la existencia de diferentes estructuras ováricas. Todas las técnicas descriptas son útiles para el diagnóstico de endometritis clínica, puesto que evalúan sobre todo presencia de contenido mucopurulento en la luz uterina, así como

sus descargas y tono de los cuernos, cuerpo y cérvix, pudiendo determinar la presencia de estos signos. Por el contrario, son muy poco sensibles para detectar endometritis subclínica no permitiendo el diagnóstico de esta patología⁶⁶.

La técnica de biopsia endometrial no se utiliza de rutina en la actividad privada, pero sí ha sido reportada en estudios de investigación. Zurgilgen en 1948 realizó el primer informe en bovinos⁶⁷. El empleo de la citología endometrial consiste en la recolección de células del endometrio a través de dos técnicas diferentes: cepillado o cytobrush y lavaje uterino. Con la muestra recolectada se realiza un frotis, y una vez que éste es debidamente teñido se observa en microscopio de campo claro para su análisis. Estas últimas técnicas (biopsia y las variantes de citología endometrial) son muy sensibles para el diagnóstico de endometritis subclínica puesto que mediante el conteo de polimorfonucleares neutrófilos permite inferir la presencia de una inflamación del endometrio⁶⁶.

Las técnicas de citología endometrial son las que brindan una mayor sensibilidad y especificidad y entre ellas la de cytobrush por sus características de facilidad de aplicación, y rapidez de obtención de los resultados, es la técnica más sensible y consistente y por ende el test principal de diagnóstico de endometritis clínica y subclínica en bovinos⁶². El cytobrush, es la técnica recomendada para mejorar el diagnóstico de endometritis subclínica, también en otras especies de animales domésticos como la yegua⁶⁸.

Recientemente, describieron un nuevo método para realizar la citología que consiste en un papel adhesivo enrollado a la parte superior de un catéter de inseminación equino. Los resultados son similares a los obtenidos con el cytobrush, pero en este caso los autores observaron que las células mantienen mejor su estructura y la contaminación por glóbulos rojos era mucho menor. Incluso, indican que podría enrollarse en el catéter de inseminación, permitiendo la recogida de una muestra al mismo tiempo que se insemina la vaca. Sin embargo, dada su reciente publicación, son pocos los estudios que lo han utilizado⁶⁹.

Otra posibilidad para poner de manifiesto altos porcentajes de PMN en el útero de forma rápida, es el empleo de tiras reactivas de urianálisis que indican la presencia de leucocitos en orina. Para adaptar el método al diagnóstico de endometritis, un cytobrush de endometrio se mantiene durante 30 s en solución salina y luego la tira reactiva se introduce en la solución durante 2 s. Es un test colorimétrico cualitativo que muestra una correlación variable con la citología uterina^{70, 71}.

3.2 Técnica de Cytobrush

La técnica de cytobrush (CB) se basa en la obtención de células a partir del endometrio, mediante un cepillado de la superficie interna del útero. El cytobrush (CB) ha demostrado ser la mejor técnica para la obtención de citologías uterinas en vacas para el diagnóstico de endometritis sub clínica (ES)⁴³.

Para la obtención de las muestras, se utilizan pistoletas de acero inoxidable, a las que se le adosan en su extremo anterior cepillos estériles comúnmente usados en ginecología humana. Todo esto es protegido mediante una vaina sanitaria plástica, para evitar la contaminación del cepillo con células del cuello y de la vagina. Si bien la técnica del Citobrush ha demostrado ser consistente y eficaz para obtener muestras de las células del endometrio y realizar el examen citológico postparto en vacas lecheras⁴³, la técnica original requiere utilizar una pistola estéril para realizar la muestra de cada vaca, lo que hace la técnica muy poco práctica para su uso fuera del ámbito científico. Por lo tanto, el desarrollo de una técnica que requiera equipamiento más simple y que sea de rápida realización a campo, tal vez permitiría extender el uso del cytobrush a varios usos diagnósticos bajo condiciones de explotación comercial como pueden ser pre IA, pre transferencia embrionaria, diagnóstico de vacas repetidoras, etc⁶⁶.

Idealmente, en el caso de los trastornos uterinos, no existe tal método, aunque se ha postulado que, en el caso de las endometritis, el diagnóstico definitivo debería ser hecho en base al examen histológico de las biopsias endometriales¹¹. Existen informes que indican para la endometritis clínica (EC), una mayor correlación entre los hallazgos clínicos e histopatológicos

que los observados entre la clínica y los aislamientos bacteriológicos. Como ejemplo se podría nombrar la presencia de fibrosis peri glandular, la cual permite emitir un pronóstico desfavorable, pese a que los resultados bacteriológicos hayan sido negativos⁷².

La evaluación de la proporción de PMN en láminas de citología es el sello distintivo del diagnóstico de la ES, hasta el punto en que algunos autores se refieren a la ES bovina como “endometritis citológica” (CITO)^{73, 74}.

4. Plaquetas

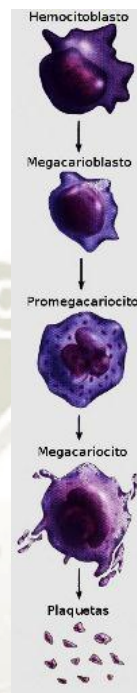
Las plaquetas son pequeños elementos sanguíneos anucleados (1-3 μm), con una membrana celular que se invagina formando los llamados sistemas canicular abierto y el tubular denso. El primero constituye una serie de canales abiertos hacia el espacio exterior que facilitan el proceso de secreción y permiten el acceso de sustancias hacia el interior de la plaqueta. El sistema tubular denso se forma de componentes del retículo endoplásmico del megacariocito y constituye el sitio principal de almacenamiento de Ca^{2+} . Inmediatamente, por debajo y alrededor de toda la membrana plasmática se presenta un haz microtubular y una red de microfilamentos con propiedades contráctiles que constituyen el citoesqueleto de la plaqueta. En el citoplasma plaquetario se encuentran mitocondrias, peroxisomas, lisosomas, partículas de glucógeno y diferentes tipos de numerosos gránulos. Los gránulos densos contienen ADP, ATP, serotonina y Ca^{2+} , mientras que los llamados gránulos α (los más numerosos), contienen sustancias vasoactivas y diversas proteínas, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante β (TGF- β), β -tromboglobulina (β -TG), fibrinógeno, los factores de coagulación FV y FVIII y proteínas de adhesión⁷⁵.

4.1 Génesis fisiología y bioquímica de las plaquetas

Los megacariocitos (MKs) son los precursores de las PLTs. Estas células se desarrollan a partir de células progenitoras mieloides multipotenciales $\text{CD}34^+$ que residen en el tejido hemopoyético y el torrente sanguíneo. Los MKs representan aproximadamente el 0,1 - 0,5 % de las células nucleadas de la médula ósea. Estas células se encuentran en la región más profunda de las sinuosidades capilares de la médula ósea y emiten prolongaciones

citoplasmáticas (proplaquetas) que están en contacto con la sangre. Estas prolongaciones son seccionadas y las PLTs son liberadas al torrente sanguíneo²⁸.

FIGURA N° 2: Formación de plaquetas ²⁸



4.2 La membrana de las plaquetas y sus receptores

La membrana de las plaquetas se compone de tres capas: glicocalix, capa fosfolipídica y submembranosa. El glicocáliz es la capa exterior que contiene receptores glicoproteicos implicados en la activación y adhesión de las PLTs. Estas glicoproteínas constituyen los antígenos de membrana de las PLTs, que se dividen en tres familias: integrinas, proteínas ricas en leucina y selectinas. Una bicapa fosfolipídica asimétrica con propiedades anticoagulantes constituye la capa central. La estructura de esta capa es idéntica a la de otras células con dominios de proteínas periféricas y transmembranales que actúan como receptores de membrana⁷⁶. La capa submembranosa contiene los microtúbulos de actina y actúa como el esqueleto que da la forma discal a la plaqueta en reposo. Esta capa interviene activamente en los procesos de señalización plaquetaria⁷⁷.

Las integrinas producen agregación y adhesión plaquetaria^{76, 78, 79}. Las integrinas están constituidas por dos subunidades, α y β , las cuales no están

ligadas covalentemente. Las integrinas están conectadas de forma interna con el citoplasma de las PLTs por una sola cola y externamente con el medio por varias subunidades con dominios extracelulares. En la parte interior las integrinas están asociadas con las proteínas de señalización (proteínas G, tirosina-quinasa) y fosfoinosítoles. La P-selectina es la principal molécula de adhesión de las PLTs y MKs. Esta glicoproteína está presente en la superficie de los gránulos α que interactúan con fibrinógeno, factor von Willebrand (vWF), fibronectina y vitronectina^{29,78,79}. La externalización de la integrina P-selectina está relacionada con la activación de las PLTs equinas⁸⁰.

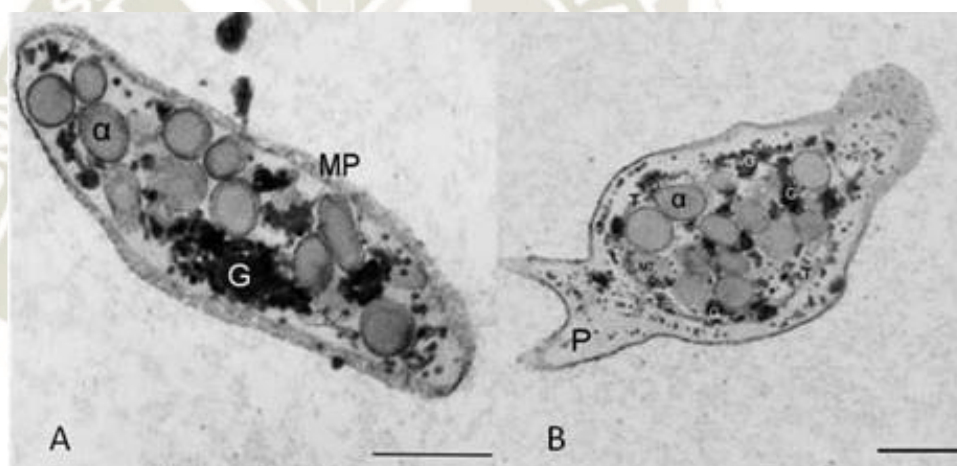
4.3 Citoplasma y gránulos de las plaquetas

La red citoplásmica de las PLTs está constituida por dos tipos de actina (globular y filamentosa). La actina filamentosa actúa como soporte estructural para diferentes gránulos plaquetarios y mitocondrias. La respuesta plaquetaria se produce por una actividad contráctil mediada por la polimerización del complejo actina-miosina. Los microtúbulos citoplasmáticos mantienen la forma discoide de las PLTs y dirigen los movimientos generados por actina-miosina^{28,79}.

Las PLTs de los mamíferos contienen tres tipos de gránulos: lisosomales, densos y alfa (α)^{29,81}. Los gránulos lisosomales contienen hidrolasas ácidas, guanina, fosfolipasas y quinasa, que actúan como enzimas proteolíticas e hidrolíticas⁷⁶. Los gránulos densos almacenan ATP, ADP, calcio, fósforo y serotonina. El ADP induce la migración plaquetaria y en combinación con la serotonina produce la contracción de las arterias lesionadas. El ATP antagoniza la acción del ADP⁸¹. Los gránulos α contienen varias moléculas (citocinas, quimiocinas, GFs, entre otras), algunas específicas para las PLTs (por ejemplo: factor plaquetario 4 y β -tromboglobulina) y otras que no son específicas para ellas, tales como la albúmina, condroitín 4-sulfato, fibrinógeno, fibronectina, trombospondina, factor V, factor Va y factor von Willebrand^{29,30}. Estas proteínas son importantes para todas las funciones plaquetarias, tales como la formación y crecimiento de trombos, modulación inflamatoria y la síntesis de matriz extracelular (ECM) durante la

cicatrización de heridas⁷⁹. Los gránulos α almacenan principalmente siete GFs directamente implicados en la cicatrización de las heridas, entre ellos: factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1), TGF- β 2, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-I) y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)^{82, 83}.

FIGURA N° 3: Micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) de una plaqueta equina normal (A) y de una plaqueta equina activada. MP: membrana plasmática. G: glicógeno. α : gránulos alfa. P: pseudópodo. MT: mitocondria. T: microtúbulos. La barra representa 1 μ m⁸⁵.



4.4 Respuesta plaquetaria

Cuando se produce lesión tisular, se dispara una fuerte interacción celular. Se producen respuestas plaquetarias independientes, tales como el cambio de forma, transformación interna, secreción de gránulos⁸⁴, formación del tapón hemostático primario y retracción del coágulo^{76, 79}. Moléculas de la superficie plaquetaria, como las integrinas, regulan la capacidad de comunicación intercelular durante la formación del tapón hemostático, la respuesta inflamatoria y los procesos de reparación de tejidos²⁹. La expresión cinética es diferente para cada tipo de gránulo plaquetario. Primero, los gránulos α liberan sus contenidos como consecuencia de estímulos de baja intensidad. Luego, los gránulos densos son activados y,

finalmente, los gránulos lisosomales liberan sus productos proteolíticos^{79, 81}. Esta cadena de eventos se conoce como “reacción de liberación plaquetaria”⁷⁸. Las plaquetas y sus proteínas secretadas, principalmente GFs y quimiocinas, disparan el inicio del proceso inflamatorio y secuencialmente coordinan el incremento o la disminución del efecto de muchas células y moléculas implicadas en la cicatrización de las heridas⁸¹.

CUADRO N° 1: Factores de crecimiento y quimiocinas contenidas en los gránulos α de las plaquetas⁸⁵.

Factor de crecimiento/ Quimiocinas y sus formas biológicas y receptores	Efectos biológicos durante la cicatrización de las heridas	Referencias
Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF). PDGF-AA, -BB, -AB, -CC y -DD. Dos receptores (PDGFRs): α y β	Este es un quimiotáctico e inductor de proliferación celular. Estimula la angiogénesis y promueve la expresión de las metaloproteínas de matriz (MMP)-1 y su inhibidor tisular (TIMP-1) en la última fase de la remodelación. Los productos de la proliferación de fibroblastos, migración epitelial, vascularización extensiva y la infiltración de neutrófilos.	Nimmi 1997, Reigstad y col 2005, Theoret 2005
Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). TGF- β 1, - β 2, - β 3. Cinco receptores (T β Rs). T β RI y T β RII son los más importantes	Regula la expresión de colágenos y fibronectina. Restringe la degradación de la matriz extracelular (ECM). Disminuye la expresión de las MMPs, promueve la síntesis de TIMPs y del factor de crecimiento de fibroblastos y la producción de angiogénesis. TGF- β 3 tiene efectos antifibróticos. Interacción con T β RI produce proliferación celular y con T β RII síntesis de ECM.	Braun y col 2002, Todorovic y col 2005, Huang y Huang 2005
Factor de	Induce la proliferación celular,	Nimmi

<p>crecimiento epidérmico (EGF). Un receptor EGF (EGFR)</p>	<p>diferenciación y motilidad. Es altamente expresado en el margen de las heridas, promueve la reepitelización. EGF induce la expresión de MMP-1 y regula el cambio de colágeno tipo I.</p>	<p>1997, Calvin 1998</p>
<p>Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). VEGF-B, -C, -D y dos proteínas VEGF. Dos receptores: VEGFR-1 y R-2</p>	<p>Promueve la vascularización de los tejidos lesionados y facilita el arribo de células inflamatorias y reparadoras. Tiene efectos sobre la proliferación de células del endotelio vascular.</p>	<p>Nimmi 1997, Ferrara 2001, Braun y col 2002, Theoret 2005</p>
<p>Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). FGF-1, -2, -4, -7, -9, -10 y -19.</p>	<p>FGF-1 (FGF básico) es una potente proteína angiogénica y controla los depósitos de ECM, puesto que inhibe la síntesis del colágeno tipo I.</p>	<p>Nimmi 1997, Braun y col 2002, Theoret 2005</p>
<p>Factor de crecimiento insulínico (IGF). IGF-I y IGF II. Dos receptores: IGF-I-R y -II-R</p>	<p>IGF es un péptido anabólico. Produce proliferación celular y depósito de ECM.</p>	<p>Harridge 2003, Frisbie y col 2000</p>
<p>Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). Proteína de unión HGF (HGF-BP)</p>	<p>Este péptido tiene efectos angiogénicos, puesto que incrementa la expresión de VEGF.</p>	<p>Catlow 2003, Anitua y col 2005</p>

Factor plaquetario 4 (PF-4). Condroitin sulfato (receptor)	Produce quimiotaxis de leucocitos y la adhesión de neutrófilos a las células endoteliales. Es un péptido antiangiogénico, puesto que interactúa directamente con FGF o VEGF mediante el bloqueo de sus receptores de superficie celular. Inhibe la apoptosis de monocitos e induce la diferenciación de estas células a macrófagos.	Mannaioni y col 1997, Boehlen y Clemetson 2001
Betatrombogl obulina (β -TG). Tres péptidos relacionados	Estas quimiocinas producen quimiotaxis de neutrófilos y degranulación plaquetaria. En el último estado de inflamación, β -TGs desensibilizan la degranulación de neutrófilos y actúan como proteínas antiinflamatorias.	Mannaioni y col 1997, Boehlen y Clemetson 2001

4.5 Métodos utilizados para la preparación de concentrados autólogos de plaquetas

Muchos dispositivos automatizados, semiautomatizados y métodos manuales se han desarrollado para la concentración de plaquetas en seres humanos^{86,87}. Estos dispositivos concentran más PLTs, leucocitos y GFs, que algunos procedimientos de aféresis⁸⁸ y el método del tubo^{83, 89}.

Todas las técnicas utilizadas para preparar APCs presentan ventajas e inconvenientes⁸⁶. Aún no se ha desarrollado un método o dispositivo ideal para concentrar plaquetas y factores de crecimiento. El sistema de aféresis requiere alta tecnología y personal experimentado y un gran volumen de sangre (> 450 mL)^{86, 88}. Sin embargo, se presenta un bajo riesgo de contaminación bacteriana durante la preparación de los APCs⁹⁰.

Los sistemas semiautomatizados (buffy coat) permiten concentrar un elevado número de PLTs y GFs en comparación con las otras dos técnicas^{86, 87, 91} y, además, el riesgo de contaminación bacteriana es menor⁹⁰ que con el método manual (tubo)⁸³. Sin embargo, estos dispositivos también concentran un elevado número de leucocitos y son costosos. Es importante señalar que la función exacta de los leucocitos en los APCs no se ha

establecido. Sin embargo, se cree que la concentración de un gran número de glóbulos blancos en los APCs podría ser perjudicial para los tejidos tratados⁹¹.

Los métodos manuales (tubo) son sencillos y baratos; sin embargo, requieren de un estricto manejo aséptico para evitar la contaminación bacteriana^{83, 89}. Las ventajas del método del tubo incluyen su simplicidad y bajo costo, mientras que los métodos semiautomatizados son costo-limitantes, ya que requieren kits y centrífugas especializadas⁹².

4.6 Fundamentos biológicos de reparación tisular

Las plaquetas y sus factores de crecimiento, poseen propiedades moduladoras y estimuladoras de la proliferación de las células derivadas de stem cell (fibroblastos, osteoblastos, células endoteliales, células epiteliales, adipoblastos, miocitos, y condrocitos, principalmente). La activación plaquetaria en respuesta al daño tisular y vascular provoca la formación de un tapón plaquetario y un coágulo hemático cuyas funciones son la consecución de la hemostasia, y la secreción de proteínas biológicamente activas involucradas en el proceso de reparación tisular. Las plaquetas empiezan a secretar activamente estas proteínas en los 10 minutos siguientes a la formación del coágulo, completando la secreción de más del 95 % de los factores de crecimiento en el plazo de 1 hora. Tras esto, las plaquetas sintetizan y secretan proteínas adicionales mientras se mantienen vivas (entre 5 y 10 días)⁹³.

CUADRO N° 2: Proteínas contenidas en los gránulos plaquetarios⁹³

GRÁNULOS DENSOS	GRÁNULOS ALFA
Serotonina	Albúmina
Histamina	Fibrinógeno
Calcio	Fibronectina
Magnesio	Vitronectina

Difosfato de adenosina	Calcitonina
Trifosfato de adenosina	Inmunoglobulinas de (IgG, IgA, IgM)
	Vascular Endotelial Growth Factor (VEGF)
	Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)
	Factor de crecimiento epitelial (EGF)
	Factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF)
	Factor de crecimiento nervioso (NGF)
	Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)
	Otros más de 300 factores de crecimiento

La activación de las plaquetas frente al daño vascular, produce la expresión y liberación de una gran variedad de citoquinas, quimioquinas y moléculas de superficie que no solo participan en la hemostasia, sino que además alertan al sistema inmune para promover el reclutamiento de leucocitos al tejido injuriado. Muchas de las moléculas con funciones inmunes son almacenadas dentro de los gránulos plaquetarios. Las plaquetas poseen tres diferentes tipos de gránulos, gránulos alfa, densos y lisosomas. Recientemente un posible nuevo tipo de gránulos ha sido descrito, denominados gránulos T⁹⁴.

Uno de los constituyentes de los gránulos alfa, que es expresado en la superficie de las plaquetas activadas, es la P-selectina, una molécula de adhesión que interacciona con la glicoproteína ligando de P-selectina (PSGL-1) expresado por las células inmunes. Esto media la adhesión de plaquetas

activadas a monocitos, neutrófilos y linfocitos, formando complejos leucocitos-plaquetas que promueven el rodado y detención de los leucocitos sobre la superficie de las plaquetas adherentes causando la inflamación vascular⁹⁵.

El rol de las plaquetas como células inmunes se debe también a la expresión en superficie de receptores para IgG (FcγRIIA), las proteínas co-estimuladoras del sistema inmune CD40 y CD40L y numerosos TLRs⁹⁶. Las plaquetas expresan únicamente el receptor FcγRIIA, de baja afinidad para IgG. A través de este receptor las plaquetas pueden unir complejos inmunes y funcionar como vehículo de traslado de estos complejos para su destrucción por fagocitos⁹⁷.

También tienen actividad bacteriostática frente a un gran número de cepas bacterianas y fúngicas⁹⁸.

4.7 Usos de las plaquetas en diferentes especialidades

En la literatura internacional actual, las plaquetas se emplean con fines regenerativos en diferentes especialidades y situaciones clínicas con resultados francamente positivos o muy prometedores. Algunas de ellas se relacionan a continuación^{26, 99}:

- **Angiología:** insuficiencia arterial periférica, pie diabético, úlceras vasculares;
- **Ortopedia:** fracturas óseas complejas, retraso de la consolidación de fracturas, defectos óseos, pseudoartrosis, osteoartrosis, rupturas de meniscos, epicondilitis, tendinitis y peritendinitis, artrodesis de cuerpos vertebrales, lesiones de ligamentos, fascitis plantar, lesiones musculares;
- **Estomatología y cirugía maxilofacial:** defectos periodontales (retracción gingival y otros), endodoncia, regeneración alveolar, cirugía dentoalveolar, implantología, comunicaciones buconasales, relleno de defectos óseos, prevención de la alveolitis seca después de la exodoncia de terceros molares;

- Dermatología: cicatrización epitelial, úlceras crónicas, úlceras de decúbito, escaras, quemaduras; Cirugía estética: rejuvenecimiento facial, blefaroplastias, reconstrucción mamaria;
- Oftalmología: lesiones de córnea, ojo seco, síndrome de disfunción de la superficie ocular tras cirugía refractiva, queratoconjuntivitis bacteriana, queratitis recurrente, síndrome de Sjögren, enfermedad injerta contra huésped oftálmica severa post trasplante, después de la cirugía refractiva ocular con láser;
- Medicina deportiva: lesiones relacionadas con la práctica deportiva, principalmente de tendones y ligamentos, musculares por sobre uso y articulares.

4.8 Métodos de activación plaquetaria

Las plaquetas deben liberar gránulos citoplasmáticos, que son los que contienen los factores de crecimiento (FC) y los metabolitos activos. Hay diversas formas de activación del PRP¹⁰⁰:

- Congelación, consiste en congelar y descongelar el plasma. Cuando se congelan las plaquetas se lisan y liberan los factores de crecimiento presentes en ellas.
- Sonificación, se debe aplicar ultrasonidos a la suspensión celular, destruyendo las membranas celulares.
- La ozonización del plasma promueve la agregación plaquetaria acentuando la liberación de los factores de crecimiento con una jeringa que contenga ozono se aspira el plasma en la misma jeringa, procediendo a la infiltración con el ozono y el PRP.
- Adición de sustancias:
 - Gel de fibrina, que actúa como malla para permitir el avance de los factores de crecimiento.
 - Cloruro de calcio (CaCl_2), es una de las técnicas más utilizadas por los médicos veterinarios hoy en día; se debe añadir 50 $\mu\text{l/ml}$ de plasma, para activar las plaquetas y coagular el fibrinógeno, de manera que el plasma inicia una fase dinámica de coagulación, que finaliza con la retracción del coagulo¹⁰⁰.

5. Antecedentes bibliográficos:

5.1 Efectos del plasma rico en plaquetas en un modelo de inflamación endometrial bovina *in vitro*.

Las células endometriales bovinas se cultivaron hasta el pase (P) 10 con 5 % o 10 % de PRP. Efecto de PRP en la proliferación de células endometriales y en la expresión de genes [prostaglandina-endoperoxidasa 2 (*COX2*), proteína tumoral p53 (*TP53*), receptores de estrógenos (*ER- α* y *ER- β*), receptor de progesterona (*PR*) y *c-Myc*] involucrado en la regulación del ciclo del estrógeno y la interacción fetal-materna fueron evaluados. Además, para evaluar la capacidad de PRP para contrarrestar la inflamación, se usaron 10 y 100 ng/ml de lipopolisacárido de endotoxina bacteriana (LPS) para inflamar las células endometriales *in vitro* durante 1, 6, 12, 24 y 48 h. La expresión de genes como la interleucina 1 β (*IL-1 β*), interleucina-8 (*IL-8*), óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), prostaglandina-endoperoxidasa 2 (*COX2/PTGS2*) y la liberación de PGE-2, IL-1 β e IL-8¹⁰¹.

El tratamiento *in vivo* con PRP aumentó la detección de PR. *In vitro*, el 5 % de PRP en el pase 5 aumentó la tasa de proliferación e indujo un aumento significativo en la expresión de todos los genes estudiados. Además, los resultados revelaron que 10 ng/ml de LPS es la dosis más efectiva para obtener una respuesta inflamatoria, y que el tratamiento con PRP regulaba significativamente la expresión de genes proinflamatorios¹⁰¹.

5.2 Hallazgos clínicos uterinos, tasa de fertilidad, migración de leucocitos y niveles de proteína COX-2 en el tejido endometrial de yeguas susceptibles tratadas con plasma rico en plaquetas antes y después de la IA.

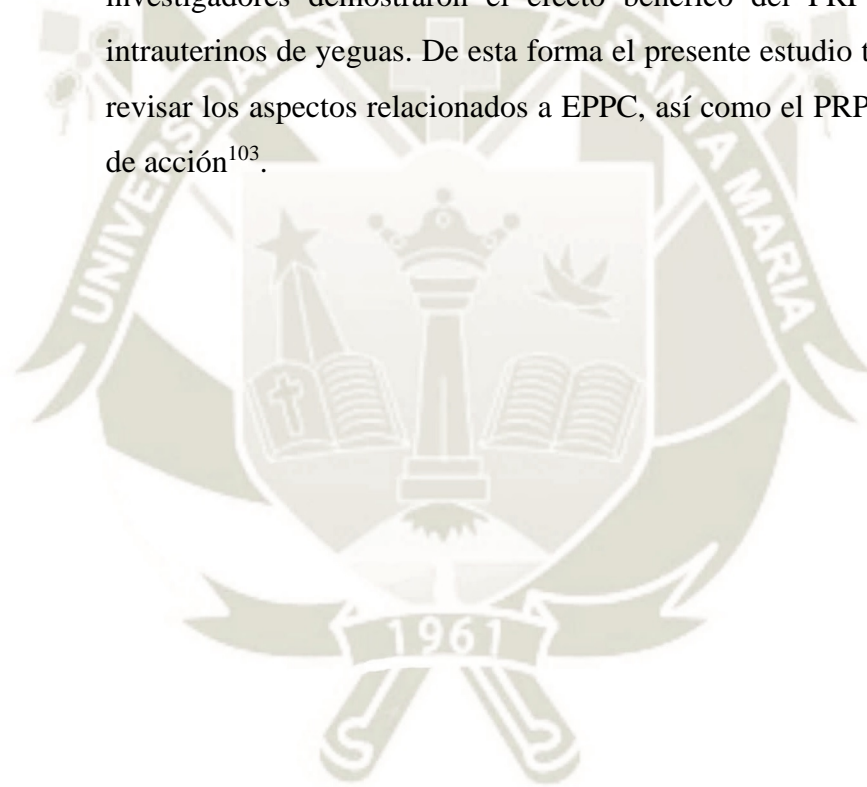
La endometritis persistente inducida por el apareamiento (PMIE) da como resultado una disminución de la fertilidad en los caballos, lo que causa un impacto significativo en el mercado de caballos. El plasma rico en plaquetas (PRP), un modulador de la respuesta inflamatoria, se ha utilizado en gran medida en medicina veterinaria. Aquí, investigamos los efectos de PRP sobre la inflamación uterina, la tasa de concepción, la migración de

neutrófilos polimorfonucleares endometriales (PMN) y los niveles de proteína COX-2 en el tejido endometrial. Se utilizaron trece yeguas susceptibles a PMIE para la inseminación artificial (IA). Las yeguas fueron inseminadas con semen fresco en tres ciclos consecutivos en un estudio cruzado diseño. Se utilizaron las siguientes clasificaciones de ciclo: ciclo de control, sin interferencia farmacológica; pre-AI, se infundieron 20 ml de PRP 24 h antes de AI; y después de la IA, se infundieron 20 ml de PRP cuatro horas después de la IA. La dinámica folicular se monitoreó diariamente por ultrasonido transrectal. Cuando se detectó un folículo mayor de 35 mm, se indujo la ovulación con acetato de deslorelina (1 mg, Im). La IA se realizó 24 h después de la inducción de la ovulación. El líquido intrauterino (FLU) se evaluó por ultrasonografía antes y 24 h después de la IA. También se observaron PMN en citología uterina (CYT) y biopsia (HIS) antes y 24 h después de la IA. El embarazo se determinó dentro de los 14 días posteriores a la ovulación. El número de células COX-2 positivas se evaluó mediante inmunohistoquímica. Ambos tratamientos PRP resultaron en una disminución de PMN en el CYT después de la reproducción en comparación con los controles. FLU no difirió entre ciclos; sin embargo, las tasas de concepción fueron significativamente más altas en las yeguas PRP. Las yeguas positivas para endometritis disminuyeron en ambos grupos de tratamiento, y se observó un marcado positivo más intenso de COX-2 en el grupo de control en comparación con los dos grupos de tratamiento. En conclusión, PRP reduce beneficiosamente la respuesta inflamatoria en yeguas PMIE independientemente de cuándo se administraron los tratamientos, lo que aumenta las posibilidades de un embarazo exitoso¹⁰².

5.3 Efecto del plasma rico en plaquetas pre y post inseminación artificial sobre la respuesta inflamatoria e índice de fertilidad en yeguas resistentes y susceptibles a endometritis persistente post cobertura.

La endometritis persistente pos-cobertura (EPPC) es la principal causa de reducción de fertilidad en yeguas, causando impactos importantes dentro del mercado del caballo. Los tratamientos comúnmente utilizados para EPPC visan apenas minimizar los factores predisponentes a su instalación, no

actuando directamente en el proceso inflamatorio. Con un intento de reducir la respuesta inflamatoria, estudios recientes han demostrado un aumento de fertilidad en los animales afectados por EPPC, cuando se utiliza agentes inmunomoduladores. El PRP es modulador de respuesta inflamatoria que está siendo largamente utilizado en medicina veterinaria. Este concentrado de plaquetas contiene diversos factores de crecimiento que actúan directamente en los mediadores inflamatorios, reduciendo el proceso y promoviendo reparación tisular. El PRP es benéfico en el tratamiento de inflamaciones tendinosas y osteoarticulares, modulando la inflamación y acelerando la regeneración de tejido lesionado. Más recientemente algunos investigadores demostraron el efecto benéfico del PRP en tratamientos intrauterinos de yeguas. De esta forma el presente estudio tiene por objetivo revisar los aspectos relacionados a EPPC, así como el PRP y su mecanismo de acción¹⁰³.





**CAPÍTULO II:
METODOLOGÍA**

6. MATERIALES:

- Microscopio óptico
- Láminas portaobjetos
- Caja porta láminas
- Kit de tinción de Diff-Quick:
 - ✓ Fijador metanol
 - ✓ Solución 1 (Xanténicos).
 - ✓ Solución 2 (Tiazínicos)
- Aceite de inmersión
- Ozonificador
- Centrífuga
- Vaso Coplin
- Tanque de oxígeno portátil
- Tubos Falcon estériles de 15 mL

Materiales para colección de muestras:

- Cytobrush (cepillo citológico)
- Citofijador (metanol)
- Pistola de inseminación artificial modificada
- Pipetas obstétricas modificadas
- Guantes obstétricos
- Camisas sanitarias
- Tablero con fichas de observación
- Algodón
- Alcohol
- Guantes de Nitrilo
- Wypale
- Clorhexidina al 4 %
- Aguja doble punta N° 20
- 2 Holders
- Jeringas de 5, 10, 20 y 60 mL
- Tubos con citrato de sodio al 3.2 % de 3.5 mL

- Cloruro de sodio al 9 %
- Marcadores indelebles delgados
- Mesa para instrumental
- Sogas
- Botas de jebe
- Tijeras
- Computadora
- Cámara digital
- Impresora
- Celular

7. MÉTODOS:

Se evaluaron 4 tratamientos, tomándose un total de 12 vacas con endometritis subclínica de 3er y 4to parto de un solo establo, subdivididas en 4 grupos de 3 vacas cada uno y se les asignó un grupo mediante aleatorización simple.

Grupo 1 (T1): 3 vacas tratadas con 5 mL de plaquetas autólogas lisadas con ozono mediante infusión intrauterina por única vez.

Grupo 2 (T2): 3 vacas tratadas con 5 mL de plaquetas autólogas lisadas con ozono mediante infusión intrauterina 2 veces con un intervalo de 3 días.

Grupo 3 (T3): 3 vacas tratadas con 10 mL de plaquetas autólogas lisadas con ozono mediante infusión intrauterina por única vez.

Grupo 4 (T4): 3 vacas tratadas con 10 mL de plaquetas autólogas lisadas con ozono mediante infusión intrauterina 2 veces con un intervalo de 3 días.

Las vacas lecheras con endometritis subclínica tuvieron las mismas condiciones que corresponden a rutina de crianza de establo, ubicación, ambiente, genética y alimentación.

Para la recolección de datos se utilizó la técnica de observación de campo y de registros; para el diagnóstico de endometritis subclínica se determinó el porcentaje de Polimorfonucleares - Neutrófilos.

Los datos fueron procesados utilizando el programa SPSS.15.0.1, se utilizó el análisis de varianza para establecer diferencias significativas entre los tratamientos a través del test de Fisher con $\alpha=0.05$. Para el caso de los tratamientos que mostraron diferencias significativas se utilizó el test de Tukey.

Método de diagnóstico de Endometritis Subclínica

Para el diagnóstico de la endometritis subclínica, se realizó la técnica de citología endometrial por el método de *Cytobrush*⁶⁶ en todas las vacas que mostraron estar entre 130 y 168 días post parto, siendo ellas 12 vacas las cuales resultaron ser positivas a la endometritis subclínica, tal como se detalla a continuación.

Método de toma de muestras de citología endometrial: Técnica del cepillado con *Cytobrush* modificado

Previo a la realización de la toma de muestra correspondiente, se realizó una cuidadosa limpieza de la zona perineal y de la vulva con solución yodada y paños de limpieza (Wypall).

Se comenzó con una palpación transrectal de los órganos genitales internos (ovarios, cuernos, cuerpo y cuello del útero) de la vaca, utilizando el brazo izquierdo enguantado y lubricado con vaselina líquida. Al mismo tiempo, dirigido mediante el brazo derecho, se introdujo en el útero por vía vaginal el instrumental necesario para la toma de muestra. El mismo que estuvo conformado por un citocepillo vaginal desechable (Mediplast) modificado, al cual se le extrajo la espátula para enroscarle un palito plástico cortado en su mango aproximadamente a 4 cm de largo esterilizado con luz ultravioleta y sujetado al mandril de una pistola o jeringa de inseminación de acero inoxidable universal. Se reemplazó parte externa de la pistola por una pipeta, a la cual se le aumentó el diámetro de la punta con ayuda de una broca N° 5/32 a lo largo de 8 cm aproximadamente, seguidamente se limó la punta con lijar de agua para eliminar los filos cortantes. Para proteger la pistola de la contaminación vaginal, la misma fue cubierta con una camisa sanitaria, para hacerla pasar a través del cérvix, en la base del cuerno de mayor tamaño, en caso de notar diferencias entre ambos por palpación y sino, en uno de los cuernos al azar. En este sitio, se realizó la presión del mandril para exponer el cepillo de la pipeta y se giró una vuelta completa (360°) en el mismo en sentido de las agujas del reloj

rozando las cerdas suavemente la mucosa uterina y colectando así la muestra necesaria⁶⁶. Seguidamente, se retrajo el cepillo dentro de la pipeta y se retiró del útero y vagina la pistola de inseminación. Una vez fuera del animal, se descartó la funda, se expuso nuevamente el cepillo y se rodó suavemente sobre un portaobjetos limpio, desengrasado y debidamente rotulado con el número que se asignó a la vaca y la fecha de toma de las muestras. Inmediatamente los frotices fueron sumergidos 5 veces por 1 segundo cada vez en metanol para fijar la muestra. Finalmente, las láminas fueron almacenadas en cajas transportadoras con una capacidad para 50 portaobjetos, para protegerlas del polvo y trasladarlas hasta el laboratorio donde se realizó la tinción comercial (Diff Quick).

Método de tinción de muestras de citología uterina: Método de Diff Quick⁶⁶

La tinción de Diff Quick, es un colorante de inmersión, por lo que cada componente se debe preparar en un frasco de Coplin o cualquier otro recipiente para tinción de este tipo, para lo cual se realiza el siguiente procedimiento:

1. Sumergir la laminilla en la solución I por 5 veces (5 inmersiones de 1 segundo cada una) y dejar escurrir el exceso de colorante.
2. Sumergir la laminilla en la solución II por 5 veces (5 inmersiones de 1 segundo cada una). Dejar escurrir el exceso de colorante.
3. Enjuagar la laminilla con agua destilada o des ionizada.
4. Dejar secar y examinar.

Nota:

Si se desea una tinción total más intensa se debe aumentar el número de inmersiones en las soluciones I y II.

- Para una tinción más pálida, se disminuye el número de inmersiones en las soluciones I y II pero nunca se debe hacer menos de 3 inmersiones de un segundo cada una.
- Para incrementar la tinción eosinófila se aumenta el número de inmersiones en la solución I.
- Para incrementar la tinción basófila se aumenta el número de inmersiones en solución II.
- Las soluciones deben ser renovadas cada semana.

Las láminas obtenidas fueron observadas y analizadas con un microscopio óptico a un aumento de 40X y contando el total de células presentes en el campo (células epiteliales y células inflamatorias), a partir de las cuales se determinó la proporción de células inflamatorias (polimorfo nucleares neutrófilos). Para determinar el grado de inflamación de la mucosa uterina, se calcula el porcentaje de polimorfo nucleares neutrófilos (% PMN-N), mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ PMN} - \text{N} = \frac{n \text{ PMN-N}}{C.T.} \times 100$$

Dónde:

% PMN-N : Porcentaje de Polimorfo Nucleares Neutrófilos

n PMN-N : Cantidad de Polimorfo Nucleares Neutrófilos presentes en la preparación .

C. T. : Células Totales presentes en la preparación (células epiteliales y PMN-N).

Método de extracción sanguínea

Para la extracción sanguínea de la vena coccígea media se realizó el siguiente procedimiento:

1. Se rotuló el tubo con marcador indeleble.
2. Se empató la aguja doble punta en la funda o camisa.
3. Se sujetó la cabeza del animal con una la ayuda de un cabezal, o lazos.
4. Se levantó la cola del animal con suavidad hasta casi colocarla casi en posición vertical, sujetándola en el tercio medio, inmediatamente se procedió a limpiar los residuos de materia fecal de la zona con papel o algodón, luego con la mano libre se localizó por palpación la vena coccígea media en la línea media, justo caudal de la inserción de los pliegues de la piel de la cola a nivel del espacio entre las vértebras coccígeas 6-7.
5. Luego de colocarse los guantes se procedió a realizar la antisepsia con alcohol 96 %, en una zona de piel de unos 10 cm de diámetro alrededor del sitio de punción, para lo cual se comenzó por el centro y se hicieron círculos concéntricos hacia el exterior y se dejó actuar 1-2 minutos,
6. Seguidamente, se encajó el tubo en la funda o camisa sin perforarlo.

7. Se insertó la aguja craneal a la protuberancia ósea del proceso laminar en la línea media a una profundidad de 8- 12 milímetros en ángulo recto, hasta que la sangre empezó a brotar, se estabilizó la funda y la aguja con la mano, colocando el pulgar de la otra mano en la parte inferior del tubo y los dedos índice y medio en las aletas de la funda, presionando con el pulgar y el dedo índice el uno contra el otro, se forzó al tapón de goma, introduciendo la aguja en el tubo para que la sangre fluyera dentro del mismo, manteniendo la funda estable, hasta consumir todo el vacío y se retiró el tubo. Sin retirar la aguja, se encajaron los siguientes tubos en la camisa hasta obtener la cantidad de sangre requerida.
8. Inmediatamente después de extraer la sangre en cada tubo, se procedió a invertir 30 veces el tubo suavemente para que la sangre y el anticoagulante se mezclen.
9. Para retirar la aguja y se ejerció presión sobre la zona de punción con algodón por unos segundos.

La cantidad total de sangre extraída fue: 10 tubos de 3.5 mL con citrato de sodio al 3.2% por vaca a un grupo de 6 vacas y 20 tubos de 3.5 mL con citrato de sodio al 3.2% por vaca al otro grupo de 6 vacas.

Método de centrifugado simple en tubo

Los tubos con sangre fueron centrifugados a 5000 rpm por 10 minutos. La centrifugación permitió separar la sangre en tres fases: volumen globular aglomerado (VGA), capa leucocitaria y plasma. El plasma fue recolectado en jeringas de 20 mL con aguja N° 21G X 1½". El total de plasma obtenido de 6 vacas fue 15 mL de cada una correspondiente a los grupos (T1 y T3), del otro grupo de 6 vacas (T2 y T4) se obtuvo 30 mL de cada una.

Método de lisado plaquetario

El plasma obtenido de cada vaca se depositó en tubos Falcon estériles previamente rotulados y se procedió a la ozonificación del plasma durante 10 minutos para promover la degranulación plaquetaria y acentuar la liberación de los factores de crecimiento.

Método de aplicación de plaquetas lisadas con ozono mediante infusión intrauterina

- Para las vacas que conforman el grupo 1: Karen, Naira e Ilaria, se disolvió 5 mL de plaquetas autólogas lisadas con ozono obtenidas, en 100 mL de cloruro de sodio 9 ‰ mediante la utilización de 2 jeringas de 60 mL por única vez.
- Para las vacas que conforman el grupo 2: Norma, Génesis y Sally, se disolvió 5 mL de plaquetas autólogas lisadas con ozono obtenidas, en 100 mL de cloruro de sodio 9 ‰ mediante la utilización de 2 jeringas de 60 mL y se realizó el mismo procedimiento 3 días después de la primera infusión intrauterina.
- Para las vacas que conforman el grupo 3: Royal, Siria y Yahaira, se disolvió 10 mL de plaquetas autólogas lisadas con ozono obtenidas, en 100 mL de cloruro de sodio 9 ‰ mediante la utilización de 2 jeringas de 60 mL por única vez.
- Para las vacas que conforman el grupo 4: Daniuska, Isaura y Lea, se disolvió 10 mL de plaquetas autólogas lisadas con ozono obtenidas, en 100 mL de cloruro de sodio 9 ‰ mediante la utilización de 2 jeringas de 60 mL y se realizó el mismo procedimiento 3 días después de la primera infusión intrauterina.

Seguidamente se realizó la limpieza y desinfección correspondiente a la zona perineal y de la vulva con solución yodada y paños de limpieza (Wypall). Utilizando el brazo izquierdo enguantado y lubricado con vaselina líquida, se comenzó con una palpación transrectal de los órganos genitales internos (ovarios, cuernos, cuerpo y cuello del útero) de la vaca, Al mismo tiempo, dirigido mediante el brazo derecho, se introdujo en el útero por vía vaginal la pipeta cubierta por una camisa sanitaria, cuando se alcanzó la entrada del cuello uterino, inmediatamente antes de progresar hacia su interior del cuerpo uterino, jalé desde fuera del extremo proximal de la camisa sanitaria, rompiendo así el extremo distal de la misma y permitiendo que el extremo de la pipeta asome por fuera de ella. En este momento de empezar a progresar mediante el extremo de la pipeta, libre de la camisa, a través del cérvix uterino, hasta alcanzar la luz del cuerpo, donde se depositó el

contenido de las dos jeringas previamente preparadas para cada una de las vacas y se procedió a retirar la pipeta para desecharla debidamente.

El plasma restante se conservó en refrigeración a 4 °C durante 3 días, para la segunda aplicación a las vacas del grupo 2 y 4.

Método de obtención de muestras

Tres días posteriores a la primera aplicación intrauterina de plaquetas lisadas con ozono, se realizó la técnica de *Cytobrush* a cada una de las 12 vacas para hacer el conteo de PMN-N y evaluar la eficiencia del tratamiento. Para lo cual se fijaron 3 muestras de cada una de las vacas en portaobjetos previamente rotulados con el número que se le asignó a cada vaca y la fecha de la toma de muestra.

A los tres días de la segunda aplicación intrauterina de plaquetas lisadas con ozono, se volvió a realizar la técnica de *Cytobrush* a cada una de las 12 vacas de los grupos, siguiendo el procedimiento del muestreo anterior.

Método de interpretación de resultados

Para la interpretación de resultados se empleó los valores que a continuación se detallan, considerando uno de los rangos establecidos por Madoz et al. 2013, en el cual menciona que ≥ 7 semanas, la cantidad para declarar positiva con endometritis subclínica a una vaca es de >4 % de polimorfo nucleares - neutrófilos, en el estudio se tomaron los días entre 130 – 168 que está dentro de los parámetros descritos.

CUADRO N° 3: Prevalencia de endometritis subclínicas diagnosticadas mediante citología endometrial en función de la semana del postparto en la que se hizo el diagnóstico, del punto de corte y de la técnica empleada para obtener la muestra¹⁰³

Cytobrush	3 ^a -5 ^a (%)	5 ^a -7 ^a (%)	≥7 (%)	Punto de corte (%)
Lopdell <i>et al.</i> , 2011	35,0			> 18,0
Kasimanickam <i>et al.</i> , 2004	35,1			> 18,0
Heidarpour <i>et al.</i> , 2012	13,5			> 18,0
Kaufmann <i>et al.</i> , 2010	12,4			> 18,0
Barrio <i>et al.</i> , 2014	17,6			> 18,0
Madoz <i>et al.</i> , 2013	21,5			> 8,0
Dubuc <i>et al.</i> , 2010	19,3			> 6,0
Plöntzke <i>et al.</i> , 2010	38,0			> 5,0
Lopdell <i>et al.</i> , 2011		7,0		> 18,0
Kasimanickam <i>et al.</i> , 2004		34,0		> 10,0
Barlund <i>et al.</i> , 2008		11,8		> 8,0
Madoz <i>et al.</i> , 2013		16,0		> 6,0
Plöntzke <i>et al.</i> , 2010		19,0		> 5,0
Barrio <i>et al.</i> , 2015		14,9		> 5,0
Madoz <i>et al.</i> , 2013			16,0	> 4,0
Dubuc <i>et al.</i> , 2010			11,1	> 4,0
Lavado				
Hammon <i>et al.</i> , 2006	51,8			> 25,0
Barlund <i>et al.</i> , 2008	15,8			> 8,0
Gilbert <i>et al.</i> , 2005		53,0		> 5,0
Cheong <i>et al.</i> , 2011		25,9		> 10,0
Citotape				
Pascottini, 2016 (en momento de la IA vacas)			27,8	≥ 1
Pascottini, 2016 (en momento de la IA Novillas)			7,86	≥ 1

8. CAMPO DE VERIFICACIÓN:

8.1 Ubicación Espacial

El presente estudio se desarrolló en el Distrito de Majes, Provincia de Caylloma, Departamento de Arequipa; El Distrito de Majes se encuentra a una altitud de 1410 m.s.n.m.

Climatología

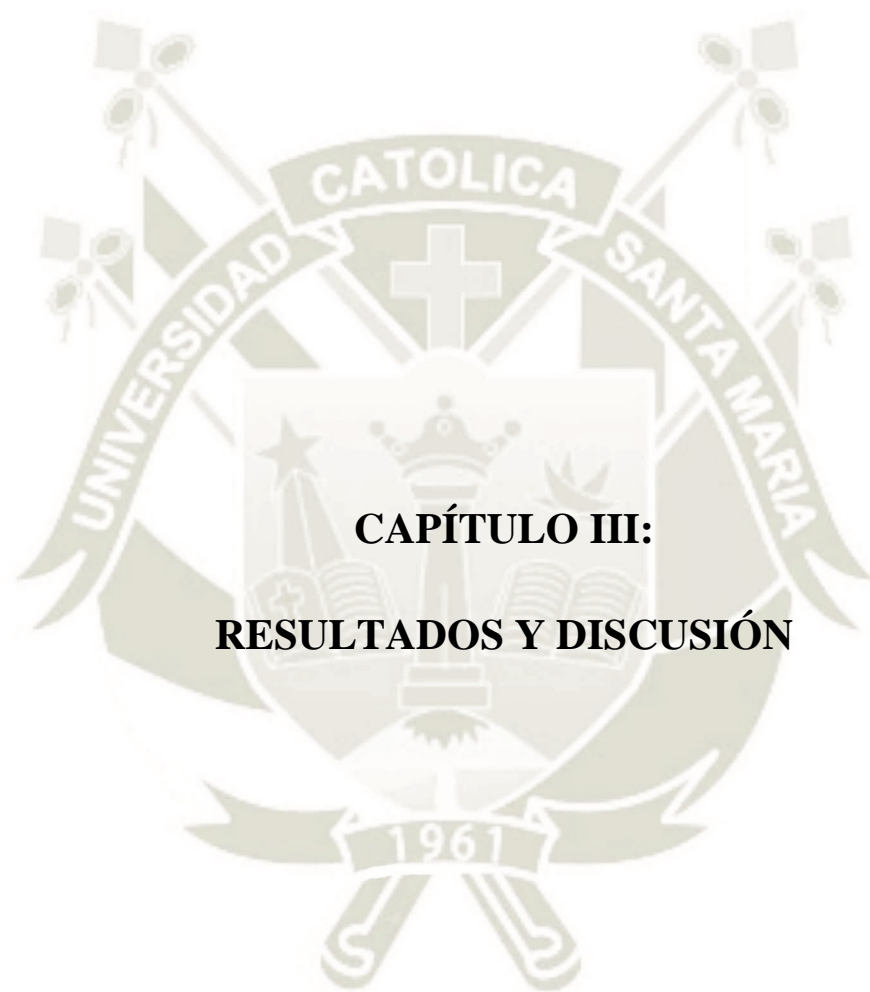
Su temperatura promedio es de 16.1 °C, (con una mínima de 8.2 °C y máxima de 24 °C), con una humedad relativa mayor de 40 % y menor de 70 % y precipitación 0 mm.

Geográficamente ubicado en:

- 16° 20' 08,35'' Latitud Sur
- 72° 09' 09,56'' Longitud Oeste⁶⁶

9. UNIDADES DE ESTUDIO:

Vaca lechera, cantidad total 12 vacas, distribuidas en 4 grupos o tratamientos de 3 unidades para la comparación de T1, T2, T3 y T4.



**CAPÍTULO III:
RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

1. Diagnóstico de endometritis subclínica en vacas lecheras, mediante el uso de Cytobrush.

TABLA N° 1: Porcentaje de PMN-N en vacas lecheras con endometritis subclínica del Distrito de Majes - 2018

n	PROMEDIO RECuento DE PMN-N	D.S	VALORES EXTREMOS	
12	8.2	5	4.5	22.7

n = Número de muestras

D.S = Desviación estándar

Fuente = Elaboración propia

En la tabla N° 1 se aprecian los resultados obtenidos del porcentaje PMN-N encontrados al realizar la lectura de las láminas que contenían las muestras citológicas adquiridas haciendo uso de la técnica del *Cytobrush*. En el promedio general enfocado en porcentaje de PMN-N hallados, se demostró que todos los objetos de estudio son positivos a endometritis subclínica.

Es necesario indicar que los puntos de corte utilizados en relación al porcentaje de PMN-N considerados para el diagnóstico, diferían entre distintos estudios (entre el 3 % y el 10 %) ¹⁰³. En el presente estudio las observaciones realizadas son similares a las descritas por Kasimanickam et al., (2004) y Sheldon et al., (2006), quienes consideran a una muestra positiva cuando el número de PMN-N es superior al 5 %. El valor de corte obtenido para PMN N de >5,10 % se encuentra cercano al 5.00 % de PMN-N recomendado por la publicaciones de Gilber y col. (2005) ¹⁶. Asimismo el porcentaje obtenido es similar al reportado en investigaciones de endometritis subclínica manifestado por Madoz (2012) quien reporto un 5 % de PMN-N en 21 – 62 DEL ¹³. En un estudio realizado por Arenas (2015) se demostró que en la Irrigación Majes el nivel de corte de PMN-N hallado fue de >5,10 % con una sensibilidad de 77,55 % y una especificidad de 38,89 % en el rango de 21 a 56 DEL para el diagnóstico de ES mediante la técnica de citología endometrial, técnica validada como método de diagnóstico de endometritis subclínica ⁶⁶.

Los valores de corte reportados en los diversos trabajos de investigación indican que, en las vacas normales el porcentaje de PMN - N no debería superar el 5 %, puesto que más allá de este umbral comenzaría a disminuir la eficiencia reproductiva en las vacas lecheras, incrementando el Intervalo Parto Concepción (IPC). A pesar de que estos valores de corte son los aceptados por la mayoría de los

investigadores no existe consenso total, variando los valores de corte entre 4 y 25 % PMN-N; basadas en estas diferencias, las interpretaciones y comparación de resultados entre diferentes estudios se hace controversial⁷⁴. La información vertida es similar a la referida por Barlund et al., (2008), en la cual menciona que la técnica de citocepillo es el método más preciso para el diagnóstico de endometritis, debido a que se obtiene no sólo un mayor número de células sino también muy bien preservadas en cada muestra, lo que hace de ésta una prueba de gran confianza y de resultados repetibles, tanto para tomar de cérvix y de pared uterina, por lo cual, este mismo método se realizó para obtención de muestras de las vacas que se sometieron a estudio en la presente investigación, considerando a esta técnica como la alternativa más confiable para la detección de enfermedades subclínica en vacas a los 130 - 160 días post parto⁶⁵.

Un proceso inflamatorio en el útero causa la migración masiva de PMN hacia él, ya que constituyen la primera línea de defensa frente a la infección¹⁰⁴. El desarrollo de una infección uterina dependerá de la respuesta inmune de la vaca y de la especie y el número de los microorganismos implicados¹¹. Debido a esto, durante los primeros días del postparto, la cantidad de PMN en el útero es muy elevada y a medida que avanza el postparto y el útero involucre se reduce su cantidad junto con la contaminación, salvo que se haya instaurado una infección uterina¹⁰⁴. El endometrio de la vaca posee poderosos mecanismos de defensa que lo protegen de agentes invasivos inespecíficos, comenzando por la cubierta de células epiteliales pseudoestratificadas, químicamente por el moco secretado por las glándulas endometriales e inmunológicamente por la acción de células polimorfonucleares⁴⁵, un mecanismo fisiológico de defensa es el aumento en el nivel de anticuerpos celulares, por ello en el estudio encontramos presencia de PMN-N que representan un mecanismo de defensa frente al proceso inicial o agudo de la endometritis subclínica.

La técnica de *Cytobrush* se basa en la obtención de células a partir del endometrio, mediante un cepillado de la superficie interna del útero, técnica muy confiable y no genera alteración de la mucosa endometrial⁴³. Las muestras obtenidas por *Cytobrush* se pueden colorear utilizando la tinción Diff Quick⁷⁴, por lo cual se empleó dicha coloración en el presente estudio.

La endometritis clínica afecta alrededor de un 15 a un 20 % de las vacas entre la 4° y 6° semana después del parto, y de un 30 a un 35 % adicional tienen endometritis

subclínica entre la 4^o y 9^o semana postparto¹. Este último dato coincide con el 16,3 % de endometritis clínica y del 53 % entre los 40 y 60 DEL de endometritis subclínica²³. La endometritis subclínica está definida como el hallazgo de una cantidad de neutrófilos mayor al 18 % en muestras citológicas colectadas del útero entre los 21 y 33 días posparto o una proporción de neutrófilos mayor a 4 % en muestras colectadas entre los 40 y 60 días posparto¹⁶, los resultados obtenidos en la investigación fueron a los 130 y 168 días post parto indistintamente, en las que se diagnosticó en forma eficaz la endometritis subclínica en las vacas lecheras.

Un ambiente uterino hostil en etapas inapropiadas del ciclo reproductivo inflige daño a los gametos y cigotos, lo que perjudica el rendimiento reproductivo de las vacas lecheras. En este contexto, una menor fertilidad contribuye negativamente al éxito económico de la unidad de producción lechera¹⁰⁵. Por consiguiente, un diagnóstico apropiado de la enfermedad del útero en el posparto es imprescindible para que se pueda establecer un tratamiento con premura y eficacia.

2. Aplicación mediante infusión intrauterina de plaquetas autólogas lisadas con ozono para la resolución de endometritis subclínica en vacas lecheras.

TABLA N° 2: Porcentaje de Polimorfonucleares - Neutrófilos aplicando 5 mL de plaquetas autólogas lisadas con ozono disueltas en 100 mL de cloruro de sodio al 9 % mediante infusión intrauterina por única vez

ESTADÍSTICOS	5 mL ÚNICA VEZ (T1)		
	% PMN-N INICIAL	% PMN-N 1er MUESTREO	% PMN-N 2do MUESTREO
Media	7,06	1,45	25,26
Desviación estándar	0,51	2,51	42,79
Varianza	0,26	6,30	1831,40
Máximo	7,53	4,35	74,67
Mínimo	6,52	0,00	0,00
TAMAÑO	3	3	3

La tabla N° 2 muestra que el porcentaje promedio de Polimorfonucleares – Neutrófilos antes de la aplicación intrauterina de plaquetas autólogas lisadas con ozono en dosis de 5 mL fue de 7.06 %, el porcentaje promedio en el primer muestreo luego de la aplicación intrauterina de plaquetas autólogas lisadas con ozono en dosis de 5 mL muestra un descenso en el porcentaje de PMN – N siendo 1.45 %, mientras que en el segundo muestreo el porcentaje promedio fue de 25.26 %. En el promedio general enfocado en porcentaje de PMN-N hallados, se demostró que los objetos de estudio son positivos a endometritis subclínica al inicio y en el segundo muestreo ya que las observaciones realizadas son similares a las descritas por Kasimanickam et al., (2004) y Sheldon et al., (2006), quienes consideran a una muestra positiva cuando el número de PMN-N es superior al 5 %.

TABLA N° 3: Porcentaje de Polimorfonucleares – Neutrófilos aplicando 5 mL de plaquetas autólogas lisadas con ozono disueltas en 100 mL de cloruro de sodio al 9 ‰ mediante infusión intrauterina dos veces con un intervalo de 3 días entre cada aplicación

ESTADÍSTICOS	5mL DOS VECES (T2)		
	% PMN-N INICIAL	% PMN-N 1er MUESTREO	% PMN-N 2do MUESTREO
Media	5,12	0,00	0,70
Desviación estándar	0.82	0,00	1,21
Varianza	0,67	0,00	1,47
Máximo	6,06	0,00	2,10
Mínimo	4,55	0,00	0,00
TAMAÑO	3	3	3

La Tabla N° 3 muestra que el porcentaje de Polimorfonucleares – Neutrófilos inicial promedio antes de la aplicación intrauterina de plaquetas autólogas lisadas con ozono en dosis de 5 mL dos veces con un intervalo de 3 días entre cada aplicación fue de 5.12 %, el porcentaje promedio en el primer muestreo

después de la aplicación intrauterina de plaquetas autólogas lisadas con ozono en dosis de 5 mL fue de 0.00 %, mientras que en el segundo muestreo el porcentaje promedio fue de 0.70 %. El porcentaje de PMN-N hallados luego del tratamiento T2 demuestra que los objetos de estudio son negativos a la endometritis subclínica puesto que los puntos de corte utilizados en relación al porcentaje de PMN considerados para el diagnóstico, diferían entre distintos estudios 3 % y el 10 %¹⁰³. Considerando uno de los rangos establecidos por Madoz et al. (2013), en el cual menciona que ≥ 7 semanas, la cantidad para declarar positiva con endometritis subclínica a una vaca es de >4 % de Polimorfo Nucleares – Neutrófilos. Por tanto, en el presente tratamiento se demuestra haber resuelto la endometritis subclínica de las vacas que conforman el grupo 2.

TABLA N° 4: Porcentaje de Polimorfonucleares – Neutrófilos aplicando 10 mL de plaquetas autólogas lisadas con ozono disueltas en 100 mL de cloruro de sodio al 9 % mediante infusión intrauterina por única vez

ESTADÍSTICOS	10 mL ÚNICA VEZ (T3)		
	% PMN-N INICIAL	% PMN-N 1er MUESTREO	% PMN-N 2do MUESTREO
Media	11,71	11,90	28,12
Desviación estándar	9,56	14,18	25,33
Varianza	91,40	201,02	641,61
Máximo	22,73	27,59	49,15
Mínimo	5,62	0,00	0,00
TAMAÑO	3	3	3

La tabla N° 4 muestra que el porcentaje de Polimorfonucleares - Neutrófilos inicial promedio antes de la aplicación intrauterina de plaquetas autólogas lisadas con ozono en dosis de 10 mL fue de 11.71 %, el porcentaje promedio en el primer muestreo después de la aplicación intrauterina de plaquetas autólogas lisadas con ozono en dosis de 10 mL fue de 11.90 %, mientras que en el segundo muestreo el porcentaje promedio fue de 28.12 %. Demostrando que los objetos

en estudio son positivos a endometritis subclínica, por lo tanto, con el tratamiento T3 no se logró resolver la endometritis subclínica del grupo en estudio.

Citológicamente la ES se define a la presencia de ≥ 18 % de células PMN-N en muestras colectadas entre los 21 – 33 (DPP), o ≥ 10 % de PMN-N en muestras obtenidas entre los 34 – 47 (DPP) y ≥ 5 % a los 40 a 60 DPP⁶⁵. Sin embargo, en un estudio realizado en Argentina en vacas en pastoreo se consideró un diagnóstico positivos valores ≥ 8 % de PMN-N en muestras colectadas entre los 21 – 33 DPP, ≥ 6 % de PMN-N en citologías obtenidas entre los 34 – 47 DPP y ≥ 4 % de PMN-N para muestras recolectadas a los 48 – 62 DPP¹³.

TABLA N° 5: Porcentaje de Polimorfonucleares – Neutrófilos aplicando 10 mL de plaquetas autólogas lisadas con ozono disueltas en 100 mL de cloruro de sodio al 9 % mediante infusión intrauterina dos veces con un intervalo de 3 días entre cada aplicación

ESTADÍSTICOS	10 mL DOS VECES (T4)		
	% PMN-N INICIAL	% PMN-N 1er MUESTREO	% PMN-N 2do MUESTREO
Media	9,00	11,11	15,32
Desviación estándar	3,31	9,65	16,63
Varianza	10,97	93,22	276,64
Máximo	12,50	20,00	34,07
Mínimo	5,92	0,84	2,33
TAMAÑO	3	3	3

La Tabla N 5 muestra que el porcentaje de Polimorfonucleares - Neutrófilos inicial promedio antes de la aplicación intrauterina de plaquetas autólogas lisadas con ozono en dosis de 10 mL dos veces con un intervalo de 3 días entre cada aplicación fue de 9.00 %, el porcentaje promedio en el primer muestreo después de la aplicación intrauterina de plaquetas autólogas lisadas con ozono en

dosis de 10 mL fue de 11.11 %, mientras que en el segundo muestreo el porcentaje promedio fue de 15.32 %.

Trabajos de investigación realizados en nuestro país mediante la técnica de cepillado endometrial reporta valores de prevalencia de 9,09 % de ES en posparto de vacas lecheras en sistemas intensivos de Arequipa. Los mismos autores en un segundo trabajo de investigación para la cuenca ganadera de Arequipa reportan una prevalencia de 13,27%⁷⁴.

El porcentaje de neutrófilos presentes en una muestra de citología uterina se usa para determinar el grado de inflamación presente en el útero. El presente trabajo de investigación utilizó la clasificación realizada por Madoz y col (2014), según el cual un porcentaje mayor al 4 % de PMN-N es indicativo de un endometrio inflamado, estos datos corroboran los hallazgos del presente¹³.

3. Comparación del porcentaje de PMN-N entre grupos luego de la aplicación intrauterina de plaquetas autólogas lisadas con ozono

TABLA N° 6: Comparación del porcentaje de PMN-N entre grupos luego de la aplicación intrauterina de plaquetas autólogas lisadas con ozono

ESTADÍSTICOS	5 mL Única Vez	5 mL dos veces	10 mL única vez	10 mL dos veces
Media	11,27	1,93	17,27	11,80
Desviación estándar	14,93	0,40	13,49	9,70
Varianza	222,80	0,16	182,06	94,08
Máximo	28,50	2,30	28,50	22,20
Mínimo	2,40	1,50	2,30	3,00
TAMAÑO	3	3	3	3

f=6.17

P<0.05

La Tabla N°. 5 según el análisis de la varianza ($f=6.17$) muestra que el porcentaje de Polimorfonucleares - Neutrófilos promedio entre grupos luego de la aplicación de plaquetas lisadas con ozono presentó diferencia estadística significativa ($P<0.05$).

Asimismo se observa que el porcentaje de Polimorfonucleares - Neutrófilos luego de la aplicación intrauterina de plaquetas autólogas lisadas con ozono en dosis de 5 mL una vez fue de 11.27 %, el porcentaje promedio en el grupo de plaquetas autólogas lisadas con ozono en dosis de 5 mL dos veces fue de 1.93 %, el promedio de PNM-N de plaquetas autólogas lisadas con ozono en dosis de 10 mL por única vez fue de 17.27 %, mientras que en el grupo de la dosis de 10 mL dos veces fue de 11.80 %.

El porcentaje de neutrófilos presentes en una muestra de citología uterina se usa para determinar el grado de inflamación presente en el útero. El presente trabajo de investigación utilizó la clasificación realizada por Madoz y col (2014), según el cual un porcentaje mayor al 4 % de PMN-N es indicativo de un endometrio inflamado, estos datos corroboran los hallazgos del presente¹³.

TABLA N° 7: Comparaciones múltiples por grupo

GRUPOS	MEDIA	TUKEY
5 mL aplicada 2 veces	1,93	a
5 mL aplicada 1 vez	11,27	b
10 mL aplicada 2 veces	11,80	b
10 mL aplicada 1 vez	17,27	b

Según la prueba de Tukey se muestra que el porcentaje de Polimorfonucleares - Neutrófilos promedio entre grupos luego de la aplicación de plaquetas lisadas con ozono en la dosis de 5 mL aplicada 2 veces presentó mayor diferencia en el resultado, en relación a los demás grupos en estudio.

Trabajos de investigación realizados en nuestro país mediante la técnica de cepillado endometrial reporta valores de prevalencia de 9,09 % de ES en posparto de vacas lecheras en sistemas intensivos de Arequipa. Los mismos

autores en un segundo trabajo de investigación para la cuenca ganadera de Arequipa reportan una prevalencia de 13,27 %⁷⁴.

En medicina veterinaria se ha reportado la utilización de PRP en caballos^{85, 106} y perros¹⁰⁷ en el tratamiento de afecciones locomotoras agudas y crónicas, aunque también se ha informado su aplicación para la curación de heridas intestinales en cerdos¹⁰⁸. Por otra parte, se ha descrito un método para producir PRP en bovinos con finalidades terapéuticas¹⁰⁹.

En un estudio, al comparar el control y los grupos de yeguas tratadas con PRP, se observó que después tratamiento, en animales susceptibles, todavía había acumulación de líquido en el dentro del útero, pero en menor cantidad en comparación con el grupo, que no fue sometido a tratamiento con PRP, mostrando así su efecto beneficioso potencial, debido a la reducción del exudado inflamatorio en estos animales, en animales resistentes, no se observaron cambios entre el grupo tratado y no tratado. En yeguas resistentes, el porcentaje de neutrófilos observado por citología en el lumen uterino se redujo después del tratamiento con plasma rico en plaquetas, que también ocurrió en yeguas susceptibles, en las que se observó que se redujo su número de células después de la aplicación de PRP, a niveles que se consideran aceptables por el momento 24 horas después del contacto del útero con el semen. Aunque no se observó diferencia estadística ($p > 0.05$) en el promedios de la concentración de PMN recuperados del líquido uterino entre control y grupos tratados en animales susceptibles, se encontró una tendencia estadísticamente a la reducción ($0.05 < p < 0.1$) de estas células después del tratamiento con PRP. Además, en 11 yeguas clasificadas como susceptibles (aproximadamente 74 % de los animales), se observó una disminución en el número de PMN. Y en las yeguas resistentes, la concentración de estas células no ha sido alterada¹⁰³.

En los últimos años el plasma rico en plaquetas (PRP) ha sido utilizado con diferentes propósitos terapéuticos, debido a la presencia de numerosos factores de crecimiento que en su conjunto contribuyen a acelerar los procesos curativos y de reparación de diferentes lesiones. Por otra parte, cuando el PRP es puesto en contacto con sustancias activadoras como sales de calcio o trombina, pierde su forma líquida y se transforma en un biomaterial conocido como gel rico en plaquetas (GRP)^{110, 106}. El GRP libera de manera gradual diversos factores de crecimiento, como el factor de crecimiento transformante beta isoforma 1 (TGF-

β 1) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)¹¹¹ y otras proteínas que disminuyen la inflamación y aceleran la reparación de tejidos traumatizados o afectados por enfermedades crónicas⁸⁵.

El tratamiento *in vivo* con plasma rico en plaquetas aumentó la detección de receptor de progesterona. *In vitro* el 5 % de plasma rico en plaquetas en el pase 5 aumentó la tasa de proliferación e indujo un aumento significativo en la expresión de todos los genes estudiados. El tratamiento con plasma rico en plaquetas regulaba significativamente la expresión de genes proinflamatorios. En nuestro estudio, probamos aún más la hipótesis de que PRP tiene propiedades antiinflamatorias y es capaz de influir en la expresión génica de factores proinflamatorios en un modelo de inflamación *in vitro*. Para desarrollar un sistema de cultivo celular *in vitro* con células estresadas y para estudiar la respuesta génica, las células endometriales fueron expuestas a la endotoxina bacteriana LPS antes y después del tratamiento con PRP. La exposición de células endometriales a 10 ng/ml de LPS resultó en más cambios en la expresión pro inflamatoria de genes que se redujeron por la adición de 5 % de PRP. La presencia de PRP mejoró los cambios moleculares inducidos por LPS en las células endometriales, ya que aumentaron los niveles de expresión génica de *IL-1 β* , *IL-8*, *iNOS* y *COX2* expresión. Paralelamente a la expresión génica, se estudió la liberación de algunas proteínas confirmando las observaciones sobre las regulaciones génicas. LPS demuestra ser capaz de inducir la liberación de PGE-2 e IL-1 β e IL-18 cuya selección se obtuvo 1 y 12-24 horas, después de la estimulación con LPS. El PRP reduce la liberación de estas proteínas, y la actividad moduladora máxima se observó inmediatamente después de 1h para PGE-2 e IL-1 β , y entre 12 y 24h para IL-8. Por lo tanto, nuestros resultados indicaron un efecto antiinflamatorio constante de PRP. En el tratamiento reproductivo repetido, después de la administración intrauterina de PRP, el porcentaje de vacas preñadas fue del 70 % en comparación con el grupo control, tratado con solución fisiológica, donde la tasa fue del 33,33 %¹⁰¹.

Marini y col 2016, determinan que su estudio sienta las bases para el tratamiento potencial de la endometritis con PRP *in vivo*.

Es importante señalar que, la literatura sobre el tratamiento de la endometritis en el ganado es extensa y, a veces inconsciente. Específicamente los tratamientos para la enfermedad uterina tienen como objetivo revertir los cambios

inflamatorios que deterioran la fertilidad, al mismo tiempo que mejoran la defensa y reparación uterina¹¹².

La respuesta inflamatoria es un proceso complejo que involucra muchas cascadas de señalización. En el tracto genital, la respuesta inicial del endometrio contra la infección depende de la inmunidad innata y los sistemas de defensa de la mucosa⁵⁹. La respuesta inmune uterina es proporcionada a nivel celular, por los leucocitos uterinos y las células polimorfonucleares que son las células que fagocitan y eliminan las bacterias¹¹⁵. En el caballo, a nivel molecular, las citocinas tienen un papel importante en el reclutamiento de células inflamatorias¹¹⁶. En el ganado bovino, la interleucina-6 y el TNF- α estimulan la producción de péptidos antimicrobianos que ayudan a la eliminación de bacterias patógenas¹¹⁷.

En las vacas, se han desarrollado muchos agentes y procedimientos terapéuticos para tratar la endometritis, incluida la administración sistémica o intrauterina de antibióticos¹¹³, o la administración de PGF2a y su análogo⁵⁵.

Se ha probado la infusión intrauterina de antisépticos (solución lugol), aunque se han informado efectos secundarios sobre la fertilidad futura en vacas¹¹⁴. También se han descrito enfoques que utilizan enzimas proteolíticas⁵⁵, administración de estradiol o GnRH⁶¹.

Considerando que todos estos estudios muestran algunos efectos sobre la respuesta uterina, no es posible inferir resultados concluyentes de los ensayos clínicos publicados.

El 02 de junio del 2020 la revista (Agraria.pe) reportó que existen 905.817 vacas en ordeño a nivel nacional, de las cuales se estima que aproximadamente el 30.5% de esta población se encuentran estabuladas, la incidencia estimada de la endometritis subclínica en la cuenca ganadera de Arequipa es de 13,27% y en la Irrigación Majes es de 26,87%⁷⁴.

Los problemas de infecciones reproductivos en la ganadería causan pérdidas económicas de gran relevancia, ya que los regímenes terapéuticos para tratar infecciones como la ES en vacas lecheras proponen varias administraciones del antibiótico por día, durante varios días además de altas dosis del fármaco. Lo que eleva los costos de servicios veterinarios y de tratamiento. Asimismo, un tratamiento prolongado puede llevar a perfiles tóxicos en tejidos periféricos al tejido a tratar¹⁰⁴.

La aplicación de plaquetas autólogas lisadas con ozono a dosis de 5 mL mediante infusión intrauterina dos veces con un intervalo de 3 días entre cada aplicación para resolver la endometritis subclínica en vacas lecheras resulta ser una terapia económicamente rentable, útil, asequible, de bajo costo y sin efectos adversos, de igual forma los efectos relacionados con la salud pública están directamente implicados al no requerir días de retiro en leche para consumo humano e industrial. Por tanto, el presente trabajo de investigación representa una alternativa para el desarrollo de futuras investigaciones en la medicina veterinaria.



CONCLUSIONES

Primera: Se aplicó plaquetas autólogas lisadas con ozono disueltas en 100 mL de cloruro de sodio al 9 ‰ mediante infusión intrauterina en vacas lecheras para resolver la endometritis subclínica con 5 mL una sola vez a las vacas que conformaban el grupo 1 (T1), 5 mL 2 veces con un intervalo de 3 días entre aplicación al grupo 2 (T2), 10 mL una sola vez al grupo 3 (T3) y 10 mL 2 veces con un intervalo de 3 días entre aplicación al grupo 4 (T4).

Segunda: Se realizó el diagnóstico de endometritis subclínica mediante la técnica de *Cytobrush*, hallando un promedio de 8,2 ‰ de Polimorfonucleares – Neutrófilos.

Tercera: Se determinó el porcentaje de PMN-N presentes en vacas lecheras luego de la aplicación intrauterina de plaquetas autólogas lisadas con ozono en sus respectivos grupos, el porcentaje de Polimorfonucleares – Neutrófilos promedio en el grupo 1 (T1) tratadas con una sola dosis de 5 mL en el primer muestreo fue 1,45 ‰ y en el segundo muestreo fue 25,26 ‰, en el grupo 2 (T2) con 5 mL y un intervalo de 3 días entre cada aplicación fue 0,00 ‰ al primer muestreo y en el segundo muestreo fue de 0,70 ‰, en el grupo 3 (T3) con una sola dosis de 10 mL en el primer muestreo fue 11,90 ‰ y en el segundo muestreo 28,12 ‰ mientras que en el grupo 4 (T4) con 10 mL y un intervalo de 3 días entre cada aplicación fue de 11,11 ‰ en el primer muestreo y 15,32 ‰ en el segundo muestreo.

Cuarta: Se comparó el porcentaje de Polimorfonucleares - Neutrófilos entre los grupos luego de la aplicación de plaquetas autólogas lisadas con ozono, según el análisis de la varianza ($f=6.17$) muestra que el promedio presentó diferencia estadística significativa ($P<0.05$), mediante la prueba de Tukey se demuestra que el porcentaje PMN-N promedio entre grupos luego de la aplicación de plaquetas lisadas con ozono en la dosis de 5 mL aplicada 2 veces con un intervalo de 3 días presentó mayor diferencia estadística significativa en el resultado, en relación a los demás grupos.

RECOMENDACIONES

A partir de los resultados obtenidos se exponen las siguientes recomendaciones:

1. Implementar la aplicación de plaquetas autólogas lisadas con ozono a dosis de 5 mL disueltas en 100 mL de cloruro de sodio al 9 % mediante infusión intrauterina dos veces con un intervalo de 3 días entre cada aplicación para resolver la endometritis subclínica en vacas lecheras, ya que mostró mayor eficacia en relación a los otros grupos en estudio.
2. Ampliar a un número mayor de vacas la aplicación mediante infusión intrauterina de plaquetas autólogas lisadas con ozono para el tratamiento de endometritis subclínica en el periodo postparto, por presentar un efecto en la disminución de Polimorfonucleares - Neutrófilos.
3. Continuar realizando investigaciones con aplicación mediante infusión intrauterina de plaquetas autólogas lisadas con ozono para aprovechar el efecto antiinflamatorio y regenerador de tejidos que posee, además que su bajo costo lo hace rentable en sistemas lecheros y no produce efecto residual en los alimentos, evitando de esta manera las pérdidas económicas en el tiempo de retiro en leche.
4. Prever el tratamiento de la endometritis subclínica con plaquetas autólogas lisadas combinado con la administración de antibióticos, hormonas o antiinflamatorios.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. LeBlanc S. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: a review. *Vet J*, 2008. 176(1): p.102-114.
2. Kaufmann T, Drillich M, Tenhagen B, Heuwieser W. Correlations between periparturient serum concentrations of non-esterified fatty acids, betahydroxybutyric acid, bilirubin, and urea and the occurrence of clinical and subclinical postpartum bovine endometritis. *BMC Vet Res* 2010; 6:47.
3. Hill J, Gilbert R. Reduced quality of bovine embryos cultured in media conditioned by exposure to an inflamed endometrium. *Aust Vet J*, 2008; 86(8):312-6.
4. Green M, Ledgard A, Beaumont S, Berg M, McNatty K, Peterson A, Back P. Long term alteration of follicular steroid concentrations in relation to subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *J. Anim Sci* 2011; 89(11): 3551-3560.
5. Perez CC, Molina L, Vizuet CG. Enfoque clínico para el síndrome repetición de la vaca reproductora. Una vista panorámica de la medicina veterinaria, 2011; 18:337-62.
6. Bell MJ, Roberts DJ. The impact of uterine infection on a dairy cow's performance. *Theriogenology* 2007 Oct; 68(7): 1074-1079.
7. Plöntzke J, Madoz LV, De la Sota RL, Drillich M, Heuwieser W. Subclinical endometritis and its impact on reproductive performance in grazing dairy cattle in Argentina. *Anim Reprod Sci* 2010; 122(1-2): 52-57.
8. Prunner I, Wagener K, Pothmann H, Ehling-Schulz M, Drillich M. Risk factors for uterine diseases on small and medium sized dairy farms determined by clinical, bacteriological, and cytological examinations. *Theriogenology* 2014 Oct; 82 (6): 857-865.
9. Gobikrushanth M, Salehi R, Ambrose DJ, Colazo MG. Categorization of endometritis and its association with ovarian follicular growth and ovulation, reproductive performance, dry matter intake, and milk yield in dairy cattle. *Theriogenology* 2016 Oct; 86(7): 1842-1849.

10. Foldi, J, Kulcsar M, Pecsí A, Huyghe B, De Sa C, Lohuis JA., Cox P, Huszenicza G. Bacterial complications of postpartum uterine in cattle. *Anim Reprod Sci* 2006; 96 (3-4):265-281.
11. Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S, Gilbert RO. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* 2006 May; 65(8): 1516-1530.
12. Lazzari G, Duchi R, Colleoni S, Baldazzi L, Benedetti V, Galli A, Luini M, Ferrari M, Galli C. Le patologie uterine cliniche e subcliniche come causa di infertilità nelle bovine da latte: studio epidemiologico in due allevamenti della regione Lombardia. *Large Animal Review* 2011; 17: 43-47.
13. Madoz LV, Giuliadori, MJ, Migliorisi AL, Jaureguiberry M, de la Sota RL. Endometrial cytology, biopsy, and bacteriology for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. *J Dairy Sci* 2014; 97: 1-7.
14. Mariño B, Barrio L, Mociños JE, Guillin JL, Barrio M, Becerra JJ, Herradón PG, Prieto A, Fernández G, Peña AI, Quintela LA (2015). Relación entre la citología y bacteriología del útero en vacas de producción láctea. *Proceedings XX Congreso internacional ANEMBE de medicina bovina, 7-8 de mayo, Burgos, España, pp. 220-221.*
15. Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, et al. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in post-partum dairy cows. *Theriogenology* 2004; 62: 9-23.
16. Gilbert RO, Shin ST, Guard CL, Erb HN, Frajblat M. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology*. 2005; 64:1879-1888.
17. Prieto M, Barrio M, Quintela LA, Perez-Marin CC, Becerra JJ, Vigo M, et al. Validation of a simple method for the interpretation of uterine cytology in cows. *Veterinary Medicine* 2012; 57(7): 360-363
18. Kasimanickam RK, Kasimanickam VR, Olsen JR, Jeffress EJ, Moore DA, Kastelic JP. Associations among serum pro-and anti-inflammatory cytokines, metabolic mediators, body condition, and uterine disease in postpartum dairy cows. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2013; 11: 103.

19. Galvão AM, Ferreira-Dias G, Skarzynski DJ. Cytokines and Angiogenesis in the Corpus Luteum. *Mediators of Inflammation*. 2013; 2013:420186
20. Drillich M, Tesfayec D, Ringsc F, Schellanderc K, Heuwiesera W, Hoelker M. Effects of polymorphonuclear neutrophile infiltration into the endometrial environment on embryonic development in superovulated cows. *Theriogenology* 2012; 77: 570-578.
21. Fernandez-Sanchez FI, Barrio-Lopez M, Quintela-Arias LA, Becerra-Gonzalez JJ, Peña-Martinez AI, Martinez-Bello D, Garcia-Herradon PJ, Perez-Marín CC. Use of endometrial cytology and metabolic profiles for selection of embryo donor cows. *Spanish Journal of Agricultural Research* 2014; 12(3): 664-671.
22. Lincke A, Drillich M, Heuwieser W. Subclinical endometritis in dairy cattle and its effect on fertility-a review of recent publications. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 2007; 120(5-6):245-50.
23. Bartolomé J, Khalloub P. Salud uterina, reinicio de la actividad ovárica y patologías del postparto en la vaca lechera. I Simposio Latinoamericano de Reproducción Animal 2011.
24. Hernández Ramírez P. Medicina regenerativa y células madre. Mecanismos de acción de las células madre adultas. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* [revista en Internet]. 2009 Abr [citado 2017 Dic 14]; 25(1): Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892009000100002.
25. Hernández Ramírez P. Medicina regenerativa II. Aplicaciones, realidad y perspectivas de la terapia celular. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* [revista en Internet]. 2006 Abr [citado 2017 Dic 14]; 22(1): Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S086402892006000100002&lng=es
26. Fernández N, Hernández P, Forrellat M. Espectro funcional de las plaquetas: de la hemostasia a la medicina regenerativa. *Rev Cubana Hematol, Inmunol, Hemoter*. 2012; 28(3): 200-16.
27. Parazzi V, Lazzari L, Rebulli P. Platelet gel from cord blood: a novel tool for tissue engineering. *Platelets*. 2010;21(7):549-54.

28. Hartwig J, Italiano J. The birth of the platelet. *J Thromb Haemost.* 2003; 1, 1580-1586.
29. Mannaioni P, Bello G, Masini E. Platelets and inflammation: role of platelet-derived growth factor, adhesion molecules and histamine. *Inflamm Res.* 1997; 46, 4-18.
30. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden A. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost.* 2004; 91, 4-15.
31. Theoret CL. 2005. The pathophysiology of wound repair. *Vet Clin Equine* 21, 1-13.
32. Gámez A, Arteaga J, Rodríguez C, López E, González F, Rodríguez E. Ventajas de las plaquetas alogénicas conservadas en el tratamiento de las úlceras de miembros inferiores. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 2013 Mar; 29(1):104-7.
33. Hafez E y Hafez B. (eds.). *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales.* 7ma Ed. Editorial McGraw-Hill. Carolina del Sur USA 2005. p.17-30.
34. Sisson S, Grossman R. Getty. *Anatomía de los animales domésticos.* 5ta. Ed. En español, reimpresión 2005. Editorial Masson S.A. Barcelona, España 2005. p.1040-1057.
35. Salisbury G, VanDemark N, Logde J. *Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de lo bóvidos.* Publicado por primera vez en EEUU. Freeman and Company, San Francisco y Londres. Editorial ACRIBIA. Zaragoza, España 1978.
36. Gloobe, H. *Anatomía aplicada del bovino. La edición.* Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura IICA. San José, Costa Rica 1989. p. 226.
37. Sorensen, J. *Reproducción Animal Principios y Prácticas.* 1ra Ed. Editorioal McGraw-Hill de México S.A de C.V. 1982.
38. Dellmann, H. *Histología Veterinaria. Capítulo 13: Sistema reproductor femenino.* 2da Ed. Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza, España 1994. p.267-290.
39. Bacha W, Bacha L, Wood M. *Atlas color de Histología Veterinaria.* 2da Ed. Editorial Interamericana. Buenos Aires, Argentina 2001.
40. Galina, C. *Reproducción de animales domésticos.* 3ra Ed. Editorial Limusa. México: 2008.

41. Massimiliano E. Manual de reproducción en ganado vacuno. S.L. Servet Diseño Y Comunicación. España, 2015.
42. Hafez y Hafez B. (eds.). Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 7ma Ed. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México 2002. p.157.
43. Kasimanickam R. Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton Js, et al. The effect of a single administration of cephalixin or cloprostenol on the reproductive performance of dairy cows with subclinical endometritis. *Theriogenology* 2005; 63: 818-830.
44. Noakes DE, Parkinson TJ. Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics, ninth ed. Elsevier Sci. 2009. Ltd, 836 p.
45. Sheldon IM, Dobson H. Postpartum uterine health in cattle. *Anim Reprod Sci* 2004; 82-83: 295-306.
46. Adams G.P., Jaiswal R, Singh J and Malhi P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology* 2008; 69:78-80.
47. Ball PHJ, Peters AR. Reproductive problem. In: *Reproduction in cattle*. In Oxford: Blackwell publishing; 2004:154-190
48. Sheldon I, Noakes D, Rycroft A, Pfeiffer D, Dobson H. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction*. 2002; 123: 837-845.
49. Senger P. Fertility factors; Which ones are really important? Proceedings of the 6th Western Dairy Management Conference. Washington State University. 2003.
50. Lewis G. Symposium: Health problems of the postpartum cow. Uterine Health and disorders. *J Dairy Sci*, 1997; 80:984-994.
51. Azawi O. Review Postpartum uterine infection in cattle. *Anim Reprod Sci*, 2008; 105:187-208.
52. Hussain A, Daniel R, O'Boyle D. Postpartum uterine flora following normal and abnormal puerperium in cows. *Theriogenology* 1992; 34:291-302.

53. LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, Keefe GP, Walton JS and Johnson WH. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci* 2002 Sep; 85(9), 2223- 2236.
54. Tizard I. *Inmunología veterinaria*. 10ma ed. Elsevier Sci.2018. Ltd, 1 p.
55. Drillich, M. Actualización sobre endometritis crónica y subclínica en vacas de tambo. Jornadas de actualización profesional. “Diagnóstico y tratamiento de endometritis clínica y subclínica en vacas de tambo”. 2007; 3-8.
56. Palmer C. Metritis postparto en vacas lecheras. Conferencia en las jornadas de Actualización en Biotecnologías de la Reproducción en Bovinos del IRAC vol. 9. Huerta Grande. Córdoba. Argentina; 2007.
57. Trigo y Travera F. *Patología Sistémica Veterinaria*. Editorial McRaw-Hill Interamericana Editores, Universidad Autónoma de México. México D.F. S.S de C.V. 1998 pp.
58. Abbas A, Lichtman A, Pober J. *Imunologia celular y molecular*. Interamericana McGraw-Hill. Madrid, España 1995.
59. Sheldon IM, Cronin J, Goetze L, Donofrio G, Schuberth HJ. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *BiolReprod*. 2009; 81(6):1025-1032.
60. Aquisé G., Presencia De Polimorfos Nucleares Neutrófilos (PMN–N) Como Indicador De Endometritis Sub Clínica En Vacas Lecheras De Diferentes Genotipos Mediante El Método De Citología Endometrial - La Joya - Arequipa – 2015. Tesis para optar por el título Profesional de Médico Veterinario. UCSM. 2015.
61. Sheldon, I.M.; Williams, E.J.; Miller A.N.A.; Nash D.M. y Herath S. Uterine diseases in cattle after parturition. *Vet J*. 2008; 176:115–121.
62. Palmer C. Endometritis en vacas lecheras. *Taurus*, 2008, 10 (37):25-32.
63. Bondurant RH. Inflammation in the bovine female reproductive tract. *J Anim Sci*. 1999; 77 Suppl 2: 101-110.

64. Pascottini O, Dini P, Hostens M, Ducatelle R, Opsomer G. A novel cytologic sampling technique to diagnose subclinical endometritis and comparison of staining methods for endometrial cytology samples in dairy cows. *Theriogenology*. 2015; 84:1438-46.
65. Barlund C, Carruthers T, Waldner C, Palmer C. A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology*. 2008; 69:714-723.
66. Arenas E. Determinación del punto de corte de polimorfonucleares neutrófilos (PMN-N) para el diagnóstico de endometritis subclínica e impacto sobre la eficiencia reproductiva y productiva en vacas lecheras. Irrigación Majes, Arequipa. 2015. Tesis de maestría. UCSM 2015.
67. Perusia O, Peralta C, Repetto A, Signorini M, Iñiguez E. Biopsias endometriales en bovinos. I Congreso Virtual Veterinario de Diagnóstico por Imagen 2000.
68. Overbeck W, Witte T, Heuwieser W. Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares. *Theriogenology* 2011; 15;75(7):1311-8.
69. Pascottini OB. Subclinical endometritis in dairy cattle: a practical approach. Tesis Doctoral. Department of Reproduction, Obstetrics and Herd Health, Faculty of Veterinary Medicine Ghent University 2016.
70. Cheong SH, Nydam DV, Galvão KN, Crosier BM, Ricci A, Caixeta LS, et al. Use of reagent test strips for diagnosis of endometritis in dairy cows. *Theriogenology* 2012; 77: 858-864.
71. Couto GB, Vaillancourt DH, Lefebvre RC. Comparison of a leukocyte esterase test with endometrial cytology for diagnosis of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 2013; 79: 103-107.
72. Campero C, Conosciuto G, Odriozola E, Moreira A, Lodeiro R, García Bouissou R, Hernaiz R. Hallazgos clínicos, bacteriológicos e histopatológicos en vacas lecheras, asociados con problemas reproductivos. *Rev Med Vet* 1992; 73:264-272.

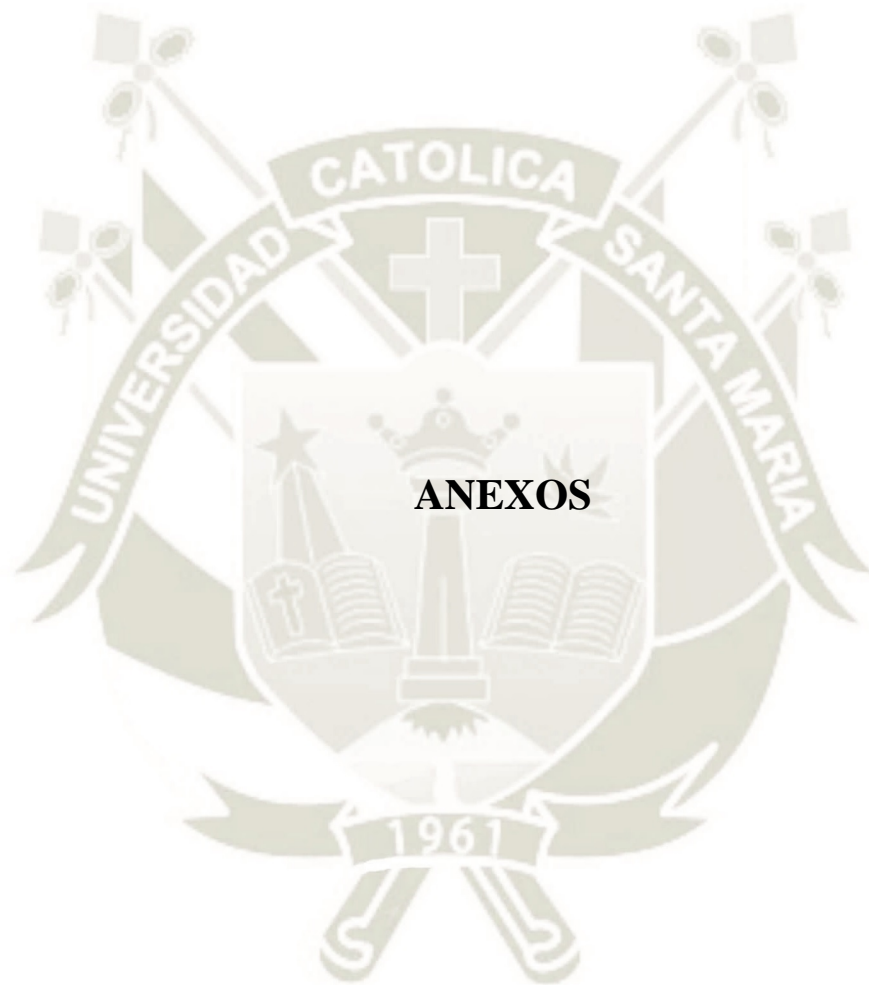
73. De Boer MW, LeBlanc SJ, Dubuc J, Meier S, Heuwieser W, Arlt S, et al. Invited review: Systematic review of diagnostic tests for reproductive-tract infection and inflammation in dairy cows. *Dairy Sci.* 2014; 97: 3983-3999.
74. Reátegui J, Fernández F, Rinaudo A, Cuadros S, Marini PR. Punto de corte de polimorfos nucleares neutrófilos para diagnóstico de endometritis subclínica por citología endometrial en vacas lecheras. *Spermova*, 2015; 5(1): p. 79-82.
75. Guzmán Grenfell Alberto M, Maldonado Noriega Luis, Mendoza Atencio Rexy, Hicks Gómez Juan José. La función plaquetaria más allá de la hemostasis: Participación en las enfermedades respiratorias. *Rev Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* 2005 Sep; 18(3):240-246.
76. Tablin F. Platelet structure and function. *Schalman's Veterinary Hematology.* Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA, 2000; Pp 448-452.
77. Spencer F, Becker R. Platelets: Structure, Function, and Their Fundamental Contribution to Hemostasis and Pathologic Thrombosis. *Textbook of Coronary Thrombosis and Thrombolysis*, Kluwer Academic Publishers, Norwell, USA, 1997; Pp 31-49.
78. Pelagalli A, Belisario M, Tafuri S, Lombardi P, D'Angelo D, Avallone L, Staiano N. Adhesive properties from different animal species. *J Comp Pathol* 2003; 128, 127-131.
79. Gentry P. Platelet biology. *Schalman's Veterinary Hematology.* Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA, 2000; Pp 459-466.
80. Segura D, Monreal L, Pérez S, Pino M, Ordinas A, Brugués R, White J, Escolar G. Assessment of platelet function in horses: ultrastructure, flow cytometry and perfusion techniques. *J Vet Intern Med.* 2006; 20, 581-588.
81. Pelagalli A, Lombardi P, D'Angelo D, Della R, Avallone L, Staiano N. Species variability in platelet aggregation response to different agonists. *J Comp Pathol* 2002; 127: 126-132.
82. Anitua E, Andia I, Sánchez M, Azofra J, Zalduendo M, de la Fuente M, Nurden P, Nurden A. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and

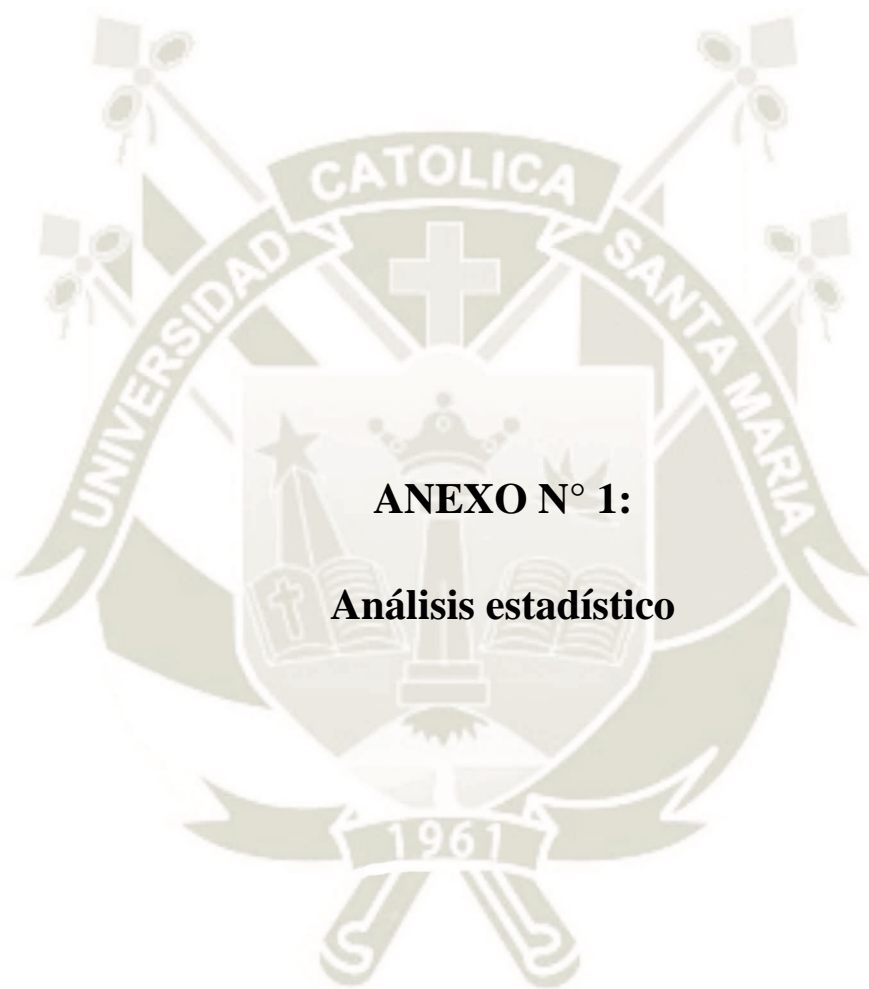
- induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J Orthop Res* 2005; 23: 281-286.
83. Weibrich G, Kleis W, Hitzler W, Hafner G. Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma-rich-ingrowth-factors kit to produce platelet rich plasma: a technical report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005; 29: 118-123.
 84. Paes F, Wurzinger L, Vasconcelos A, Alves G. Ativação de plaquetas de equinos com laminite induzida e tratados com ketoprofeno, fenilbutazona e flunixin meglumina. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2006; 58: 149-157.
 85. Carmona J, López C, Giraldo C. Uso de concentrados autólogos de plaquetas como terapia regenerativa de enfermedades crónicas del aparato musculoesquelético equino. *Arch Met Vet.* 2011; 43(1): 1-10
 86. Weibrich G, Kleis K, Hafner G. Growth factor levels in the platelet-rich plasma produced by 2 different methods: curasan type PRP kit versus PCCS PRP system. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002; 17: 2184-2190.
 87. Eppley B, Woodell J, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconst Surg* 2004; 114: 1502-1508.
 88. Marx R, Carlson E, Eichstaedt R, Schimmele S, Strauss J, Georgeff K. Platelet rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85: 638-646.
 89. Tamimi F, Montalvo S, Tresguerres I, Blanco L. A comparative study of 2 methods for obtaining platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg* 2007; 65: 1084-1093.
 90. Vasconcelos E, Figueiredo A, Seghatchian J. Quality of platelet concentrates derived by platelet rich plasma, buffy coat and apheresis. *Transfus Apher Sci* 2003; 29: 13-16.
 91. Zimmermann R, Arnold D, Strasser E, Ringwald J, Schlegel A, Wiltfang J, Eckstein R. Sample preparation technique and white cell content influence the detectable levels of growth factors in platelet concentrates. *Vox Sang* 2003; 85: 283-289.

92. Álvarez ME, CE Giraldo, JU Carmona. 2010. Contaminación bacteriana en concentrados de plaquetas de caballos. Arch Med Vet 42, 49-56.
93. Barría N, Haro F, Henríquez E, Unda M. Concentrados plaquetarios y usos en Oftalmología. Rev. Medicina y Humanidades. [revista en internet]. 2017. [citado: 10 de diciembre del 2018]. Número Monográfico de Oftalmología: Disponible en: www.medicinayhumanidades.cl/ediciones/2017/especial_ofthalmologia/04_CONCENTRADOS%20PLAQUETARIOS.pdf.
94. Thon J, Peters C, Machlus K y col., T granules in human platelets function in TLR9 organization and signaling. The Journal of cell biology 2012; 198: 561-74.
95. Cerletti C, Tamburrelli C, Izzi B, Gianfagna F, de Gaetano G, Platelet-leukocyte interactions in thrombosis. Thrombosis research 2012; 129: 263-6
96. D'Atri L, Etulain J, Rivadeneyra L y col., Expression and functionality of Toll-like receptor 3 in the megakaryocytic lineage. Journal of thrombosis and haemostasis: JTH 2015; 13: 839-50.
97. Huang Z, Chien P, Indik Z, Schreiber A, Human platelet Fcγ3 and phagocytes in immune complex clearance. Molecular immunology 2011; 48: 691-6.
98. Fabbro MD , Bortolin M , Taschieri S , Ceci C , Weinstein RL .Antimicrobial properties of platelet-rich preparations. A systematic review of the current pre-clinical evidence. Platelets. 2016 Jan;14:1-10.
99. Carrillo-Mora P, González-Villalva A, Macías-Hernández SI, Villaseñor CP. Platelets-rich plasma: a versatile tool for regenerative medicine? Cir. 2013 Jan-Feb; 81(1):74-82.
100. Laos C. Uso de plasma rico en plaquetas en equinos: Revisión sistemática de la literatura. Tesis para optar por el título Profesional de Médico Veterinario. Universidad Tecnológica de Pereira. 2018.
101. Marini MG, Perrini C, Esposti P, Corradetti B, Bizzaro D, Riccaboni P. et al. Effects of platelet-rich plasma in a model of bovine endometrial inflammation *in vitro*. Reprod Biol Endocrinol 2016, 14, 58. <https://doi.org/10.1186/s12958-016-0195-4>.

- 102.**Segabinazzi LG, Friso AM, Correal SB, et al. 2017. Hallazgos clínicos uterinos, tasa de fertilidad, migración de leucocitos y niveles de proteína COX-2 en el tejido endometrial de yeguas susceptibles tratadas con plasma rico en plaquetas antes y después de la IA. *Theriogenology*. 104: 120-126. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.08.007.
- 103.**Segabinazzi LG. Efeito do plasma rico em plaquetas pré ou pós-inseminação artificial sobre a resposta inflamatória e índice de fertilidade em éguas susceptíveis a endometrite persistente pós-cobertura. Botucatu – SP. 2016, p.67. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.
- 104.**Quintela L., Vigo M., Becerra J., Barrio M., Peña A. y Herradón P. Endometritis subclínica en ganado vacuno lechero: etiopatogenia y diagnóstico. Revisión Bibliográfica. ITEA (en prensa), Vol. xx, 1-17. 2017. DOI: 10.12706/itea.2017.016.
- 105.**Bogado P. y Opsomer G. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades del postparto uterino en vacas lecheras: una revisión con énfasis en la endometritis subclínica. Universidad de Guelph – Colegio de Veterinaria de Ontario, Departamento de Medicina de Población, Canadá. *Compen. Cienc. Vet.* 2017; 07(01): 29-40.
- 106.**Carmona JU, C López, JA Sandoval. 2013. Review of the currently available systems to obtain platelet related products to treat equine musculoskeletal injuries. *Rec Pat Reg Med* 3, 148-159.
- 107.**Silva RF, JU Carmona, CMF Rezende. 2012. The use of intra-articular platelet rich-plasma as a postsurgical treatment of cranial cruciate ligament rupture in a dog. *Arq Bras Med Vet Zootec* 64, 847-852.
- 108.**Fresno L, Fondevila D, Bambo O, Chacaltana A, García F, Andaluz A. 2010. Efectos del plasma rico en plaquetas en la cicatrización de heridas intestinales en cerdos. *Vet J.*; 185:322-7.
- 109.**López C, CE Giraldo, JU Carmona. 2012. Evaluation of a double centrifugation tube method for concentrating bovine platelets: Cellular study. *Arch Med Vet* 44, 109-115.

- 110.**Dohan Ehrenfest DM, T Bielecki, A Mishra, P Borzini, F Inchingolo, G Sammartino, L Rasmusson, PA Everts. 2012. In Search of a consensus terminology in the field of platelet concentrates for surgical use: Platelet-Rich Plasma (PRP), Platelet-Rich Fibrin (PRF), fibrin gel polymerization and leukocytes. *Curr Pharm Biotechnol* 13, 1131-1137.
- 111.**Giraldo CE, C López, ME Álvarez, IJ Samudio, M Prades, JU Carmona. 2013. Effects of the breed, sex and age on cellular content and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. *BMC Vet Res* 9, 1-10.
- 112.**Shams-Esfandabadi N, Shizari A, Ghasemzadeh-nava H. 2004. Taza de embarazo después del tratamiento intrauterino posterior a la inseminación de la endometritis en ganado lechero. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 5:155-6.
- 113.**Runciman DJ, Anderson GA, Malmö J. 2009. Comparación de dos métodos para detectar el flujo vaginal purulento en vacas lecheras postparto y el efecto de la cefapirina intrauterina en el rendimiento reproductivo. *Aust Vet J* 87:369-79
- 114.**Knutti B, Kupfer U, Busano A. 2000. Eficiencia reproductiva de vacas con endometritis después del tratamiento con infusiones intrauterinas o inyecciones de prostaglandina, o sin tratamiento. *Journal of veterinary Medicine Series A* 47:609-15.
- 115.**Gilbert R, Santos N, Galvão K, Brittin S, Roman H. 2007. The relationship between postpartum uterine bacterial infection (BI) and subclinical endometritis (SE). *Journal Dairy Science* 90; 1:469.
- 116.**Woodward EM, Christoffersen M, Horohov D, Squires EL, Troedsson MH. 2015. The effect of treatment with immune modulators on endometrial cytokine expression in mares susceptible to persistent breeding-induced endometritis. *Equine Vet J* 47:235–9.
- 117.**Chapwanya A, Meade KG, Doherty ML, Callanan JJ, Mee JF, O’Farrelly C. 2009. Histopathological and molecular evaluation of Holstein-Friesian cows postpartum: toward an improved understanding of uterine innate immunity. *Theriogenology* 71:1396–407.





ANEXO N° 1:

Análisis estadístico

GRÁFICO N° 1: Porcentaje de Polimorfonucleares - Neutrófilos aplicando 5 mL de plaquetas autólogas lisadas con ozono disueltas en 100 mL de cloruro de sodio al 9 % mediante infusión intrauterina por única vez

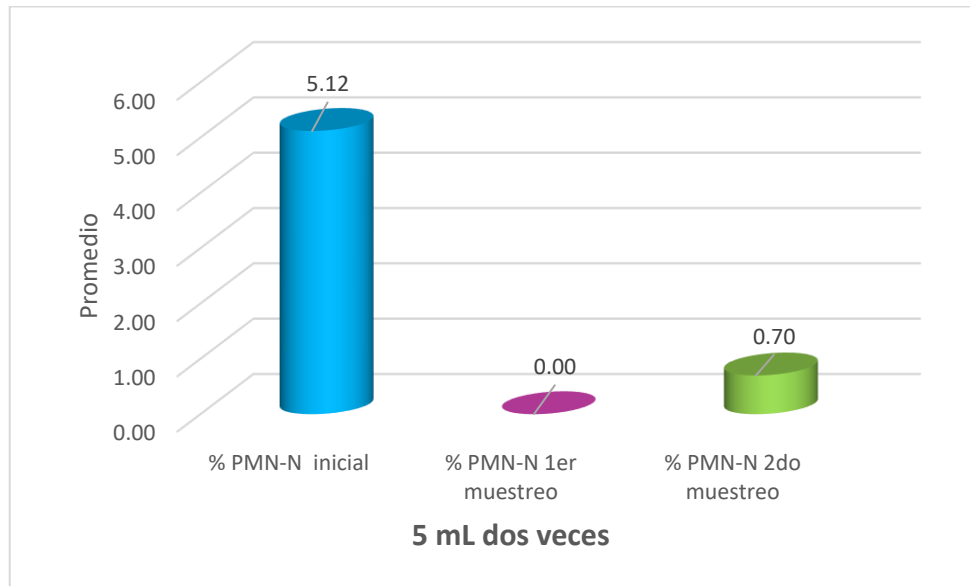


GRÁFICO N° 2: Porcentaje de Polimorfonucleares – Neutrófilos aplicando 5 mL de plaquetas autólogas lisadas con ozono disueltas en 100 mL de cloruro de sodio al 9 % mediante infusión intrauterina dos veces con un intervalo de 3 días entre cada aplicación

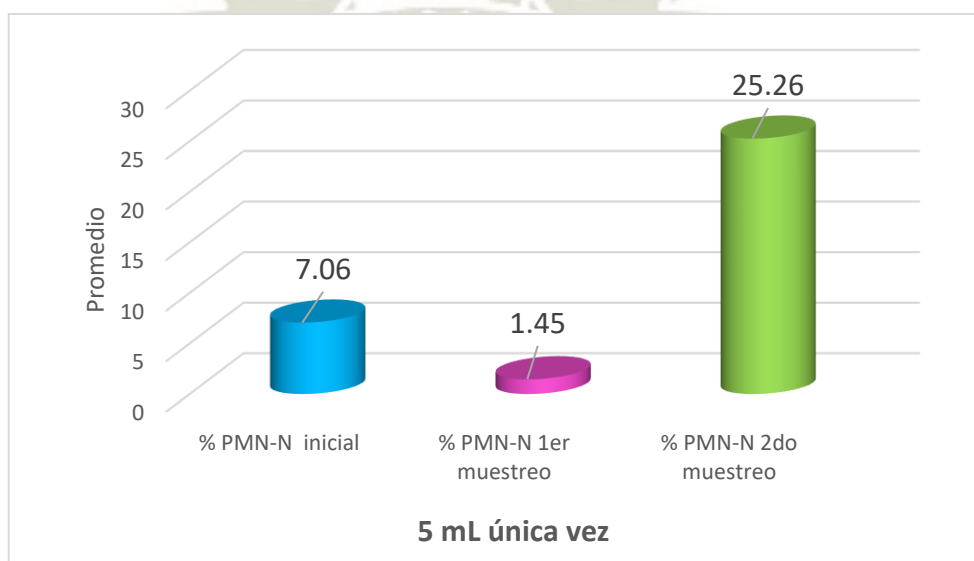


GRÁFICO N° 3: Porcentaje de Polimorfonucleares – Neutrófilos aplicando 10 mL de plaquetas autólogas lisadas con ozono disueltas en 100 mL de cloruro de sodio al 9 % mediante infusión intrauterina por única vez

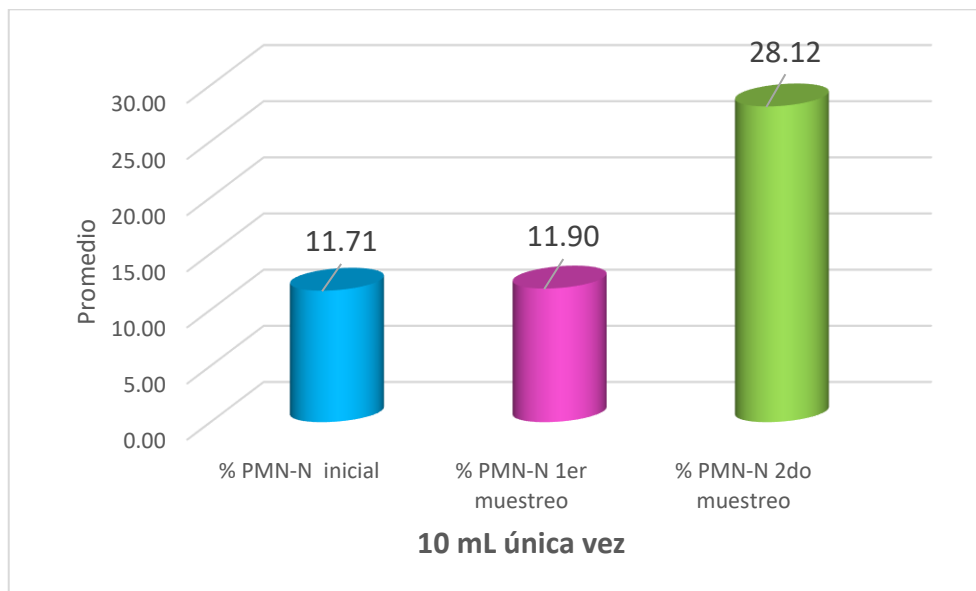


GRÁFICO N° 4: Porcentaje de Polimorfonucleares – Neutrófilos aplicando 10 mL de plaquetas autólogas lisadas con ozono disueltas en 100 mL de cloruro de sodio al 9 % mediante infusión intrauterina dos veces con un intervalo de 3 días entre cada aplicación

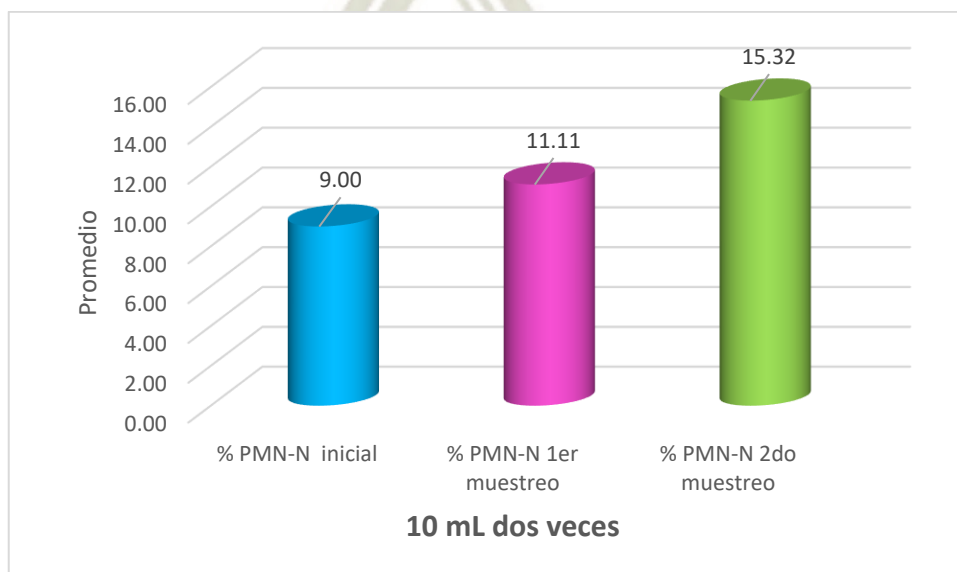
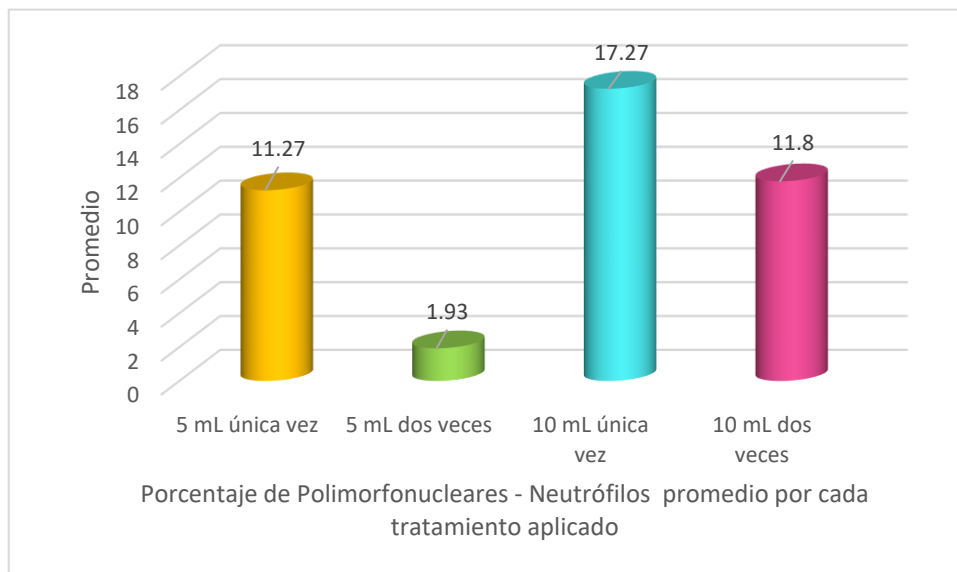
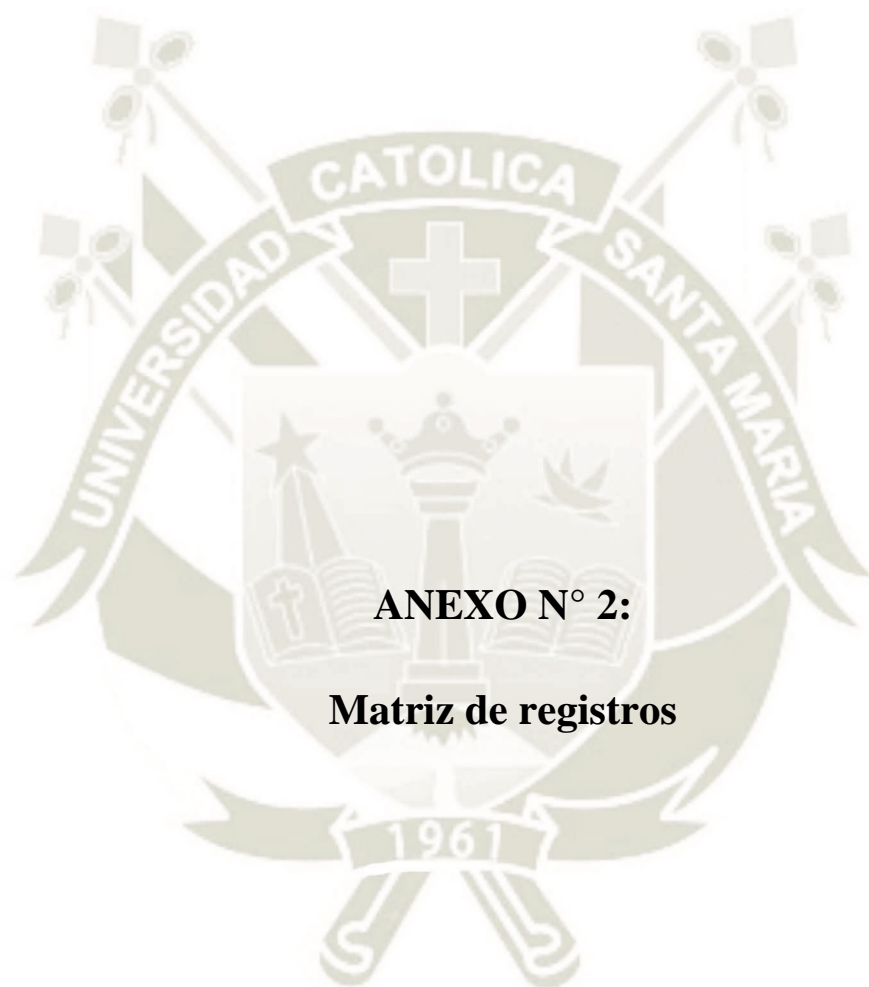


GRÁFICO N° 5: Comparación del porcentaje de PMN-N entre grupos luego de la aplicación de plaquetas autólogas lisadas con ozono





ANEXO N° 2:

Matriz de registros

REGISTRO DE TRATAMIENTOS

TRATAMIENTOS	N° ASIGNADO	NOMBRE	DOSIS PLTS (ML)	N° APLICACIONES
T1	1	Karen	5	1
	9	Nayra	5	1
	11	Ilaria	5	1
T2	2	Norma	5	2
	3	Génesis	5	2
	6	Sally	5	2
T3	5	Royal	10	1
	8	Siria	10	1
	10	Yahaira	10	1
T4	4	Daniuska	10	2
	7	Isaura	10	2
	12	Lea	10	2

REGISTRO DE LAS FICHAS DE OBSERVACIÓN

RESUMEN DE LAS FICHAS DE OBSERVACIÓN

N°	NOMBRE	N° APLICACIONES	DOSIS PLTS (ML)	FECHA DE PARTO	FECHA ÚLTIMO SERVICIO	IPC	N° SERVICIOS	DEL	N° PARTOS	IPPS	KG LECHE	%PMN-N INICIAL	%PMN-N 1er MUESTREO	%PMN-N 2do MUESTREO
1	Karen	1	5	18/08/2018	10/12/2019	165	3	146	4	67	52	7.5	0.0	1.1
2	Norma	2	5	17/08/2018	14/12/2018	153	3	147	4	69	51	4.8	0.0	2.1
3	Génesis	2	5	03/09/2018	16/12/2018	142	3	130	3	71	53	4.5	0.0	0.0
4	Daniuska	2	10	29/07/2018	11/12/2018	188	4	166	3	75	33	8.6	12.5	9.6
5	Royal	1	10	14/08/2018	13/12/2018	129	4	150	4	70	55	6.8	0.0	0.0
6	Sally	2	5	24/08/2018	15/12/2018	102	3	140	3	66	58	6.1	0.0	0.0
7	Isaura	2	10	02/09/2018	10/12/2018	122	3	131	3	68	52	12.5	20.0	34.1
8	Siria	1	10	28/07/2018	16/12/2018	145	4	167	4	74	35	22.7	27.6	35.2
9	Nayra	1	5	01/09/2018	12/12/2018	164	3	132	3	78	57	7.1	0.0	0.0
10	Yahaira	1	10	27/07/2018	19/12/2018	117	4	168	4	67	38	5.6	8.1	49.2
11	Ilaria	1	5	15/08/2018	10/12/2018	134	3	149	4	69	41	6.5	4.3	74.7
12	Lea	2	10	25/08/2018	14/12/2018	131	3	139	4	65	37	5.9	0.8	2.3
PROMEDIO						141	3.3	147.1	3.6	69.9	46.8	8.2	6.1	17.3
DESVIACIÓN ESTÁNDAR						23.8	0.5	13.8	0.5	3.9	9.3	5.0	9.3	25.0
COEFICIENTE DE VARIACIÓN						16.9	14.8	9.4	14.4	5.6	19.8	61.1	152.3	144.2
MÍNIMO						102	3	130	3	65	33	4.55	0.00	0.00
MÁXIMO						188	4	168	4	78	58	22.73	27.59	74.67

REGISTRO DE CONTEO DE % PMN-N PARA T1

TRATAMIENTO 1						
N°	NOMBRE	N° APLICACIONES	DOSIS PLTS (ML)	%PMN-N MUESTREO INICIAL	%PMN-N 1er MUESTREO	%PMN-N 2do MUESTREO
1	Karen	1	5	7.5	0	1.1
9	Nayra	1	5	7.1	0	0
11	Ilaria	1	5	6.5	4.3	74.7
Promedio				7.03	1.43	25.27
Desviación estandar				0.50	2.48	42.81
Coef de variación				7.16	173.21	169.45
Minimo				6.50	0.00	0.00
Máximo				7.50	4.30	74.70

REGISTRO DE CONTEO DE % PMN-N PARA T2

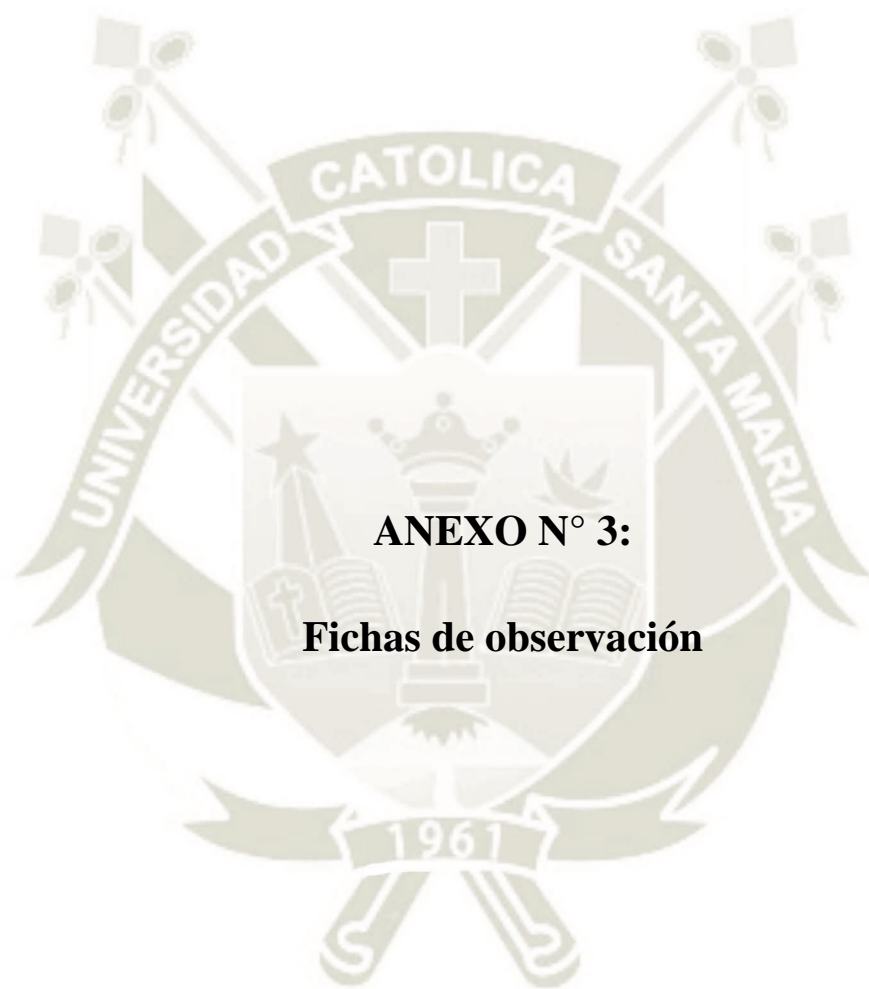
TRATAMIENTO 2						
N°	NOMBRE	N° APLICACIONES	DOSIS PLTS (ML)	%PMN-N MUESTREO INICIAL	%PMN-N 1er MUESTREO	%PMN-N 2do MUESTREO
2	Norma	2	5	4.8	0.0	2.1
3	Génesis	2	5	4.5	0.0	0
6	Sally	2	5	6.1	0.0	0
Promedio				5.13	0.00	0.70
Desviación estandar				0.85	0.00	1.21
Coef de variación				16.57	0.00	173.21
Minimo				4.50	0.00	0.00
Máximo				6.10	0.00	2.10

REGISTRO DE CONTEO DE % PMN-N PARA T3

TRATAMIENTO 3						
N°	NOMBRE	N° APLICACIONES	DOSIS PLTS (ML)	%PMN-N MUESTREO INICIAL	%PMN-N 1er MUESTREO	%PMN-N 2do MUESTREO
5	Royal	1	10	6.8	0	0
8	Siria	1	10	22.7	27.6	35.2
10	Yahaira	1	10	5.6	8.1	49.2
Promedio				11.70	11.90	28.13
Desviación estandar				9.55	14.19	25.35
Coef de variación				81.58	119.22	90.11
Minimo				5.60	0.00	0.00
Máximo				22.70	27.60	49.20

REGISTRO DE CONTEO DE % PMN-N PARA T4

TRATAMIENTO 4						
N°	NOMBRE	N° APLICACIONES	DOSIS PLTS (ML)	%PMN-N MUESTREO INICIAL	%PMN-N 1er MUESTREO	%PMN-N 2do MUESTREO
4	Daniuska	2	10	8.6	12.5	9.6
7	Isaura	2	10	12.5	20.0	34.1
12	Lea	2	10	5.9	0.8	2.3
Promedio				9.00	11.10	15.33
Desviación estandar				3.32	9.68	16.66
Coef de variación				36.87	0.00	108.63
Minimo				5.90	0.80	2.30
Máximo				12.50	20.00	34.10



ANEXO N° 3:

Fichas de observación

Ficha de observación vaca Karen

FICHA DE OBSERVACIÓN N°1	
Nombre de la vaca: KAREN	
Cantidad de plaquetas (mL): 5	
Número de aplicaciones: 1	
Datos productivos y reproductivos	
Intervalo parto concepción: 165 d.	Número de partos: 4
Fecha de parto: 18/08/2018	Intervalo parto primer servicio: 67 d.
Número de servicios: 3	Fecha de último servicio: 10/12/2018
Días en leche: 146	Producción de leche (kg): 52
Observaciones:	
1er Diagnóstico de Endometritis subclínica	
Fecha de frotis: 11/01/2019	N° de lámina: 1
Resultados de laboratorio	
Positivo: (X) Negativo: ()	% de PMN-N: 7.5
2do Diagnóstico de Endometritis subclínica	
Fecha de frotis: 14/01/2019	N° de lámina: 1
Resultados de laboratorio	
Positivo: () Negativo: (X)	% de PMN-N: 0
3er Diagnóstico de Endometritis subclínica	
Fecha de frotis:	N° de lámina:
Resultados de laboratorio	
Positivo: () Negativo: (X)	% de PMN-N: 1.1

Ficha de observación vaca Norma

FICHA DE OBSERVACIÓN N°2	
Nombre de la vaca: NORMA	
Cantidad de plaquetas (mL): 5	
Número de aplicaciones: 2	
Datos productivos y reproductivos	
Intervalo parto concepción: 153 d.	Número de partos: 4
Fecha de parto: 17/08/2018	Intervalo parto primer servicio: 69 d.
Número de servicios: 3	Fecha de último servicio: 14/12/2018
Días en leche: 147	Producción de leche (kg): 51
Observaciones:	
1er Diagnóstico de Endometritis subclínica	
Fecha de frotis: 11/01/2019	N° de lámina: 2
Resultados de laboratorio	
Positivo: (X) Negativo: ()	% de PMN-N: 4.8
2do Diagnóstico de Endometritis subclínica	
Fecha de frotis: 14/01/2019	N° de lámina: 2
Resultados de laboratorio	
Positivo: () Negativo: (X)	% de PMN-N: 0
3er Diagnóstico de Endometritis subclínica	
Fecha de frotis: 17/01/2019	N° de lámina: 2
Resultados de laboratorio	
Positivo: () Negativo: (X)	% de PMN-N: 2.1

Ficha de observación vaca Génesis

FICHA DE OBSERVACIÓN N°3	
Nombre de la vaca: GÉNESIS	
Cantidad de plaquetas (mL): 5	
Número de aplicaciones: 2	
Datos productivos y reproductivos	
Intervalo parto concepción: 142 d.	Número de partos: 3
Fecha de parto: 03/09/2018	Intervalo parto primer servicio: 71 d.
Número de servicios: 3	Fecha de último servicio: 16/12/2018
Días en leche: 130	Producción de leche (kg): 53
Observaciones:	
1er Diagnóstico de Endometritis subclínica	
Fecha de frotis: 11/01/2019	N° de lámina: 3
Resultados de laboratorio	
Positivo: (X) Negativo: ()	% de PMN-N: 4.5
2do Diagnóstico de Endometritis subclínica	
Fecha de frotis: 14/01/2019	N° de lámina: 3
Resultados de laboratorio	
Positivo: () Negativo: (X)	% de PMN-N: 0
3er Diagnóstico de Endometritis subclínica	
Fecha de frotis: 17/01/2019	N° de lámina: 3
Resultados de laboratorio	
Positivo: () Negativo: (X)	% de PMN-N: 0

Ficha de observación vaca Daniuska

FICHA DE OBSERVACIÓN N°4	
Nombre de la vaca: DANIUSKA	
Cantidad de plaquetas (mL): 10	
Número de aplicaciones: 2	
Datos productivos y reproductivos	
Intervalo parto concepción: 188 d.	Número de partos: 3
Fecha de parto: 27/07/2018	Intervalo parto primer servicio: 75 d.
Número de servicios: 4	Fecha de último servicio: 11/12/2018
Días en leche: 166	Producción de leche (kg): 33
Observaciones:	
1er Diagnóstico de Endometritis subclínica	
Fecha de frotis: 11/01/2019	N° de lámina: 4
Resultados de laboratorio	
Positivo: (X) Negativo: ()	% de PMN-N: 8.6
2do Diagnóstico de Endometritis subclínica	
Fecha de frotis: 14/01/2019	N° de lámina: 4
Resultados de laboratorio	
Positivo: (X) Negativo: ()	% de PMN-N: 12.5
3er Diagnóstico de Endometritis subclínica	
Fecha de frotis:	N° de lámina: 4
Resultados de laboratorio	
Positivo: (X) Negativo: ()	% de PMN-N: 9.6

Ficha de observación vaca Royal

FICHA DE OBSERVACIÓN N°5	
Nombre de la vaca: ROYAL	
Cantidad de plaquetas (mL): 10	
Número de aplicaciones: 1	
Datos productivos y reproductivos	
Intervalo parto concepción: 129 d.	Número de partos: 4
Fecha de parto: 14/08/2018	Intervalo parto primer servicio: 70 d.
Número de servicios: 4	Fecha de último servicio: 13/12/2018
Días en leche: 150	Producción de leche (kg): 55
Observaciones:	
1er Diagnóstico de Endometritis subclínica	
Fecha de frotis: 11/01/2019	N° de lámina: 5
Resultados de laboratorio	
Positivo: (X) Negativo: ()	% de PMN-N: 6.8
2do Diagnóstico de Endometritis subclínica	
Fecha de frotis: 14/01/2019	N° de lámina: 5
Resultados de laboratorio	
Positivo: () Negativo: (X)	% de PMN-N: 0
3er Diagnóstico de Endometritis subclínica	
Fecha de frotis:	N° de lámina: 5
Resultados de laboratorio	
Positivo: () Negativo: (X)	% de PMN-N: 0

Ficha de observación vaca Sally

FICHA DE OBSERVACIÓN N°6	
Nombre de la vaca: SALLY	
Cantidad de plaquetas (mL): 5	
Número de aplicaciones: 2	
Datos productivos y reproductivos	
Intervalo parto concepción: 102 d.	Número de partos: 3
Fecha de parto: 24/08/2018	Intervalo parto primer servicio: 66 d.
Número de servicios: 3	Fecha de último servicio: 15/12/2018
Días en leche: 140	Producción de leche (kg): 58
Observaciones:	
1er Diagnóstico de Endometritis subclínica	
Fecha de frotis: 11/01/2019	N° de lámina: 6
Resultados de laboratorio	
Positivo: (X) Negativo: ()	% de PMN-N: 6.1
2do Diagnóstico de Endometritis subclínica	
Fecha de frotis: 14/01/2019	N° de lámina: 6
Resultados de laboratorio	
Positivo: () Negativo: (X)	% de PMN-N: 0
3er Diagnóstico de Endometritis subclínica	
Fecha de frotis:	N° de lámina: 6
Resultados de laboratorio	
Positivo: () Negativo: (X)	% de PMN-N: 0

Ficha de observación vaca Isaura

FICHA DE OBSERVACIÓN N°7	
Nombre de la vaca: ISAURA	
Cantidad de plaquetas (mL): 10	
Número de aplicaciones: 2	
Datos productivos y reproductivos	
Intervalo parto concepción: 122 d.	Número de partos: 3
Fecha de parto: 02/09/2018	Intervalo parto primer servicio: 68 d.
Número de servicios: 3	Fecha de último servicio: 10/12/2018
Días en leche: 131	Producción de leche (kg): 52
Observaciones:	
1er Diagnóstico de Endometritis subclínica	
Fecha de frotis: 11/01/2019	N° de lámina: 7
Resultados de laboratorio	
Positivo: (X) Negativo: ()	% de PMN-N: 12.5
2do Diagnóstico de Endometritis subclínica	
Fecha de frotis: 14/01/2019	N° de lámina: 7
Resultados de laboratorio	
Positivo: (X) Negativo: ()	% de PMN-N: 20
3er Diagnóstico de Endometritis subclínica	
Fecha de frotis:	N° de lámina: 7
Resultados de laboratorio	
Positivo: (X) Negativo: ()	% de PMN-N: 34.1

Ficha de observación vaca Siria

FICHA DE OBSERVACIÓN N°8	
Nombre de la vaca: SIRIA	
Cantidad de plaquetas (mL): 10	
Número de aplicaciones: 1	
Datos productivos y reproductivos	
Intervalo parto concepción: 145 d.	Número de partos: 4
Fecha de parto: 28/07/2018	Intervalo parto primer servicio: 74 d.
Número de servicios: 4	Fecha de último servicio: 16/12/2018
Días en leche: 167	Producción de leche (kg): 35
Observaciones:	
1er Diagnóstico de Endometritis subclínica	
Fecha de frotis: 11/01/2019	N° de lámina: 8
Resultados de laboratorio	
Positivo: (X) Negativo: ()	% de PMN-N: 22.7
2do Diagnóstico de Endometritis subclínica	
Fecha de frotis: 14/01/2019	N° de lámina: 8
Resultados de laboratorio	
Positivo: (X) Negativo: ()	% de PMN-N: 27.6
3er Diagnóstico de Endometritis subclínica	
Fecha de frotis:	N° de lámina:
Resultados de laboratorio	
Positivo: (X) Negativo: ()	% de PMN-N: 35.2

Ficha de observación vaca Nayra

FICHA DE OBSERVACIÓN N°9	
Nombre de la vaca: NAYRA	
Cantidad de plaquetas (mL): 5	
Número de aplicaciones: 1	
Datos productivos y reproductivos	
Intervalo parto concepción: 164 d.	Número de partos: 3
Fecha de parto: 01/09/2018	Intervalo parto primer servicio: 78 d.
Número de servicios: 3	Fecha de último servicio: 12/12/2018
Días en leche: 132	Producción de leche (kg): 57
Observaciones:	
1er Diagnóstico de Endometritis subclínica	
Fecha de frotis: 11/01/2019	N° de lámina: 9
Resultados de laboratorio	
Positivo: (X) Negativo: ()	% de PMN-N: 7.1
2do Diagnóstico de Endometritis subclínica	
Fecha de frotis: 14/01/2019	N° de lámina: 9
Resultados de laboratorio	
Positivo: () Negativo: (X)	% de PMN-N: 0
3er Diagnóstico de Endometritis subclínica	
Fecha de frotis:	N° de lámina:
Resultados de laboratorio	
Positivo: () Negativo: (X)	% de PMN-N: 0

Ficha de observación vaca Yahaira

FICHA DE OBSERVACIÓN N°10	
Nombre de la vaca: YAHAIRA	
Cantidad de plaquetas (mL): 10	
Número de aplicaciones: 1	
Datos productivos y reproductivos	
Intervalo parto concepción: 117 d.	Número de partos: 4
Fecha de parto: 27/07/2018	Intervalo parto primer servicio: 67 d.
Número de servicios: 4	Fecha de último servicio: 19/12/2018
Días en leche: 168	Producción de leche (kg): 38
Observaciones:	
1er Diagnóstico de Endometritis subclínica	
Fecha de frotis: 11/01/2019	N° de lámina: 10
Resultados de laboratorio	
Positivo: (X) Negativo: ()	% de PMN-N: 5.6
2do Diagnóstico de Endometritis subclínica	
Fecha de frotis: 14/01/2019	N° de lámina: 10
Resultados de laboratorio	
Positivo: (X) Negativo: ()	% de PMN-N: 8.1
3er Diagnóstico de Endometritis subclínica	
Fecha de frotis:	N° de lámina:
Resultados de laboratorio	
Positivo: (X) Negativo: ()	% de PMN-N: 49.2

Ficha de observación vaca Ilaria

FICHA DE OBSERVACIÓN N°11	
Nombre de la vaca: ILARIA	
Cantidad de plaquetas (mL): 5	
Número de aplicaciones: 1	
Datos productivos y reproductivos	
Intervalo parto concepción: 134 d.	Número de partos: 4
Fecha de parto: 15/08/2018	Intervalo parto primer servicio: 69 d.
Número de servicios: 3	Fecha de último servicio: 10/12/2018
Días en leche: 149	Producción de leche (kg): 41
Observaciones:	
1er Diagnóstico de Endometritis subclínica	
Fecha de frotis: 11/01/2019	N° de lámina: 11
Resultados de laboratorio	
Positivo: (X) Negativo: ()	% de PMN-N: 6.5
2do Diagnóstico de Endometritis subclínica	
Fecha de frotis: 14/01/2019	N° de lámina: 11
Resultados de laboratorio	
Positivo: (X) Negativo: ()	% de PMN-N: 4.3
3er Diagnóstico de Endometritis subclínica	
Fecha de frotis:	N° de lámina:
Resultados de laboratorio	
Positivo: (X) Negativo: ()	% de PMN-N: 74.7

TABLA 1: Ficha de observación vaca Lea

FICHA DE OBSERVACIÓN N°12	
Nombre de la vaca: LEA	
Cantidad de plaquetas (mL): 10	
Número de aplicaciones: 2	
Datos productivos y reproductivos	
Intervalo parto concepción: 131 d.	Número de partos: 4
Fecha de parto: 25/08/2018	Intervalo parto primer servicio: 65 d.
Número de servicios: 3	Fecha de último servicio: 14/12/2018
Días en leche: 139	Producción de leche (kg): 37
Observaciones:	
1er Diagnóstico de Endometritis subclínica	
Fecha de frotis: 11/01/2019	N° de lámina: 12
Resultados de laboratorio	
Positivo: (X) Negativo: ()	% de PMN-N: 5.9
2do Diagnóstico de Endometritis subclínica	
Fecha de frotis: 14/01/2019	N° de lámina: 12
Resultados de laboratorio	
Positivo: () Negativo: (X)	% de PMN-N: 0.8
3er Diagnóstico de Endometritis subclínica	
Fecha de frotis: 17/01/2019	N° de lámina: 12
Resultados de laboratorio	
Positivo: () Negativo: (X)	% de PMN-N: 2.3



ANEXO N° 4:

Secuencias fotográficas

Secuencia fotográfica para la obtención, preparación y aplicación de las plaquetas lisadas con ozono

FOTO N° 1: Preparación del material para toma de muestra



FOTO N° 2: Toma de muestra mediante el método de citobrush



FOTO N° 3: Extracción de sangre



FOTO N° 4: Frotis y rotulación de lámina

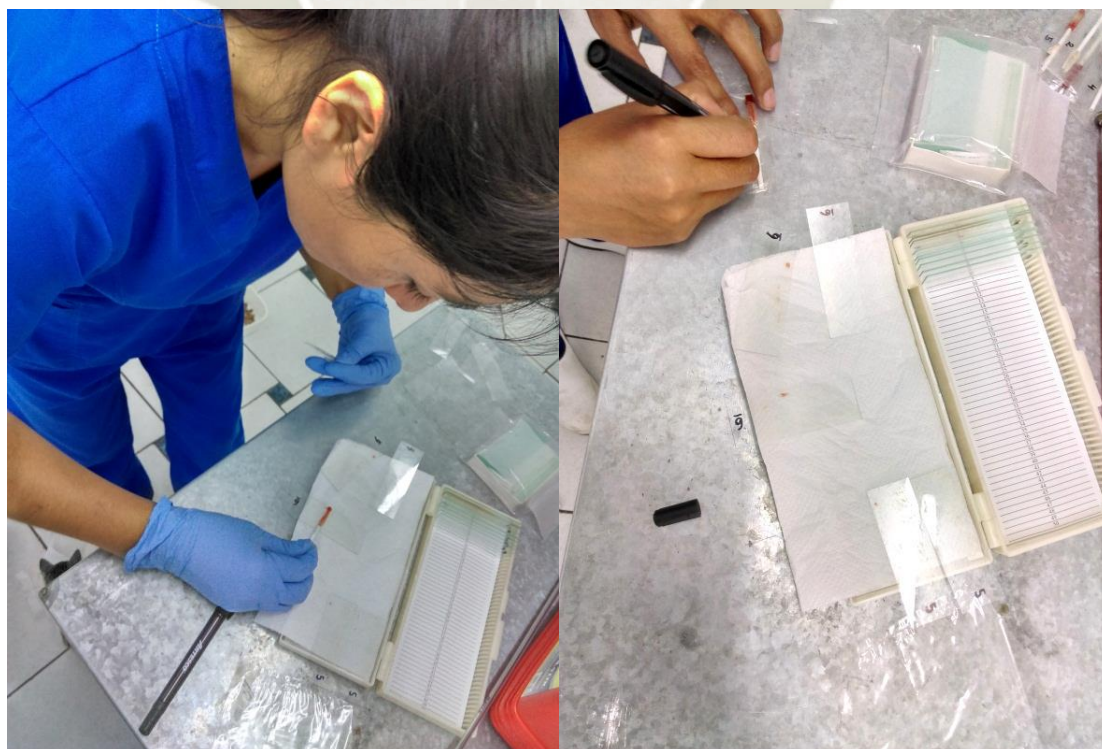


FOTO N° 5: Fijación del frotis



FOTO N° 6: Centrifugación y extracción de plaquetas



FOTO N° 7: Ozonificación para lisado de plaquetas



FOTO N° 8: Aplicación intrauterina de plaquetas lisadas



**Secuencia fotográfica de láminas obtenidas en el muestreo inicial (diagnóstico)
observadas y analizadas con un microscopio óptico a un aumento de 40X**

FOTO N°1: Lámina 1 Karen

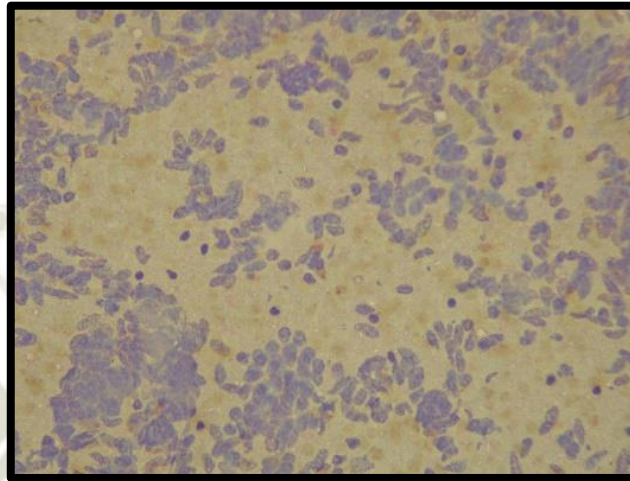


FOTO N°2: Lámina 2 Norma

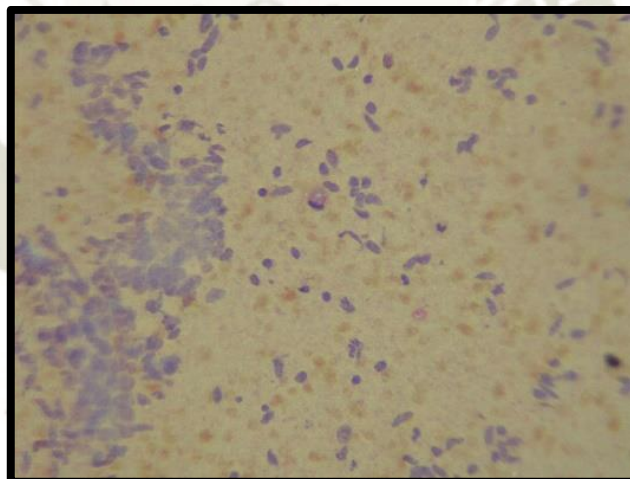


FOTO N°3: Lámina 3 Génesis

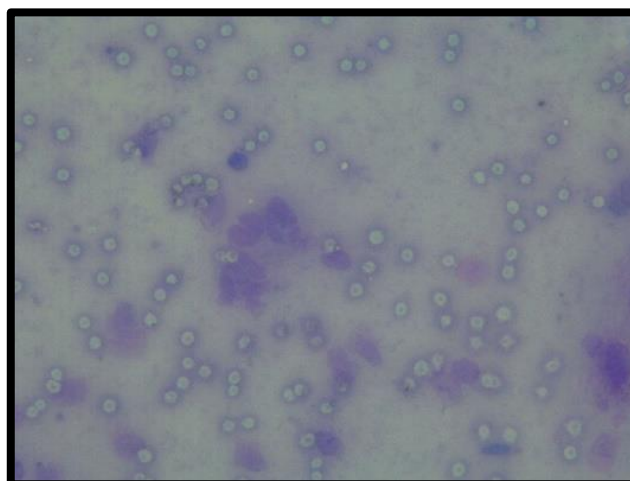


FOTO N°4: Lámina 4 Daniuska

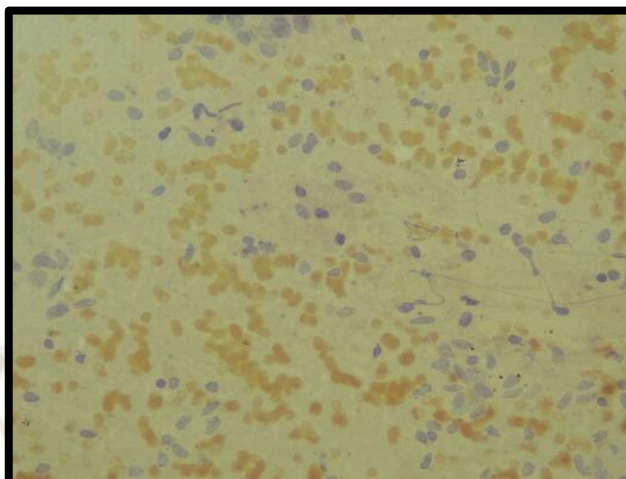


FOTO N°5: Lámina 5 Royal

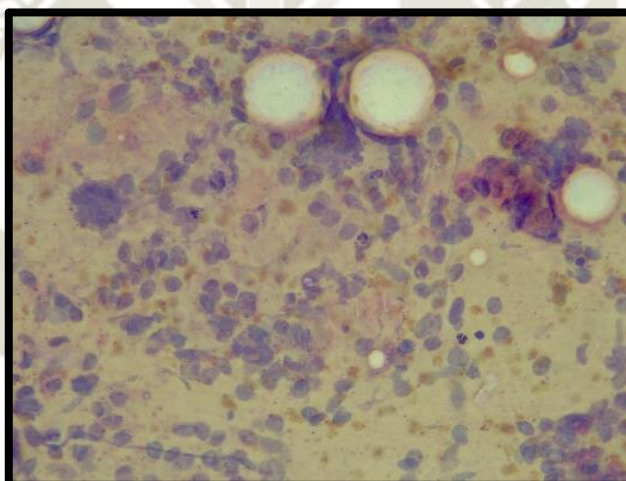


FOTO N°6: Lámina 6 Sally

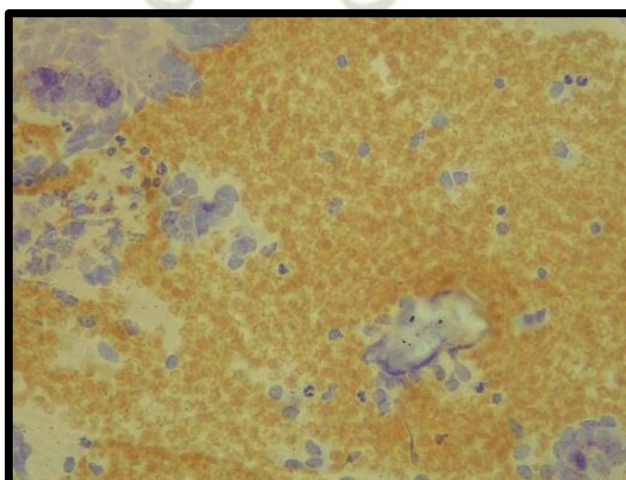


FOTO N°7: Lámina 7 Isaura

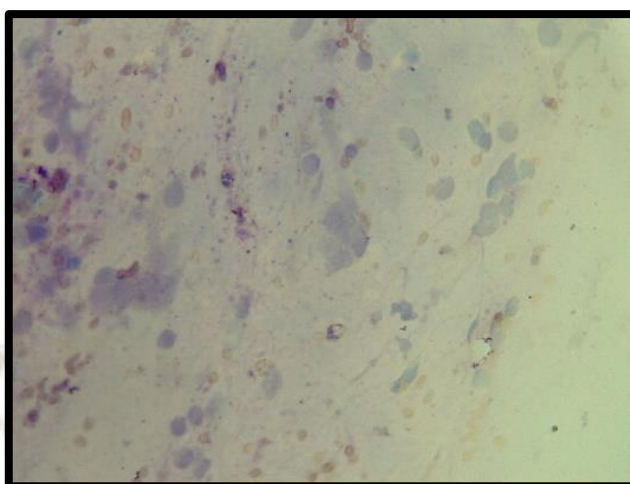


FOTO N°8: Lámina 8 Siria

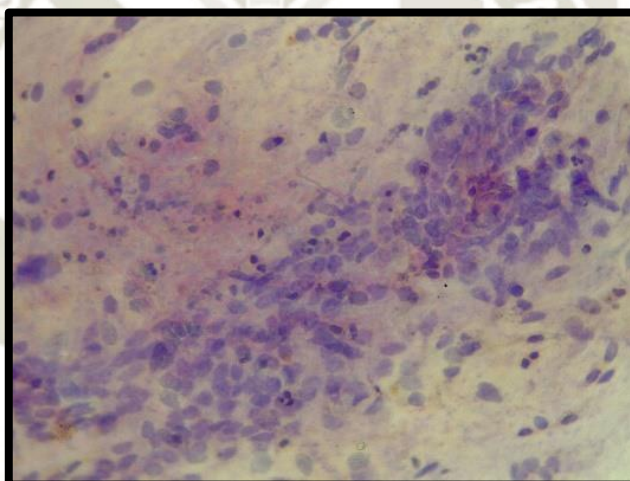


FOTO N°9: Lámina 9 Nayra

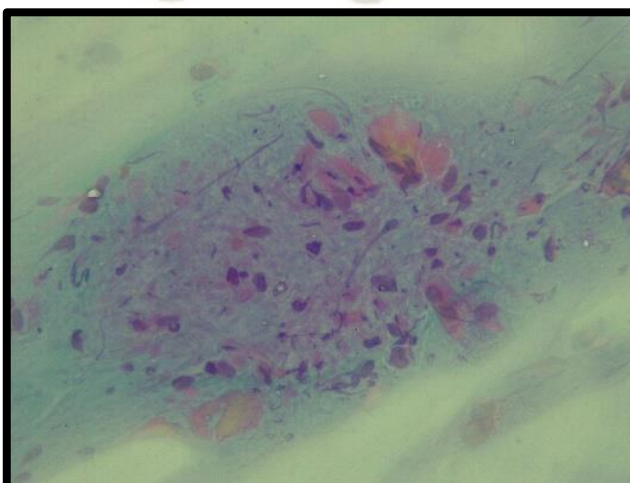


FOTO N°10: Lámina 10 Yahaira

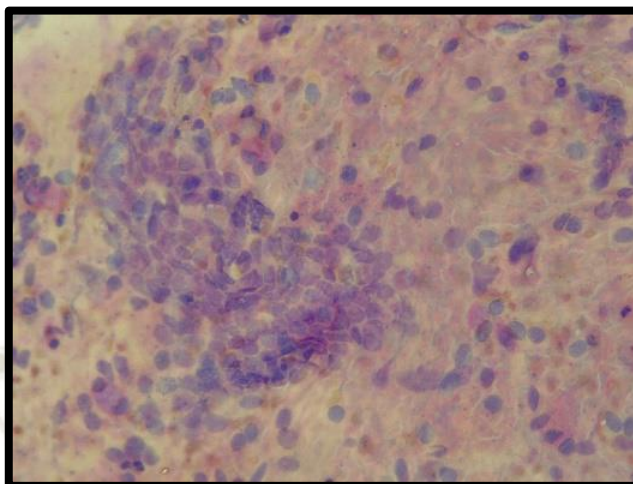


FOTO N°11: Lámina 8 Ilaria

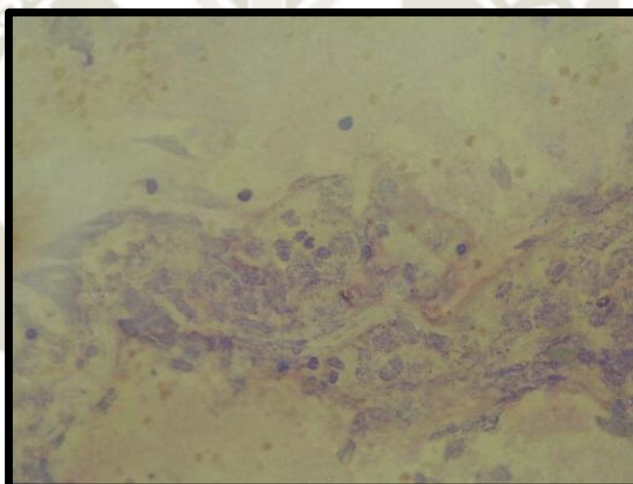
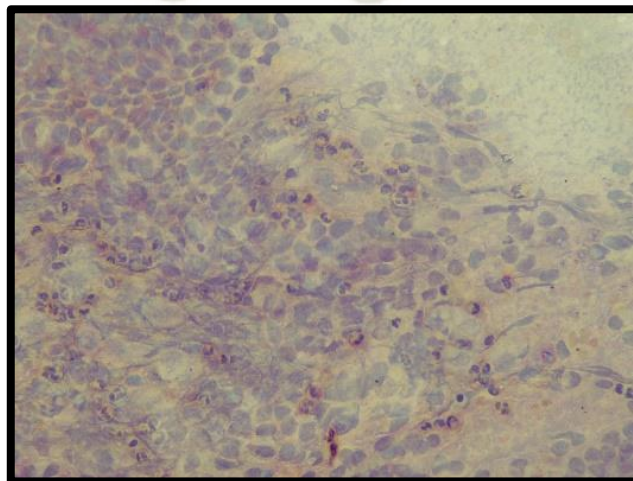


FOTO N°12: Lámina 12 Lea



Secuencia fotográfica de láminas obtenidas en el primer muestreo observadas y analizadas con un microscopio óptico a un aumento de 40X

FOTO N°13: Lámina 1 Karen

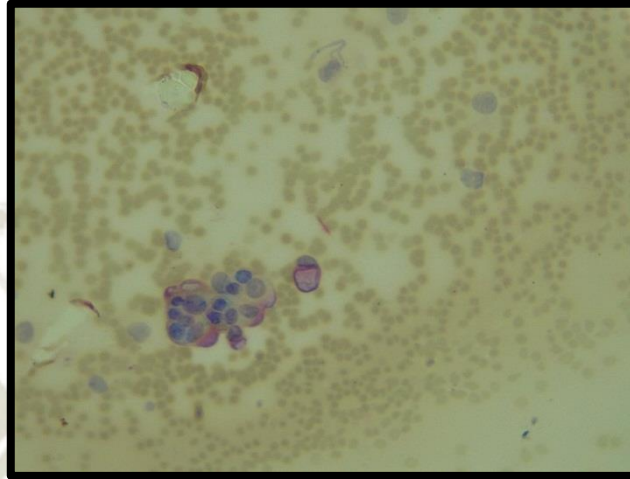


FOTO N°14: Lámina 2 Norma

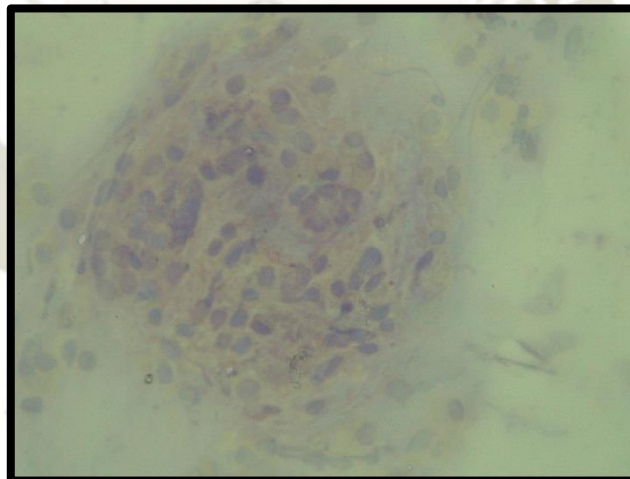


FOTO N°15: Lámina 3 Génesis

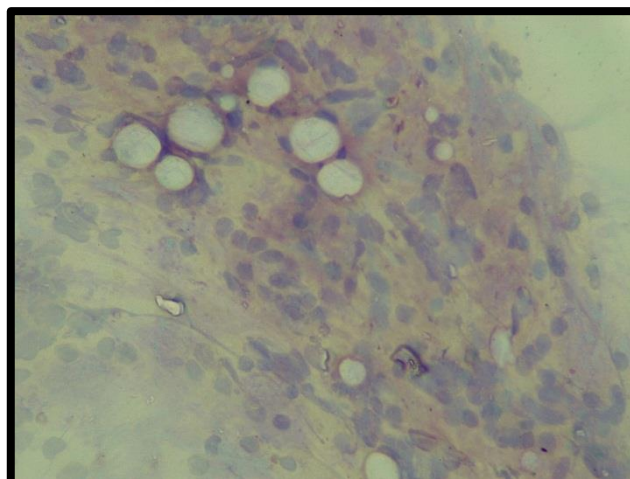


FOTO N°16: Lámina 4 Daniuska

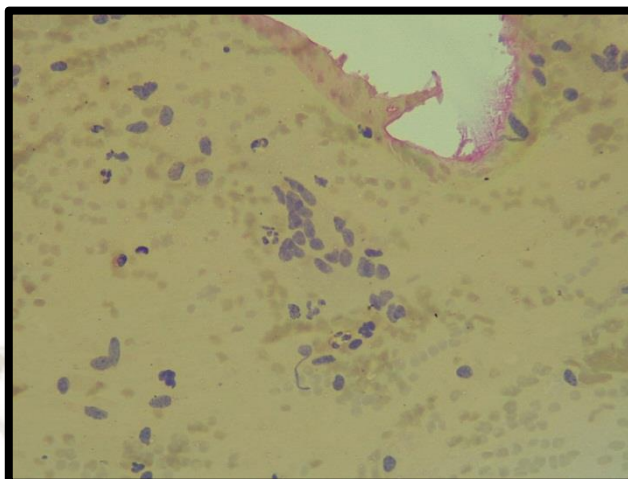


FOTO N°17: Lámina 5 Royal

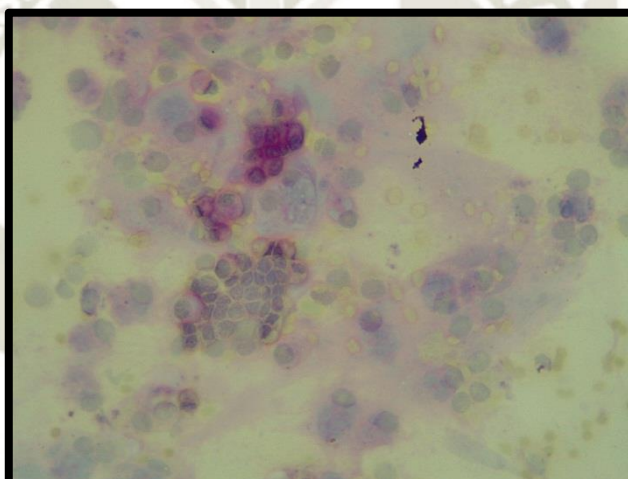


FOTO N°18: Lámina 6 Sally

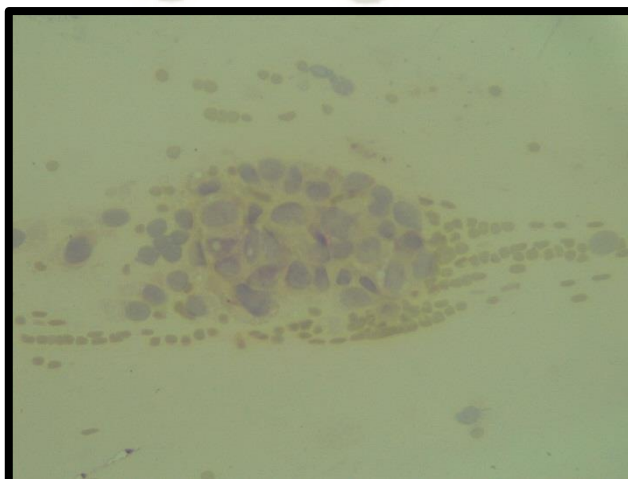


FOTO N°19: Lámina 7 Isaura

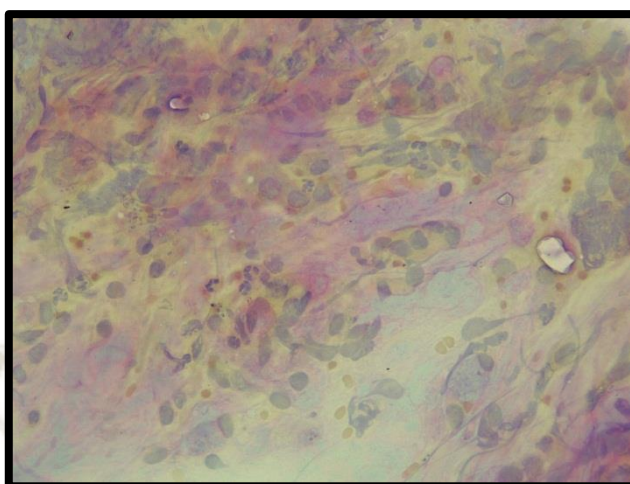


FOTO N°20: Lámina 8 Siria

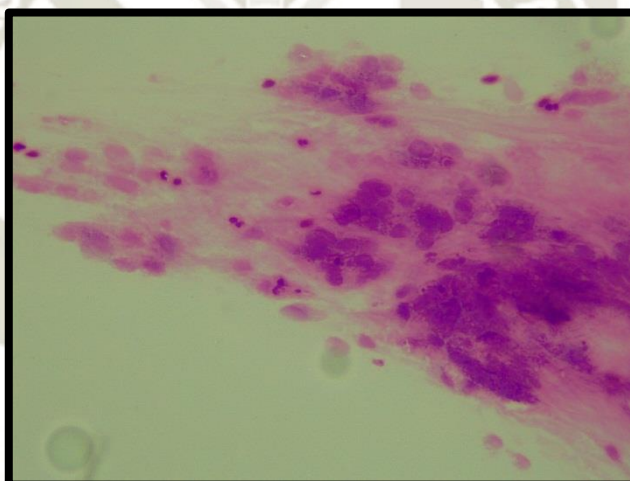


FOTO N°21: Lámina 9 Nayra

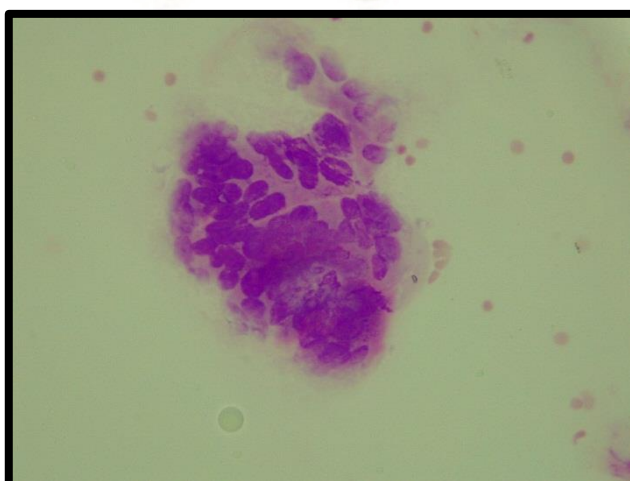


FOTO N°22: Lámina 10 Yahaira

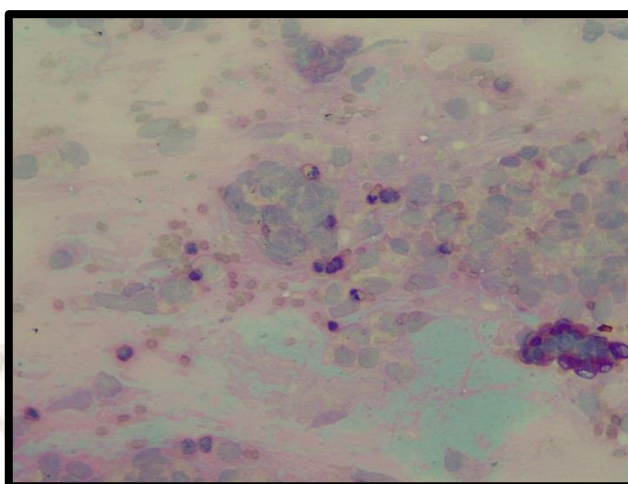


FOTO N°23: Lámina 11 Ilaria

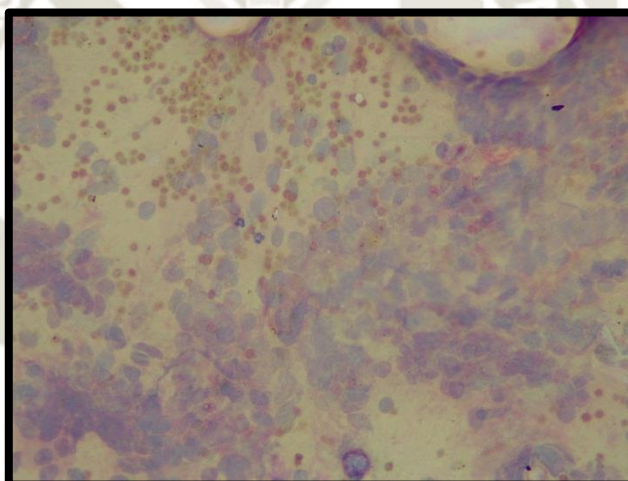
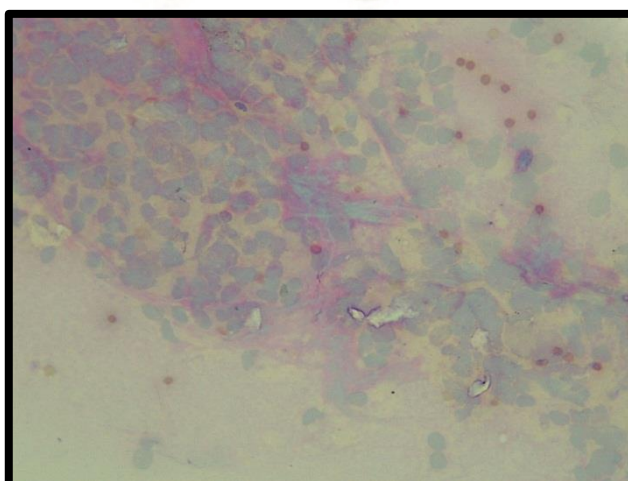


FOTO N°24: Lámina 12 Lea



Secuencia fotográfica de láminas obtenidas en el segundo muestreo observadas y analizadas con un microscopio óptico a un aumento de 40X

FOTO N°25: Lámina 1 Karen

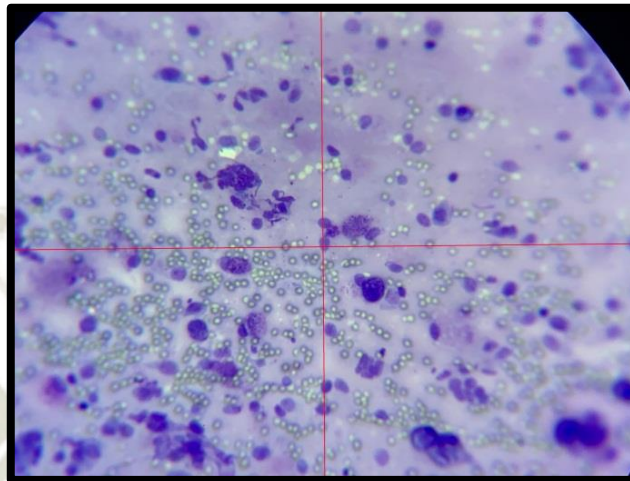


FOTO N°26: Lámina 2 Norma

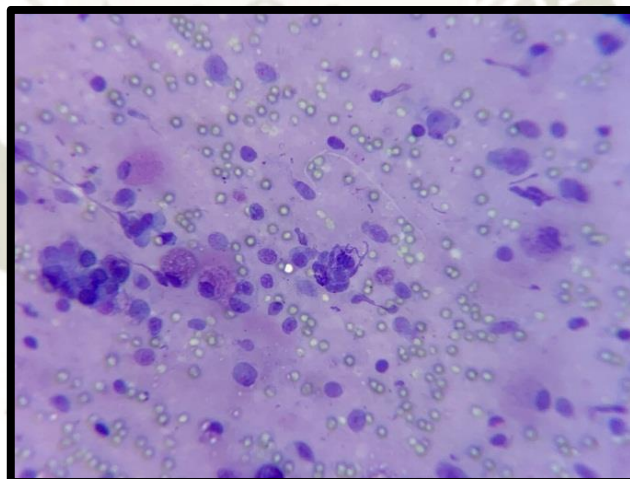


FOTO N°27: Lámina 3 Génesis

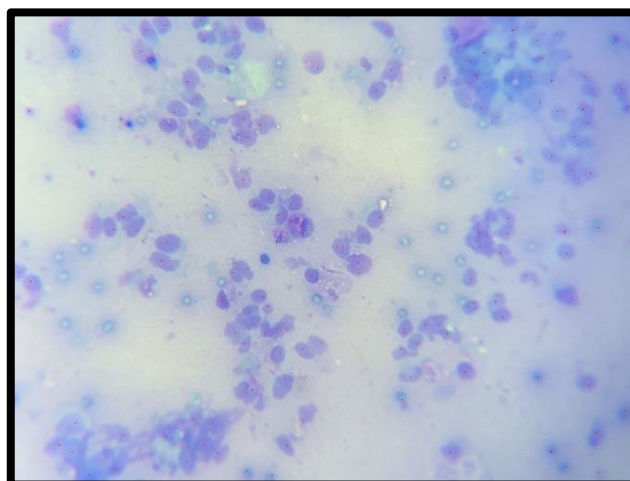


FOTO N°28: Lámina 4 Daniuska

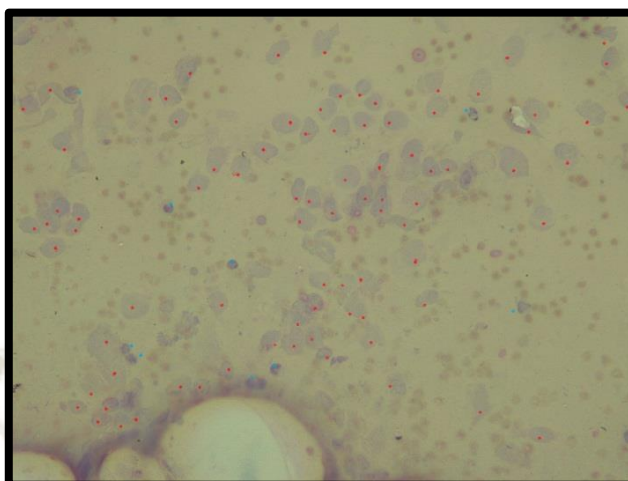


FOTO N°29: Lámina 5 Royal

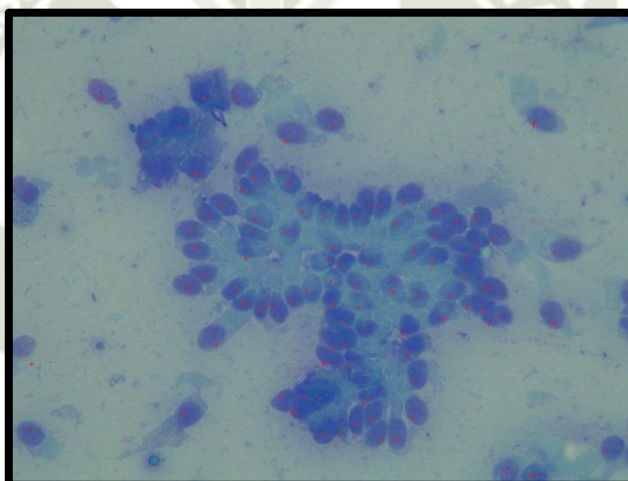


FOTO N°30: Lámina 6 Sally

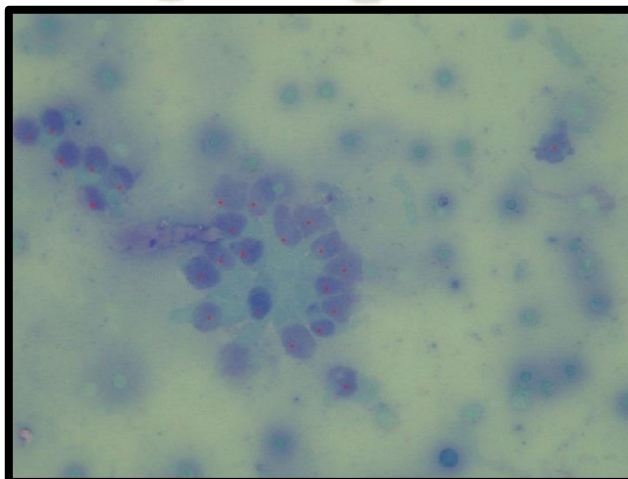


FOTO N°31: Lámina 7 Isaura

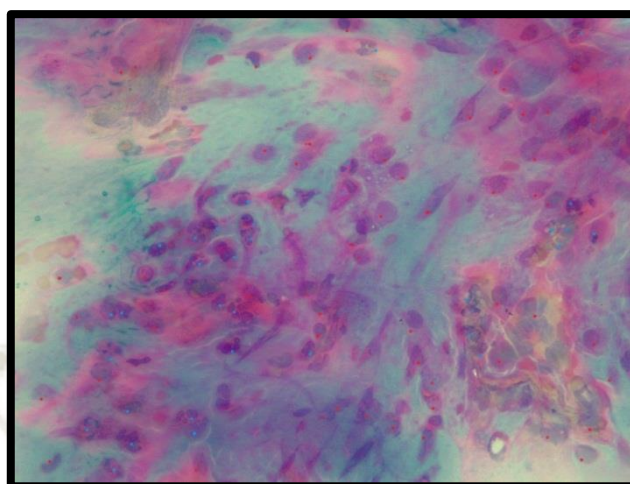


FOTO N°32: Lámina 8 Siria

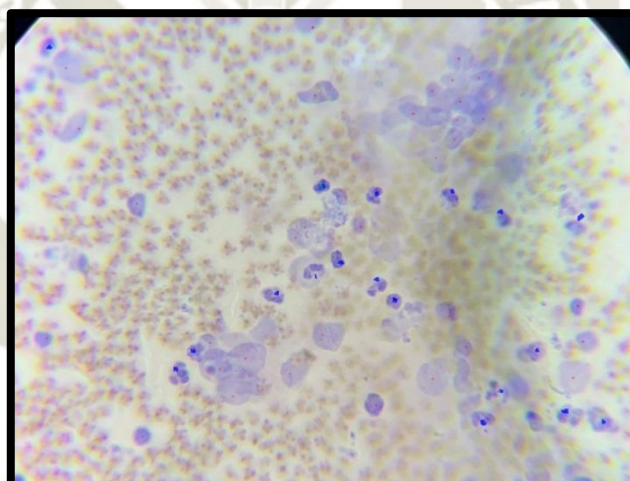


FOTO N°33: Lámina 9 Nayra

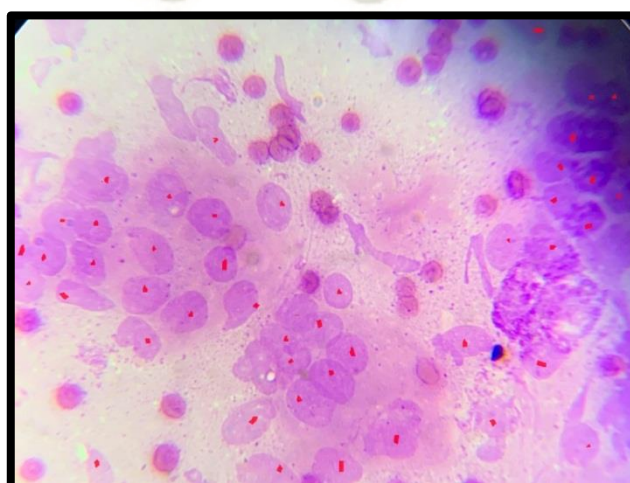


FOTO N°34: Lámina 10 Yahaira

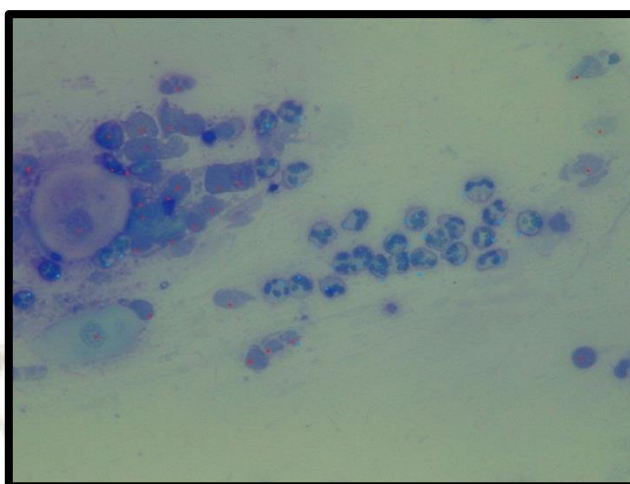


FOTO N°35: Lámina 11 Ilaria

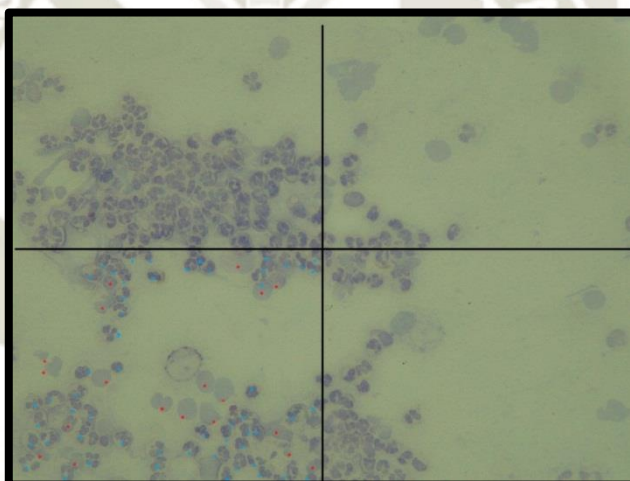


FOTO N°36: Lámina 12 Lea

